

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Lucia Sládková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Analýza karyotypu cíceru baranieho
(*Cicer arietinum* L.)

Diplomová práce

Bc. Lucia Sládková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Alžběta Němečková, Ph.D

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Lucia SLÁDEKOVÁ**
Osobní číslo: **R190068**
Adresa: **Stráňavy 504, Stráňavy, 013 25 Stráňavy, Slovenská republika**
Téma práce: **Analýza karyotypu cíceru baranieho (Cicer arietinum L.)**
Téma práce anglicky: **Karyotype analysis of chickpea (Cicer arietinum L.)**
Vedoucí práce: **Mgr. Alžběta Němečková**
Katedra buněčné biologie a genetiky


Zásady pro vypracování:

1. Vypracovanie literárneho prehľadu zaoberajúceho sa analýzou karyotypu.
2. Príprava mikroskopických preparátov, fluorescenčná *in situ* hybridizácia.
3. Vyhodnotenie získaných dát.

Seznam doporučené literatury:

Varshney R. K., Thudi M. et Muehlbauer, F. J. (2017): *The Chickpea Genome: An Introduction. The Chickpea Genome: 1-4.* Karafiátová M., Hřibová E. et Doležel, J. (2017): *Cytogenetics of Cicer. The Chickpea Genome: 25-41.* Sajja S. B., Samineni S. et Gaur P. M. (2017): *Botany of Chickpea. The Chickpea Genome: 13-24.* Parween S., Nawaz K., Roy R., Pole A. K., Venkata S., Misra G., Jain M., Yadav G., Parida S. K., Tygali A. K., Bhatia S. et Chattopadhyay D. (2015): *An advanced draft genome assembly of a desi type chickpea (Cicer arietinum L.). Scientific Reports: 5(1).* Zatloukalová P., Hřibová E., Kubaláková M., Suchánková P., Šimková H., Adoración C., Kahl G., Millán T. et Doležel J. (2011): *Integration of genetic and physical maps of the chickpea (Cicer arietinum L.) genome using flow-sorted chromosomes. Chromosome Research 19(6): 729-739.* Jain M., Misra G., Patel R. K., Priya P., Jhanwar S., Khan A. W., Shan N., Singh V. K., Garg R., Jeena G., Yadav M., Kant C., Sharma P., Yadav G., Bhatia S., Tyagi A. K. et Chattopadhyay D. (2013): *A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (Cicer arietinum L.). The Plant Journal 74(5): 715-729.*

Podpis vedoucího práce:



Datum: 16.10.2019

Podpis vedoucího pracoviště:

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc. et Ph.D.

Datum: 01-11-2019

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Lucia Sládeková
Názov práce	Analýza karyotypu cíceru baranieho (<i>Cicer arietinum</i> L.)
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedúci práce	Mgr. Alžběta Němečková, Ph.D
Rok obhajoby práce	2021

SÚHRN

Predložená diplomová práca sa zaoberá analýzou karyotypu hospodársky významných kultivarov cíceru baranieho – Desi a Kabuli s využitím najnovších cytogenetických metód. Teoretická časť práce pojednáva o súčasnej problematike, všeobecnej a cytogenetickej charakterizácii cíceru, popisuje molekulárne a cytogenetické prístupy analýzy karyotypu u rastlín. V experimentálnej časti práce boli identifikované jednotlivé chromozómy oboch kultivarov metódou oligo-maľovania, ktorá nebola doposiaľ u cíceru použitá. Táto technika sa preukázala u cíceru ako funkčná a dostatočne citlivá k odhaleniu prestavby karyotypu vrámci druhu a tiež chýb v orientácii a zostave referenčných pseudomolekúl. Za účelom detailnejšej analýzy boli tiež mapované, v minulosti už lokalizované sekvencie, ktoré spoľahlivosť oligo-maľovacieho systému u cíceru potvrdili.

Kľúčové slová	cytogenetika, oligo-maľovanie, fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia, karyotyp, BAC klony, cícer
Počet strán	81
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lucia Sládeková
Title	Karyotype analysis of chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.)
Type of thesis	Master
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	Mgr. Alžběta Němečková, Ph.D
The year of presentation	2021

SUMMARY

The presented master thesis deals with the analysis of the karyotype of economically important cultivars of chickpea – Desi and Kabuli using the latest cytogenetic methods. The theoretical part deals with current issues, general and cytogenetic characterization of chickpea, describes molecular and cytogenetic approaches to karyotype analysis in plants. In the experimental part of the work, the individual chromosomes of both cultivars were identified by the oligo-painting method, which has not been used in chickpea. This technique has been shown in chickpea to be functional and sensitive enough to detect karyotype rearrangement within a species, as well as errors in the orientation and assembly of reference pseudomolecules. For a more detailed analysis, sequences already localized in the past were also mapped, which confirmed the reliability of the oligopainting system in chickpea.

Keywords	cytogenetics, oligo-painting, fluorescent <i>in situ</i> hybridization, karyotype, BAC clones, chickpea
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením
Mgr. Alžběty Němečkovéj, Ph.D. za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

Podpis

Rada by som touto cestou poďakovala predovšetkým vedúcej práce Mgr. Alžbětě Němečkovéj, Ph.D. za jej odborné rady, ochotu, ústretovosť a čas, ktoré mi pri vypracovaní diplomovej práce venovala. Ďalej by som chcela poďakovať všetkým zamestnancom Centra štruktúrnej a funkčnej genomiky rastlín Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci, za príjemné pracovné prostredie a ochotu vždy poradiť a pomôcť. Veľká vďaka patrí Mgr. Evě Hřibové, Ph.D za prevedenie bioinformatickej analýzy, ktorá stála na počiatku tejto práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHĽAD	3
3.1	Charakteristika cíceru baranieho (<i>Cicer arietinum</i> L.)	3
3.1.1	Pôvod, význam a výskyt cíceru	3
3.1.2	Taxonómia	5
3.1.3	Morfológia	7
3.1.4	Porovnanie kultivarov Desi a Kabuli	9
3.2	Cytogenetická charakteristika.....	10
3.2.1	Veľkosť a organizácia genómu cíceru	10
3.2.2	Identifikácia chromozómov cíceru.....	11
3.2.3	<i>In situ</i> hybridizácia (ISH)	12
3.2.4	Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia (FISH).....	13
3.2.5	Typy preparátov využívané pre FISH	15
3.3	Prístupy využité k analýze genómu cíceru	16
3.3.1	Analýza karyotypu	16
3.3.2	Molekulárne prístupy analýzy genómu cíceru.....	17
3.3.3	Izolácia jednotlivých chromozómov	18
3.3.4	BAC klony a maľovanie chromozómov.....	19
3.3.5	Oligo-maľovanie chromozómov	20
4	MATERIÁL A METÓDY	22
4.1	Biologický materiál.....	22
4.2	Použité chemikálie a roztoky.....	22
4.2.1	Použité chemikálie	22
4.2.2	Použité roztoky a ich príprava	23
4.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení	26
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	27
4.4.1	Príprava rastlinného materiálu, synchronizácia a fixácia koreňov	27

4.4.2	Príprava roztlakových preparátov	27
4.4.3	Príprava nakvapkávaných preparátov metafáznych chromozómov.....	28
4.4.4	Príprava suspenzií protoplastov	28
4.4.5	Príprava nakvapkávaných preparátov zo suspenzií protoplastov	29
4.4.6	Príprava oligo-maľovacích sond.....	29
4.4.7	Príprava sondy pre lokus 45S rDNA.....	30
4.4.8	Príprava sondy pre lokus 5S rDNA.....	30
4.4.9	Príprava telomerickej sondy	31
4.4.10	Príprava sond z izolovaných BAC klonov.....	31
4.4.11	Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia a fluorescenčná mikroskopia.....	32
5	VÝSLEDKY.....	34
5.1	Identifikácia chromozómov metódou oligo-maľovania.....	34
5.1.1	Cytogenetická lokalizácia prestavby karyotypu v rámci druhu.....	39
5.1.2	Meranie absolútnej dĺžky metafáznych chromozómov.....	41
5.2	Mapovanie génov pre 45S rDNA a telomerickej repetíciu.....	42
5.3	Mapovanie sond pripravených z izolovanej BAC DNA.....	45
5.4	Schematické znázornenie lokalizovaných sekvencií	49
5.5	Ukotvenie pseudomolekúl po aplikácii FISH.....	49
6	DISKUSIA	53
7	ZÁVER.....	57
8	LITERATÚRA	58

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

BAC	bakteriálny umelý chromozóm (Bacterial Artificial Chromosome)
Bp	bázový pár (Base Pair)
CCD	zariadenie s viazanými nábojmi (Charged Coupled Device)
Cy3	cyanin 3
Cy5	cyanin 5
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleotide Acid)
dNTPs	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty
FAO	Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo (Food and Agriculture Organization)
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization)
FISHIS	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia v suspenzii (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization In Suspension)
FITC	fluorescein isothiokyanát
ICRISAT	Medzinárodný inštitút pre výskum plodín v polosuchých oblastiach (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics)
NOR	oblasť organizátoru jadierka (Nucleolus Organizer Region)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)
Pg	pikogram
rDNA	ribozomálna DNA
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorfism)

ZOZNAM OBRÁZKOV

- Obrázok 1:** Mapa produkcie cíceru vo svete. Zeleno sú vyznačené oblasti prirodzeného výskytu cíceru, fialovo sú znázornené oblasti, kde bol cícer prisťahovaný. Prevzaté z <http://www.plantsoftheworldonline.org/>.
- Obrázok 2:** Schematické znázornenie rozdelenia rodu *Cicer*.
- Obrázok 3:** Morfológia rastliny cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.). Prevzaté s úpravami od Sajja *et al.*, 2017.
- Obrázok 4:** Typ semien kultivaru Desi (naľavo) a Kabuli (napravo) typ semena. Prevzaté od Sajja *et al.*, 2017.
- Obrázok 5:** Zobrazenie chromozómov cíceru (*Cicer arietinum* L.) typu Desi (vľavo) a Kabuli (vpravo) v metafáze.
- Obrázok 6:** Schéma priebehu fluorescenčnej *in situ* hybridizácie s priamym a nepriamym značením.
- Obrázok 7:** Príklad oligo-mal'ovania dvoch pachyténnych chromozómov banánovníku (Prevzaté od Šimoníková *et al.*, 2019)
- Obrázok 8:** Návrh špecifických oligo-mal'ovacích sond R a G pre chromozómy cíceru. Jednotlivé pseudomolekuly odpovedajúce chromozómom sú značené Ca1–Ca8 a čísla ukazujú oblasť pseudomolekuly, na ktorej bol špecifický vzor navrhnutý. Sonda R je znázornená červenými bodmi, sonda G je znázornená zelenými bodmi. Chromozómy sú označené písmenami A–H; A = najväčší chromozóm, H = najmenší chromozóm.
- Obrázok 9:** Identifikácia chromozómov cíceru typu Desi s využitím špecifických oligo-mal'ovacích sond. Jednotlivé chromozómy sú značené zostupne podľa veľkosti, písmenami A–H. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. (A)

Karyotyp zostavený na základe signálov špecifickej oligo-maľovacej sondy R (červený signál), G (zelený signál) a ich spojení. **(B)** Figúra metafáznych chromozómov cíceru typu Desi po aplikácii oligo-maľovacích sond R a G. **(C)** Príklad cytogenetického mapovania génu pre 5S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch B a G. Fluorescenčný signál odpovedajúci 5S rDNA bol kolorovaný žltou farbou.

Obrázok 10: Identifikácia chromozómov cíceru typu Kabuli s využitím špecifických oligo-maľovacích sond. Jednotlivé chromozómy sú značené zostupne podľa veľkosti, písmenami A–H. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Karyotyp zostavený na základe signálov špecifickej oligo-maľovacej sondy R (červený signál), G (zelený signál) a ich spojení. **(B)** Figúra metafáznych chromozómov po aplikácii oligo-maľovacích sond R a G. **(C)** Príklad cytogenetického mapovania génu pre 5S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch B a G. Fluorescenčný signál odpovedajúci 5S rDNA bol kolorovaný žltou farbou.

Obrázok 11: Prestavba chromozómov kultivaru Desi a Kabuli s využitím oligo-maľovacej sondy pre subtelomerickú oblasť pseudomolekuly Ca7 (chromozóm D). Zelený signál odpovedá oligo-maľovacej sonde G a červený signál odpovedá sonde R. Fluorescenčný signál odpovedajúci sonde pre translokovanú oblasť bol kolorovaný fialovou farbou. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Lokalizácia delécie na chromozóme D a inzercie na chromozóm B, kultivar Desi. **(B)** Lokalizácia delécie na chromozóme B a inzercie na chromozóm D, kultivar Kabuli.

Obrázok 12: Príklady cytogenetického mapovania telomerickej repetície a 45S rDNA na chromozómoch kultivaru Desi. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce 45S rDNA a telomére boli kolorované žltou farbou. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Lokalizácia telomerickej repetície spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B. **(B)** Lokalizácia génov pre 45S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B.

Obrázok 13: Príklady cytogenetického mapovania telomerickéj repetície a 45S rDNA na mitotických chromozómoch kultivaru Kabuli. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce 45S rDNA a telomére boli kolorované žltou farbou. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Lokalizácia telomerickéj repetície spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B. **(B)** Lokalizácia génov pre 45S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B.

Obrázok 14: Návrh špecifických oligo-maľovacích sond R a G spolu s vybranými BAC klonmi na chromozómoch kultivaru Desi. Pozícia BAC klonov je znázornená žltými bodmi na schémach chromozómov. Predpokladaná lokalizácia vybraných BAC klonov spolu s R-G oligo-maľovacím systémom sú schematicky znázornené na pseudomolekulách odpovedajúcich jednotlivým chromozómom A, B, E a F.

Obrázok 15: Príklady cytogenetického mapovania BAC klonov na chromozómoch kultivaru Desi. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce BAC klonom boli kolorované žltou farbou. **(A)** Lokalizácia BAC klonu 14M02 na chromozóme B. **(B)** Lokalizácia BAC klonu na chromozóme F. **(C)** Lokalizácia BAC klonu 11K07 na chromozóme E. **(D)** Lokalizácia BAC klonu 10I13 na chromozóme A. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI.

Obrázok 16: Príklady cytogenetického mapovania BAC klonov na chromozómoch kultivaru Kabuli. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce BAC klonom boli kolorované žltou farbou. **(A)** Lokalizácia BAC klonu 14M02 na chromozóme B. **(B)** Lokalizácia BAC klonu na chromozóme F. **(C)** Lokalizácia BAC klonu 11K07 na chromozóme E. **(D)** Lokalizácia BAC klonu 10I13 na chromozóme A. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI.

Obrázok 17: Schematické znázornenie poradia a kombinácie špecifických oligo-maľovacích sond R a G, sond pre rDNA gény, telomerickú repetíciu a sond pripravených z izolovanej BAC DNA v idiogramoch jednotlivých chromozómov A–H u oboch kultivarov.

Obrázok 18: Porovnanie *in silico* analýzy navrhnutého oligo-maľovacieho systému spolu s výsledkami fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. **(A)** *In silico* mapovanie navrhnutých oligo-maľovacích sond na pseudomolekuly Ca1–Ca8, odpovedajúce chromozómom A–H. Červený signál odpovedá oligo-maľovacej sonde R, zelený signál sonde G. **(B)** Karyotyp zostavený na základe výsledkov FISH s využitím oligo-maľovacích sond R (červený signál) a G (zelený signál). **(C)** Schematické znázornenie pozície a kombinácie oligo-maľovacích sond R (červené body) a G (zelené body) na základe výsledkov po aplikácii FISH. Rozdiely v orientácii alebo zostave jednotlivých pseudomolekúl oproti FISH analýze sú znázornené schematicky pomocou šípiek a zakrúžkovaných častí chromozómov.

Obrázok 19: Porovnanie *in silico* analýzy navrhnutého oligo-maľovacieho systému spolu s výsledkami fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. **(A)** *In silico* mapovanie navrhnutých oligo-maľovacích sond na pseudomolekuly Ca1–Ca8, odpovedajúce chromozómom A–H. Červený signál odpovedá oligo-maľovacej sonde R, zelený signál sonde G. **(B)** Karyotyp zostavený na základe výsledkov FISH s využitím oligo-maľovacích sond R (červený signál) a G (zelený signál). **(C)** Schematické znázornenie pozície a kombinácie oligo-maľovacích sond R (červené body) a G (zelené body) na základe výsledkov po aplikácii FISH. Rozdiely v orientácii jednotlivých pseudomolekúl oproti FISH analýze sú znázornené schematicky pomocou šípiek.

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Teplotný a časový profil PCR reakcie na prípravu 5S rDNA

Tabuľka 2: Prehľad použitých BAC klonov pre prípravu chromozómovo špecifických sond cíceru (*Cicer arietinum* L.), navrhnuté podľa Zatloukalová *et al.*, 2011.

Tabuľka 3: Meranie absolútnych dĺžok ramien chromozómov u kultivaru Desi.

Tabuľka 4: Meranie absolútnych dĺžok ramien chromozómov u kultivaru Kabuli.

1 ÚVOD

Cícer baraní (*Cicer arietinum* L.) je jediný kultivovaný druh rodu *Cicer* a svojou spotrebou a produkciou patrí medzi tri najpestovanejšie obilné strukoviny na svete. Má veľký ekonomický význam, predstavuje kvalitný nutričný zdroj a vďaka schopnosti symbiotickej fixácie dusíka sa tiež podieľa na zúrodňovaní pôdy. Hospodársky významné sú dva kultivary - Desi a Kabuli, ktoré sa okrem odlišnej morfológie semien líšia tiež v odolnosti voči biotickým a abiotickým stresom.

Väčšina produkcie je sústredená do polosuchých oblastí Indického subkontinentu, kde sa cícer pestuje na nekvalitných pôdach s deficitom vody, čo vedie k výraznému zníženiu jeho produktivity. Napriek skutočnosti, že celková plocha pestovania tejto strukoviny predstavuje skoro 18 miliónov hektárov, bol výnos semien za rok 2018 menej ako 1 tona/hektár. Táto hodnota je omnoho nižšia ako odhadovaný produkčný potenciál v zavlažovaných podmienkach.

Vzhľadom na vplyv rôznych stresov, ktoré nepriaznivo vplyvajú na úrodu cíceru je dôležité vyvinúť značné úsilie v oblasti vývoja vylepšených odrôd alebo alternatívnych stratégií pestovania, ktoré umožnia udržiteľnú produkciu cíceru i v nepriaznivých podmienkach. Aplikácia prístupov na zvýšenie produktivity si vyžaduje lepšie pochopenie štruktúry genómu kultivovaného cíceru ako aj príbuzných druhov. Predkladaná diplomová práca si preto kladie za cieľ analýzu karyotypu oboch pestovaných kultivarov cíceru baranieho pomocou najnovších molekulárne-cytogenetických metód.

2 CIELE PRÁCE

Cieľom teoretickej časti práce bolo vypracovať literárny prehľad o všeobecnej a cytogenetickej charakteristike cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.) a jeho hospodársky významných kultivarov. Popísať molekulárne a cytogenetické techniky používané k analýze karyotypu rastlinných druhov.

Cieľom experimentálnej časti bola identifikácia jednotlivých chromozómov, zostavenie a analýza karyotypu dvoch pestovaných kultivarov cíceru, novou metódou oligo-maľovania chromozómov. Pre overenie funkčnosti tejto novej metódy, bolo ďalším cieľom použiť ako podpornú metódu mapovanie génov pre rDNA, telomerickú repetíciu a vybrané BAC klony. Z dôvodu využitia techniky oligo-maľovania, ktorá u cíceru doposiaľ nebola použitá, bol čiastočný cieľ tiež optimalizácia prípravy preparátov z rastlinného materiálu.

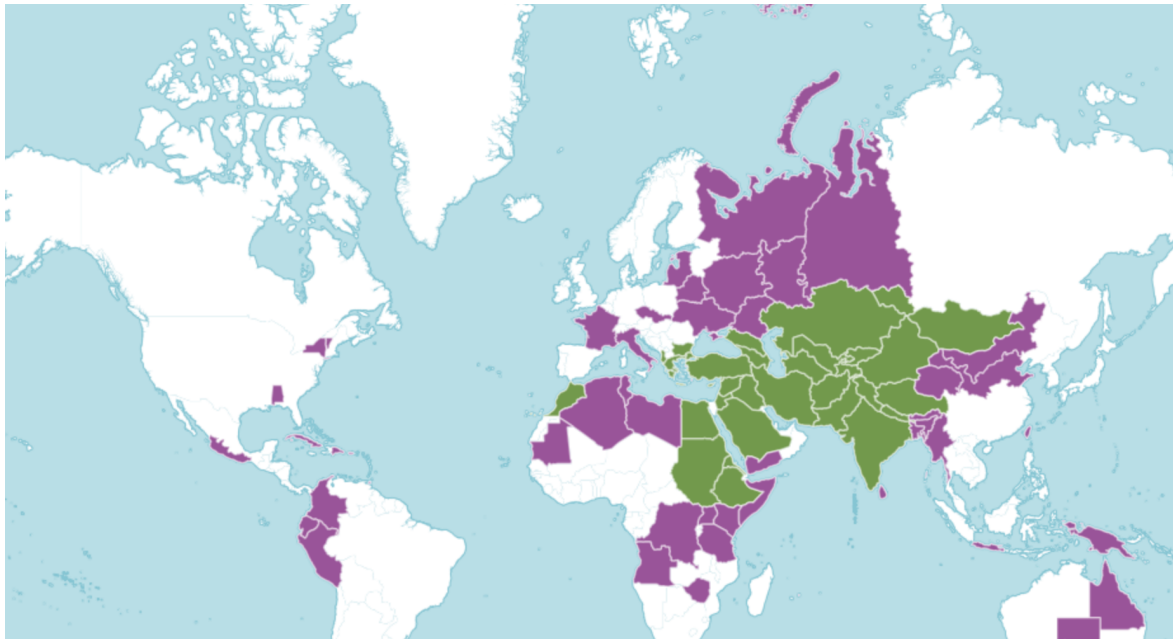
3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Charakteristika cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.)

3.1.1 Pôvod, význam a výskyt cíceru

Cícer baraní (*Cicer arietinum* L.) je samoopelivá diploidná ($2n=16$) plodina pochádzajúca z juhovýchodného Turecka a po domestikovaní na Blízkom východe sa rozšírila po celom Stredomorí až do Indie a Etiópie (Vavilov, 1926; Ladizinsky, 1975; Van der Maesen, 1987). V oblastiach jeho pôvodu sa vyskytujú navzájom príbuzné druhy, z ktorých sa táto kultivovaná forma pravdepodobne vyvinula. Názov „*arietinum*“ má grécky pôvod a súvisí s podobnosťou medzi tvarom semena plodiny a tvarom hlavy barana (Van der Maesen, 1987).

Podľa Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO) je cícer tretia najpestovanejšia obilná strukovina po hrachu (*Pisum sativum*) a fazuli (*Phaseolus vulgaris*) (FAO 2018, www.fao.org/faostat). Je cenným zdrojom mnohých bielkovín, ktorých obsah sa v závislosti od odrody a podmienok životného prostredia pohybuje v rozmedzí 15–30% (Hulse, 1994). Predstavuje tak vysoko kvalitný zdroj proteínov, nie len, vo vegetariánskej strave. Cícer je bohatý na dôležité nenasýtené mastné kyseliny a vitamíny, ako sú riboflavín, niacín, tiamín, folát a prekursor vitamínu A, β -karotén. Štúdie priniesli dôkazy o potenciálnych priaznivých účinkoch zložiek cíceru na zníženie výskytu rôznych druhov rakoviny, vysokého cholesterolu, cukrovky II. typu či srdcových ochorení (Roy *et al.*, 2010; Jukanti *et al.*, 2012). Konzumuje sa ako jedlé semeno, slúži na výrobu múky, vývar z listov môže byť aplikovaný ako liečivo a cícerový škrob je vhodný na úpravu textílií. Vďaka svojej schopnosti symbiotickej fixácie atmosférického dusíka má tiež ekologický význam v zúrodňovaní pôdy (Ladizinsky, 1975; Gil *et al.*, 1996).



