

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2019**

**Tereza Tomíčková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Studium párování chromozomů**  
**u mezidruhových kříženců *Lolium***  
***multiflorum* × *Festuca glaucescens***

**Bakalářská práce**

**Tereza Tomíčková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: Mgr. Veronika Koláčková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Mgr. Veroniky Kolářkové, Ph.D.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

## SOUHRN

Trávy (*Poaceae*) představují jednu z nejvýznamnějších čeledí kvetoucích rostlin na Zemi. Vytváří rozsáhlá společenstva, která jsou dominantní složkou luk a pastvin. Tyto porosty mají velký agronomický význam, neboť jsou hlavním zdrojem potravy hospodářských zvířat. Mezi zástupce čeledi *Poaceae* patří kostřava (*Festuca* L.) a jílek (*Lolium* L.), jejichž křížením vznikají hybridy nazývané Festulolium. Šlechtění těchto hybridních forem je ale komplikováno nestandardním chováním chromozomů během meiózy, které následně narušuje správný průběh celého procesu. Cílem této bakalářské práce bylo objasnit způsob párování chromozomů v metafázi prvního meiotického dělení u vybraných zástupců Festulolium.

Teoretická část práce je věnována významu čeledi *Poaceae* a charakterizaci rodu kostřava a jílek se zaměřením na jejich křížence. Proces hybridizace je v této problematice klíčový, a proto je vysvětlen v další kapitole společně s polyploidizací, která tento jev provází. Následně je popsána meióza u rostlin, v čem je u polyploidů vzniklých hybridizací jiná, a především v čem se liší u studovaných rostlin. Závěr teoretické části je věnován metodě fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která byla ve výzkumu uplatněna.

Experimentální část práce se zabývá cytogenetickou analýzou párování chromozomů. V experimentu byl použit kultivar Lueur, který vznikl syntetickým křížením mezi hybridy  $FgFg'LmLm$  a  $FgFg'LmLm$ . Výsledky potvrzují hypotézu, že chování chromozomů není zcela náhodné a pravděpodobně u těchto hybridů existuje preference pro homologní párování. Na studovaných rostlinách byla také pozorována tvorba univalentů (I) a zejména bivalentů (II), která výrazně převyšovala počty trivalentů (III) nebo kvadrivalentů (IV). U bivalentů byl navíc analyzován způsob párování, který je dvojího typu.

Tyto výsledky přispívají k pochopení principu meiózy u mezidruhových hybridů Festulolium. Jedinci, kteří vykazovali přednostní homeologní párování budou použiti v dalším experimentu, který bude mít za cíl popsat systém, který je odpovědný za chování chromozomů v průběhu meiózy u mezidruhového křížence Festulolium.

## SUMMARY

Grasses (*Poaceae*) are one of the most important family of flowering plants in the world. They create an extensive fellowships which represent a dominant part of meadows and pastures. These growths have a huge agronomic significance because they provide a fodder for livestock. Its members are also fescues (*Festuca* L.) and ryegrass (*Lolium* L.). Crossing between these two genera leads to creation of hybrids which are called Festulolium. However, the breeding of the Festulolium hybrids is complicated by non-standard behavior of chromosomes during meiosis. This behavior disturbs a proper running of the entire process. The aim of this bachelor thesis is to clarify a manner of pairing chromosomes during metaphase I of the first meiotic division in chosen representatives of Festulolium.

Theoretical part of the thesis is dedicated to an importance of *Poaceae* family and characterization of the genus fescues and ryegrass and especially to their hybrids. Process of a hybridization is very important and therefore it is described in following chapter together with a polyploidization which accompanies it. After that there is a description of plant meiosis, its difference at polyploids which were made by hybridization and especially at hybrids which are studied in this thesis. At the end of the theoretical part there is described a method of fluorescent in situ hybridization (FISH) which was used in this experiment.

An experimental part is dealing with a cytogenetic analysis of pairing chromosomes. In this experiment there was used a cultivar Lueur which was made by a synthetic hybridization between hybrids *FgFg'LmLm* and *FgFg'LmLm*. Results confirm a hypothesis that behavior of chromosomes is not completely random and a preference for homologous pairing probably does exist. At studied plants there was as well observed creation of univalents (I) and especially bivalents (II) which significantly exceeded the number of trivalents (III) and quadrivalents (IV). At quadrivalents there were also analyzed a forms of pairing which are occurred in two types.

The results contribute to the understanding principle of meiosis at interspecific hybrids Festulolium. Individuals which preferred homeologous pairing will be used in following experiment whose aim is to clarify a system which is responsible for the behavior of chromosomes during meiosis in interspecific hybrids of Festulolium.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Veronice Koláčkové, Ph.D. a RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady.

## OBSAH

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>ÚVOD</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>2</b> | <b>CÍLE PRÁCE</b> .....                                     | <b>4</b>  |
| <b>3</b> | <b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....                              | <b>5</b>  |
| 3.1      | Význam čeledi lipnicovité ( <i>Poaceae</i> ) .....          | 5         |
| 3.1.1    | Charakteristika rodu kostřava ( <i>Festuca</i> L.) .....    | 5         |
| 3.1.2    | Charakteristika rodu jílek ( <i>Lolium</i> L.).....         | 6         |
| 3.2      | Mezidruhový hybrid <i>Festulolium</i> .....                 | 7         |
| 3.3      | Mezidruhová hybridizace a polyploidizace u rostlin .....    | 8         |
| 3.3.1    | Využití polyploidie v zemědělství .....                     | 10        |
| 3.4      | Meióza u rostlin .....                                      | 10        |
| 3.4.1    | Meióza u polyploidů .....                                   | 12        |
| 3.4.2    | Meióza u mezidruhového hybridu <i>Festulolium</i> .....     | 12        |
| 3.5      | <i>In situ</i> hybridizace .....                            | 13        |
| 3.5.1    | Typy <i>in situ</i> hybridizace .....                       | 14        |
| 3.5.2    | Příprava sond pro <i>in situ</i> hybridizaci .....          | 16        |
| <b>4</b> | <b>MATERIÁL A METODY</b> .....                              | <b>17</b> |
| 4.1      | Materiál.....   | 17        |
| 4.1.1    | Rostlinný materiál .....                                    | 17        |
| 4.1.2    | Použité chemikálie, kity a roztoky .....                    | 17        |
| 4.1.3    | Přístroje a zařízení.....                                   | 19        |
| 4.2      | Metodika.....   | 20        |
| 4.2.1    | Odběr prašníků.....   | 20        |
| 4.2.2    | Příprava roztakových preparátů metafázních chromozomů ..... | 20        |
| 4.2.3    | Izolace celogenomové DNA.....                               | 21        |
| 4.2.4    | Měření čistoty a koncentrace DNA.....                       | 22        |
| 4.2.5    | Příprava fluorescenčně značených sond.....                  | 22        |
| 4.2.6    | Příprava blokovací DNA .....                                | 22        |
| 4.2.7    | Genomová <i>in situ</i> hybridizace .....                   | 23        |
| 4.2.8    | Mikroskopování .....  | 24        |
| <b>5</b> | <b>VÝSLEDKY</b> .....                                       | <b>25</b> |
| <b>6</b> | <b>DISKUZE</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>7</b> | <b>ZÁVĚR</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>8</b> | <b>LITERATURA</b> .....                                     | <b>6</b>  |

## SEZNAM ZKRATEK

|                |  |
|----------------|--|
| bp             | páry bází ( <i>base pairs</i> )  |
| DAPI           | 4',6-diamindin-2-fenylindol  |
| DIG            | digoxigenin  |
| DNA            | deoxyribonukleová kyseliny ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )                              |
| EDTA           | ethylendiamintetraoctová kyselina ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )             |
| F1             | první filiální generace  |
| FISH           | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>fluorescent in situ hybridization</i> )    |
| FITC           | fluorescein isothiokyanát ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )                          |
| <i>Fg, Fg'</i> | <i>Festuca arundinacea</i> var. <i>glaucescens</i> Boiss.                                |
| <i>Fp</i>      | kostrava luční ( <i>Festuca pratensis</i> L.)  |
| gDNA           | celogenomová DNA ( <i>genomic DNA</i> )  |
| GISH           | genomová <i>in situ</i> hybridizace ( <i>genomic in situ hybridization</i> )             |
| ISH            | <i>in situ</i> hybridizace ( <i>in situ hybridization</i> )                              |
| kb             | tisíc párů bází ( <i>kilo base pairs</i> )   |
| Lm             | jílek mnohokvětý ( <i>Lolium multiflorum</i> L.)   |
| Mbp            | milion párů bází ( <i>kilo base pairs</i> )  |
| PCR            | polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )                        |
| <i>Ph1</i>     | lokus pšenice odpovídající za párování chromozomů ( <i>Pairing homoeologous I</i> )      |
| RNA            | ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )  |
| SSC            | citronan sodný ( <i>saline-sodium citrate</i> )  |
| TdT            | terminální deoxynucleotidyl transferáza ( <i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i> ) |
| var.           | varieta ( <i>variety</i> )   |



## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1:** *Festuca arundinacea* var. *glaucescens*.

**Obrázek 2:** *Lolium multiflorum* Lam.

**Obrázek 3:** Schématické znázornění homoploidní hybridizace a polyploidizace reprezentováno jedním párem chromozomů každého rodiče.

**Obrázek 4:** Schéma genomové *in situ* hybridizace (GISH).

**Obrázek 5:** Schéma znázorňující mezidruhové křížení mezi *L. multiflorum* a *F. glaucescens*.

**Obrázek 6:** Příklad chromozomové konfigurace (7 I + 9 II + 2 III) s ukázkou trivalentu.

**Obrázek 7:** Příklad chromozomové konfigurace (14 I + 4 II + 2 IV) s ukázkou kvadrivalentu.

**Obrázek 8:** Příklad chromozomové konfigurace (14 I + 7 II) s ukázkou univalentů.

**Obrázek 9:** Příklad chromozomové konfigurace (4 I + 12 II) s ukázkou homologních rod a ring bivalentů.

**Obrázek 10:** Příklad chromozomové konfigurace (10 I + 9 II) s ukázkou homeologního párování u rod bivalentu.

## SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1:** Složky použité na přípravu 1 ml 87% hybridizačního premixu.

**Tabulka 2:** Průměrné množství všech způsobů párování chromozomů kultivarů Lueur v metafázi I.

**Tabulka 3:** Průměrný výskyt bivalentů rozdělen na rod a ring způsob párování a jejich celková průměrná hodnota.

**Tabulka 4:** Průměrný výskyt homologního a homeologního párování u kultivarů Lueur.

## 1 ÚVOD

*Poaceae* je jednou z agronomicky nejvýznamnějších čeledí na celém světě. Do této skupiny patří i dva významné travní rody, kterými jsou kostřava a jílek (Soreng *et al.*, 2015). Tyto trávy, v přírodě převládající nad ostatními, představují významnou složku krmiva pro hospodářská zvířata a jsou často používány pro zatravnění sportovišť nebo zahrad (Kopecký *et al.*, 2008a).

Momentálně žije na světě asi 7,6 miliard lidí a toto číslo stále stoupá (Peacock, 2018). Cílem dnešního zemědělství je pěstovat nejenom kvalitnější plodiny, které by byly odolné vůči rychle se měnícímu klimatu, ale musí také aby zajistily dostatek výživy (Robertson *et Swinton*, 2005; Ghesquiere *et al.*, 2010). Mezi intenzivně studované rostliny patří i trávy rodů kostřav a jílků, jejichž cíleným šlechtěním se usiluje o vytvoření kříženců s co nejlepší kombinací vlastností. Výsledkem takového procesu jsou pak hybridní souhrnně nazývání *Festulolium*, kteří jsou pro zefektivnění přenosu požadovaných vlastností intenzivně studováni ve vědeckých centrech po celém světě (Kopecký *et al.*, 2008a). Šlechtění těchto hybridních forem je ale značně komplikováno nestandardním párováním chromozomů v průběhu meiózy a častým vznikem sterilního potomstva nevhodného pro další studium (Jauhar, 1975).