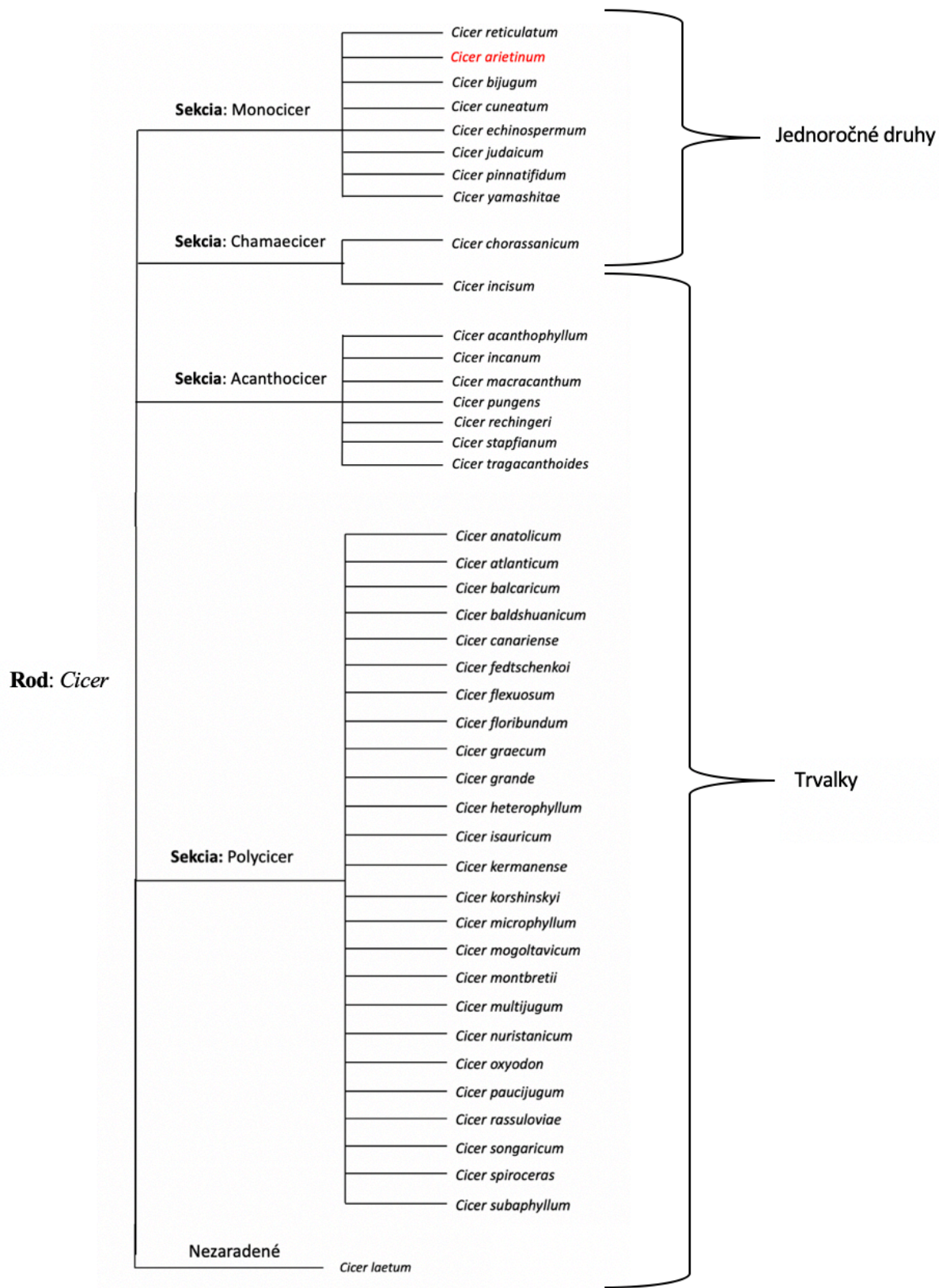
Obrázok 1: Mapa produkcie cíceru vo svete. Zeleno sú vyznačené oblasti prirodzeného výskytu cíceru, fialovo sú znázornené oblasti, kde bol cícer prísťahovaný. Prevzaté z <http://www.plantsoftheworldonline.org/>.

Väčšina produkcie cíceru sa sústreďuje do rozvojových krajín, hlavne do polosuchých oblastí Indie. Napriek skutočnosti, že sa táto strukovina pestuje vo viac ako 50 krajinách sveta na 17,8 milióna hektároch (Obrázok 1), je produktivita cíceru menej ako 1 tona/hektár (FAO 2018, www.fao.org/faostat). Táto hodnota je omnoho nižšia ako je odhadovaný produkčný potenciál - cca 6 ton/hektár za optimálnych podmienok. Maximálny výnos (6 044 kg/ha) bol dosiahnutý v Izraeli, kde sa cícer pestuje v zavlažovaných podmienkach (Arnon, 1972; Singh, 1985; Millán *et al.*, 2015).

Produktivitu cíceru nepriaznivo ovplyvňujú rôzne biotické a abiotické faktory. Medzi hlavné stresy zodpovedné za zníženie výnosu semien patrí sucho, teplo a chlad, problémom sú tiež rozšírené choroby ako plesň *Ascochyta* či *Fusarium* (Singh, 1985; Ruelland *et al.*, 2002). Najväčšiu výzvu v oblastiach kde sa cícer pestuje, spôsobuje práve sucho, ktoré výnos globálne znižuje až o 40–50% (Ahmad *et al.*, 2005). Pestovanie cíceru v polosuchých oblastiach na pôdach nízkej kvality a v kombinácii s náchylnosťou na sucho a plesňové choroby, tak obmedzuje výnos semien výrazne pod teoretický potenciál. Vzhľadom na vplyv rôznych faktorov, ktoré nepriaznivo vplyvajú na produktivitu cíceru je dôležité vyvinúť vylepšené odrody či stratégie pestovania, ktoré umožnia udržateľnú produkciu cíceru aj v nepriaznivých podmienkach.

3.1.2 Taxonómia

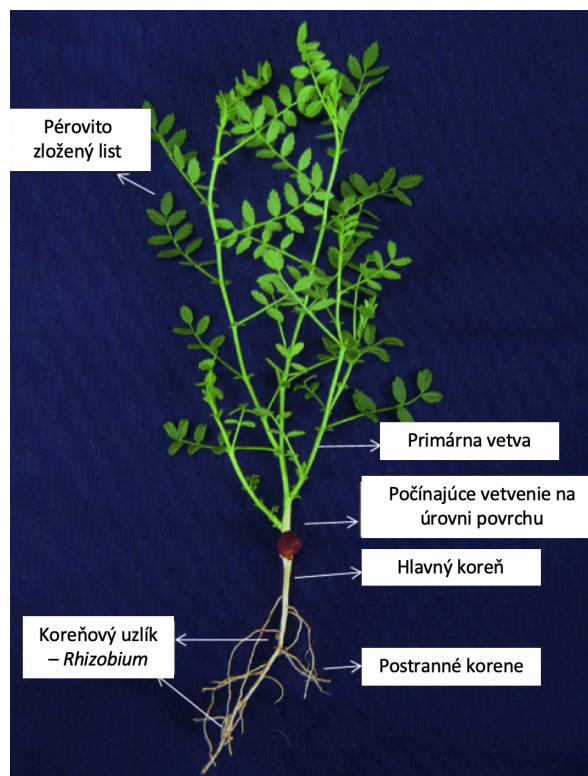
Z hľadiska taxonomickej klasifikácie patrí cícer do ríše rastlín (*Plantae*), podríše cievnaté rastliny (*Tracheobionta*), oddelenie krytosemenných rastlín (*Magnoliophyta*), triedy dvojkľúčolistové (*Magnoliopsida*), rád bôbotvaré (*Fabales*) a čal'ad' bôbovitých (*Fabaceae*) (www.plants.usda.gov). Spočiatku bol cícer súčasťou podčel'ade vikvovitých (*Viciae*), ale pre svoje odlišné znaky bol neskôr zaradený do monogenerickej podčel'ade *Cicereae* (Singh *et al.*, 1997). Rod *Cicer* obsahuje 34 trvalých druhov a 9 letničiek (Obrázok 2). Na základe morfológie, geografického rozšírenia a dĺžky života bol subklasifikovaný do 4 podrodov: *Monocicer*, *Chamaecicer*, *Polycicer* a *Akantocicer*. *Cicer arietinum* patrí medzi jednoročné druhy do sekcie *Monocicer* a je jediným domestikovaným druhom rodu (Ladizinsky, 1975; Van der Maesen, 1987). Ako progenitor kultivovaného cíceru bol identifikovaný divoký druh *Cicer reticulatum* (Ladizinski *et Adler* 1976a).



Obrázok 2: Schematické znázornenie rozdelenia rodu *Cicer*.

3.1.3 Morfológia

Cicer arietinum je jednoročná bylina, ktorá dorastá do výšky 100 cm a v závislosti od rastových podmienok dosahuje až 150 cm. Vetvenie začína od úrovne terénu a podľa uhlu vetví môže byť rastlina vzpriamená, polovzpriamená, rozprestierajúca sa alebo vetvy ležia na zemi (Obrázok 3). Typ vetvenia zohráva dôležitú rolu v architektúre rastliny, ktorá má zásadný agronomický význam, pretože ovplyvňuje jej adaptibilitu a tým potenciálny výnos semien (Reinhardt, 2002; Sajja *et al.*, 2017). Povrch celej rastliny je pokrytý žľaznatými a bezžľaznatými chlpkami. Žľazové chlpy vylučujú zmes kyselín, ktorá pôsobí ako obranný mechanizmus proti škodcom.



Obrázok 3: Morfológia rastliny cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.). Prevzaté s úpravami od Sajja *et al.*, 2017.

Stonka cíceru je vďaka hypodermálnemu kolenchymu pevná, má hranatý a vrúbkovaný tvar. Rastlina produkuje 3 typy vetví: primárne, sekundárne a terciárne. Primárne vetvy sú drevité s pevnou kutikulou a často sú zamieňané s hlavnou stonkou. Sekundárne vetvy vyrastajú z uzlov na primárnych vetvách a sú pomerne tenké. Tieto vetvy nesú listy a kvety.

V závislosti od genotypu a rastových podmienok môže byť prítomné aj terciárne vetvenie (Sajja *et al.*, 2017).

Listy cíceru sú zložené a obsahujú 5–7 párov ochlpených lístkov na jeden list, uložené striedavo alebo oproti sebe. Lístky sú oválneho alebo eliptického tvaru zakončené zúbkovitými okrajmi (Obrázok 3) (Sajja *et al.*, 2017).

Robustný koreňový systém sa vyznačuje silným primárnym koreňom s niekoľkými bočnými koreňkami. Povrch koreňa je žľaznato ochlpený a vylučovaná zmes kyselín pomáha pri solubilizácii pôdnych živín. Prítomnosť koreňových uzlíkov naznačuje symbiotický vzťah medzi cícerom a baktériami rodu *Rhizobium* (*Mesorhizobium ciceri*). Táto symbióza umožňuje strukovine biologickú fixáciu dusíka, čím zlepšuje úrodnosť pôdy (Obrázok 3). Koreňový systém dosahuje viac ako 3 metre do hĺbky a tým rastline napomáha prežiť v stresových podmienkach (Sajja *et al.*, 2017).

Kvety cíceru sú obojpohlavné a pravidelné. Päť ochlpených a vzájomne zrastených klíčnych listov vytvára kalich s piatimi okvetnými lístkami. Okvetné lístky môžu byť ružovej, bielej, fialovej alebo modrej farby v papilónovom usporiadaní, typickom pre strukoviny. Kvitnutie závisí od genotypu, pôdy či počasia, zvyčajne začína v rozmedzí 24–80 dní od zasiatia rastliny (Kumar *et Rao*, 1996; Gaur *et al.*, 2012). Po výraznom poklese hladiny vlhkosti dochádza k samoopeleniu a tvorbe plodov (Sajja *et al.*, 2017).

Plodom cíceru sú lusky, ktorých počet závisí opäť od genotypu rastliny a podmienok prostredia, najmä od dostupnosti vlhkosti. Veľkosť lusku sa pohybuje v rozmedzí 15–30 mm v závislosti od konkrétneho genotypu a každý obsahuje spravidla 1–2 semená. Na konci vývoja semien dochádza k žltnutiu listov a následnému vyschnutiu celej rastliny, čo značí zrelosť. Veľkosť a farba semien sú odrodovo charakteristické a do značnej miery ovplyvnené prostredím. V súčasnosti sa pestujú dva hlavné typy kultivovaného cíceru - Desi a Kabuli (Sajja *et al.*, 2017).

3.1.4 Porovnanie kultivarov Desi a Kabuli

Dva hlavné kultivary domestikovaného cíceru (*Cicer arietinum* L.) zdieľajú spoločný pôvod a predpokladá sa, že typ Kabuli sa vyvinul z typu Desi v Stredomorskej oblasti cielenou selekciou veľkosti semien či hrúbky semenného plášťa (Moreno *et* Cubero, 1978; Gil *et* Cubero, 1993). Medzi týmito dvomi odrodami sú významné rozdiely v agronomických vlastnostiach. Odolnosť voči plesni *Ascochyta*, tolerancia chladu a vzpriamený typ rastu sa častejšie vyskytujú u typu Kabuli, zatiaľ čo u typu Desi prevláda odolnosť voči plesni *Fusarium*, väčšia tolerancia tepla a sucha a skoré kvitnutie (Singh, 1987). Kultivary sa líšia tiež v hrúbke semien, obsahu vlákniny, zložení minerálnych a stopových prvkov alebo obsahu polyfenolických zlúčenín (Jambunathan *et* Singh, 1981; Gil *et al.*, 1996).



Obrázok 4: Typ semien kultivaru Desi (naľavo) a Kabuli (napravo) typ semena. Prevzaté od Sajja *et al.*, 2017.

Kultivar Desi dominuje v Indickej produkcii, pestuje sa tiež v Pakistane či východnej Afrike. Vyznačuje sa relatívne malými semenami hranatého tvaru s výrazným charakteristickým „zobákom“, v ktorom je umiestnená embryonálna os (Obrázok 4). Vďaka pigmentácii antokyanmi sú semená tohto typu sfarbené od svetlohnedého po čierny odtieň s mnohými variáciami. V závislosti od genotypu sa ich váha pohybuje v rozmedzí 0,1–0,3g. Hrúbka semenného plášťa tvorí 14 % z celkovej hmotnosti semena. Semená sa niekedy konzumujú vcelku, ale väčšinou sa odlúpnu (odstráni sa semenný plášť), kľúčne listy sa rozštiepia a vytvorí sa produkt označovaný ako „dhal“. Ďalším spracovaním sa vyrába múka známa ako „besan“. V svetovej produkcii prevláda práve tento kultivar cíceru a predstavuje až 80 % celkovej produkcie, pretože je ľahšie pestovateľný a lacnejší (Pundir *et al.*, 1985; Muehlbauer *et* Sarker, 2017).

Cícer typu Kabuli je charakterizovaný veľkými semenami, ktoré môžu mať priemer viac ako 22 mm (Obrázok 4). Týmto semenám chýba antokyanový pigment, preto sú biele alebo

krémovo sfarbené. Majú guľatý tvar a hladký povrch. Spravidla sú semená u tohto kultivaru ťažšie, dosahujú váhu 0,2–0,6g. Hrúbka semien je omnoho tenšia v porovnaní s typom Desi, semenný plášť predstavuje len 5 % celkovej hmotnosti semien. Produkcia typu Kabuli prevláda na Blízkom východe, kde sa varené semená melú na kašu známu ako hummus (Pundir *et al.*, 1985; Muehlbauer *et Sarker*, 2017). Predpokladá sa, že kultivar Kabuli bol dovezený do Indie cez Kábul v Afganistane (preto názov Kabuli) v polovici až koncom sedemnásteho storočia (Singh, 1987). Uvádza sa, že tento typ je nutrične výživnejší ako typ Desi, má vyššiu trhovú cenu, ktorá sa zvyšuje úmerne so zväčšovaním semien (Singh *et al.*, 1991).

3.2 Cytogenetická charakteristika

Cytogenetická charakteristika je súbor štúdií, ktoré popisujú organizmus, na základe jeho genetickej informácie, pomocou cytogenetických techník. Jednou zo základných charakterizácií akéhokoľvek druhu je popis veľkosti a ploidity genómu. Veľkosť genómu je daná obsahom DNA v jadre a vyjadruje sa pomocou tzv. C-hodnoty (z angl. constant), ktorá značí množstvo DNA v jednej haploidnej sade chromozómov (n), pred replikáciou DNA. Jadro v G_1 fáze bunkového cyklu obsahujúce dve kópie nereplikovaného genómu má teda $2C$ DNA (Swift, 1950). C-hodnota sa udáva buď v pg DNA alebo v počte párov báz (bp) ($1 \text{ pg DNA} = 0,978 \cdot 10^9 \text{ bp}$). Na určenie veľkosti genómu sa dnes bežne používa prietoková cytometria, ktorá je založená na detekcii optických parametrov častíc, unášaných v kvapaline, po prenutí svetelným lúčom intenzívneho zdroja žiarenia (Doležel *et al.*, 2005). Ako všeobecný popis základnej genetickej výbavy organizmu sa využíva zostavenie karyotypu, ktorý predstavuje počet, veľkosť a tvar všetkých chromozómov v jadre. Karyotypová analýza spoľieha na identifikáciu jednotlivých chromozómov. Najdôležitejšie milníky cytogenetických prístupov analýzy karyotypu boli pruhovanie chromozómov (tzv. banding) a *in situ* hybridizácia (Friebe *et al.*, 1996).

3.2.1 Veľkosť a organizácia genómu cíceru

Druhy rodu *Cicer* sú diploidné a všetky vykazujú 16 somatických chromozómov (Ladizinski *et Adler*, 1976b; Ocampo *et al.*, 1992). Napriek stabilnému počtu chromozómov sú vo veľkosti genómu medzi jednotlivými druhmi rozdiely. Prvý odhad veľkosti genómu u cíceru, pomocou Feulgenovej mikrodensitometrie, uviedli Bennet *et Smith* (1976), ktorí obsah jadrovej DNA u *Cicer arietinum* stanovili na $2C = 1,90 \text{ pg}$. V novšej štúdií Ruperao *et al.*, (2014) overili množstvo jadrovej DNA u cíceru baranieho prietokovou cytometriou a stanovili hodnoty $2C = 1,80 \text{ pg}$ ($1C = 882 \text{ Mbp}$) pre kultivar Kabuli a $2C = 1,77 \text{ pg}$ ($1C = 866 \text{ Mbp}$) pre

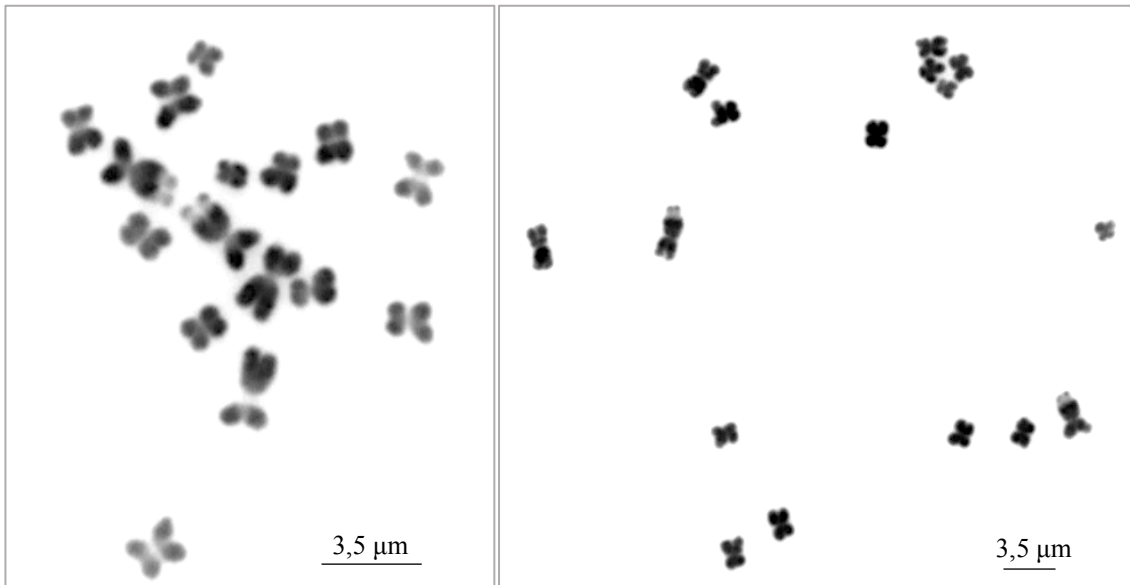
Desi. Štúdie naznačujú, že existuje pozitívna korelácia medzi rozdielom vo veľkosti genómu a genetickou vzdialenosťou (Ohri *et al.* 1991; Buhariwalla *et al.*, 2005).

Za vývoj a špecializáciu rodu *Cicer* sú pravdepodobne zodpovedné štrukturálne zmeny chromozómov, sprevádzané chromozomálnymi prestavbami, inzerciami či deléciami génov (Ohri *et al.* 1991; Ocampo *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 1993; Tayyar *et al.*, 1994). Ahmad (2000) vo svojej štúdií zaznamenal odlišnosti v dĺžke jednotlivých chromozómov či polohe primárnych a sekundárnych konstriktíí. Rozdiely v relatívnej dĺžke chromozómov (0,2 % – 0,8 %) boli neskôr pozorované aj medzi jednotlivými karyotypmi Desi a Kabuli u kultivovaného druhu *Cicer arietinum* (Ruperao *et al.*, 2014).

3.2.2 Identifikácia chromozómov cíceru

Dôsledná identifikácia jednotlivých chromozómov u daného druhu je základ úspešného cytogenetického výskumu. Chromozómy cíceru sú malé, ich priemerná dĺžka v mitotickej metafáze leží v rozmedzí od 3,69 μm do 1,32 μm (Ahmad, 2000). Na základe relatívnej dĺžky boli u rodu *Cicer* použité dva systémy nomenklatúry chromozómov. Ocampo *et al.*, (1992) pomenovali chromozómy číslami 1 (najdlhší) až 8 (najkratší). Druhý systém (použitý tiež v tejto práci) označuje chromozómy písmenami A–H, kde A=1; B=2 atď. (Galasso *et al.*, 1996; Staginnus *et al.*, 1999; Vláčilová *et al.*, 2002; Zatloukalová *et al.*, 2011).

Okrem sekundárneho zúženia nevykazujú cícerové chromozómy žiadne výrazné znaky, ktoré by umožnili ich klasifikáciu. Štruktúru sekundárnej konstriktie, obsahujúcej gény pre ribozomálnu DNA (rDNA), vykazuje u druhov *Cicer* iba jeden pár chromozómov (Ohri *et al.* 1991; Tayyar *et al.*, 1994; Kordi *et al.*, 2006). Výnimkou je *Cicer reticulatum*, ktorý má dva páry satelitných chromozómov (Ohri *et al.* 1991; Ocampo *et al.*, 1992; Abbo *et al.*, 1994). Galasso *et al.*, (1996) pomocou farbenia dusičnanom strieborným preukázali, že oba lokusy organizátoru jadierka (NOR) u *Cicer reticulatum* sú aktívne, aj keď nie rovnako. Predpokladali, že počas vývoja z tohto pôvodného druhu sa stratil jeden z dvoch lokusov pre rDNA gény. Na základe morfológie je teda u cíceru baranieho možné jednoznačne identifikovať iba najdlhší submetacentrický chromozóm, ktorý nesie NOR a najmenší chromozóm (Kordi *et al.*, 2006) (Obrázok 5).



Obrázok 5: Zobrazenie chromozómov cíceru (*Cicer arietinum* L.) typu Desi (vľavo) a Kabuli (vpravo) v metafáze.