Výsledky experimentů potvrzují, že neobvyklé chování chromozomů není zcela náhodné. Otázkou stále zůstává, zda příčinou nenáhodného párování homologů je benevolentní kontrolní systém, který nerozlišuje rozdíly mezi chromozomy, anebo se zde vyskytuje podobný geneticky podmíněný mechanismus, jaký je znám například u pšenice (*Triticum* L.) (Kopecký *et al.*, 2008b). Pochopení procesů, které stojí za průběhem meiózy, by značně usnadnilo šlechtění hybridních forem *Festulolium*.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat párování metafázních chromozomů v průběhu prvního meiotického dělení u mezidruhového křížence *Festulolium* metodou genomové *in situ* hybridizace (GISH) a vypracovat literární rešerši dané problematiky.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Význam čeledi lipnicovité (*Poaceae*)

Experiment byl proveden na hybridních jedincích dvou významných zástupců trav z čeledi *Poaceae*, konkrétně na kostřavě (*Festuca* L.) a jílku (*Lolium* L.). Do této čeledi patří také pšenice (*Triticum* L.), ječmen (*Hordeum* L.), oves (*Avena* L.), žito (*Secale* L.) a jiné obiloviny, což ji dělá agronomicky významnou na celém světě. V České republice je téměř 40 % zemědělské plochy využito pro pěstování trávy, zatímco ve Spojeném království to je asi 75 % (Černocho *et al.*, 2003). Často slouží jako pastviny nebo zdroj krmiva pro dobytek (Kopecký *et al.*, 2008a).

Mezi převládající travní druhy patří příbuzné rody jílku (*Lolium* L.) a kostřavy (*Festuca* L.) (Kopecký *et al.*, 2008a). Počet chromozomů u zástupců rodu kostřava se pohybuje od diploidní sady ( $2n=2x=14$ ) až po dodekaploidní ( $2n=10x=70$ ). Na druhou stranu, u rodu jílek se vyskytují pouze diploidní zástupci ( $2n=2x=14$ ) (Morgan *et al.*, 2001).

##### 3.1.1 Charakteristika rodu kostřava (*Festuca* L.)

Kostřava je jedním z nejpočetnějších rodů trav z čeledi *Poaceae* (Martínez-Sagarra *et al.*, 2017). Jedná se o vytrvalé byliny zahrnující přibližně 600 druhů (Watson *et al.*, 1992; Czaban *et al.*, 2015). Taxonomie celého rodu je poměrně komplikovaná a nejednotná, jelikož některé druhy si jsou morfologicky hodně podobné (Martínez-Sagarra *et al.*, 2017). Vyskytují se převážně v mírném pásu nebo ve vysokohorských oblastech, kde se jedná hlavně o endemické druhy. Jsou to oboupohlavné rostliny, jejichž květenství je typu lata. Prašníky dorůstají do velikosti 0,46 mm a nachází se mezi dvěma pluchami (Watson *et al.*, 1992). Kostřavy mají vysoce vyvinutý kořenový systém a schopnost regenerace, díky čemuž jsou schopny přežívat i na méně kvalitních půdách a odolávat různým biotickým a abiotickým faktorům, kterými je třeba sucho nebo chlad (Kopecký *et al.*, 2009; Czaban *et al.*, 2015). Jsou pěstovány především pro jejich vysokou krmnou hodnotu, dále jako okrasný trávnik na zahrady nebo pro zatravnění sportovišť (Watson *et al.*, 1992; Martínez-Sagarra *et al.*, 2017).

Mezi nejvýznamnější zástupce rodu *Festuca* patří například *F. pratensis* Huds. (kostřava luční), *F. mairei* St.-Yves (kostřava atlasská), *F. gigantea* (L.) Vill (kostřava obrovská) nebo *F. arundinacea* Schreb. (kostřava rákosovitá) (Banfi *et al.*, 2017).

***Festuca arundinacea* var. *glaucescens* Boiss. (syn. *F. a. subsp. fenas* Lag. Bormm.)**

Allotetraploidní *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* ( $2n=4x=28$ ,  $FgFgFg'Fg'$ ) je víceletá tráva trsnatého vzrůstu dosahující výšky okolo 50 cm. Čepele jejich listů jsou úzké tmavě zelené a na dotek drsné. V textu je dále uváděna jako *F. glaucescens* (Obrázek 1).



**Obrázek 1:** *Festuca arundinacea* var. *glaucescens*.

### **3.1.2 Charakteristika rodu jílek (*Lolium* L.)**

Jílek je dalším významným rodem trav z čeledi *Poaceae*, který zahrnuje 10 druhů (Czaban *et al.*, 2015). Původně se tyto rostliny vyskytovaly v Severní Americe, Eurasii a severní Africe, ale postupem času byly rozšířeny do celého světa. Mezi jílky nalezneme jak jednoleté, tak i vytrvalé druhy. Dorůstají do výšky 10–130 cm. Mají oboupohlavné květy s květenstvím typu klásek. Prašníky dosahující velikosti 1,3–4,5 mm jsou uloženy mezi dvěma pluchami. K jejich významným vlastnostem patří především rychlý růst. Jílky mají také velkou nutriční hodnotu a jsou velice chutné, proto patří mezi hospodářsky významné druhy (Kopecký *et al.*, 2009; Czaban *et al.*, 2015). Nevýhodou je, že jsou citlivé na biotický a abiotický stres (Kopecký *et al.*, 2006). Využívají se také pro zatravnění sportovních ploch a zahrad (Watson *et al.*, 1992).

Do tohoto rodu je například řazen *L. perenne* L. (jílek vytrvalý), *L. apenninum* De Not. (kostřava apeninská), *L. giganteum* L. (jílek obrovský) a nejznámější *L. multiflorum* Lam. (jílek mnohokvětý).

### ***Lolium multiflorum* Lam.**

V experimentu byl t použit jílek mnohokvětý, resp. jeho syntetický autotetraploid ( $2n=4x=28$ , *LmLmLmLm*) (Obrázek 2). Jedná se o trsnatou asi 30-50 cm vysokou travu. Ve srovnání s *F. glaucescens* má světle zelené široké listy, které jsou na povrchu žebrované. Květenství je ve formě přímého zploštělého lichoklasu, který dosahuje výšky až 100 cm. Pluchy jsou zakončeny typickou osinou (Morgan *et al.*, 2001).



**Obrázek 2:** *Lolium multiflorum* Lam (převzato z [www.keyserver.lucidcentral.org](http://www.keyserver.lucidcentral.org)).

## **3.2 Mezidruhový hybrid Festulolium**

Jílky a kostřavy jsou díky svým vlastnostem a taxonomické příbuznosti využívány pro šlechtění mezidruhových hybridů nazývaných Festulolium. Tyto dva příbuzné rody jsou unikátní v tom, že i přes svou odlišnou genomickou konstituci hybridizují neobvykle snadno, a tak dochází k interspecifickému párování chromozomů a následné rekombinaci (Humphreys, 1988; Morgan *et al.*, 2001; Zwierzykowski *et al.*, 2008). Vzniklí jedinci poté mohou nést užitečné vlastnosti obou rodičovských druhů, kterými jsou například vysoká odolnost proti biotickým a abiotickým faktorům (znak kostřavy) či rychlý růst

(znak jílku). Této skutečnosti se hojně využívá při šlechtění (Kopecký *et al.*, 2005). Porozumění afinitnímu chování chromozomů během meiózy by usnadnilo přenesení genů mezi zástupci těchto dvou rodů trav pomocí zpětného křížení (Morgan *et al.*, 2001).

Při cíleném šlechtění hybridních forem *Festulolium* bývá závažnou komplikací sterilita. Asi před 30 lety byly v umělých podmínkách získány první fertillní kultivary Prior a Elmet (Kopecký *et al.*, 2006). Tyto vylepšené travní odrůdy vytvořené v Evropě byly následovány vznikem dalších v Americe. Konkrétně velmi úrodným kultivarem je Kenhy, díky kterému započaly programy, jejichž cílem bylo pěstovat další hybridy *Festulolium* (Kopecký *et al.*, 2008a). Při křížení je většinou využíváno kombinace mezi jílkem mnohokvětým a některým zástupcem rodu kostřavy (Ghesquiere *et al.*, 2010). Příkladem je velká skupina hybridů mezi *L. multiflorum* (2x) a *F. arundinacea* (6x) nebo kultivary vzniklé reciprokým křížením mezi tetraploidními hybridy *L. multiflorum* × *F. pratensis*, které mají dobré agronomické vlastnosti a jsou odolné vůči chladu (Kopecký *et al.*, 2008a).

V Evropské unii byly všechny hybridní kultivary odvozené od *F. arundinacea* (6x) řazeny mezi zástupce rodu kostřavy. V roce 2004 došlo k rozšíření definice *Festulolium* (2004/55/EC) a do této skupiny jsou řazeni všichni hybridi jakékoliv kombinace rodů kostřava a jílek bez ohledu na jejich genetickou konstituci (Ghesquiere *et al.*, 2010).

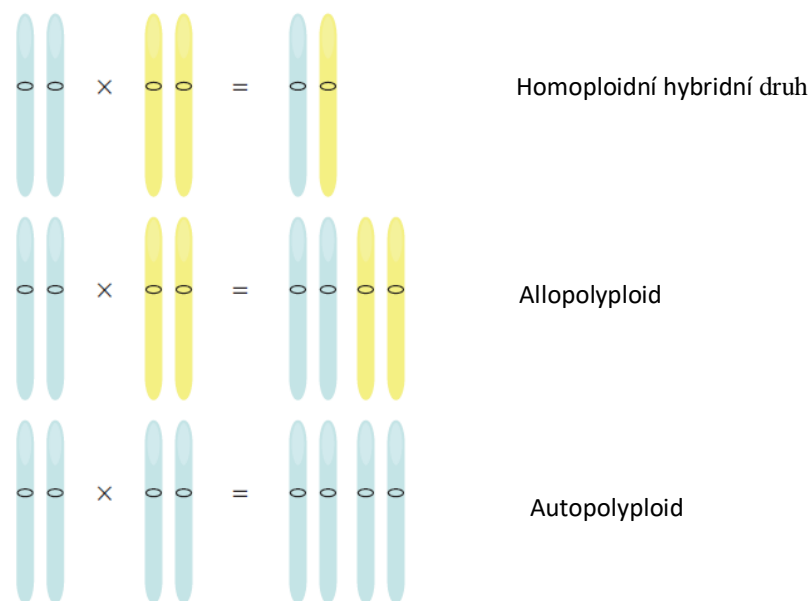
### 3.3 Mezidruhová hybridizace a polyploidizace u rostlin

Hybridizace a polyploidizace jsou dva důležité procesy v evoluci rostlin, které vedou ke vzniku nové kombinaci genů (Obbard *et al.*, 2006). Představují také významný způsob získávání genetické variability užitkových rostlin a jejich studium je klíčové pro moderní šlechtění (Soltis *et Soltis*, 2009).