3.2.3 *In situ* hybridizácia (ISH)

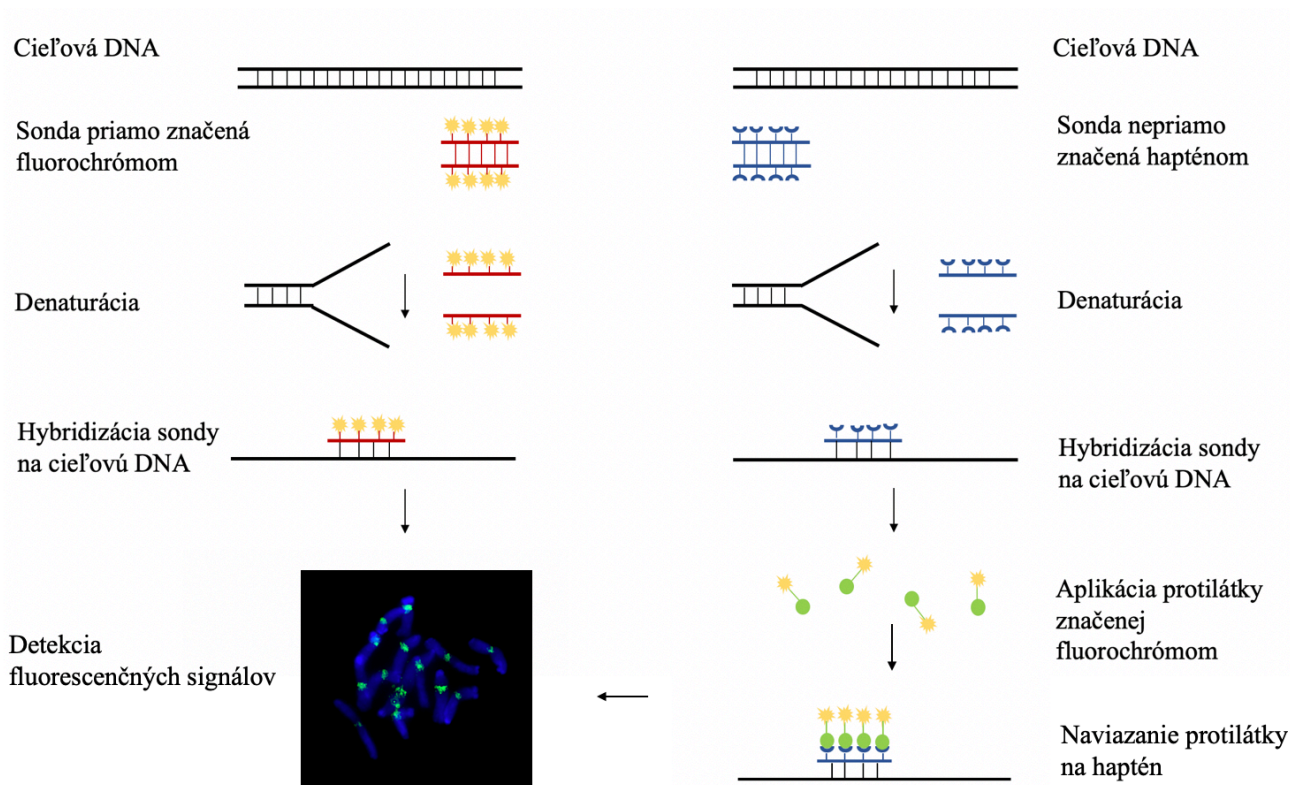
Ako už bolo spomenuté, jednou z najvýznamnejších cytogenetických techník, ktorá prispela k pochopeniu organizácie a funkcie genómov mnohých organizmov, je *in situ* hybridizácia. Popísanie ISH na oocytoch Drápatky vodnej (*Xenopus laevis*) v roku 1969, posunulo klasickú cytogenetiku medzi moderné molekulárne vedy. Stala sa dôležitým nástrojom vo vedeckom výskume ako i v klinických aplikáciách, najmä na diagnostické účely (Gall *et* Pardue, 1969; John *et al.*, 1969).

Hybridizácia *in situ* je označenie molekulárne-cytogenetických metód, ktoré spočívajú v naviazaní značených fragmentov nukleovej kyseliny, označovaných ako sondy, na komplementárnu cieľovú sekvenciu DNA či RNA fixovanú na mikroskopickom skle. Pôvodne boli sondy značené pomocou radioaktívnych izotopov a k vizualizácii cieľových miest sa využívala autorádiografia. Jedná sa o veľmi citlivé značenie, avšak s nízkym rozlíšením. Nevýhodou je tiež zdĺhavý postup, dlhá expozícia a náročná manipulácia pri práci s radioaktívnym materiálom (Langer-Safer *et al.*, 1982b). Pre svoju nepraktickosť bolo značenie na bázy radioaktívnych izotopov nahradené nerádioaktívnym značením. Súčasná technika značenia sond využíva fluorescenčné značenie (Lukumbuzya *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019).

3.2.4 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH)

Nástup fluorescenčnej techniky *in situ* hybridizácie priniesol dôležité poznatky o lokalizácii špecifických sekvencií DNA (napr. Galasso *et Pignone*, 1992; Abbo *et al.*, 1994; Galasso *et al.*, 1996; Vláčilová *et al.*, 2002; Šimoníková *et al.*, 2019). Oproti pôvodnej metóde využívajúcej radioaktívne značenie, je fluorescenčná *in situ* hybridizácia rýchla, umožňuje viacnásobné lokalizácie a poskytuje vysoké rozlíšenie (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000). Technika bola vyvinutá začiatkom 80. rokov minulého storočia na polyténnych chromozómoch *Drosophily melanogaster* (Langer-Safer *et al.*, 1982). Metóda je založená na detekcii špecifických sekvencií na chromozómoch alebo v interfáznych jadrách pomocou fluorescenčne značených fragmentov nukleovej kyseliny, označovaných ako sondy. Optimálna dĺžka týchto fragmentov použitých na FISH leží v rozmedzí 100–300 bp (Schwarzacher, 2003). Ako sondy sa podľa povahy prevádzaného experimentu používajú rôzne fragmenty DNA či RNA, PCR produkty, syntetické oligonukleotidy, repetitívne sekvencie DNA, dlhé fragmenty DNA sekvencií zaklonovaných do BAC (Bacterial Artificial Chromosome) vektoru alebo celková genómová DNA (Trask, 1999).

Cieľová molekula DNA, spolu so sondou pridanou v hybridizačnej zmesi, sú najskôr teplom alebo chemicky (napr. hydroxidom) denaturované, kedy dochádza k rozrušeniu vodíkových väzieb dsDNA. Následne komplementárna sonda na vzniknutú jednovláknovú DNA hybridizuje na základe homológie nukleotidovej sekvencie. Výsledný signál naviazanej sondy je detekovaný pomocou fluorescenčnej mikroskopie (Obrázok 6) (Langer-Safer *et al.*, 1982; Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000)



Obrázok 6: Schéma priebehu fluorescenčnej *in situ* hybridizácie s priamym a nepriamym značením.

Sondy sa môžu značiť priamo naviazaním rôznych fluorochrómov alebo nepriamo pomocou hapténov. Najčastejšie využívanými hapténmi sú biotín a digoxigenin, ktoré sú následne detekované pomocou konjugátu protilátka-fluorochróm (Obrázok 6). Vzhľadom k možnosti viacfarebného značenia sa pre priame značenie dlhodobo používa fluoresceín isothiokyanát (FITC), Cyanin 3 (Cy3) či Cyanin 5 (Cy5). Medzi novšie fluorochrómy patria napríklad série farbív Alexa Fluor, Atto alebo Texas Red (Kato *et al.*, 2006; Lukumbuzya *et al.*, 2019). Prvým fluorescenčným farbivom použitým na FISH bol práve FITC (Langer-Safer *et al.*, 1982). Ďalšou možnosťou je nepriame značenie naviazaním hapténu, kedy je pre vizualizáciu hybridizačného signálu nutné použiť protilátku konjugovanú s fluorescenčným farbivom. Nevýhodou nepriameho značenia je jeho časová náročnosť a vyššia nešpecifickosť pozadia, naopak, oproti priamemu značeniu poskytuje vyššiu citlivosť reakcie (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).

Predpoklad pre správnu hybridizáciu sondy na cieľové miesto molekuly DNA závisí hlavne od ich sekvenčnej homológie. Aby bola dosiahnutá čo najpresnejšia a najšpecifickejšia hybridizácia, je nutné nastaviť veľmi prísne podmienky hybridizačnej reakcie. Prísnosť

reakčných podmienok, označovaná ako stringencia, predstavuje percento homológie v párovaní nukleotidov použitej sondy a cieľovej DNA. Závisí predovšetkým od teploty topenia danej molekuly DNA, od dĺžky a nukleotidového zloženia sondy, koncentrácie formamidu a katiónov v hybridizačnom roztoku a tiež od reakčnej teploty (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). Intenzita výsledného snímaného signálu je ovplyvnená účinnosťou značenia sondy, presnosťou hybridizácie, veľkosťou detekovaného miesta a tiež kvalitou detekčného zariadenia (Trask, 1999).

3.2.5 Typy preparátov využívané pre FISH

Citlivosť a rozlíšenie signálu sa tiež líši v závislosti na stupni kondenzácie chromatinu. U rastlín sa cytogenetické mapovanie pomocou FISH prevádza na interfáznych jadrách, mitotických či meiotických chromozómoch, natiahnutých chromozómoch, alebo priamo na vláknach DNA.

Najčastejšie používané sú nakvapkávané alebo roztlakové preparáty mitotických chromozómov v metafáze. Metafázne chromozómy sú však vysoko špiralizované a teda poskytujú relatívne nízke rozlíšenie (Jiang *et al.*, 1995; Jiang *et* Gill, 2006). Vyššie rozlíšenie je dosiahnuté v prípade prometafáznych chromozómov, ktoré sú menej kondenzované a teda viac rozvolnené (Jiang *et* Gill, 2006).

Výborné rozlíšenie poskytujú meiotické pachyténne chromozómy, ktorých dĺžka môže byť v porovnaní s metafáznymi až niekoľkonásobne väčšia. U ryže boli pozorované pachyténne chromozómy až 20-krát dlhšie ako mitotické chromozómy v metafáze (Cheng *et al.*, 2002).

Cytogenetické mapovanie na natiahnutých chromozómoch (Super-stretched chromosomes) ponúka podobné rozlíšenie ako v prípade pachyténnych chromozómov, až 70 kb s citlivosťou 1 kb a chromozómy dosahujú až 100-násobok svojej dĺžky v metafáze. Nevýhodou je, že mapovanie na tomto type chromozómov je možné iba u rastlinných druhov, u ktorých je možné izolovať jednotlivé chromozómy prietokovou cytometriou (Valárik *et al.*, 2004).

Technika, kedy sa *in situ* hybridizácia prevádza na vláknach DNA z lyzovaných interfáznych jadier, sa nazýva „fiber-FISH“. Táto metóda umožňuje rozlíšenie 1–5 kb s citlivosťou pod 1 kb (Weier, 2001). Obmedzením mapovania na natiahnutých vláknach DNA je obtiažna lokalizácia signálov väčších sond s vysokým obsahom repetícií, napríklad BAC klonov (Jiang *et* Gill, 2006).

K mapovaniu génomu pomocou FISH, ktoré umožňuje študovať organizáciu chromatinu v interfázi, sa využívajú interfázne jadrá. Chromozómy sa v tomto prípade nachádzajú v dekonzenzovanom stave a sú organizované do tzv. chromozómových teritórií (Jiang *et al.*, 1996).

3.3 Prístupy využité k analýze génomu cíceru

3.3.1 Analýza karyotypu

Pokusy o charakterizáciu karyotypu cíceru boli najskôr založené na jednoduchom farbení chromozómov železitým acetokarmínom (Ohri *et Pal*, 1991) či Feulgenovým farbením (Ocampo *et al.*, 1992; Venora *et al.*, 1995). Podrobnejšiu diferenciaciu jednotlivých chromozómov umožnil postup zvaný C-banding. Táto cytogenetická technika farbí prednostne heterochromatínové oblasti a po ofarbení je na chromozómoch viditeľný pruhovaný vzor, unikátny pre každý chromozóm. Po aplikácii C-bandingu boli pozorované rozdiely v distribúcii heterochromatínu pozdĺž jednotlivých cícerových chromozómov. Intenzívne sfarbené časti zahŕňali centromerické oblasti, menej intenzívne pruhy sa nachádzali v stredných a distálnych častiach chromatíd (Galasso *et Pignone*, 1992; Galasso *et al.*, 1996).

Odhalit významnú variabilitu obsahu heterochromatínu u jednoročných druhov pomohlo použitie fluorochrómov (DAPI, Hoechst 33258, Chromocín A3), ktoré sa líšia v afinite k dusíkatým bázam DNA. Odhadovaný obsah heterochromatínových oblastí u väčšiny jednoročných druhov sa pohyboval okolo 40% (Tayyar *et al.*, 1994). Výnimkou sú *Cicer cuneatum* a *Cicer bijungum*, ktorých pomer heterochromatínu tvoril 60%. Tayyar *et al.*, (1994) predpokladali, že tento rozdiel odráža koreláciu medzi evolučným pokrokom a redukciiu heterochromatínu.

Dôležité poznatky o organizácii chromozómov cíceru priniesol nástup techniky *in situ* hybridizácie, ktorý umožňuje lokalizáciu špecifických sekvencií DNA na mitotických či meiotických chromozómoch (Galasso *et Pignone*, 1992; Abbo *et al.*, 1994; Galasso *et al.*, 1996; Vláčilová *et al.*, 2002). Prvé sekvencie, ktoré boli lokalizované týmto prístupom, boli gény pre ribozomálnu DNA (Abbo *et al.*, 1994; Staginnus *et al.*, 1999). Hoci iba jeden pár chromozómov u *Cicer arietunum* nesie viditeľný satelit, hybridizujú dve miesta so sekvenciou 45S rDNA. Táto skutočnosť je zaujímavá z hľadiska prítomnosti dvoch satelitných párov chromozómov u divokého predka *Cicer reticulatum* (Ohri *et Pal* 1991; Abbo *et al.*, 1994). Ďalej boli identifikované dva lokusy nesúce sekvencie 5S rDNA, z ktorých jeden leží na rovnakom chromozóme ako jedno z miest pre 45S rDNA (Vláčilová *et al.*, 2002). Telomerická sekvencia

bola podľa predpokladov lokalizovaná na koncoch všetkých ramien chromozómov. Hlavný telomérový klaster sa však nachádza na krátkom ramene chromozómu B a slabší signál bol identifikovaný tiež v pericentromerickej oblasti chromozómu A (Staginnus *et al.*, 1999; Zatloukalová *et al.*, 2011).

3.3.2 Molekulárne prístupy analýzy genómu cíceru

Príchod technológií sekvenovania DNA novej generácie (NGS) dramaticky znížil náklady na získanie údajov o genómových sekvenciách a priniesol nové príležitosti pre genetiku a šľachtenie rastlín (Varshney *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2010). Vďaka vývoju vysoko výkonného sekvenovania boli získané čiastočné genómové sekvencie cíceru baranieho, ako u typu Desi (38,48%), tak aj u typu Kabuli (39,37%) (Jain *et al.*, 2013; Varshney *et al.*, 2013). Na základe zostavených pseudomolekúl bol navrhnutý ďalší systém nomenklatúry pre jednotlivé cícerové chromozómy, kedy A = Ca5; B = Ca3; C = Ca6; D = Ca7; E = Ca4; F = Ca2; G = Ca1 a H = Ca8 (Ruperao *et al.*, 2014). Párovým porovnaním každej zo pseudomolekúl oboch pestovaných kultivarov, boli odhalené početné štrukturálne variácie, ktoré môžu byť dôsledkom nesprávneho zostavenia referenčných genómov.

Bolo zistené, že približne polovica cícerového genómu obsahuje repetitívnu DNA (Jain *et al.*, 2013; Varshney *et al.*, 2013; Parween *et al.*, 2015). Rovnako ako u iných rastlinných druhov, aj v genóme cíceru je značná časť repetitívnej DNA prítomná vo forme oblastí obsahujúcich tandemovo usporiadané repetície. Centromerické a subtelomerické oblasti sa skladajú z tandemovo usporiadaných mikrosatelitových motívov CaSat1 a CaSat2. Sekvencie podobné retrotranspozómom CaRep1, CaRep2 a CaRep3 sú rozptýlené po celom genóme a po aplikácii FISH poskytujú signál prítomný na každom chromozóme s výnimkou pericentromerických oblastí (Staginnus *et al.*, 1999).

Získanie genómových sekvencií cíceru umožnilo použitie sekvenčných markerov na charakterizáciu genetickej diverzity. Genotypyzáciou založenou na jednonukleotidovom polymorfizme (SNP) bolo možné jednoznačne rozdeliť zárodočnú plazmu *Cicer arietinum* na dva hlavné uznávané typy – Kabuli a Desi (Kujur *et al.*, 2015). Vďaka znalosti sekvencie genómu je dnes možné identifikovať sekvencie *in silico* ako vhodné sondy pre FISH (Aliyeva-Schorr *et al.*, 2015).

Identifikácia jednotlivých chromozómov cíceru bola doposiaľ umožnená iba na základe spojenia niekoľkých prístupov. Kombináciou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie spolu s prístupom izolácie chromozómov, bol postupne zostavený najaktuálnejší publikovaný karyotyp cíceru (Vláčilová *et al.*, 2002; Zatloukalová *et al.*, 2011; Karafiátová *et al.*, 2017).

3.3.3 Izolácia jednotlivých chromozómov

Atraktívnou technikou, ktorá ponúka účinné prostriedky na skúmanie genómu, je izolácia jednotlivých chromozómov. Triedené chromozómy môžu byť použité na konštrukciu chromozómovo špecifických knižníc DNA s krátkym inzertom alebo izoláciu molekulárnych markerov z určených genómových oblastí. Schopnosť purifikovať chromozómy tiež otvára možnosti vysoko výkonného fyzického mapovania sekvencií DNA (Šimková *et al.*, 2008; Zatloukalová *et al.*, 2011).

Chromozómy je možné izolovať buď mikrodisekciou alebo pomocou prietokovej cytometrie (Kejnovský *et al.*, 2001). Prístup triedenia chromozómov prietokovou cytometriou bol vyvinutý pre množstvo rastlinných druhov (Macas *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 2002; Doležel *et al.*, 2004) vrátane cíceru (Zatloukalová *et al.*, 2011). Pre analýzu a triedenie je potrebná suspenzia chromozómov, ktorej kvalita závisí na frekvencii buniek v metafáze v zdrojovom tkanive. Doležel *et al.*, (1992) navrhli postup synchronizácie koreňového meristému, ktorý možno použiť na izoláciu intaktných chromozómov vhodných na triedenie prietokovou cytometriou. Izolácia chromozómov, ktoré boli následne použité ako templát pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) s priemerami špecifickými pre molekulárne markery, umožnila ukotvenie väzbových skupín ku konkrétnym chromozómom alebo párom chromozómov u oboch kultivarov cíceru baranieho (Vláčilová *et al.*, 2002; Zatloukalová *et al.*, 2011).

U rastlín sa bežne vyskytujú problémy s rozlíšením všetkých jednotlivých izolovaných chromozómov v karyotype. Je to spôsobené tým, že dĺžka alebo pomer chromatíd sa v dôsledku síl, ktorým sú chromozómy v procese triedenia vystavené, líšia (Doležel *et al.*, 1994). Pre úspešnosť triedenia chromozómov prietokovou cytometriou je rozhodujúci dostatočný výskyt rozdielov vo veľkosti alebo zložení jednotlivých chromozómov, ktorý je však u rastlín neobvyklý. Toto obmedzenie bolo u niektorých rastlinných druhov prekonané vývojom robustnej metódy značenia izolovaných chromozómov, označovanej ako FISHIS (Fluorescent *In Situ* Hybridization In Suspension). Technika je založená na fluorescenčnom značení syntetických repetitívnych sond DNA, ktoré hybridizujú na suspenziu chromozómov po alkalyckej denaturácii DNA (Giorgi *et al.*, 2013). FISHIS priniesla pokrok v triedení chromozómov prietokovou cytometriou u rastlinných druhov, u ktorých sú dostupné mnohé cytogenetické markery (Neumann *et al.*, 2002; Kubaláková *et al.*, 2002, 2005; Suchánková *et al.*, 2006), ktoré však pre cícer nie sú k dispozícii. Identifikácia jednotlivých izolovaných

chromozómov cíceru je možná pomocou FISH, s použitím sond, ktoré poskytujú špecifické vzory fluorescenčného značenia (Zatloukalová *et al.*, 2011).

3.3.4 BAC klony a maľovanie chromozómov

Nástup fluorescenčnej *in situ* hybridácie spolu s prístupom izolácie jednotlivých chromozómov viedli k vývoju nových techník, ktoré slúžia na identifikáciu a štúdium štrukturálnych zmien chromozómov u rady rastlín (Liu *et al.*, 2011; Danilova *et al.*, 2014; Amosova *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2018). V 80. rokoch minulého storočia bola vyvinutá pôvodná metóda maľovania, založená na FISH s celými chromozómovými sondami získanými z izolovaných chromozómov. Táto technika priniesla revolúciu v cytogenetike človeka a stala sa účinným nástrojom na detekciu medzichromozomálnych prešmykov (Speicher *et al.*, 1996) a na výskum vývoja karyotypov medzi príbuznými živočíšnymi druhmi (Ferguson-Smith *et Trifonov*, 2007). Metóda však zlyhala u rastlín, ktorých genóm je tvorený z veľkej časti repetitívnou DNA a iba malá časť sekvencií je jedinečná a chromozómovo špecifická. Veľké zastúpenie rozstrúsených repetícií spôsobuje vysokú úroveň nešpecifickej hybridizácie, a preto je použitie pôvodných maľovacích sond pre vizualizáciu rastlinných chromozómov v podstate nemožné (Schubert *et al.*, 2001).

Riešenie pre rastliny s nízkym obsahom repetícií priniesli v roku 2001 Lysak *et al.*, maľovaním chromozómov u *Arabidopsis thaliana* založeným na spojení BAC klonov, odvodených od špecifického chromozómu. Bakteriálne umelé chromozómy sú využívané pre mnoho genomických aplikácií, pretože umožňujú klonovanie inzertov o veľkosti viac ako 100 kb. Genómová DNA cieľového organizmu, čiastočne naštiepená restriktívnym enzýmom je ligovaná do BAC vektora, ktorým sa následne transformujú kompetentné baktérie (Miyake *et Amemiya*, 2004). Metóda BAC-FISH kombinuje klonovanie genómovej DNA do bakteriálnych vektorov a fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu.

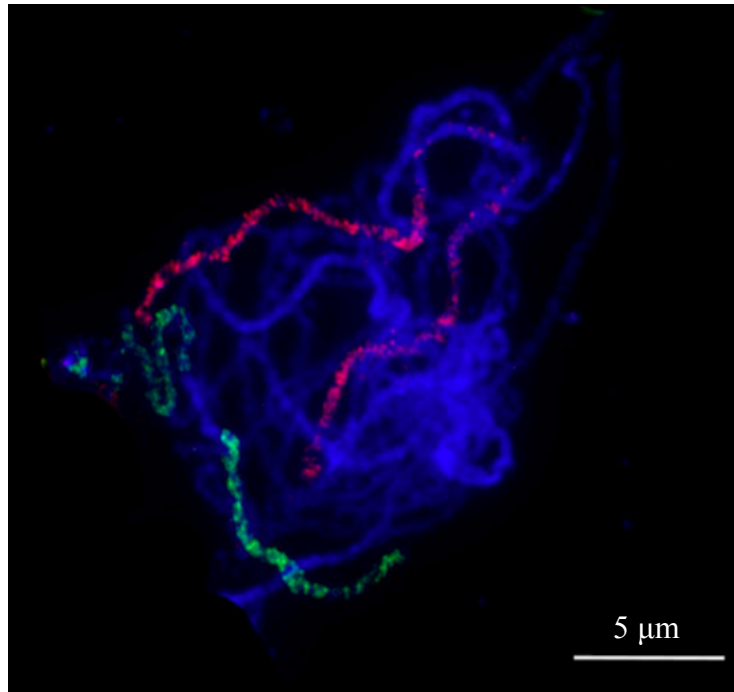
Sondy na báze BAC klonov boli ďalej použité k maľovaniu chromozómov u príbuzných druhov, čo sa stalo účinným prístupom k štúdiu dupikácií genómu, preskupovania chromozómov a evolúcie tiež u *Brassicaceae* (Lysak *et al.*, 2005; Lysak *et al.*, 2006; Mandáková *et Lysak*, 2008; Mandáková *et al.*, 2010). Vývoj chromozómovo špecifických BAC poolov však vyžaduje kompletnú sekvenciu genómu získanú sekvenovaním klonu za klonom (BAC by BAC). Pre úspešnosť tejto metódy sú teda nutné usporiadané BAC kontigy, ktoré pokrývajú celý genóm rastlinného druhu. U *Arabidopsis thaliana* sa spolieha na skutočnosť, že genóm rastliny je veľmi malý (125 Mb) a do značnej miery tiež euchromatický, takže väčšina

vybraných BAC klonov obsahuje takmer výlučne jednu alebo nízky počet kópií sekvencie. Z dôvodu nedostatku väčšieho počtu nízkokópiových BAC klonov u zložitejších a väčších rastlinných genómov, napríklad u banánovníku, neboli pokusy o použitie BAC-FISH úspešné (Hřibová *et al.*, 2008).