Hybridizace je dvojího typu, a to buď homoploidní nebo polyploidní (Obrázek 3). Pokud dojde k hybridizaci bez navýšení ploidie, tedy pokud následkem hybridizace vznikne nový druh, ale nedojde k navýšení počtu chromozomů, mluvíme o homoploidní hybridní speciaci (Mallet, 2007). Dochází k ní po splynutí dvou haploidních gamet odlišných druhů (Schumer *et al.*, 2014). V rostlinné říši je ale hybridizace častěji doprovázená polyploidizací, během které dochází ke znásobení počtu chromozomů. V jádře buňky se tak vyskytují více než dvě základní chromozomové sady (Madlung,

2013). Výzkumy v posledních letech ukazují, že polyploidizace se pravděpodobně vyskytovala v evoluci všech krytosemenných rostlin. Druhy, které se dnes jeví jako diploidní, prošly procesem nazývaným diploidizace, jež je doprovázen celou řadou strukturních chromozomových změn, a především snížením počtu chromozomů (Stebbins, 1940).

Kihara a Oho (1926) rozdělili polyploidii na dva druhy, autopolyploidii a allopolyploidii. Autopolyploidie se vyskytuje například u brambor nebo banánů a jde o navýšení počtu sad chromozomů stejného původu, k čemuž dojde buď splynutím neredukovaných gamet stejného druhu nebo zvýšením chromozomových sad u diploidního jedince. Zatímco allopolyploidie je hybridizace mezi nejméně dvěma příbuznými druhy a jejím výsledkem jsou sady chromozomů odlišného původu (Soltis *et* Soltis, 2009). Chromozomy v rámci jednoho allopolyploidního jedince jsou označovány jako homeologní. Opakem jsou chromozomy homologní, jejichž původ je stejný (Hamant *et al.*, 2006).



**Obrázek 3:** Schématické znázornění homoploidní hybridizace a polyploidizace reprezentováno jedním párem chromozomů každého rodiče (převzato a upraveno z Soltis *et* Soltis, 2009).

**Legenda:** Žlutý chromozom – druh A, modrý chromozom – druh B



Proces hybridizace je velmi často provázen cytologickými a genetickými rozdíly mezi jedinci, které vedou k nesprávnému průběhu meiózy. To je způsobeno nepravidelným párováním chromozomů během metafáze prvního meiotického dělení, čímž vznikají univalenty nebo multivalenty (Ramsey *et Schemske*, 1998; Sattler *et al.*, 2016). Následkem tohoto procesu je vytvoření aneuploidních gamet a sterilita potomstva (Ramsey *et Schemske*, 1998; Kopecký *et al.*, 2018).

### 3.3.1 Využití polyploidie v zemědělství

Jak už bylo zmíněno výše, polyploidie sehrála významnou roli v evoluci rostlin (Obbard *et al.*, 2006; Soltis *et Soltis*, 2009). V zemědělství se ale využívá jevu, který polyploidizaci doprovází a tím je tzv. „gigas efekt“, kdy je navýšení počtu chromozomů spojeno se zvětšením velikosti buněk a tím i celkového vzrůstu polyploidního jedince oproti diploidnímu (Levin, 1983; Ramsey *et Schemske* 1998). V některých případech se nemusí jednat o celé rostliny, ale pouze o jejich jednotlivé orgány, kterými mohou být například kořeny, listy nebo plody. Pokud jde o celkový vzrůst, tak polyploidie jsou spíše vyšší než robustnější, mají velká semena a květy (te Beest *et al.* 2012; Sattler *et al.*, 2016). Se zvětšením velikosti souvisí také prodloužení replikace, což vede ke zpomalení metabolismu, kratší době růstu a tendenci kvést později nebo delší dobu (Comai 2005; te Beest *et al.* 2012). Další významnou a ve šlechtění využívanou vlastností polyploidie je heteróze neboli hybridní vitalita. Po křížení dvou geneticky odlišných genotypů lze v F1 generaci pozorovat jedince s vyšší hodnotou daného znaku ve srovnání s rodiči. Heterózní efekt se u kříženců projevuje rychlým růstem jednotlivých orgánů, větší plodností, výnosem a odolností v nepříznivém prostředí v porovnání s rodiči (te Beest *et al.* 2012; Madlung, 2013; Sattler *et al.*, 2016).

## 3.4 Meióza u rostlin

Meióza je vysoce konzervativní proces v rámci eukaryotických buněk, který hraje klíčovou roli v buněčném cyklu všech pohlavně se rozmnožujících organismů. Výsledkem meiózy jsou, na rozdíl od mitózy, čtyři haploidní buňky. Ty vznikají dvěma po sobě následujícími děleními (Hamant *et al.*, 2006), kdy v prvním dojde k rozdělení homologních chromozomů k opačným pólům buňky a ve druhém se oddělí sesterské chromatidy (Kleckner, 1996).

Před samotnou meiózou se nejdříve replikuje DNA. Poté následuje profáze I jako první fáze meiózy, jež se dělí na leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakinezi. Během leptotene duplikované chromozomy vypadají jako dlouhá tenká vlákna, která začínají kondenzovat (Dawe, 1998; Mercier *et al.*, 2015; Snustad *et Simmons*, 2017). V zygotene se k sobě začnou přikládat homologické chromozomy a je zahájena synapse a tvorba synaptonemálního komplexu (Naranjo, 2015; Snustad *et Simmons*, 2017). Následuje pachytene, během které už jsou dokončeny synapse homologních chromozomů. Vytváří se bivalenty, jež jsou tvořeny dvěma chromozomy, z nichž každý má dvě sesterské chromatidy. Chromozomy jsou krátké a kondenzované (Caryl *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2015; Naranjo, 2015). V pachytene také začíná crossing-over vedoucí k rekombinaci genetického materiálu mezi spárovanými chromozomy (Naranjo, 2015; Snustad *et Simmons*, 2017). Poté následuje diplotene, kdy se od sebe chromozomy pomalu oddalují a spojeny zůstávají pouze v blastech nazývaných chiasmata (Naranjo, 2015) V diakinezi už jsou chromozomy zřetelně pozorovatelné, pohybují se směrem k ekvatoriální rovině a nastává terminalizace chiazmat. Profáze I končí rozpadem jaderné membrány a jadérka (Mercier *et al.*, 2015).

Další fází je metafáze I, během které se bivalenty po rozpadu jaderné membrány seřadí v oblasti ekvatoriální roviny označované jako metafázní destička (Mercier *et al.*, 2015). Bivalenty jsou tvořeny dvěma homologními chromozomy, které jsou spojeny pomocí proteinu kohezinu držícího sesterské chromatidy pohromadě (Nasmyth, 2001). Tato fáze je velmi důležitá, protože musí dojít ke správnému seřazení bivalentů do metafázní destičky. Bivalenty se mohou vyskytovat ve dvou formách, které jsou nazývány rod a ring. Jejich rozdíl spočívá v počtu a umístění chiasmata, jež se tvoří v terminálních oblastech chromozomů. Chromozomy, které jsou spojeny na jednom konci vytvářejí rod bivalenty. Druhou možností jsou ring bivalenty, které tvoří chiasmata na obou svých terminálních koncích. Tvorba ring bivalentů je důležitá pro rovnoměrné rozdělení k opačným pólům buňky a minimalizování tvorby non-disjunkce (Gairdner *et Darlington*, 1931). Další podmínkou je správné seřazení, které umožňuje navázání dělicího vřeténka do oblasti kinetochoru, což hraje klíčovou roli v rovnoměrném rozdělení chromozomů (Wagenaar, 1960). V případě, že se v dělicí buňce vyskytnou univalenty nebo multivalenty, tak je tento proces narušen a chromozomy mohou být rozděleny nesprávně (Gairdner *et Darlington*, 1931; Dawe, 1998).

V anafázi I jsou od sebe uvolněny homologní chromozomy (Mercier *et al.*, 2015). V oblasti centromér se nacházejí kinetochory, na které se vážou dělicí vřeténka zajišťující rozchod chromozomů k opačným pólům. Tím dochází k náhodnému, ale rovnoměrnému rozdělení mezi dceřiné buňky (Dawe, 1998; Nasmyth, 2001). Během telofáze I chromozomy dekonduzují a poté plynule přecházejí do profáze II. Dochází k opětovnému kondenzování chromozomů a následně se v metafázi II chromozomy seřadí v oblasti dvou metafázních destiček. V anafázi II se sesterské chromatidy oddělí a vznikne tetráda, kdy každé jádro obsahuje haploidní sadu chromozomů (Caryl *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2015). Na závěr meiózy se během telofáze II formují čtyři jádra (Mercier *et al.*, 2015).

### 3.4.1 Meióza u polyploidů

Polyploidie u rostlin způsobuje odlišné chování chromozomů v průběhu meiózy, neboť může docházet k párování mezi více jak dvěma chromozomy (Dawe, 1998; Mercier *et al.*, 2015). Rostliny proto mají vyvinuté systémy, kterými tyto potíže překonávají. Jejich společným cílem je stabilizovat genom, přiblížit se diploidnímu stavu a obnovit formování bivalentů (Mercier *et al.*, 2015).

U autopolyploidů se vyskytují více než dvě sady stejných chromozomů a tyto homologní chromozomy se mezi sebou mohou párovat se stejnou pravděpodobností. Následně může docházet ke vzniku multivalentů, což způsobuje problémy při tvorbě gamet. V případě allopolyploidních druhů je situace složitější. V buňkách se vyskytují jak chromozomy homologní, tak homeologní (Mercier *et al.*, 2015). Allopolyploidní druhy proto musí mít mechanismus, díky kterému bude přednostně docházet k synapsi a crossing-overu mezi homologními chromosomy. Tento proces je v mnoha případech geneticky podmíněný. Příkladem může být hexaploidní pšenice u které byl nalezen lokus *Ph1 (Pairing homoeologous I)* potlačující párování homeologních chromozomů (Sears and Okamoto, 1958; Martín *et al.*, 2017).

### 3.4.2 Meióza u mezidruhového hybridu *Festulolium*

Kříženci kostřav a jílků jsou jedineční díky své schopnosti se párovat a rekombinovat v metafázi prvního meiotického dělení, a to i přesto, že jsou od sebe fylogeneticky vzdáleni (Kopecký *et al.*, 2008b). Na rozdíl od obecného pravidla se spolu kostřavy a jílky párují homeologně s takovou četností, která je téměř srovnatelná s četností homologního párování (Kopecký *et al.*, 2008a; 2008b). Během párování homeologů může docházet k rekombinaci, eliminaci chromozomů a vzniku aneuploidů

nebo k formování univalentů či multivalentů. Bylo zjištěno, že hybridy mezi *F. pratensis* a *L. multiflorum* dokonce vytvářejí bivalenty a přesto jsou sterilní, což zatím nebylo objasněno (Kopecký *et al.*, 2008a).

Další významnou otázkou je, zda u hybridů převládá homologní párování nad homeologním (Kopecký *et al.*, 2008a). Je zřejmé, že homeologní způsob není zcela náhodný. Bylo zjištěno, že vliv na tento děj může mít nejenom sekvence DNA, ale také strukturní aberace chromozomů. Záleží i na tom, jaké možnosti výběru mají párující se chromozomy. V přítomnosti homologních a homeologních chromozomů existuje malá preference pro homologní párování. Pokud možnost výběru není, tak je párování zcela náhodné. Důvod tohoto chování není známý. Jednou z možností je benevolentní kontrolní systém, který přehlíží rozdíly mezi chromozomy (Kopecký *et al.*, 2008b).