U cíceru sa nepodarilo s využitím BAC klonov dosiahnuť maľovanie chromozómov, ako v štúdií Lysak *et al.*, 2001, ale podarilo sa niekoľko BAC klonov identifikovať ako chromozómovo-špecifické sondy. Zatloukalová *et al.* (2011) za účelom vyvinúť nové cytogenetické markery, skonštruovali parciálnu BAC knižnicu obsahujúcu 7 680 BAC klonov. Cytogeneticky mapovali na chromozómy kultivaru Desi predpokladaných 57 BAC klonov s nízkym počtom kópií. Zo súboru mapovaných klonov poskytovalo chromozómo špecifický signál však iba 7,7 % z ich.

3.3.5 Oligo-maľovanie chromozómov

Nedávno vyvinutá metóda s názvom oligo-maľovanie (Han *et al.*, 2015) je použiteľná pre všetky druhy rastlín so sekvenovaným genómom. Technika spočíva v *in silico* identifikácii veľkého počtu krátkych (45-50 bp) a jednokópiových sekvencií v pseudomolekulách jednotlivých chromozómov alebo ich častiach, následnej syntéze oligonukleotidov a ich fluorescenčnom značení. Súbor nasyntetizovaných, fluorescenčne značených oligonukleotidov slúži ako sonda pre FISH. Oligo-maľovanie patrí medzi najnovšie techniky cytogenetického mapovania, poskytuje príležitosť na jednoznačnú identifikáciu všetkých chromozómov a na ukotvenie pseudomolekúl referenčnej genómovej sekvencie k jednotlivým chromozómom *in situ* (Jiang, 2019). Doteraz boli zaznamenané úspešné aplikácie oligo-maľovania u niekoľkých druhov rastlín vrátane uhorky (Han *et al.*, 2015), jahody (Qu *et al.*, 2017), zemiakov (Braz *et al.*, 2018), kukurice (Albert *et al.*, 2019) či banánovníku (Šimoníková *et al.*, 2019) (Obrázok 7).



Obrázok 7: Príklad oligo-maľovania dvoch pachyténnych chromozómov banánovníku
(Prevzaté od Šimoníková *et al.*, 2019)

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Pre praktickú časť tejto diplomovej práce boli použité semená diploidných kultivarov $2n = 2x = 16$ cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.) – Desi ICC 1882 a Kabuli (CDC Frontier). Semená boli získané z International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT).

4.2 Použité chemikálie a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Anti-dioxigenin-fluorescein isothiokyanát (Sigma-Aldrich, kat.č. 11207741910)
- Biotin-16-dUTP (Roche, kat. č. 11093070910)
- Biotin nick-translačný mix (Roche, kat. č. 11745824910)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, kat. č. RPN418)
- Bromfenolová modrá (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- Celuláza Onozuka R-10 (Yakult Honsa, kat. č. 150422-01)
- Citrát sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. S1804)
- Cytohelikáza (Sigma-Aldrich, kat. č. SLCB0853)
- Dextran sulfát, sodná soľ (SERVA, kat. č. 9011-18-1)
- Digoxigenin nick-translačný mix (Roche, kat. č. 11745816910)
- Digoxigenin-11-dUTP, alkali stable (Roche, kat. č. 11093088910)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, kat. č.20025-A96)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Formaldehyd 37% (Merck KGaA, kat.číslo: 103999)
- Formamid 99,5% (Sigma-Aldrich, kat. č. F9037)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, kat. č.: SM0321)
- Hydroxymočovina (Sigma-Aldrich, kat. č. H8627-56)
- Chlorid draselný (KCl) (Lach-Ner, kat. č. 7447-40-7)
- Chlorid horečnatý (MgCl₂) (Finnzymes, kat. č. AB0359)

- Imerzní olej Immersol 518F (Carl Zeiss, kat. č. 12-624-66A)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (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)
- Oryzalín (Ducheve Biochemil, kat. č. 01318.1000)
- Pektolyáza Y-23 (Ducheve Biochemie, kat. č. 015595.02)
- Pufr pre *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)
- TRIS (citronan sodný dihydrát p.a.) (kat. číslo: 30009-AP0)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat.číslo: X100)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P2287)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, kat. č. H-1200)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č. X4126)

4.2.2 Použité roztoky a ich príprava

50mM Fosfátový pufr: 2,267 g KH_2PO_4 ; 5,97 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – rozpustiť každé zvlášť v 250 ml redestilovanou vodou - zmiešať s 175 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 75 ml KH_2PO_4 – pH upraviť na 7

Fixáž ethanol: kyselina octová (3:1): 30 ml 96% ethanolu + 10 ml 99,8% ľadovej kyseliny octovej – vždy pripraviť čerstvú fixáž

Roztok 75mmol·l⁻¹ KCl + 7,5mmol·l⁻¹ EDTA: 2,796 g KCl; 0,396 g EDTA - rozpustiť každé zvlášť v 200 ml redestilované vody – zmiešať a doplniť redestilovanou vodou do 500 ml – pH upraviť na 4

Roztok 20x SSC: 175,3 g 3mol·l⁻¹ NaCl + 88,2 g 0,3 mol·l⁻¹ citronan sodný (dihydrát) – rozpustiť v 1 l redestilovanej vody - pH upraviť na 7,0 – prefiltrovať, autoklávovať 25 minút – rozliať po 500 ml do vyautoklávovaných fľaší

Roztok 2x SSC: 300 ml 20x SSC + 2700 ml redestilovanej vody – pH upraviť na 7,0 - vyautoklávovať 4x SSC/Tween - 600 ml 20x SSC - 6 ml Tween – doplniť redestilovanou vodou do 3 l – pH upraviť na 7,0 – vyautoklávovať

Roztok 0,1x SSC + 2mmol·l⁻¹Mg²⁺ · 6H₂O: 5 ml 20x SSC + 1 ml Tween + 0,406 g chloridu hořečnatého (hexahydrát) - doplniť vodou na 1 l – pH upraviť na 7,0 – vyautoklávovať

1% blokovací pufr: 0,5 g blocking reagent – rozpustiť v 50 ml 4x SSC/Tween jednu hodinu pri 70°C – vyautoklávovať – rozpipetovať po 1 ml

5x TBE pufr: 54 g Tris base + 27,5 g kyseliny boritej + 20 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA, pH 8 – doplniť redestilovanou vodou do 1 l

Roztok enzýmov celulázy, pektolyázy a cytohelikázy: 16 mg celulázy R-10 (5000 U/g); 168 mg pektinázy Y-23 (474 U/g); 0,01 mg cytohelikázy – rozpustiť každé zvlášť v 1 ml 75 mmol·l⁻¹ KCl a 7,5 mmol·l⁻¹ EDTA pufr – centrifugovať a doplniť 75 mmol·l⁻¹ KCl a 7,5 mmol·l⁻¹ EDTA pufrom do 4 ml – rozpipetovať po 300 µl do mikroskúmaviek

Roztok enzýmov celulázy a pektolyázy: 100 mg celulázy R-10 (561 U/g); 25 mg pektolyázy Y-23 (5000 U/g) – rozpustiť každé zvlášť v 2 ml 75 mmol·l⁻¹ KCl a 7,5 mmol·l⁻¹ EDTA pufr – zmiešať, centrifugovať – rozpipetovať po 300 µl do mikroskúmaviek

TRIS pufr (pH 7,5): 10 mmol·l⁻¹ TRIS (302,85 mg) + 10 mmol·l⁻¹ Na₂-EDTA (930,6 mg) + 100 mmol·l⁻¹ NaCl (1,461 g) – doplniť do 250 ml a upraviť pH 7,5 pomocou 1N NaOH

TRIS fixáž (pH 7,5): 10 mmol·l⁻¹ TRIS (302,85 mg) + 10 mmol·l⁻¹ Na₂-EDTA (930,6 mg) + 100 mmol·l⁻¹ NaCl (1,461 g) + 0,1% Triton-X (22 250 µl) – doplniť do 200 ml destilovanou vodou a upraviť pH 7,5 pomocou 1N NaOH – do množstva 250 ml dodať 13,5 ml formaldehydu

50% dextran sulfát: 2,5 g dextran sulfátu rozpustiť za mierneho miešania v 5 ml destilovanej vody

6x STOP C (10 ml): 2 ml 0,5M EDTA + 1 ml 10% SDS + 4,3 ml 99,9% glycerolu + 5 mg bromfenolovej modrej + 5 mg xylenecyanolu – doplniť destilovanou vodou na 10 ml

Pracovný roztok ethidium bromidu (1 l): 50 mg ethidium bromidu rozpustiť v 100 ml destilovanej vody a doplniť destilovanou vodou na 1 l

TE (Tris-EDTA) pufr (100 ml): 1 ml 1M Tris-HCl + 200 μ l 0,5M EDTA – doplniť destilovanou vodou na 100 ml a upraviť pH na 8

Hoaglandový vyživujúci roztok: 4,7 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,3 g KNO_3 ; 0,6 g $\text{NH}_4 \cdot \text{H}_2\text{PO}_4$ – rozpustiť každé zvlášť v 50 ml destilovanej vody – pridať 5 ml roztoku solí 280 mg H_3BO_3 + 340 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 10 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpustených v 100 ml dH_2O – pridať 0,5 ml koncentrovanej H_2SO_4 rozpustenej v 100 ml dH_2O a doplniť do celkového objemu 500 ml

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Centrifuga Micro Star 17R (VWR International)
- Binokulárna lupa (Arsenal)
- Digestor (Merci)
- Elektroforetická aparatúra Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorescenčný mikroskop Axio Imager.Z2 s CCD kamerou (Carl Zeiss)
- Hybridizačná komora SM30 (Boekel Scientific)
- Zdroj Power Suply (Explax GmbH)
- UV lampa X-Cite exacte (Excelitas)
- Spektrofotometer NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Stolná centrifuga MiniStar silverline (VWR International)
- Svetelný mikroskop Primo Star (Carl Zeiss)
- Termoblok Digital Dry Bath (Labnet International)
- Termocycler Mastercycler (Eppendorf)
- Trepáčka Reax Top (Heldolph Instruments)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene)
- Vodný kúpeľ SUB6 (Grant Instruments)
- Zdroj pre elektroforézu Power Pac (Bio-Rad)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Príprava rastlinného materiálu, synchronizácia a fixácia korieňkov

Klíčenie, synchronizácia a fixácia korieňkov cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.) boli prevedené na základe už zavedeného protokolu na pracovisku, podľa Vláčilová *et al.* (2002). Semená cíceru sa nechali prebublávať v destilovanej vode počas 24 hodín a následne 48 hodín klíčiť v perlite navlhčenom Hoaglandovým výživujúcim roztokom.

Klíčky s cca 2 cm dlhými primárnymi koreňmi boli inkubované 18 hodín v Hoaglandovom roztoku obsahujúcom $2\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxymočovinu. Následne boli korieňky opláchnuté destilovanou vodou a po dobu 4,5 hodín premývané v Hoaglandovom roztoku bez hydroxymočoviny. Pre dosiahnutie akumulácie buniek v metafáze sa korieňky ďalej inkubovali 2 hodiny v Hoaglandovom roztoku s $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oryzalínom. Synchronizované korieňky boli uchované v ľadovej vode cez noc.

Následujúci deň boli korieňky fixované 20 minút v 2% roztoku formaldehydu s Tris pufrom (viz 4.2. použité roztoky) pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po fixácii boli korene premyté 3x po dobu 5 minút v Tris pufry pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a použité na prípravu metafáznych preparátov alebo uchované v 70% ethanole pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aj niekoľko mesiacov.

4.4.2 Príprava roztlakových preparátov

Zafixované korieňky boli zafarbené v roztoku 1% acetokarmínu po dobu 2 hodín. Následne bola skalpelom odrezaná tmavo sfarbená koreňová špička a prenesená do kvapky 45% kyseliny octovej na podložnom skle, ktoré bolo pred prípravou preparátov vyleštené pomocou 96% etanolu. Po prekrytí krycím sklom bol pomocou špáradla, v prostredí 45% kyseliny octovej, prevedený roztlak koreňovej špičky. Podložné sklo bolo opálené nad liehovým kahanom a po vychladnutí bol preparát ešte roztláčny tlakom prstu. Takto pripravený roztlakový preparát bol ponechaný 45 minút na bloku suchého ľadu (CO_2 v pevnom skupenstve), krycím sklom smerom dolu. Následne bolo krycie sklo odstránené a preparát bol krátko inkubovaný v 45% kyseliny octovej pri pokojovej teplote. Po inkubácii bol preparát prenesený na 3 minúty do 45% kyseliny octovej, predhriatej na teplotu $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následne bol preparát vysušený. Kvalita roztlakových preparátov bola nakoniec skontrolovaná pomocou svetelného mikroskopu Primo Star (Carl Zeiss) a vhodné preparáty boli použité k fluorescenčnej *in situ* hybridizácii.

4.4.3 Príprava nakvapkávaných preparátov metafáznych chromozómov

Zafixované koreňky boli v priebehu 10 minút trikrát premyté destilovanou vodou a následne jedenkrát v $75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pufrí (viz 4.2. použité roztoky) po dobu 5 minút. Vždy dve koreňové špičky o dĺžke približne 0,25 cm boli premiestnené do 30 μl enzymatickej zmesi a inkubované pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vo vodnom kúpeli po dobu 60 minút. Zmes enzýmov obsahovala 4% celulázu R-10 a 1% pektolýazu Y-23 v $75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pufrí (viz 4.2. použité roztoky). Po inkubácii boli macerované koreňové špičky premiestnené na ľad a enzymatické pôsobenie bolo zastavené pridaním TE pufru. Následne bol macerovaný rastlinný materiál 2x po 4 minúty premytý v 96% ethanole a homogenizovaný v 31 μl fixáže 9:1 (99,8% ľadová kyselina octová : 99,5% methanol). Z pripravenej suspenzie bolo nakvapnutých 5 μl na podložné sklíčko v prostredí s vysokou vlhkosťou, kde boli preparáty umiestnené minimálne 15 minút. Kvalita preparátov bola skontrolovaná pomocou svetelného mikroskopu s fázovým kontrastom Primo Star (Carl Zeiss) a v prípade preparátov s dostatočným výskytom metafáznych chromozómov boli ďalej použité pre fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu.

4.4.4 Príprava suspenzií protoplastov

Postup prípravy metafáznych preparátov cícerových chromozómov bol prevedený podľa protokolu Doležel *et al.* (1998) s nasledujúcimi modifikáciami. Približne dvanásť synchronizovaných a zafixovaných koreňkov bolo v priebehu 15 minút trikrát premytých v $75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pufrí. Pod lupou boli skalpelom narezané disky z koreňového meristému (cca 4-5 koreňových diskov z každého koreňku), ktoré boli vložené do 200 μl zmesi enzýmov 2% celulázy, 2% pektinázy a 0,25% cytohelikázy (viz 4.2. použité roztoky). Enzymatická zmes spolu s koreňovými diskami bola macerovaná 90 minút pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (po každých 20 minútach bola zmes pretrepaná). Po macerácii bola suspenzia prefiltrovaná cez nylonovú sieťku (150 μm), ktorá bola vopred zvlhčená $75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pufrom. Nasledovala trikrát opakovaná centrifugácia pri 1000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minút kedy bol pelet premytý v rovnakom pufrí. Po poslednej centrifugácii bol pelet premytý v 70% ethanole a opäť centrifugovaný 2x za rovnakých podmienok. Nakoniec bol pelet rozsuspendovaný v 50 μl 70% ethanolu a pripravená suspenzia protoplastov bola uchovaná aj niekoľko mesiacov v mraziaku pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.5 Príprava nakvapkávaných preparátov zo suspenzií protoplastov

Pripravená suspenzia protoplastov bola zastrihnutou špičkou nakvapnutá na vychladené podložné sklíčko (SuperFrost Plus™). K 1-2 µl nakvapnutej suspenzie bolo pridaných 14 µl vychladenej fixáže 3:1 (96% ethanol : 99,8% kyselina octová) a preparát bol ihneď pozorovaný pod svetelným mikroskopom s fázovým kontrastom Primo Star (Carl Zeiss). V okamihu pozorovania procesu plazmoptýzy bol preparát vložený do kyvety s 96% ethanolom po dobu 2 minút. Následne bol preparát umiestený na stojan a usušený vzduchom pri pokojovej teplote.

Preparát na sklíčku bol post-fixovaný v 4% formaldehyde v sérii premývaní: 2x SSC/5 min; 4% formaldehyd/10 min; trikrát 2x SSC/4 min a po 2 min v 70%, 90% a 99,8% ethanole.

4.4.6 Príprava oligo-mal'ovacích sond

Špecifické oligo-mal'ovacie sondy pre identifikáciu jednotlivých chromozómov cíceru boli navrhnuté podľa dostupnej referencie genómu cíceru s využitím Chorus programu (<https://github.com/forrestzhang/Chorus>). Pre návrh sond boli zvolené úseky, dlhé približne 500 kb, z oblastí na chromozómoch *Cicer arietinum* CDC Frontier, ktoré zdieľajú vysokú homológiu s typom Desi ICC 4958 (Parween *et al.*, 2015). Takto boli navrhnuté 2 špecifické knižnice obsahujúce 20 000 oligomérov (o dĺžke cca 45 nukleotidov), ktoré pokrývajú špecifické úseky chromozómov (Obrázok 8). K porovnaniu navrhnutej lokalizácie oligomérov na pseudomolekulách kultivaru Desi a Kabuli, boli špecifické sekvencie oligo-mal'ovacích sond namapované na referenčný genóm CDC Frontier a ICC 4958 (Varschney *et al.*, 2013; Parween *et al.*, 2015) pomocou BWA v0.7.17 (Li *et Durbin*, 2010) a vizualizované na pseudomolekulách pomocou using BEDTools v2.27.1 (Quinlan *et Hall*, 2010). Pre potvrdenie translokácie bola neskôr pomocou Chorus programu navrhnutá špecifická sonda pokrývajúca predpokladanú translokovanú oblasť (0-10 Mb) na pseudomolekule Ca7, odpovedajúcej úseku chromozómu D.

Špecifické knižnice boli syntetizované firmou Arbor Bioscience (Ann Arbor, Michigan, USA). Zo získaných knihovní oligomérov boli pripravené dvojfarebné sondy pre fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu podľa protokolu Han *et al.*, (2015). Červená sonda CAF-OP2 bola označovaná ako R, z angl. red a zelená sonda CAF-OP1, označovaná ako G, z angl. green. Knihovňa oligomérov bola amplifikovaná pomocou emulznej PCR s použitím primeru obsahujúceho promotor T7 RNA polymerázy (Murgha *et al.*, 2014). PCR produkt bol následne purifikovaný pomocou QIAquick PCR kitu (Qiagen, Hilden, Nemecko). Purifikovaná DNA bola použitá pre T7 *in vitro* transkripciu s využitím MEGAshortscript T7 kitu (ThermoFisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) pri 37 °C po dobu 4 hodín. RNA produkt

bol purifikovaný RNeasy Mini kitom (Qiagen). Približne 40 µg prečistenej RNA bolo reverzne transkribovaných pomocou reverznej transkriptázy Superscript II a SUPERázy (ThermoFisher Scientific / Invitrogen) 4 hodiny pri 42 °C s použitím R primeru (5'-CGTGGTCGCGTCTCA-3') označeného digoxigenínom, biotínom alebo Cy5 (Eurofins Genomics, Ebersberg, Nemecko) za stáleho pôsobenia inhibítora RNasy (ThermoFisher Scientific / Invitrogen). Hybridné molekuly RNA:DNA boli purifikované Quick-RNA MiniPrep kitom (Zymo Research, Freiburg im Breisgau, Nemecko) a hydrolyzované pôsobením RNasy H (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Nakoniec bola prevedená hydrolýza RNA pridaním RNasy A (ThermoFisher Scientific / Invitrogen). Produkty reverznej transkripcie boli prečistené Quick-RNA MiniPrep kitom (Zymo Research, Freiburg im Breisgau, Nemecko). Získané jednovláknové značené oligoméry boli ihneď použité pre *in situ* hybridizáciu alebo uchované v mraziaku pri – 20 °C.

4.4.7 Príprava sondy pre lokus 45S rDNA

Sonda špecifická pre 45S rDNA lokus bola pripravená nick-transláciou z vyizolovaného plazmidu pTa71 (Gerlach *et* Bedbrook, 1979). Pre značenie bol použitý komerčný Nick-translation mix podľa inštrukcií výrobcu (Roche Applied Science, Penzberg, Nemecko). Do celkového objemu 25 µl reakcie bolo použitých 1000 ng plazmidu a fluorescenčne značené Alexa Fluor 546 nukleotidy o koncentrácii 2 mmol·l⁻¹ (Invitrogen). Reakcia prebiehala pri 15 °C/180 minút. Požadovaná dĺžka fragmentov (200-500 bp) bola overená elektroforeticky v 1,2% agarózovom gély. Nick-translačná reakcia bola zastavená pridaním 1 µl EDTA pH=8 o koncentrácii 0,5 mol·l⁻¹ s následnou inkubáciou pri 65 °C po dobu 10 minút. Po inkubácii bola pripravená sonda pre 45S rDNA lokus ihneď použitá pre fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu alebo uchovaná v – 20 °C.

4.4.8 Príprava sondy pre lokus 5S rDNA

Špecifická sonda pre lokus 5S rDNA bola pripravená pomocou PCR reakcie. PCR amplifikačný mix o celkovom objeme 20 µl obsahoval 24 ng genomickej DNA; 0,2 mmol·l⁻¹ dNTPs; 0,2 µmol·l⁻¹ primery RICRGAC1 (5'- GATCCCATCAGAACTCCGAAG-3') a RICRGAC2 (5'- CGGTGATTTAGTGCTGGTAT-3') (Fukui *et al.*, 1994; Zatloukalová *et al.*, 2011); 1x PCR pufr a 2,5U/100 µl One *Taq* Hot Start DNA polymerázy (Invitrogen). PCR amplifikácia bola prevedená za podmienok uvedených v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Teplotný a časový profil PCR reakcie na prípravu 5S rDNA

Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
94	5 min	1
94	50 s	34
55	50 s	
72	40 s	
72	10 min	1

Úspešnosť amplifikácie PCR produktu špecifického pre 5S rRNA lokus bola overená elektroforeticky v 1,2% agarózovom gély.

Amplifikovaný PCR produkt bol následne fluorescenčne značený pomocou ďalšej PCR reakcie. PCR mix o celkovom objeme 20 μl obsahoval značené nukleotidy Alexa Fluor 647 o koncentrácii 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ primery RICRGAC1 a RICRGAC2 (Fukui *et al.*, 1994; Zatloukalová *et al.*, 2011); 1x PCR pufr a 2,5U/100 μl DNA polymerázy (Invitrogen). Značenie prebiehalo za rovných podmienok ako PCR amplifikácia. Po overení úspešnosti značenia špecifickej sondy pre 5S rDNA lokus pomocou elektroforézy bola pripravená sonda uchovaná v mraziaku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.9 Príprava telomerickéj sondy

K príprave telomerickéj sondy bol syntetizovaný značený oligomér na 5' konci pomocou Cy3 alebo Cy5 fluorochrómov (Eurofins Genomics, Ebersberg, Nemecko). Bola použitá sekvencia vychádzajúca z *Arabidopsis*-type telomerickéj repetície v podobe (5'-CCCTAAA-3') v štyroch opakovaníach.

4.4.10 Príprava sond z izolovaných BAC klonov

Pre prípravu chromozómovo špecifických sond boli vybrané klony z BAC knižnice obsahujúcej 7 680 klonov s priemernou dĺžkou inzertu 50 kbp, vopred pripravenej na Ústave experimentálnej botaniky AV, ČR v Olomouci (Zatloukalová *et al.*, 2011). Purifikovaná DNA z vybraných BAC klonov (viz Tabuľka 2) bola značená Nick-translation mixom (Roche Applied Science, Penzberg, Nemecko). Reakčná zmes o objeme 20 μl obsahovala 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ vyizolovanej BAC DNA a fluorescenčne značené 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Alexa Fluor 546/647 nukleotidy. Nick-translácia prebiehala pri 15 $^{\circ}\text{C}$ po dobu minimálne 180 minút, pokiaľ neboli získané

fragmenty o požadovanej dĺžke. Kvalita štiepenia a inkorporácie značených nukleotidov bola elektroforeticky overená v 1,2% agarózovom gély. Reakcia bola zastavená pridaním 1 μ l EDTA pH=8 o koncentrácii 0,5 mol·l⁻¹ s následnou inkubáciou pri 65 °C, 10 minút. Pripravená sonda, získaná z izolovanej BAC DNA, bola použitá ako sonda pre fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu alebo uchovaná pri – 20 °C v mraziaku.

Tabuľka 2: Prehľad použitých BAC klonov pre prípravu chromozómovo špecifických sond cíceru (*Cicer arietinum* L.), navrhnuté podľa Zatloukalová *et al.*, 2011.

Názov BAC klonu	Umiestnenie na chromozóme
BAC 14M2	B
BAC 5E3	F
BAC 11K7	E
BAC 10I13	A

4.4.11 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia a fluorescenčná mikroskopia

Na post-fixované podložné sklo bola nanosená hybridizačná zmes o objeme 30 μ l. Hybridizačná zmes obsahovala 50% formamid, 5x SSC (70%), 10% dextran sulfát a 200-400 ng pripravenej sondy. Po nanesení hybridizačnej zmesi bolo sklo s preparátom prikryté krycím sklíčkom a denaturované 2 min 15s pri 80 °C. Následne bol preparát na skle ihneď prenesený do vlhkej hybridizačnej komôrky a hybridizácia prebiehala cez noc pri 37 °C.

Následujúci deň bolo krycie sklíčko odstránené a preparáty boli premyté v roztokoch SSC. V prípade použitia sondy s priamym značením bol preparát premytý trikrát po 5min v roztoku 4x SSC pri 42 °C. Pri použití nepriamo značenej sondy boli koncentrácie SSC roztokov, teplotné a časové profily premývania boli nasledovné:

- 2 x 7 min 2x SSC pri 42 °C
- 1 x 10 min 0,1 SSC pri 42 °C
- 1 x 5 min 2x SSC pri 42 °C
- 2 x 7 min 4x SSC pri pokojovej teplote

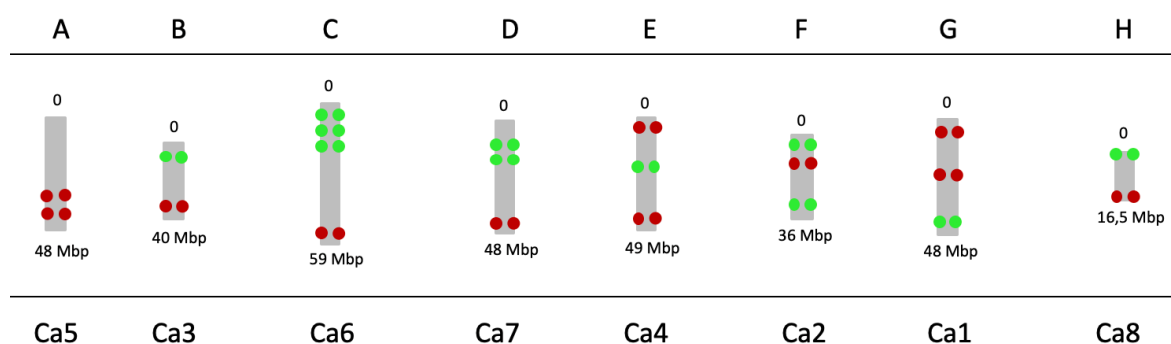
Po premytí bolo na sklo nanesených 100 μ l 1% blokovacieho pufru, sklo bolo prikryté parafilmom a inkubované 10 minút. Sondy značené dioxigenínom alebo biotínom boli detekované následným pridaním 100 μ l zmesi 1% blokovacieho pufru s protilátkami anti-digoxigenin-FITC zriedený v pomere 1:200 (Roche Applied Science) a anti-streptavidin-Cy3 zriedený v pomere 1:5000 (ThermoFisher Scientific/Invitrogen). Sklá boli prikryté parafilmom a inkubované vo vlhkej komôrke pri 37 °C 1 hodinu.

Nenaviazané protilátky boli premyté 3x po 5 minút v 4x SSC pri 42 °C. Tento krok bol rovnaký aj v prípade použitia sondy s priamym značením bez predchádzajúcej aplikácie protilátok či premývania. Na premyté sklo bolo pridaných 7 μ l Vectashield s DAPI (Vectashield Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories). Pripravené preparáty boli prikryté krycím sklíčkom a pozorované vo fluorescenčnom mikroskope Axio Imager Z.2 Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Nemecko) s vhodnými optickými filtrami. Pomocou softvéru ISIS 5.4.7 (Metasystems) boli zachytené fluorescenčné signály, zlúčené vrstvy a nameraná dĺžka pozorovaných chromozómov. K finálnej úprave obrázkov a tvorbe idiogramov bol použitý software Adobe Photoshop CS5 (verzia 12.0).

5 VÝSLEDKY

5.1 Identifikácia chromozómov metódou oligo-maľovania

Na základe dostupných sekvencií referenčného genómu, boli navrhnuté špecifické oligo-maľovacie sondy. Pre návrh sond boli zvolené úseky chromozomálnych oblastí kultivaru Kabuli a kultivaru Desi, ktoré zdieľajú vysokú homológiu. Navrhnuté špecifické oligo-maľovacie sondy boli označené ako R (červená, CAF-OP2) a G (zelená, CAF-OP1). Unikátne sondy boli navrhnuté v programe Chorus podľa Han *et al.* (2015). Sondy boli dizajnované tak, aby ich kombináciou vznikol chromozómovo špecifický vzor (Obrázok 8), ktorý by umožnil identifikáciu jednotlivých chromozómov s následným zostavením karyotypu.



Obrázok 8: Návrh špecifických oligo-maľovacích sond R a G pre chromozómy cíceru. Jednotlivé pseudomolekuly odpovedajúce chromozómom sú značené Ca1–Ca8 a čísla ukazujú oblasť pseudomolekuly, na ktorej bol špecifický vzor navrhnutý. Sonda R je znázornená červenými bodmi, sonda G je znázornená zelenými bodmi. Chromozómy sú označené písmenami A–H; A = najväčší chromozóm, H = najmenší chromozóm.

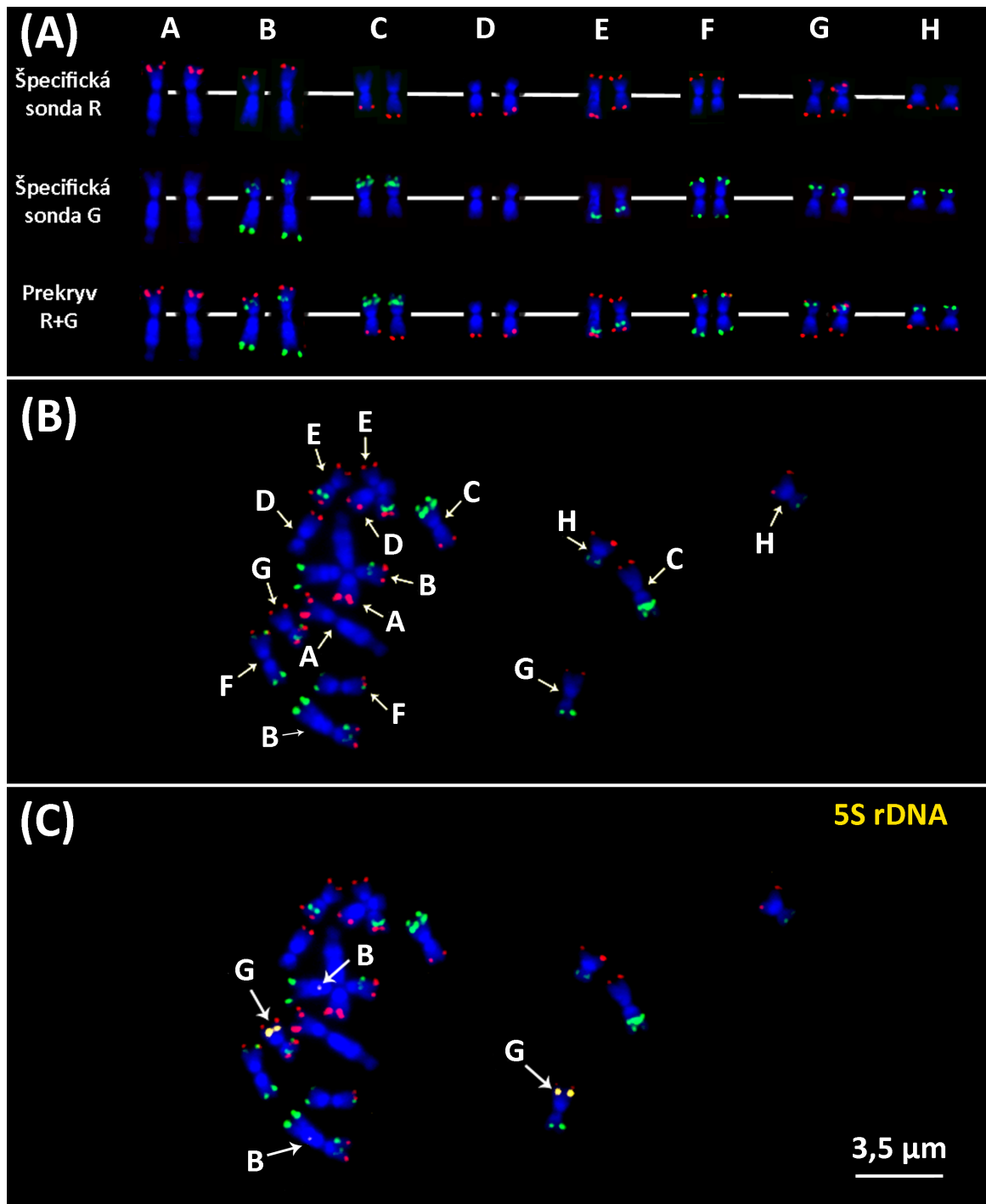
Pripravené oligo-maľovacie sondy R a G (príprava viz 4.4.5.) boli aplikované na preparáty fixovaných metafáznych chromozómov a bola prevedená fluorescenčná *in situ* hybridizácia. Prípravu preparátov bolo nutné najskôr zoptimalizovať tak, aby bolo množstvo cytoplazmy v okolí chromozómov redukované. Počiatočné pokusy s použitím roztlakovej metódy boli neúspešné, pretože dochádzalo k nešpecifickému viazaniu sekundárnej protilátky na zvyšky cytoplazmy, čo znemožnilo snímanie špecifických fluorescenčných signálov sond. Lepšie výsledky boli dosiahnuté použitím metódy nakvapkávaných metafáznych

chromozómov. Ako najvhodnejšia metóda na prípravu preparátov sa však ukázala technika nakvapkávania suspenzie protoplastov.

Sondy R a G hybridizovali do odlišných miest na jednotlivých chromozómoch a vznikol tak unikátny vzor na každom z ôsmich chromozómov diploidného kultivaru Desi. Predpokladaný vzor R a G sond hybridizoval podľa návrhu (Obrázok 8) s výnimkou chromozómového páru G (Obrázok 9), kde bola pozorovaná odlišnosť od predpokladaného vzoru. Kombinácia a poradie sond tak bolo u chromozómov E i G rovnaké. Z tohto dôvodu nebolo možné chromozómy oligo-maľovacím systémom od seba spoľahlivo odlíšiť. Rozdiel v absolútnej dĺžke chromozómov E a G umožnil ich odlíšenie (Tabuľka 3), avšak k ich jednoznačnej diferenciacii bola využitá cytogenetická lokalizácia lokusov pre rDNA gény.

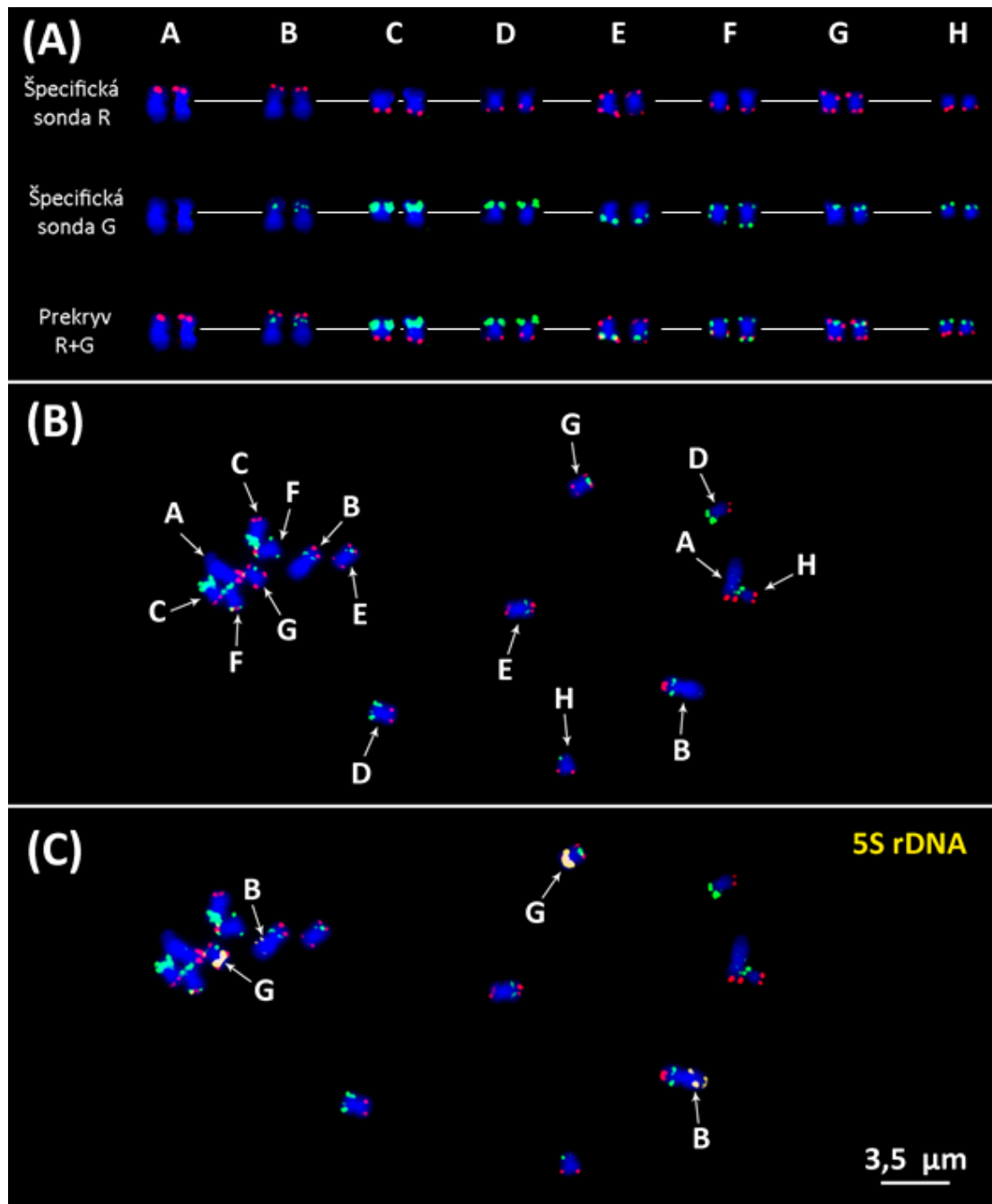
Poloha fluorescenčných signálov oligo-maľovacích sond bola v porovnaní s návrhom (Obrázok 8) odlišná aj u ďalších chromozómov. Poloha hybridizačného miesta pre špecifickú sondu R bola na chromozóme A invertovaná. Rovnako bola invertovaná pozícia oboch oligo-maľovacích sond u chromozómu B. Chromozóm B vykazoval ďalšiu zmenu, prítomnosťou 3 hybridizačných miest špecifickej G sondy namiesto jedného. Naopak, chromozóm D neniesol, oproti návrhu, žiadny zelený signál odpovedajúci sonde G.

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia so sondou pre 5S rDNA poskytovala hybridizačné miesta u 2 párov chromozómov (Obrázok 9 (C)). Intenzívnejší signál bol lokalizovaný na konci dlhého ramena chromozómu G a slabší signál sa nachádzal v centrálnej oblasti dlhého ramena chromozómu B. Mapovanie génu pre 5S rDNA sa ukázalo ako účinný spôsob jednoznačného odlíšenia chromozómov E a G, keďže hybridizačné miesto pre 5S rDNA nesie iba jeden z dvojice.



Obrázok 9: Identifikácia chromozómov cíceru typu Desi s využitím špecifických oligo-maľovacích sond. Jednotlivé chromozómy sú značené zostupne podľa veľkosti, písmenami A–H. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. (A) Karyotyp zostavený na základe signálov špecifickej oligo-maľovacej sondy R (červený signál), G (zelený signál) a ich spojení. (B) Figúra metafázných chromozómov cíceru typu Desi po aplikácii oligo-maľovacích sond R a G. (C) Príklad cytogenetického mapovania génu pre 5S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch B a G. Fluorescenčný signál odpovedajúci 5S rDNA bol kolorovaný žltou farbou.

Špecifické oligo-maľovacie sondy R a G boli k identifikácii jednotlivých chromozómov použité rovnako u kultivaru Kabuli. Systém oligo-maľovania chromozómov sa ukázal ako funkčný i pre tento kultivar. Po prevedení FISH poskytovali oligo-maľovacie sondy R a G jedinečný vzor pre každý chromozóm, okrem chromozómov E a G, rovnako ako u kultivaru Desi (Obrázok 10). Odlíšenie chromozómov E a G bolo možné aj na základe ich rozdielnej dĺžky (Tabuľka 4), ale k jednoznačnej identifikácii chromozómov bolo nutné previesť mapovanie génu pre 5S rDNA, ktoré sa ukázalo ako spoľahlivý nástroj k odlíšeniu chromozómového páru G (Obrázok 10 (C)).

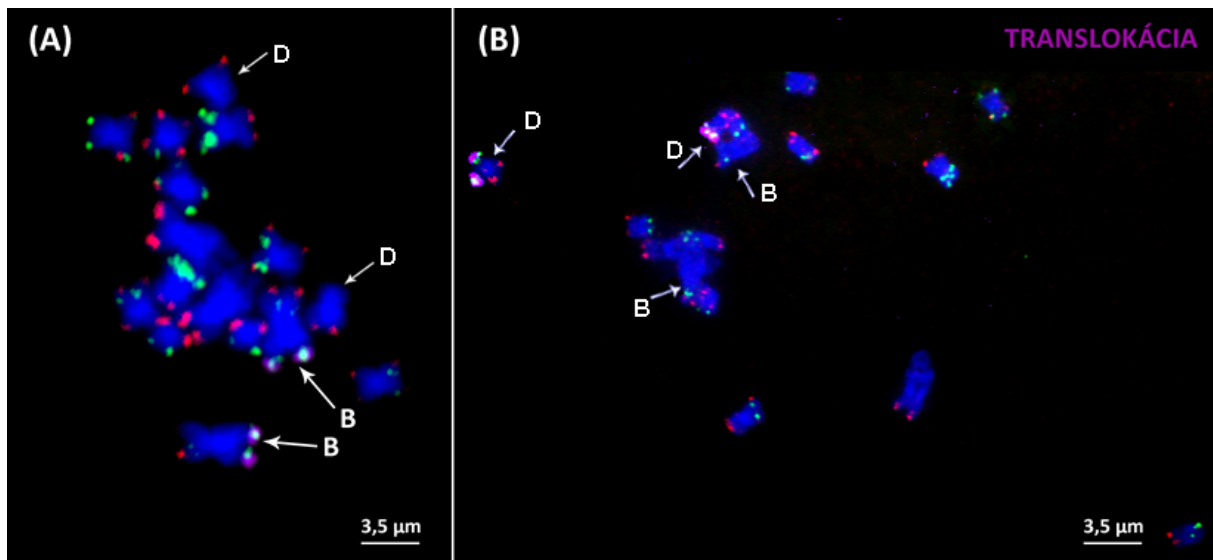


Obrázok 10: Identifikácia chromozómov cíceru typu Kabuli s využitím špecifických oligo-maľovacích sond. Jednotlivé chromozómy sú značené zostupne podľa veľkosti, písmenami A–H. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Karyotyp zostavený na základe signálov špecifickej oligo-maľovacej sondy R (červený signál), G (zelený signál) a ich spojení **(B)** Figúra metafázných chromozómov po aplikácii oligo-maľovacích sond R a G. **(C)** Príklad cytogenetického mapovania génu pre 5S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch B a G. Fluorescenčný signál odpovedajúci 5S rDNA bol kolorovaný žltou farbou.

Vzor fluorescenčných signálov oligo-maľovacích sond na chromozómoch typu Kabuli sa zhodoval so vzorom u typu Desi, s výnimkou chromozómov B a D. Chromozóm B u kultivaru Kabuli niesol na krátkom ramene iba jedno hybridizačné miesto oligo-maľovacej sondy G, čo odpovedá návrhu sond (Obrázok 8). Chromozóm D sa naopak vyznačoval prítomnosťou dvoch zelených signálov sondy G, v koncovej oblasti krátkeho ramena, čo je rovnako v súlade s návrhom. Táto skutočnosť naznačuje možnú translokáciu distálnej časti dlhého ramena chromozómu B u kultivaru Desi, na krátke rameno chromozómu D u typu Kabuli.

5.1.1 Cytogenetická lokalizácia prestavby karyotypu v rámci druhu

Na základe teórie o možnej prestavbe karyotypu v rámci druhu, bola navrhnutá špecifická oligo-maľovacia sonda pre subtelomerickú oblasť pseudomolekuly Ca7 (chromozóm D). Po prevedení FISH bola preukázaná prestavba 2 chromozómov. U kultivaru Desi došlo k delícii koncovej časti chromozómu D a inzercii na chromozóm B, v oblasti kde sa nachádza zelený signál odpovedajúci oligo-maľovacej sonde G (Obrázok 11 **(A)**). Naopak, u kultivaru Kabuli došlo na chromozóme D k inzercii v koncovej oblasti a delícii na chromozóme B, v mieste výskytu zeleného signálu sondy G (Obrázok 11 **(B)**).



Obrázok 11: Prestavba chromozómov kultivaru Desi a Kabuli s využitím oligo-maľovacej sondy pre subtelomerickú oblasť pseudomolekuly Ca7 (chromozóm D). Zelený signál odpovedá oligo-maľovacej sonde G a červený signál odpovedá sonde R. Fluorescenčný signál odpovedajúci sonde pre translokovanú oblasť bol kolorovaný fialovou farbou. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Lokalizácia delécie na chromozóme D a inzercie na chromozóm B, kultivar Desi. **(B)** Lokalizácia delécie na chromozóme B a inzercie na chromozóm D, kultivar Kabuli.

5.1.2 Meranie absolútnej dĺžky metafáznych chromozómov

U oboch kultivarov bola meraná absolútna dĺžka chromozómov v metafáze. Výsledky priemeru meraní vrátane smerodajnej odchýlky sú zobrazené v Tabuľke 3 a 4. Z každého kultivaru boli merané chromozómy v 10 kompletných metafázach. Na základe pomeru krátkeho a dlhého ramena chromozómov boli určené príslušné morfológické typy.

Tabuľka 3: Meranie absolútnych dĺžok ramien chromozómov u kultivaru Desi.

DESI			
Chromozóm (pseudomolekula)	q-rameno (μm)	p-rameno (μm)	q + p (μm)
A (Ca 5)	2,49 \pm 0,54	1,48 \pm 0,28	3,94 sm
B (Ca 3)	2,14 \pm 0,47	1,44 \pm 0,25	3,58 sm
C (Ca 6)	1,32 \pm 0,29	0,97 \pm 0,25	2,29 sm
D (Ca 7)	1,32 \pm 0,27	0,91 \pm 0,15	2,23 sm
E (Ca 4)	1,26 \pm 0,35	0,95 \pm 0,22	2,29 sm
F (Ca 2)	1,02 \pm 0,27	0,94 \pm 0,25	2,21 m
G (Ca 1)	0,95 \pm 0,24	0,87 \pm 0,21	1,82 m
H (Ca 8)	0,77 \pm 0,18	0,52 \pm 0,13	1,29 sm

*sm = submetacentrický typ; m = metacentrický typ. Krátke rameno = p, dlhé rameno = q.

Tabuľka 4: Meranie absolútnych dĺžok ramien chromozómov u kultivaru Kabuli.