Bylo pozorováno, že při párování chromozomů existují rozdíly ve vzájemné afinitě jednotlivých genomů, která se hodnotí na základě množství heterologních spojení. Například triploidní hybrid *L. multiflorum* × *F. pratensis* (*LmLmFp*) tvoří trivalenty mnohem častěji, než triploidní hybrid *L. multiflorum* × *F. glaucescens* (*LmLmFg*) (Kosmala *et al.*, 2006). Tudíž se dá předpokládat, že *L. multiflorum* má větší afinitu k *F. pratensis* než k *F. glaucescens* (Kopecký *et al.*, 2008a).

### 3.5 *In situ* hybridizace

*In situ* hybridizace (ISH) je molekulárně-cytogenetická metoda, která se využívá při studiu dědičné informace. S její pomocí je možné identifikovat a charakterizovat jednotlivé chromozomy, sledovat jejich chování během meiózy nebo mitózy, ale také studovat evoluci karyotypů (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). Základním principem je hybridizace na základě komplementarity párů bází (Schwarzacher *et al.*, 2000; Younis, 2015). Tato metoda má ale i řadu nevýhod, mezi které patří například špatná reprodukovatelnost výsledků nebo její citlivost (Younis, 2015).

Pro hybridizaci se využívají značené sondy neboli próby. Jedná se o uměle připravený úsek DNA nebo RNA, který je komplementární k vybrané sekvenci. Po denuraci sondy společně s cílovou DNA dochází k jejímu nasednutí na základě komplementarity párů bází. Díky tomu, že je sonda značená je možné ji po hybridizaci snadno a rychle detekovat (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000).

V šedesátých letech minulého století byly používány sondy značené pomocí radioaktivních izotopů. Dnes už ale převládá časově méně náročné, a především bezpečnější fluorescenční značení (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). V případě použití fluorochromů se metoda nazývá fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Výhodou fluorescenčního barvení je možnost použití více sond značených různými fluorochromy a následně simultánní detekce většího množství cílových sekvencí (Younis, 2015).

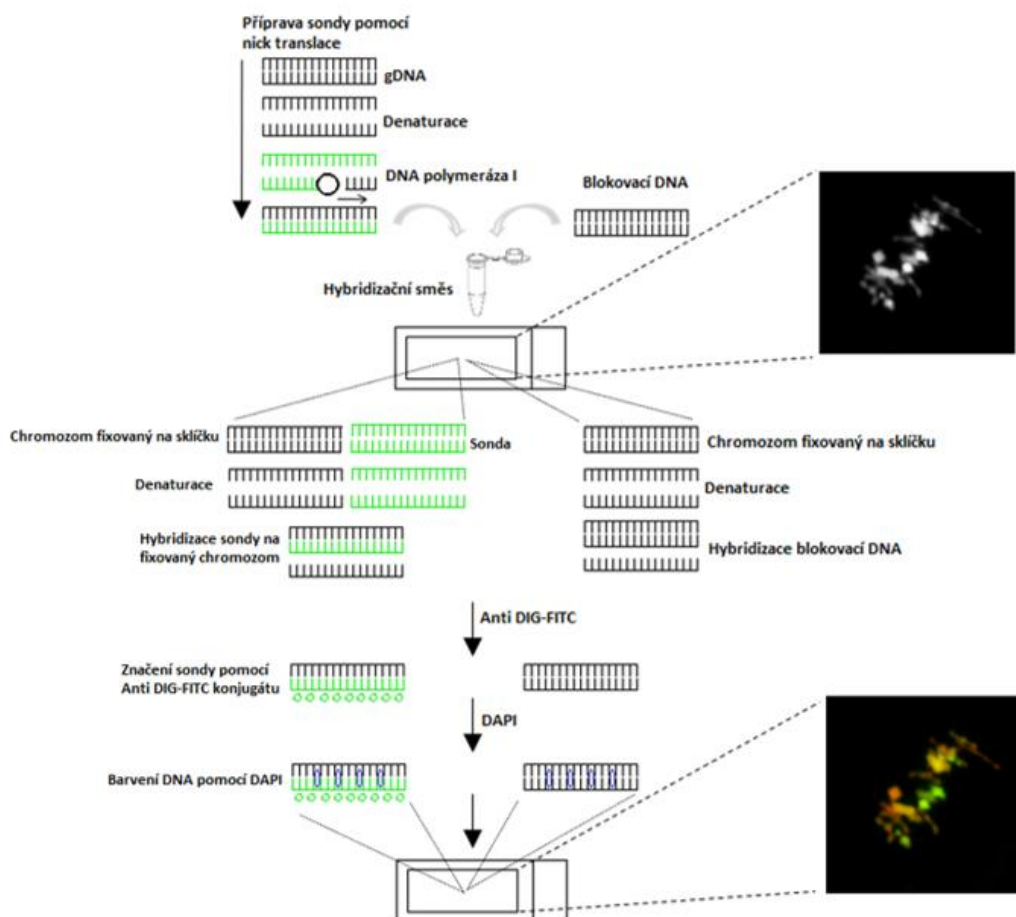
Fluorescenční barviva mohou být vázaná na sondu dvěma způsoby, a to buď přímo, nebo nepřímo. Výhodou nepřímého značení je možnost amplifikace signálu. Užití přímo vázaných fluorescenčních barviv na sondy je jednodušší a rychlejší ve srovnání s nepřímým značením sondy, kdy je potřeba sondy značit pomocí antigenů. Příkladem antigenu je digoxigenin nebo biotin (vitamin H), který je detekován pomocí konjugátu protilátka-fluorochrom (Younis, 2015). Protilátkou digoxigeninu je anti-digoxigenin nesoucí fluorochrom FITC (fluorescein isothiokyanát). V případě biotinu se jako protilátka používá biotinylovaný streptavidin a značí se například pomocí Cy3 (cyanin 3) (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000; Younis, 2015).

### **3.5.1 Typy *in situ* hybridizace**

#### **3.5.1.1 Genomová *in situ* hybridizace**

Genomová *in situ* hybridizace (GISH) je modifikací fluorescenční *in situ* hybridizace a má největší využití při studiu mezidruhových hybridů. Tato velmi oblíbená metoda je přímou vizuální analýzou genomů hybridů, pomocí které je možné rozlišit jejich odlišný původ, získat informace o evoluci chromozomů nebo studovat párování chromozomů v průběhu meiózy (Silva *et* Souza, 2013).