KABULI			
Chromozóm (pseudomolekula)	q-rameno (μm)	p-rameno (μm)	q + p (μm)
A (Ca 5)	2,33 \pm 0,22	1,50 \pm 0,18	3,83 sm
B (Ca 3)	1,81 \pm 0,26	1,47 \pm 0,27	3,28 sm
C (Ca 6)	1,42 \pm 0,15	1,15 \pm 0,14	2,57 sm
D (Ca 7)	1,27 \pm 0,12	1,11 \pm 0,15	2,37 m
E (Ca 4)	1,35 \pm 0,12	0,98 \pm 0,19	2,33 sm
F (Ca 2)	1,17 \pm 0,16	1,02 \pm 0,14	2,18 m
G (Ca 1)	1,18 \pm 0,15	0,90 \pm 0,16	2,07 sm
H (Ca 8)	0,95 \pm 0,12	0,65 \pm 0,15	1,60 sm

*sm = submetacentrický typ; m = metacentrický typ. Krátke rameno = p, dlhé rameno = q.

Absolútna dĺžka chromozómov kultivaru Desi sa pohybovala v rozmedzí 3,94 μm u najväčšieho chromozómu A do 1,29 μm u najmenšieho chromozómu H. Na základe výsledkov merania boli všetky chromozómy kultivaru Desi určené ako submetacentrický typ s výnimkou chromozómov F a G, ktoré sa ukázali ako metacentrické (viz Tabuľka 3). Rozsah absolútnej dĺžky chromozómov u kultivaru Kabuli bol od 3,83 μm u chromozómu A do 1,6 μm pre chromozóm H (viz Tabuľka 4). Napriek tomu, že hodnoty sú pre oba kultivary podobné, boli v meraniach zaznamenané odchýlky.

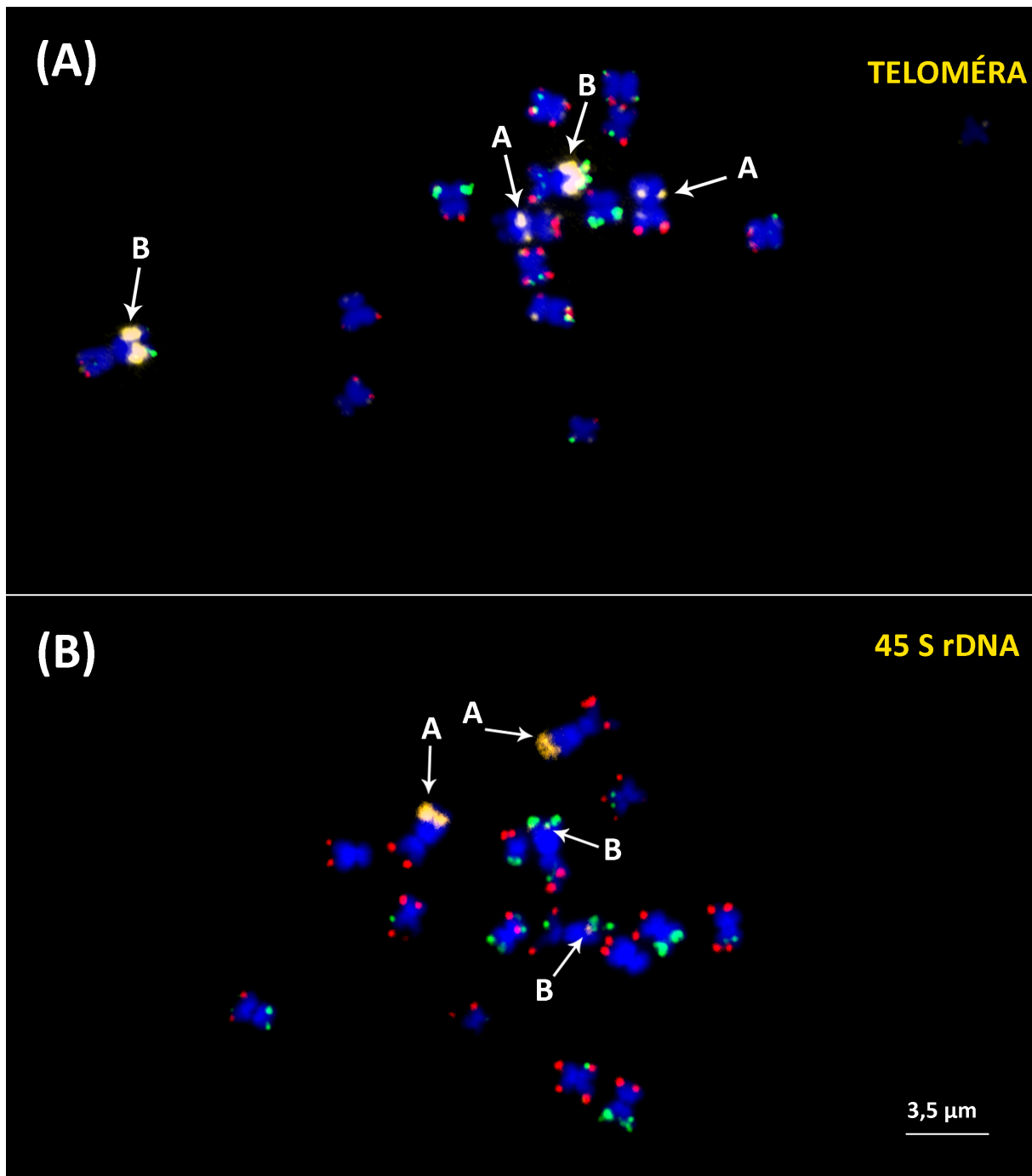
Rovnako u kultivaru Kabuli bola väčšina chromozómov submetacentrického typu, okrem metacentrických chromozómov F a D. Chromozóm D u kultivaru Kabuli je väčší ako rovnaký chromozóm u kultivaru Desi. Naopak, veľkosť chromozómu B je u typu Kabuli nižšia. Táto skutočnosť je ďalším dôkazom prestavby karyotypu, kedy pri evolučnom vývine druhu došlo k delícii distálnej časti chromozómu B a k inzercii tejto časti na chromozóm D.

5.2 Mapovanie génov pre 45S rDNA a telomerickú repetíciu

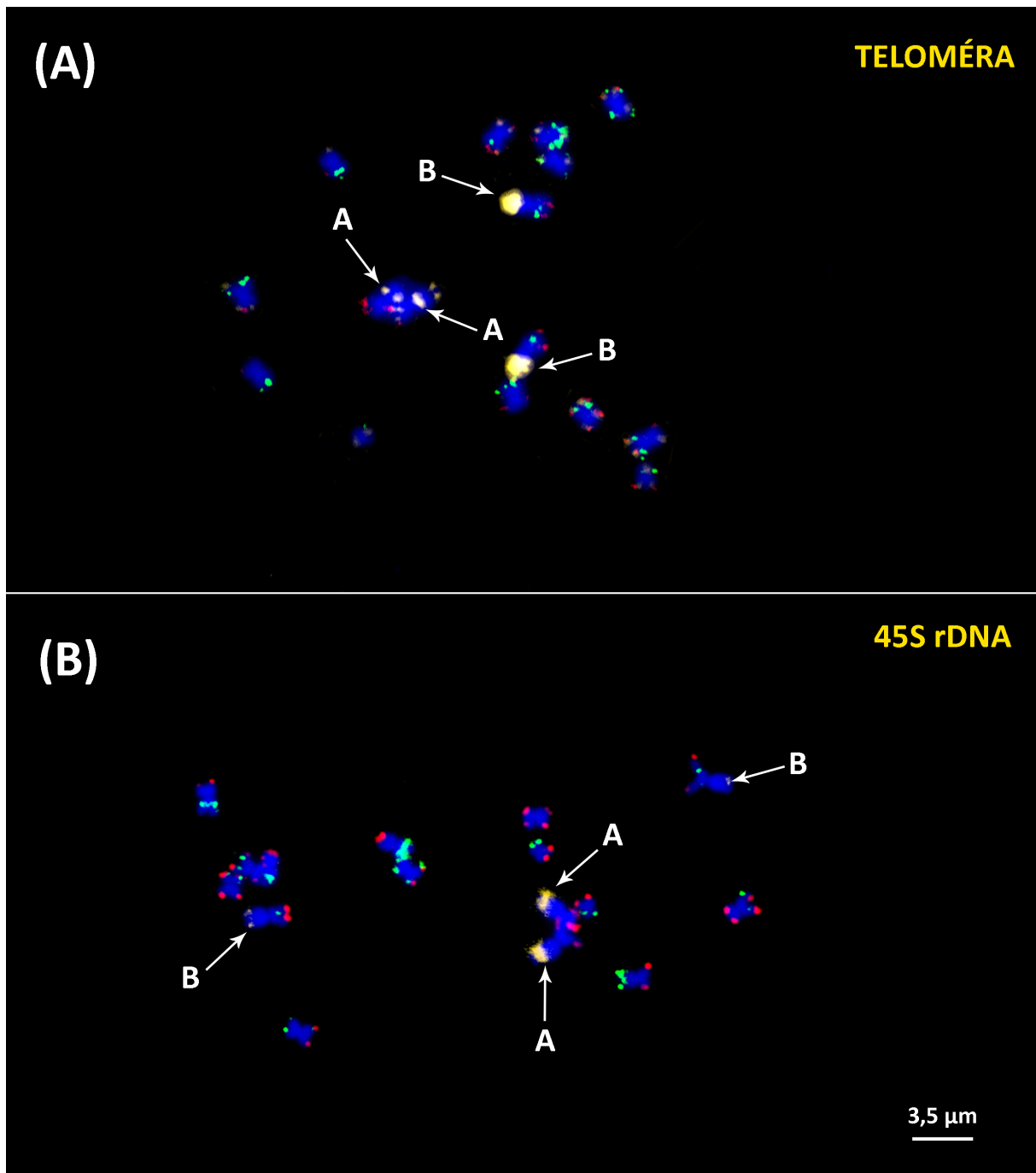
Pretože prístup oligo-maľovania chromozómov doposiaľ nebol u cíceru použitý, boli k identifikácii chromozómov použité tiež niektoré, v minulosti už zamapované, sekvencie. Za účelom mapovania chromozómov boli pripravené fluorescenčne značené sondy špecifické pre 45S rDNA a telomerickú repetíciu (5'-CCCTAAA-3')₄ (viz kapitola 4.4.6.- 4.4.8), ktoré následne hybridizovali na preparáty metafáznych chromozómov oboch kultivarov fixovaných na skle. FISH bola prevedená súčasne so špecifickým oligo-maľovacím systémom. Lokalizácia génu pre 45S rDNA a telomerickú repetíciu bola rovnaká pre oba kultivary a potvrdila identifikáciu chromozómov A a B.

Fluorescenčné signály odpovedajúce telomerickej repetícii boli podľa očakávaní lokalizované na koncoch každého chromozómu. Oblasti telomerického signálu sa však nachádzali i mimo telomerickú oblasť na 2 chromozómových pároch. Hlavný signál poskytovala distálna oblasť dlhého ramena chromozómu B a menej intenzívny klaster sa nachádzal v pericentromerickej oblasti chromozómu A (Obrázok 12 a 13 **(A)**).

Ďalej boli mapované gény pre 45S rDNA, ktoré sú zodpovedné za tvorbu organizátoru jadierka (NOR - nucleolus organizer region). Výrazný fluorescenčný signál sondy pre 45S rDNA sa nachádzal v satelitnej oblasti chromozómu A. Hybridizačné miesto poskytoval tiež chromozóm B, napriek tomu, že nenesie viditeľný satelit (Obrázok 12 a 13 **(B)**).



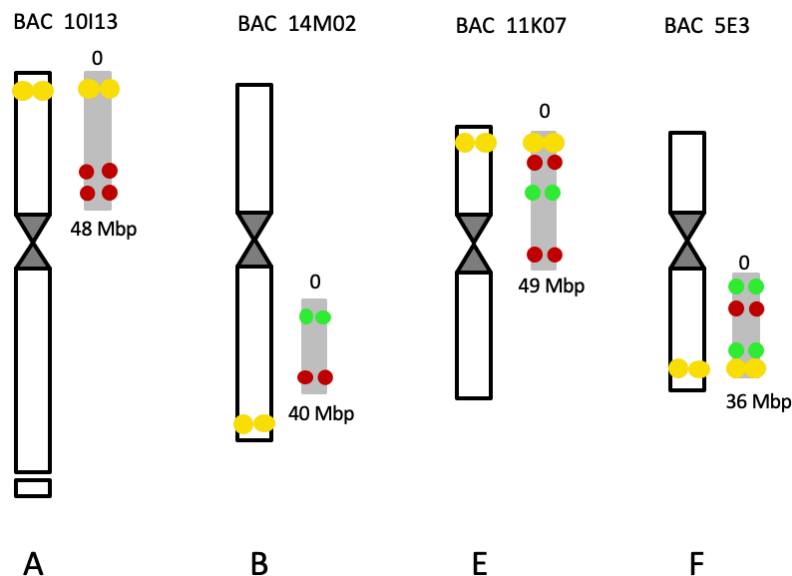
Obrázok 12: Príklady cytogenetického mapovania telomerickéj repetície a 45S rDNA na chromozómoch kultivaru Desi. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce 45S rDNA a telomére boli kolorované žltou farbou. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Lokalizácia telomerickéj repetície spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B. **(B)** Lokalizácia génov pre 45S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B.



Obrázok 13: Príklady cytogenetického mapovania telomerickéj repetície a 45S rDNA na mitotických chromozómoch kultivaru Kabuli. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce 45S rDNA a telomére boli kolorované žltou farbou. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI. **(A)** Lokalizácia telomerickéj repetície spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B. **(B)** Lokalizácia génov pre 45S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na chromozómoch A, B.

5.3 Mapovanie sond pripravených z izolovanej BAC DNA

Ako už bolo spomenuté, k identifikácii jednotlivých chromozómov a overeniu usporiadania pseudomolekúl bolo k oligo-maľovaciemu systému pridané tiež mapovanie už známych sekvencií. Knižnica BAC klonov, ktorú pripravila Zatloukalová *et al.* (2011) obsahovala celkom 7 680 BAC klonov a niekoľko z nich bolo v minulosti úspešne zamapovaných na chromozónoch kultivaru Desi, izolovaných prietokovou cytometriou. Na základe predchádzajúcich štúdií bol vytvorený návrh zostavy vybraných BAC klonov spolu s R-G oligo-maľovacím systémom na jednotlivých pseudomolekulách, odpovedajúcich chromozómom kultivaru Desi (Obrázok 14).

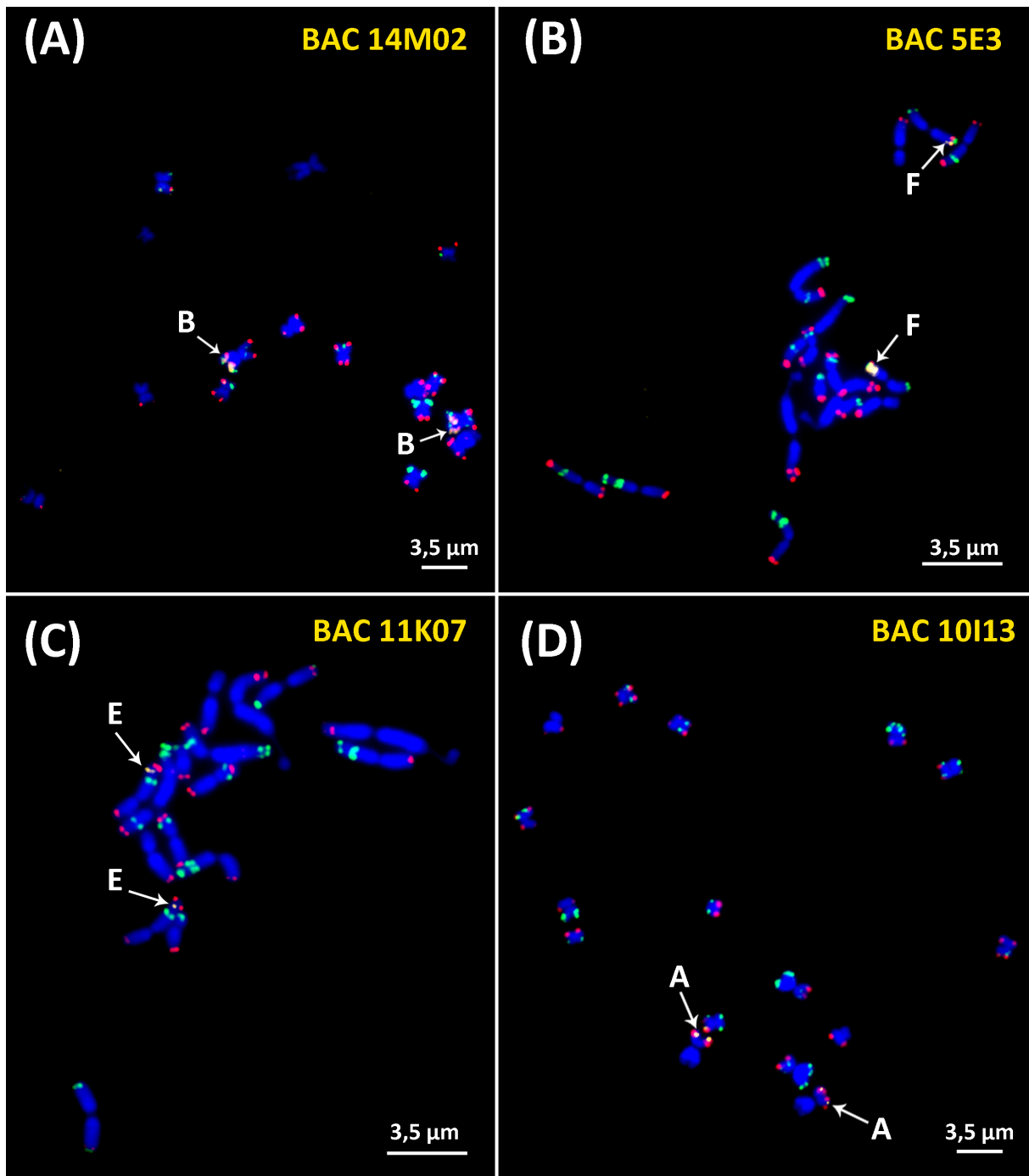


Obrázok 14: Návrh špecifických oligo-maľovacích sond R a G spolu s vybranými BAC klonmi na chromozónoch kultivaru Desi. Pozícia BAC klonov je znázornená žltými bodmi na schémach chromozómov. Predpokladaná lokalizácia vybratých BAC klonov spolu s R-G oligo-maľovacím systémom sú schematicky znázornené na pseudomolekulách odpovedajúcich jednotlivým chromozómom A, B, E a F.

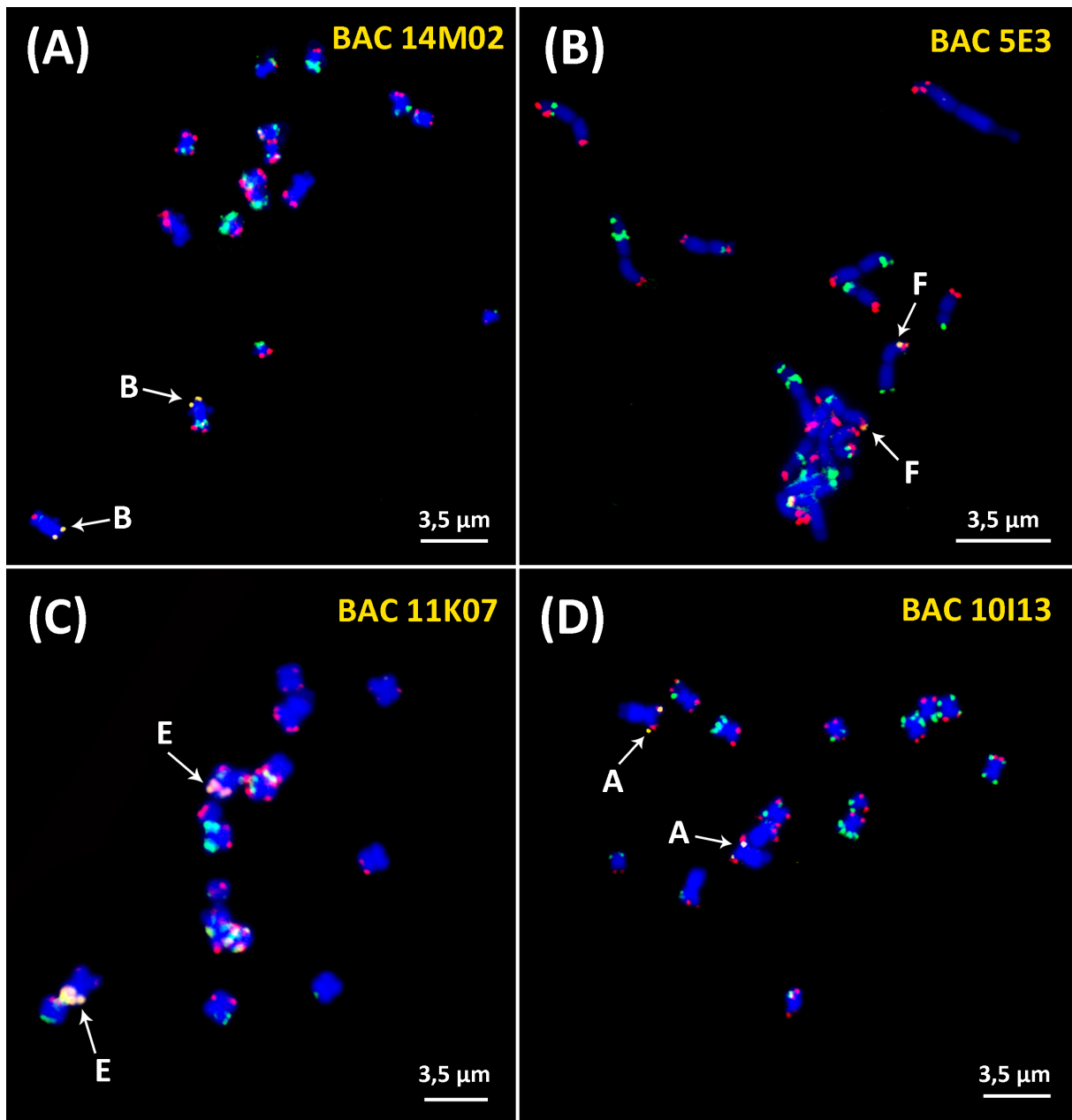
Vybraté BAC klony sa preukázali ako chromozómovo špecifické a po prevedení BAC-FISH, za použitia špecifických barkódovacích sond, bola potvrdená unikátnosť oligo-maľovacieho systému daných chromozómov. BAC-FISH spolu s použitím oligo-maľovacích sond R-G bola prevedená u oboch kultivarov s rovnakými výsledkami. V prípade mapovania polohy sond pripravených z izolovaných BAC klonov spolu s oligo-maľovacím systémom, sa

ako vhodné ukázali figúry s prometafáznymi chromozómami. Prometafázne chromozómy sú v porovnaní s metafáznymi rozťahnutejšie a poskytujú tak vyššie rozlíšenie jednotlivých sond.

BAC 14M02 bol lokalizovaný v subtelomerickkej oblasti dlhého ramena chromozómu B (Obrázok 15 a 16 **(A)**). Pozícia BAC klonu 5E3 na chromozóme F, bola oproti návrhu (Obrázok 14) posunutá bližšie centromerickej oblasti až za polohu oligo-maľovacích sond R-G (Obrázok 15 a 16 **(B)**). BAC 11K07 hybridizoval v subtelomerickkej oblasti dlhého ramena chromozómu E. Presná pozícia bola v porovnaní s návrhom (Obrázok 14) odlišná, hybridizačné miesto sa nachádzalo medzi lokusom pre oligo-maľováciu sondy R a G (Obrázok 15 a 16 **(C)**). BAC 10I13 vykazoval hybridizačný signál v subtelomerickkej oblasti krátkeho ramena chromozómu A, medzi červenými signálmi sondy R, ktorých poloha bola vzhľadom k návrhu invertovaná (Obrázok 15 a 16 **(D)**).



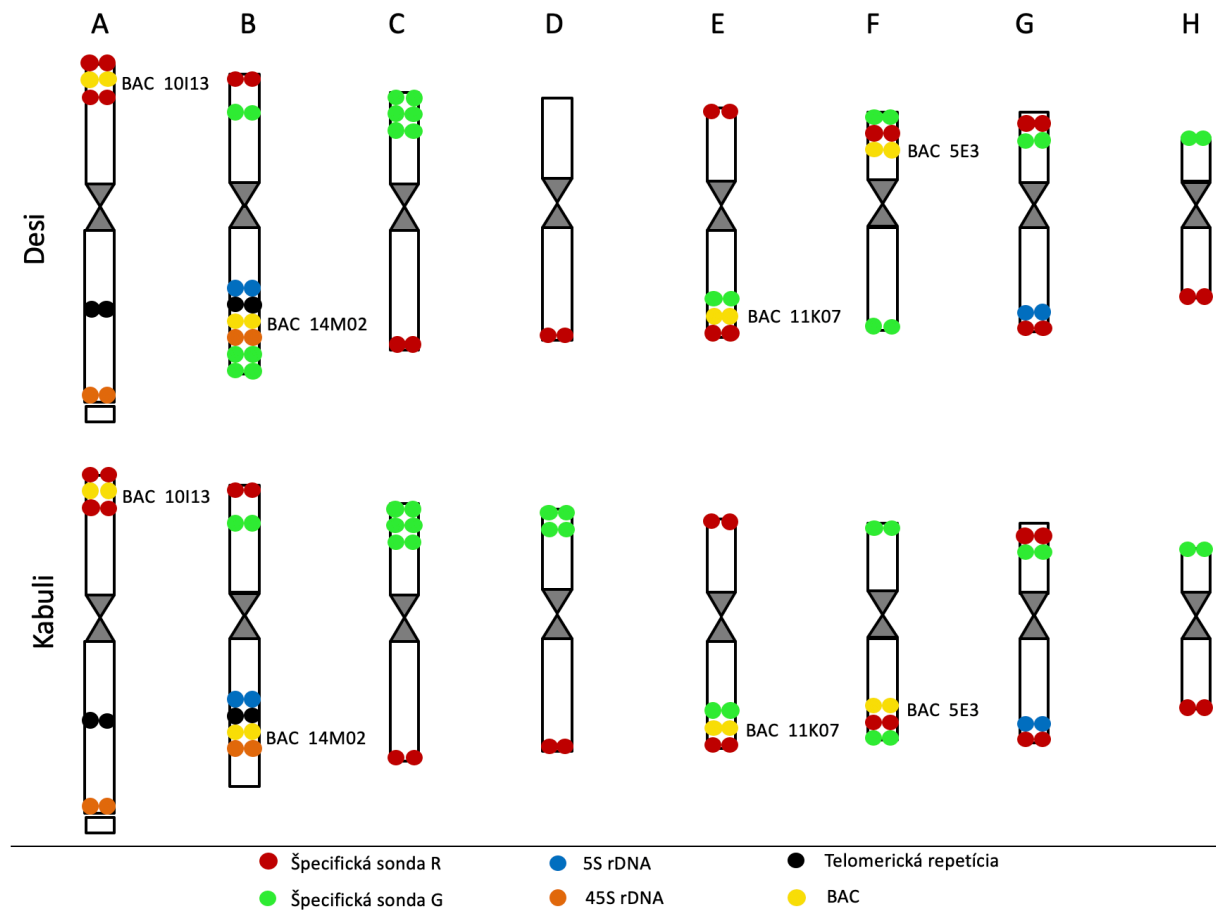
Obrázok 15: Príklady cytogenetického mapovania BAC klonov na chromozómoch kultivaru Desi. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-mal'ovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce BAC klonom boli kolorované žltou farbou. **(A)** Lokalizácia BAC klonu 14M02 na chromozóme B. **(B)** Lokalizácia BAC klonu na chromozóme F. **(C)** Lokalizácia BAC klonu 11K07 na chromozóme E. **(D)** Lokalizácia BAC klonu 10I13 na chromozóme A. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI.



Obrázok 16: Príklady cytogenetického mapovania BAC klonov na chromozómoch kultivaru Kabuli. Zelený signál odpovedá špecifickej oligo-maľovacej sonde G, červený signál odpovedá sonde R. Signály odpovedajúce BAC klonom boli kolorované žltou farbou. **(A)** Lokalizácia BAC klonu 14M02 na chromozóme B. **(B)** Lokalizácia BAC klonu na chromozóme F. **(C)** Lokalizácia BAC klonu 11K07 na chromozóme E. **(D)** Lokalizácia BAC klonu 10I13 na chromozóme A. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI.

5.4 Schematické znázornenie lokalizovaných sekvencií

Na základe pozorovania metafáznych figúr mitotických chromozómov po prevedení fluorescenčnej *in situ* hybridizácie s rôznymi kombináciami sond, boli zostavené idiogramy pre oba kultivary (Obrázok 17). V idiogramoch je schematicky zobrazená vzájomná lokalizácia jednotlivých mapovaných sond.

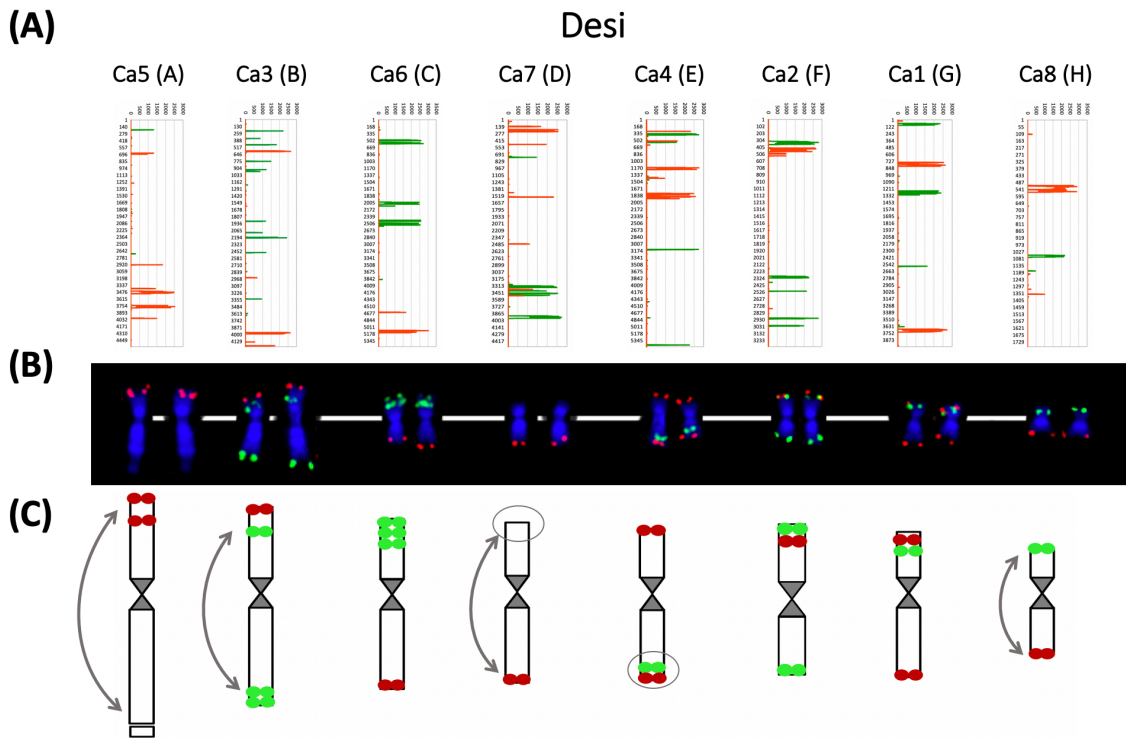


Obrázok 17: Schematické znázornenie poradia a kombinácie špecifických oligo-maľovacích sond R a G, sond pre rDNA gény, telomerickú repetíciu a sond pripravených z izolovanej BAC DNA v idiogramoch jednotlivých chromozómov A–H u oboch kultivarov.

5.5 Ukotvenie pseudomolekul po aplikácii FISH

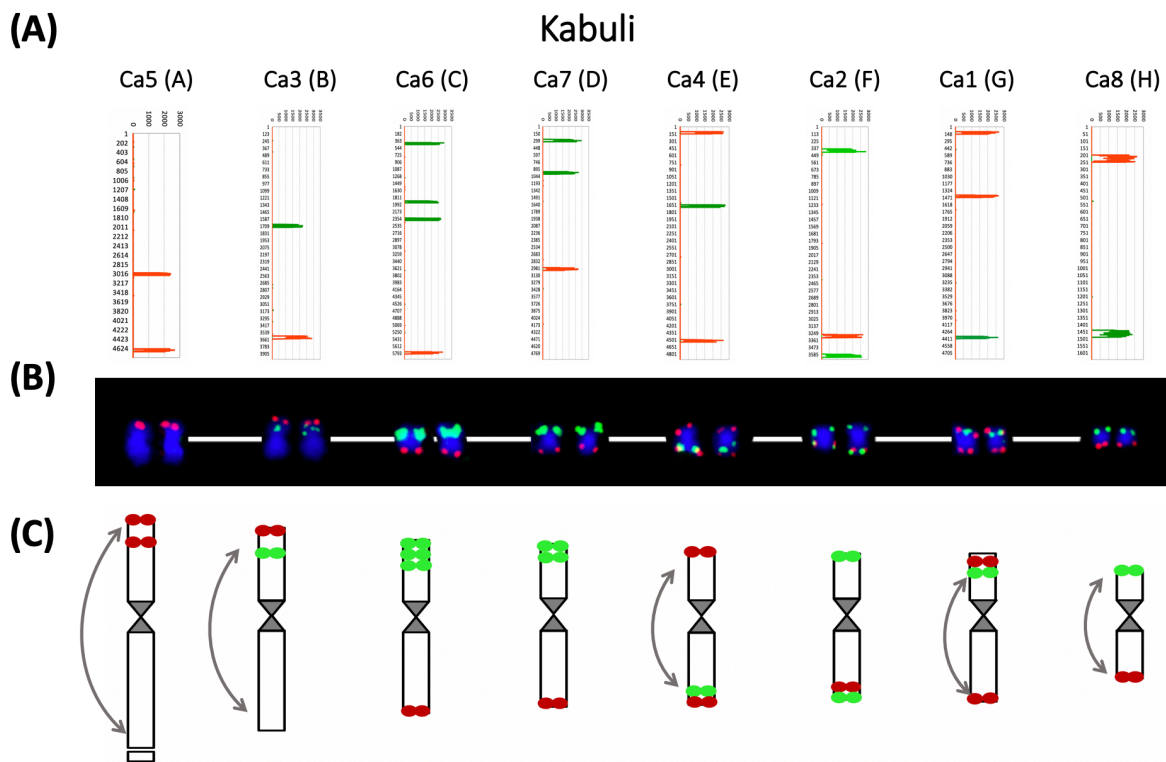
Po návrhu oligo-maľovacích sond (Obrázok 8) boli ich sekvencie spätne použité pre *in silico* analýzu, ktorá ukázala detailný vzor na pseudomolekulách (Ca1–Ca8) odpovedajúcich jednotlivým chromozómom u kultivaru Desi (Obrázok 18 (A)) a Kabuli (Obrázok 19 (A)). Technika FISH sa ukázala ako citlivá metóda, ktorá zobrazuje skutočnú pozíciu a kombináciu

navrhnutých oligo-maľovacích sond na jednotlivých chromozómoch cíceru (Obrázok 18 a 19 (B)). Na základe pozorovaných signálov bolo možné zostaviť schematické idiogramy pre jednotlivé chromozómy spolu s oligo-maľovacími sondami (Obrázok 18 a 19 (C)). Spojením výsledkov FISH s *in silico* analýzou bolo možné odhaliť chyby v orientácii a zostavení jednotlivých referenčných pseudomolekúl.



Obrázok 18: Porovnanie *in silico* analýzy navrhnutého oligo-maľovacieho systému spolu s výsledkami fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. **(A)** *In silico* mapovanie navrhnutých oligo-maľovacích sond na pseudomolekuly Ca1–Ca8, odpovedajúce chromozómom A–H. Červený signál odpovedá oligo-maľovacej sonde R, zelený signál sonde G. **(B)** Karyotyp zostavený na základe výsledkov FISH s využitím oligo-maľovacích sond R (červený signál) a G (zelený signál). **(C)** Schematické znázornenie pozície a kombinácie oligo-maľovacích sond R (červené body) a G (zelené body) na základe výsledkov po aplikácii FISH. Rozdiely v orientácii alebo zostave jednotlivých pseudomolekúl oproti FISH analýze sú znázornené schematicky pomocou šípiek a zakrúžkovaných častí chromozómov.

Porovnaním polohy signálov po aplikácii FISH s *in silico* analýzou u chromozómov kultivaru Desi (Obrázok 18), bolo zistené, že pseudomolekuly Ca5 (A), Ca3 (B) a Ca8 (H) sú invertované. Rovnako poloha pseudomolekuly Ca7 (D) je opačná a rozdiel oproti *in silico* analýze je tiež v absencii zeleného signálu. U pseudomolekuly Ca4 (E) neodpovedajú polohy signálov po prevedení FISH *in silico* analýze, čo značí chybné zostavenie pseudomolekuly. Pozícia a orientácia signálov na pseudomolekulách Ca1 (G), Ca2 (F) a Ca6 (C) bola po aplikácii FISH zhodná s *in silico* návrhom.



Obrázok 19: Porovnanie *in silico* analýzy navrhnutého oligo-maľovacieho systému spolu s výsledkami fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. **(A)** *In silico* mapovanie navrhnutých oligo-maľovacích sond na pseudomolekuly Ca1–Ca8, odpovedajúce chromozómom A–H. Červený signál odpovedá oligo-maľovacej sonde R, zelený signál sonde G. **(B)** Karyotyp zostavený na základe výsledkov FISH s využitím oligo-maľovacích sond R (červený signál) a G (zelený signál). **(C)** Schematické znázornenie pozície a kombinácie oligo-maľovacích sond R (červené body) a G (zelené body) na základe výsledkov po aplikácii FISH. Rozdiely v orientácii jednotlivých pseudomolekul oproti FISH analýze sú znázornené schematicky pomocou šípiček.

Rovanko boli na základe výsledkov FISH s využitím oligo-maľovacích sond R a G ukotvené pseudomolekuly u chromozómov typu Kabuli (Obrázok 19). Podobne ako u predchádzajúceho kultivaru, sú pseudomolekuly Ca5 (A), Ca3(B) a Ca8 (H) invertované. Opačnú orientáciu tiež vykazuje pseudomolekula Ca4 (E) a u pseudomolekuly Ca1 (G) došlo k inverzii červeného a zeleného signálu. Orientácia a poloha jednotlivých signálov po prevedení FISH je zhodná s *in silico* mapovaním v prípade pseudomolekúl Ca6 (C), Ca7 (D) a Ca2 (F).

6 DISKUSIA

Hlavným cieľom tejto práce bolo previesť cytogenetickú analýzu a identifikovať tak jednotlivé chromozómy v karyotype dvoch hospodársky významných kultivarov cíceru - Desi a Kabuli, s využitím novej techniky oligo-maľovania chromozómov. Identifikácia jednotlivých chromozómov tvorí základ analýzy karyotypu a kvôli nedostatku chromozómovo-špecifických markerov môže byť výzvou u väčšiny nemodelových rastlinných druhov. Najpopulárnejšou technikou slúžiacou k identifikácii chromozómov u rastlín sa stala fluorescenčná *in situ* hybridizácia, najčastejšie využívajúca typy sond na bázy repetitívnych sekvencií DNA a BAC klonov. Je však často náročné nájsť repetíciu, ktorá po aplikácii FISH produkuje na jednotlivých chromozómoch odlišné signály. Navyše signály z repetitívnych sond DNA môžu byť vysoko polymorfne medzi rôznymi odrodami, čo môže byť v dôslednej identifikácii chromozómov prekážka (Jiang *et al.*, 2006). Prístup identifikácie jednotlivých chromozómov s použitím sond na báze BAC klonov, zas závisí od dostupnosti knižnice genómovej DNA s veľkými inzertami a náročnej izolácie klonov, ktoré sú chromozómo-špecifické (Jiang *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2000). Pokrok v analýze karyotypu priniesla možnosť izolácie jednotlivých chromozómov. Spojením techniky FISH s metódou triedenia chromozómov prietokovou cytometriou, bol postupne zostavený najnovší dostupný karyotyp cíceru (Vláčilová *et al.*, 2002; Zatloukalová *et al.*, 2011; Karafiátová *et al.*, 2017).

Nedávno bola za účelom identifikácie jednotlivých chromozómov v karyotype rastlín vyvinutá nová trieda sond pre FISH, založená na združení jednokópiových oligonukleotidov. Pokiaľ je k dispozícii genomická sekvencia cieľového druhu, je možné paralelne systentizovať oligá, ktoré sú špecifické pre chromozomálnu oblasť alebo pre celý chromozóm, fluorescenčne ich označiť a použiť ako sondy pre FISH (Han *et al.*, 2015; Jiang, 2019). Maľovanie chromozómov s využitím oligo-sond má v porovnaní s bežne využívanými stratégiami identifikácie chromozómov niekoľko výhod. Predovšetkým nevyžaduje predchádzajúce triedenie alebo disekciu chromozómov, čo výrazne urýchľuje a zjednodušuje analýzu (napr. Albert *et al.*, 2018; Braz *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020; Xin *et al.*, 2020). Signálne vzory FISH odvodené od oligo-maľovacích sond nie sú medzi rôznymi odrodami toho istého druhu polymorfne. Modifikácia vzoru by naznačovala potenciálne chromozomálne preusporiadanie spojené s kultivarom. Oligo-maľovacie sondy môžu byť teda použité tiež u príbuzných druhov (Braz *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). Bolo demonštrované, že oligo-sondy vyvinuté na základe sekvencií zemiakov boli užitočné k identifikácii jednotlivých homeológnych chromozómov u vzdialene príbuzných druhov, napríklad paradajky (Braz *et al.*,

2018). Oligo-maľovacie sondy sú tiež nákladovo efektívne. Napriek vyšším obstarávacím nákladom poskytuje každá syntetizovaná knižnica dostatok templátovej DNA pre celkovo 1 200 000 experimentov a možno ju teda použiť ako trvalý zdroj pre navrhnutú sondu (Han *et al.*, 2015).

Veľkou výhodou sond na báze oligonukleotidov je, že môžu byť špeciálne navrhnuté na základe cieľov výskumného projektu. V štúdiách vypracovaných na rastlinách boli demonštrované dva typy oligo-maľovacích sond. Prvý typ obsahuje oligá pokrývajúce celý chromozóm, s výnimkou vysoko repetitívnych oblastí, napríklad centromér. Každá celochromozómová oligo-maľovacia sonda však umožňuje identifikáciu iba jedného chromozómu, v rôznych štádiách kondenzácie chromatinu. Oligo-maľovanie chromozómov so sondami pokrývajúcimi celé chromozómy bolo využité u jahody (Li *et al.*, 2017), ryže (Hou *et al.*, 2018), kukurice (Albert *et al.*, 2019), či banánovníku (Šimoníková *et al.*, 2019). Druhý typ sond obsahuje oligá vytvorené z viacerých oblastí viacerých chromozómov. Takéto sondy generujú vzory fluorescenčných signálov na každom chromozóme daného rastlinného druhu. Signály FISH v tomto prípade tvoria na každom chromozóme unikátny „čiarový kód“, čo umožňuje identifikáciu všetkých chromozómov v karyotype. Táto stratégia sa úspešne preukázala u zemiakov (Braz *et al.*, 2018), ryže (Liu *et al.*, 2020) cukrovej trstiny (Meng *et al.*, 2020), alebo kukurice (Braz *et al.*, 2020) a bola použitá tiež v tejto práci.

V rámci predkladanej štúdie boli testované dve špecifické oligo-maľovacie sondy, sonda R (červená) obsahujúca 18 667 oligonukleotidov a sonda G (zelená) obsahujúca 19 917 oligonukleotidov. Tieto sondy hybridizovali do 22 špecifických miest na chromozómoch cíceru. Napriek skutočnosti, že dostupná referenčná sekvencia genómu u oboch kultivarov nedosahuje ani 40 %, bola dostačujúca na návrh dvojfarebných oligo-sond produkujúcich unikátny vzor fluorescenčných signálov na každom z ôsmich cícerových chromozómov. Po prevedení FISH u kultivaru Desi aj Kabuli boli úspešne identifikované jednotlivé chromozómy s výnimkou chromozómu G a E. Ich čiarový kód, tvorený fluorescenčnými signálmi R-G oligo-maľovacieho systému, nebol chromozómovo-špecifický. Z tohto dôvodu boli pre identifikáciu chromozómov využité sondy pre ribozomálnu DNA, ktoré už boli zamapované v predchádzajúcej štúdií od Zatloukalová *et al.* (2011). Mapovaním chromozómov s R-G oligo-maľovacími sondami spolu so sondami pre rDNA sa podarilo zostaviť karyotyp cíceru. Použitý oligo-maľovací systém sa tiež preukázal ako dostatočne citlivý k odhaleniu chýb v zostave pseudomolekúl, odpovedajúcich jednotlivým chromozómom u oboch kultivarov.

V tejto práci bola pozorovaná modifikácia signálov navrhnutých sond medzi kultivarmi Desi a Kabuli, konkrétne u chromozómov B a D. Chromozóm B u kultivaru Desi niesol o dva

signály zelenej sondy viac ako rovnaký chromozóm u typu Kabuli a naopak, chromozóm D u kultivaru Desi obsahoval o dva signály sondy G menej, ako odpovedajúci chromozóm v kultivare Kabuli. Táto skutočnosť naznačovala translokáciu časti dlhého ramena chromozómu B a krátkeho ramena chromozómu D medzi kultivarmi. Hypotézu o translokácii podporovali aj výsledky meraní absolútnych dĺžok jednotlivých chromozómov oboch kultivarov. Chromozóm D u kultivaru Desi je submetacentrický, zatiaľ čo rovnaký chromozóm u kultivaru Kabuli je metacentrického typu. Chromozóm B u Desi je naopak väčší v porovnaní s rovnakým chromozómom u Kabuli. Na základe predpokladov prestavby karyotypu bola navrhnutá ďalšia oligo-maľovacia sonda, špecifická pre predpokladanú translokovanú oblasť na chromozóme D. Výsledky oligo-maľovania chromozómov s využitím tejto sondy, spolu s R-G oligo-maľovacím systémom predpokladanú translokáciu potvrdili. Táto prestavba karyotypu by mohla súvisieť s vývojom druhu, pretože je známe, že oba kultivary zdieľajú spoločný pôvod, avšak typ Kabuli bol vyvinutý z typu Desi cieľenou selekciou semien (Gil *et al.*, 1993). Už predchádzajúce štúdie priniesli dôkazy o tom, že oligo-maľovanie chromozómov, využívajúce dvojfarebný systém sond, môže identifikovať štrukturálne chromozomálne aberácie, ako sú delécie, duplikácie, inverzie či translokácie, na základe vzájomnej vzdialenosti a existencie fluorescenčných signálov sond. Napríklad Šimoníková *et al.* (2019) v štúdiu na banánovníku, dokázali pomocou dvojfarebných celochromozómových oligo-maľovacích sond, identifikovať translokáciu dlhého ramena chromozómu 3 a dlhého ramena chromozómu 1 u *Musa balbisiana* (B genóm). Braz *et al.*, 2018 zas demonštrovali využitie oligo-maľovacích sond vytvárajúcich unikátny chromozomálny vzor, na odhalenie interchromozomálnej translokácie chromozomálnych segmentov u druhov *Solanum tuberosum* a *Solanum caripense*. V štúdiu od Meng *et al.* (2018) bol dvojfarebný oligo-maľovací systém použitý k demonštrácii preskupenia segmentov chromozómov medzi *Sacharum spontaneum* a príbuzným čirokom. Oligo-maľovanie chromozómov sa preukázalo ako citlivá metóda na odhalenie chromozomálnych aberácií rovnako medzi rôznymi líniami kukurice (Albert *et al.*, 2018; Braz *et al.*, 2020).

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia využívajúca oligo-maľovacie sondy môže byť kombinovaná so sondami na báze repetícií alebo BAC klonov, čo prispieva k detailnejšej analýze karyotypu (Albert *et al.*, 2018). Navyše identifikácia chromozómov metódou oligo-maľovania nebola doteraz u cíceru použitá. Z týchto dôvodov bolo ďalším cieľom predkladanej práce mapovanie, v minulosti už lokalizovaných, sond špecifických pre rDNA gény, telomerickú repetíciu a vybrané BAC klony. Lokalizácia génu pre 5S rDNA spolu s R-G oligo-maľovacím systémom umožnila jednoznačnú identifikáciu všetkých chromozómov v karyotype oboch

kultivarov cíceru. Sonda pre 5S rDNA hybridizovala na chromozóm B a G, čo je v súlade so štúdiou od Vláčilová *et al.* (2002), kde bola FISH prevedená na triedených chromozómoch. So sondou pre 45S rDNA hybridizovali 2 páry chromozómov - A a B, napriek tomu, že iba chromozóm A nesie viditeľný satelit. Táto skutočnosť by mohla súvisieť s evolučným vývojom druhu, pretože 45S rDNA gény sú vysoko evolučne konzervované. Ako už bolo spomenuté, progenitorom kultivovaného *Cicer arietinum* je divoký predok *Cicer reticulatum*, u ktorého boli pozorované až dva páry satelitných chromozómov (Ohri *et al.*, 1991). Ďalším dôvodom, prečo bolo v tejto práci vizualizovaných viac lokusov pre 45S rDNA, môže byť použitie nižšej stringencie - 70%, pri ktorej sú hybridizačné podmienky nižšie. Táto hodnota stringencie bola zvolená, pretože sa preukázala ako optimálna pre hybridizáciu použitých oligo-maľovacích sond.

Ďalej bola mapovaná telomerická repetícia typu *Arabidopsis*. Rovnako ako v práci Zatlouková *et al.* (2011), aj v tejto štúdií bola teloméra lokalizovaná na koncoch všetkých chromozómov a intenzívne signály boli pozorované na chromozómoch A a B. Zatlouková *et al.* (2011) vo svojej štúdií tiež pripravili parciálnu knižnicu BAC klonov a niekoľko z nich úspešne mapovali na chromozómy kultivaru Desi. V predkladanej práci boli z pripravenej knižnice vybraté 4 BAC klony (14M02, 5E3, 11K07, 10I13) a spolu s R-G oligo-maľovacím systémom boli mapované na chromozómy kultivaru Desi aj Kabuli s rovnakými výsledkami. Všetky štyri BAC klony sa preukázali ako chromozómovo špecifické pre chromozómy B, F, E, A a potvrdili tak spoľahlivú identifikáciu chromozómov pomocou oligo-maľovacieho systému.

Nakoniec boli sekvencie špecifických oligo-maľovacích sond po návrhu na chromozómy kultivaru Desi spätne podrobené *in silico* analýze. Počítačová analýza ukázala detailný vzor oligo-maľovacích sond na zostavených pseudomolekulách, odpovedajúcich jednotlivých chromozómom u oboch kultivarov. Bolo možné spojiť *in silico* analýzu sekvencií oligo-sond s ich cytogenetickým mapovaním pomocou FISH, na základe čoho boli potvrdené opačné orientácie pseudomolekúl alebo chyby v ich zostave.

7 ZÁVER

V predkladanej práci bol analyzovaný karyotyp dvoch hospodársky významných kultivarov cíceru baranieho - Desi a Kabuli. Primárnym cieľom bolo identifikovať jednotlivé chromozómy v karyotype novou metódou oligo-maľovania chromozómov. Za týmto účelom boli využité dvojfarebné oligo-maľovacie sondy R (červená) a G (zelená). Po pevedení FISH poskytovali oligo-maľovacie sondy na chromozómoch oboch kultivarov unikátny vzor fluorescenčných signálov, čo umožnilo ich identifikáciu. Výnimkou bol pár chromozómov E a G, u ktorých fluorescenčný signál sond nebol chromozómovo-špecifický. K jednoznačnej diferenciacii týchto chromozómov sa ako účinný nástroj ukázalo mapovanie génov pre 5S rDNA.

Z dôvodu využitia techniky, ktorá doteraz u cíceru nebola použitá, bolo ďalším cieľom práce cytogenetické mapovanie v minulosti už zamapovaných sekvencií - telomerickéj repetície typu *Arabidopsis*, 45S rDNA a vybratých BAC klonov. Lokalizácia spomínaných sekvencií bola v súlade s výsledkami predchádzajúcich štúdií a potvrdila spoľahlivosť identifikácie jednotlivých chromozómov pomocou oligo-maľovacieho systému.

Oligo-maľovanie chromozómov s využitím dvojfarebných sond sa u cíceru tiež preukázalo ako dostatočne citlivé k odhaleniu translokácie časti chromozómov vrámci druhu. Po porovnaní výsledkov cytogenetickej analýzy s *in silico* návrhom oligo-sond, boli odhalené chyby v orientácii či zostave referenčných pseudomolekúl, odpovedajúcich jednotlivým chromozómom v karyotype oboch kultivarov cíceru baranieho.

8 LITERATÚRA

- Abbo S., van-Oss Pinhasi R., Gopher A., Saranga Y., Ofner I. *et* Peleg Z. (2014): Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Science* 19(6):351–360.
- Ahmad F., Gaur P.M. *et* Croser J. (2005): Chickpea (*Cicer arietinum* L.): In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement—grain legumes. vol 1. CRC Press, Boca Raton 187–217.
- Ahmad F. *et* Hymowitz T. (1993): The fine structure of chickpea (*Cicer arietinum* L.) chromosomes as revealed by pachytene analysis. *TAG. Theoretical and Applied Genetics* 86:637–641.
- Albert P. S., Zhang T., Semrau K., Rouillard J.-M., Kao Y.-H., Wang C.-J. R. *et* Birchler J. A. (2019): Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201813957.
- Aliyeva-Schorr L., Beier S., Karafiátová M., Schmutzer T., Scholz U., Doležel J., Stein N. *et* Houben A. (2015): Cytogenetic mapping with centromeric bacterial artificial chromosomes contigs shows that this recombination-poor region comprises more than half of barley chromosome 3H. *The Plant Journal* 84:385–394.
- Amosova A. V., Bolsheva N. L., Zoshchuk S. A., Twardovska M. O., Yurkevich O. Y., Andreev I. O., Samatadze T. E., Badaeva E. D., Kunakh V. A *et* Muravenko O. V. (2017): Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (*Poaceae*) species. *PloS One* 12 (4): e0175760.
- Arnon I. (1972): *Crop Production in Dry Regions, Vol I* (Leonard Hill Books, London, UK).
- Bennett M. D. *et* Smith J. B. (1976): Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 274(933): 227–274.
- Braz G. T., He L., Zhao H., Zhang T., Semrau K. *et* Rouillard J. M. (2018): Comparative oligo-FISH mapping: An efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution. *Genetics* 208 (2): 513–523.
- Braz G. T., do Vale Martins, L., Zhang T., Albert P. S., Birchler J. A. *et* Jiang J. (2020): A universal chromosome identification system for maize and wild *Zea* species. *Chromosome Research* 28: 183–194.

- Buhariwalla H.K., Jayashree B., Eshwar K. *et* Jonathan H.C. (2005): Development of ESTs from chickpea roots and their use in diversity analysis of the *Cicer* genus. *BMC Plant Biology* 5:16.
- Cheng Z., Buell C.R., Wing R.A. *et* Jiang J. (2002): Resolution of fluorescence *in situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chromosome Research* 10: 379–387.
- Danilova T. V., Friebe B. *et* Gill B. S. (2014): Development of wheat single gene FISH map for analyzing homoeologous relationship and chromosomal rearrangements within the triticeae. *Theoretical and Applied Genetics* 127 (3): 715–730.
- Doležel J., Doleželová M., Roux N. *et* Van den houwe I. (1998): A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa spp.* *Infomusa* 7: 3-4.
- Doležel J., Kubaláková M., Bartoš J. *et* Macas J. (2004): Flow cytogenetics and plant genome mapping. *Chromosome Research* 12:77–91.
- Doležel, J. (2005): Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95(1): 99–110.
- Dong F. G., J. Q. Song, S. K. Naess, J. P. Helgeson *et* C. Gebhardt (2000): Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1001–1007.
- Edwards D., Batley J. *et* Snowdon R. (2013): Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. *Theoretical and Applied Genetetics* 126: 1–11.
- FAO, FAOSTAT statistical database. Dostupné z: www.fao.org/faostat [navštívené 9.11. 2020].
- Ferguson-Smith M. A. *et* Trifonov V. (2007): Mammalian karyotype evolution. *Nature Reviews Genetics* 8: 950-962.
- Friebe B., Endo T. R. *et* Gill B. S. (1996): Chromosome banding methods, pp. 123–153 in *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*, edited by K. Fukui, and S. Nakayama. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Fukui K., Ohmido N. *et* Khush G.S. (1994): Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 87:893–899.
- Gall J.G. *et* Pardue M. L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrides molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 63: 378–383.

- Galasso I. *et* Pignone D. (1992): Characterization of chickpea chromosomes by banding techniques. *Genetic Resources and Crop Evolution* 39:115–119.
- Galasso I., Pignone D., Frediani M., Maggiani M. *et* Cremonini R. (1996): Chromatin characterization by banding techniques, *in situ* hybridization and nuclear DNA content in *Cicer L. (Leguminosae)*. *Genome* 39:258–265.
- Gaur P. M., Jukanti A. K., Srinivasan S. *et* Gowda C. L. L. (2012): Chickpea (*Cicer arietinum* L.). In D. N. Bharadwaj (Ed.), *Breeding of field crops*. Agrobios (India): Jodhpur 165–194.
- Gil J., Nadal S., Luna D., Moreno M.T. *et* De Haro A. (1996): Variability of some physico-chemical characters in Desi and Kabuli chickpea types. *Journal of Science and Food Agriculture* 71:179–184.
- Gil J. *et* Cubero J.I. (1993): Inheritance of seed coat thickness in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its evolutionary implications. *Plant Breeding* 111:257–260.
- Gerlach W. L. *et* Bedbrook J. R. (1979): Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic acids research* 7(7): 1869–1885.
- Giorgi D., Farina A., Grosso V., Gennaro A., Ceoloni C. *et* Lucretti S. (2013): FISHIS: Fluorescence *In Situ* Hybridization in Suspension and Chromosome Flow Sorting Made Easy. *PLoS ONE* 8(2): e57994
- Han Y., Zhang T., Thammapichai P., Weng Y. *et* Jiang J. (2015): Chromosome-specific painting in *Cucumis* species using bulked oligonucleotides. *Genetics*, 200: 771–779.
- He L., Zhao H., He J., Yang Z., Guan B., Chen K. *et* Jiang J. (2020): Extraordinarily conserved chromosomal synteny of Citrus species revealed by chromosome-specific painting. *The Plant Journal* 103: 2225–2235.
- Hou L.L., Xu M., Zhang T., Xu Z., Wang W., Zhang J., Yu M., Ji W., Zhu C., Gong Z., Gu M., Jiang J. *et* Yu H. (2018): Chromosome painting and its applications in cultivated and wild rice. *BMC Plant Biology* 18: 110.
- Hulse J.H. (1994): Nature, composition, and utilization of food legumes. In: Muehlbauer F.J., Kaiser W.J. (eds) *Expanding the production and use of cool season food legumes*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 77–97.
- Jain M., Misra G., Patel R. K., Priya P., Jhanwar S., Khan A. W., Shah N., Singh V. K., Garg R., Jeena G., Yadav M., Kant C., Sharma P., Yadav G., Bhatia S., Tyagi Ak. K. *et* Chattopadhyay D. (2013): A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). *The Plant Journal* 74(5): 715–729.

- Jambunathan R. *et* Singh U. (1981): Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars-3. Mineral and trace elements composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29:1091–1093.
- Jiang J., Gill B. S., Wang G. L., Ronald P. C. *et* Ward D. C. (1995): Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(10): 4487–4491.
- Jiang J., Hulbert S.H., Gill B.S. *et* Ward D.C. (1996): Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. *Molecular Genetics and Genomics* 252(5): 497–502.
- Jiang J. *et* Gill B.S. (2006): Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49: 1057–1068.
- Jiang J. (2019): Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research* 27: 153–165.
- John H. A., Birnstiel M. L. *et* Jones K.W. (1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582–587.
- Jukanti A.K., Gaur P.M., Gowda C.L.L. *et* Chibbar R.N. (2012): Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition* 108 (S1): S11–S26.
- Karafiátová M., Hřibová E. *et* Doležel J. (2017): Cytogenetics of *Cicer*. *The Chickpea Genome* 25–41.
- Kato, A., Kato, A., Albert, P. S., Vega, J. M., Kato, A., Albert, P. S. *et* 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 and Histochemistry* 81(2–3): 71–78.
- Kejnovský E., Vrána J., Matsunaga S., Soucek P., Siroký J., Dolezel J. *et* Vyskot B. (2001): *Genetics* 158(3): 1269–1277.
- Kordi M., Majd A., Valizadeh M., Sheidai M. *et* Sabaghpour H. (2006): A comparative study of chromosome morphology among some genotypes of *Cicer arietinum* L. *Pakistan. Journal of Biological Science* 9:1225–1230.
- Kubaláková M., Vrána J., Číhalíková J., Šimková H. *et* Doležel J. (2002): Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104:1362–1372.

- Kubaláková M., Kovářová P., Suchánková P., Číhalíková J., Bartoš J., Lucretti S., Watanabe N., Kianian S.F. *et* Doležel J. (2005): Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics* 170: 823–829
- Kujur A., Bajaj D., Upadhyaya H.D., Das S., Ranjan R., Shree T., Saxena M. S., Badoni S., Kumar V., Tripathi S., Gowda C. L. L., Sharma S., Singh S., Tyagi A. K. *et* Parida S. K. (2015): Employing genome-wide SNP discovery and genotyping strategy to extrapolate the natural allelic diversity and domestication patterns in chickpea. *Frontiers in Plant Science* 6:162.
- Kumar J. *et* Rao B. V. (1996): Super early chickpea developed at ICRISAT Asia center. *International Chickpea Pigeonpea Newsletter* 3: 17–18.
- Ladizinsky G. (1975): A new *Cicer* from Turkey. *Notes Royal Botany Gard Edinburgh*, 34: 201–202.
- Ladizinski G. *et* Adler A. (1976a): The origin of the chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 25: 211–217.
- Ladizinski G. *et* Adler A. (1976b): Genetic relationship among the annual species of *Cicer* L. *TAG. Theoretical and Applied Genetics* 48:197–203.
- Langer-Safer P. R., Levine M. *et* Ward D. C. (1982): Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79(14): 4381–4385.
- Li H. *et* Durbin R. (2010): Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26(5): 589–595.
- Liu W., Rouse M., Friebe B., Jin Y., Gill B. *et* Pumphrey M. O. (2011). Discovery and molecular mapping of a new gene conferring resistance to stem rust, Sr53, derived from *Aegilops geniculata* and characterization of spontaneous translocation stocks with reduced alien chromatin. *Chromosome Research* 19(5): 669–682.
- Liu X., Sun S., Wu Y., Zhou Y., Gu S., Yu H., Yi C., Gu M., Jiang J., Liu B., Zhang T. *et* Gong, Z. (2019). Dual-color oligo-FISH can reveal chromosomal variations and evolution in *Oryza* species. *The Plant Journal* 101: 112–121.
- Lou Q. F., Zhang Y. X., He Y. H. , Li J., Jia L., Cheng C., Guan W., Yang S. *et* Chen J. (2014): Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. *Plant Journal* 78: 169–179.
- Lukumbuzya M., Schmid M., Pjevac P. *et* 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., Fransz P.F., Ali H.B.M. *et* Schubert I. (2001): Chromosome-painting in *A. thaliana*. *Plant Journal* 28: 689–697.
- Lysak M. A., Koch M. A., Pecinka A. *et* Schubert I. (2005): Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. *Genome Research* 15: 516–525.
- Lysak M. A., Berr A., Pecinka A., Schmidt R., McBreen K. *et* Schubert I. (2006): Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related *Brassicaceae* species. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 103: 5224–5229.
- Macas J., Doležel J., Lucretti S., Pich U., Meister A., Fuchs J. *et* Schubert I. (1993): Localization of seed protein genes on flow-sorted field bean chromosomes. *Chromosome Research* 1:107–115.
- Mandáková T. *et* Lysak M. A. (2008): Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x=7$ Crucifer species (*Brassicaceae*). *Plant Cell* 20: 2559–2570.
- Mandáková T., Joly S., Krzywinski M., Mummenhoff K. *et* Lysak M. A. (2010): Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 2277–2290.
- Meng Z., Zhang Z., Yan T., Lin Q., Wang Y., Huang W., Li Z., Yu Q., Wang J. *et* Wang K. (2018): Comprehensively Characterizing the Cytological Features of *Saccharum spontaneum* by the Development of a Complete Set of Chromosome-Specific Oligo Probes. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Millán T., Madrid E., Cubero J. I., Amri M., Castro P. *et* Rubio J. (2015): Chickpea. *Handbook of Plant Breeding* 85–109.
- Miyake T. *et* Amemiya C. T. (2004): BAC libraries and comparative genomics of aquatic chordate species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 138(3): 233–244.
- Moreno M.T. *et* Cubero J.I. (1978): Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27:465–485.
- Muehlbauer F.J. *et* Sarker A. (2017): Economic Importance of Chickpea: Production, Value, and World Trade. *The Chickpea Genome* 5–12.
- Murgha Y. E., Rouillard J. M. *et* Gulari E. (2014): Methods for the preparation of large quantities of complex single-stranded oligonucleotide libraries. *PloS One* 9, e94752.
- Neumann P., Požárková D., Vrána J., Doležel J. *et* Macas J (2002): Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Chromosome Research* 10: 63–71.
- Ocampo B, Venora G, Errico A. *et* Singh K.B. (1992): Karyotype analysis in the genus *Cicer*. *Journal of Genetic Breeding* 46: 229–240.

- Ohri D. *et al.* (1991): The origin of chickpea (*Cicer arietinum* L.): karyotype and nuclear DNA amount. *Heredity* 66(3): 367–372.
- Parween S., Nawaz K., Roy R., Pole A. K., Suresh B. V., Misra G., Jain M., Yadav G., Parida S. K., Tyagi A. K., Bhatia S. *et al.* Chattopadhyay D. (2015): An advanced draft genome assembly of a desi type chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Scientific Reports* 5: 12806.
- Pundir R.P.S, Rao N.K. *et al.* Van Der Maesen L.J.G (1985): Distribution of qualitative traits in the world germplasm of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 34: 697–3.
- Qu M., Li K., Han Y., Chen L., Li Z. *et al.* Han Y. (2017): Integrated karyotyping of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) with oligopaint FISH probes. *Cytogenetic and Genome Research* 153: 158–164.
- Quinlan A. R. *et al.* Hall I. M. (2010): BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26(6): 841–842.
- Reinhardt D. (2002): Plant architecture. *EMBO Reports* 3(9): 846–851.
- Roy F., Boye J.I. *et al.* Simpson B.K. (2010): Bioactive proteins and peptides in pulse crops: pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43: 432–442.
- Ruelland E., Cantrel C., Gawer M., Kader J.C. *et al.* Zachowski A. (2002): Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiology* 130:999–1007.
- Ruperao P., Chan C.-K. K., Azam S., Karafiátová M., Hayashi S., Čížková J. *et al.* Edwards D. (2014): A chromosomal genomics approach to assess and validate the desi and kabuli draft chickpea genome assemblies. *Plant Biotechnology Journal* 12(6): 778–786.
- Sajja S. B., Samineni S. *et al.* Gaur P. M. (2017): Botany of Chickpea. *The Chickpea Genome* 13– 24.
- Schubert I., Fransz P. F., Fuchs J. *et al.* De Jong, J. H. (2001): Chromosome painting in plants. *Methods in Cell Science* 23: 57–69.
- Schwarzacher T. *et al.* Heslop-Harrison P. (2000): Practical in situ hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Schwarzacher T. (2003): DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome* 46(6): 953– 962.
- Singh K.B. (1987): Chickpea breeding. In: Saxena MC, Singh KB (eds) *The chickpea*. CABI, Wallingford 127–162.
- Singh K. B., Omar M., Saxena M. C. *et al.* Johansen C. (1997): Screening for Drought Resistance in Spring Chickpea in the Mediterranean Region. *Journal of Agronomy and Crop Science* 178(4): 227–235.

- Singh U., Subrahmanyam N. *et* Kumar J. (1991): Cooking quality and nutritional attributes of some newly developed cultivars of chickpea. *Journal of Food Science and Agricultural* 55:37–46.
- Singh U. (1985): Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): current status and future research needs. *Plant Foods for Human Nutrition* 35: 339–351.
- Speicher M. R., Ballard S. G. *et* Ward D. C. (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12: 368–375.
- Staginnus C., Winter P., Desel C., Schmidt T. *et* Kahl G. (1999): Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Plant Molecular Biology* 39:1037–1050.
- Suchánková P., Kubaláková M., Kovářová P., Bartoš J., Číhalíková J., Molnár-Láng M., Endo T.R. *et* Doležel J. (2006): Dissection of the nuclear genome of barley by chromosome flow sorting. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 651–659.
- Swift H. (1950): The Constancy of Desoxyribose Nucleic Acid in Plant Nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36(11): 643–654.
- Šimková H., Svensson J.T., Condamine P., Hříbová E., Suchánková P., Bhat P.R., Bartoš J., Šafář J., Close T.J. *et* Doležel J. (2008): Coupling amplified DNA from flow-sorted chromosomes to high-density SNP mapping in barley. *BMC Genomics* 9: 294.
- Šimoníková D., Němečková A., Karafiátová M., Uwimana B., Swennen R., Doležel J. *et* Hříbová 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.
- Tayyar R.I., Lukaszewski A.J. *et* Waines J.G. (1994): Chromosome banding pattern in the annual species of *Cicer*. *Genome* 37: 656–663.
- Trask B. (1999): Fluorescence *in situ* Hybridization. In: Birren B., Green E.D., Hieter P., Klapholz S., Myers R.M., Riethman H., Roskams J.: *Genome analysis (a laboratory manual)-Mapping genome, Volume 4*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 303–407.
- Valárik M., Bartoš J., Kovářová P., Kubaláková M., de Jong J.H. *et* Doležel J. (2004): High resolution FISH on super-stretched flow-sorted chromosomes. *The Plant Journal* 27: 940–950.
- Van der Maesen L.J.G. (1987): *Cicer* L. Origin, history and taxonomy of chickpea. In: Saxena MC and Singh KB (eds), *The chickpea*. C.A.B. international cambrian news ltd, Aberystwyth, UK 11–34.

- Varshney R.K., Nayak S.N., May G.D. *et* Jackson S.A. (2009): Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* 27: 522–530.
- Varshney R.K., Song C., Saxena R.K., Azam S., Yu S., Sharpe A. G., Cannon S., Baek J., Rosen B. D., Taran B., Millan T., Zhang X., Ramsay L. D., Iwata A., Wang Y., Nelson W., Farmer A. D., Gaur P. M., Soderlund C., Varma Penmetsa R., Xu C., Bharti A. K., He W., Winter P., Zhao S., Hane J. K., Carrasquilla-Garcia N., Condie J. A., Upadhyaya H. D., Luo M.C., Thudi M., Gowda C. L. L., Singh N. P., Lichtenzveig J., Gali K. K., Rubio J., Nadarajan N., Doležel J., Bansal K.C., Xu X., Edwards D., Zhang G., Kahl G., Gil J., Singh K. B., Datta S. K., Jackson S. A., Wang J. *et* Cook D. R. (2013a): Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology* 31: 240–246.
- Vavilov N.I. (1926): *Studies on Origin of Cultivated Plants*. Leningrad: Institute of Applied Botany and Plant Breeding.
- Venora G., Ocampo B., Singh K.B. *et* Saccardo F. (1995): Karyotype of kabuli-type chickpea (*Cicer arietinum* L.) by imaging analysis system. *Caryologia* 48: 147–155.
- Vláčilová K., Ohri D., Vrána J., Číhalíková J., Kubaláková M., Kahl G. *et* Doležel J. (2002): *Chromosome Research* 10(8): 695–706.
- Weier H.-U.G. (2001): DNA Fiber Mapping Techniques for the Assembly of High- resolution Physical Maps. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49(8): 939–948.
- Xin H., Zhang T., Wu Y., Zhang W., Zhang P., Xi M. *et* Jiang, J. (2019): An extraordinarily stable karyotype of the woody *Populus* species revealed by chromosome painting. *The Plant Journal* 101: 253–264.
- Zatloukalová P., Hřibová E., Kubaláková M., Suchánková P., Šimková H., Adoración C., Kahl G., Millán T. *et* Doležel J. (2011): Integration of genetic and physical maps of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome using flow-sorted chromosomes. *Chromosome Research* 19(6): 729–739.