Principem GISH je hybridizace sondy, která je vytvořena z genomové DNA jednoho organismu na genomovou DNA jiného organismu. Z důvodu zvýšené pravděpodobnosti vzájemné homologie mezi příbuznými druhy je u GISH důležitá tzv. blokovácí DNA. Ta reprezentuje neznačený genom jednoho z rodičů a zabraňuje nespecifickému navázání fluorescenčně značené sondy (Silva *et* Souza, 2013) (Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma genomové *in situ* hybridizace (GISH).

### 3.5.1.2 Další typy fluorescenční *in situ* hybridizace

- PRINS – primed *in situ* labeling je jednou z modifikací fluorescenční *in situ* hybridizace, která je založena na nasednutí specifických neznačených sond na vlákno chromozomu. Tyto sondy slouží jako primery pro *in situ* elongaci v přítomnosti příslušné DNA polymerázy, která využívá značené nukleotidy (Hindkjær *et al.*, 1994). Používá se pro rychlé mapování repetitivních sekvencí DNA (Kubaláková *et al.*, 1997).
- 3D-FISH – tato varianta spočívá v provedení FISH na 3D jádře nebo chromozomech. Je potřeba dodržet dvě základní podmínky, kterými jsou zaprvé zachování chromatinu v nativním uspořádání a zadruhé umožnit sondám přístup do jádra. Využívá se pro studium přesné organizace chromozomů nebo lokalizace specifické sekvence. Detekce následně probíhá pomocí specializovaných programů a konfokálního mikroskopu (Solovei *et al.*, 2010).

- Fiber FISH – je založená na fluorescenční *in situ* hybridizaci na vláknech DNA. Jako sondy jsou využívány uměle připravené klony z chromozomů bakterií nebo kvasinek. Cílová DNA je rozeznána pomocí fluorescenčních signálů jevících se jako řetězec korálek. Mezi její výhody patří vysoké rozlišení (1 kb–1 Mbp) a rozsáhlé mapování DNA, jež nacházejí uplatnění zejména v molekulární patologii při studiu genetických onemocnění (Rijke *et al.*, 2000).

### 3.5.2 Příprava sond pro *in situ* hybridizaci

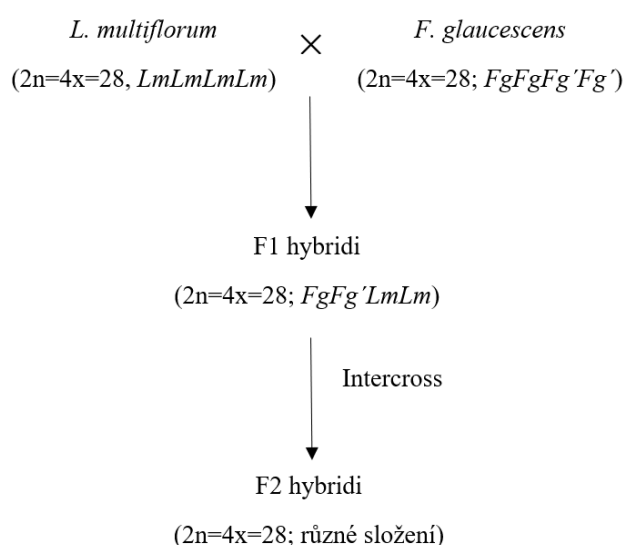
- Nick translace – je vhodná pro značení velkých úseků DNA, mezi které patří například genomová DNA. Pomocí DNázy I vznikají na každém vlákně DNA náhodné zářezy (tzv. nicky). Následně polymeráza I ze zářezů odstraňuje nukleotidy a na jejich místo komplementárně začleňuje nukleotidy značené (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).
- PCR labeling – tato technika se využívá pro amplifikaci a současné značení DNA, proto výchozím materiálem může být i její malé množství. Enzymem této reakce je Taq polymeráza. PCR labeling probíhá v několika po sobě jdoucích cyklech skládajících se z denaturace DNA, navázání primerů a syntézy nového úseku vlákna pomocí směsí značených a neznačených nukleotidů (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).
- Random primer labeling – je technika, která je na rozdíl od nick translace vhodná pro menší úseky DNA. Používá se jednovláknová DNA, jejíž nové vlákno se syntetizuje pomocí Klenow enzymu v přítomnosti značených a neznačených nukleotidů. Primer na templátovou DNA nasedá na náhodných pozicích a produkty této reakce jsou jak značená DNA vlákna (nově syntetizované vlákno), tak i neznačená (templátová ssDNA) (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).
- End labeling – se používá pro značení krátkých fragmentů (kratší jak 100 bp), u kterých není vhodná nick translace nebo random primer labeling. Principem reakce je syntéza 3' konce vlákna pomocí terminální deoxynucleotidyl transferázy (TdT) a DNA polymerázy, která přidává nukleotidy. Používá se směs značených i neznačených nukleotidů nebo pouze nukleotidy značené (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

V experimentu byl použit interspecifický hybrid Festulolium, konkrétně kultivar Lueur. Křížením rostlin allopolyploidního druhu kostřavy (*F. glaucescens*,  $2n=28$ ) se syntetickým tetraploidním druhem jílku (*L. multiflorum*,  $2n=28$ ) byla vytvořena F1 generace mezidruhových hybridů *FgFg'LmLm* ( $2n=28$ ). Tyto rostliny byly následně kříženy mezi sebou, čímž vznikla F2 generace mezidruhových hybridů nazývaná Lueur.



**Obrázek 5:** Schéma znázorňující mezidruhové křížení mezi *L. multiflorum* a *F. glaucescens*.

#### 4.1.2 Použité chemikálie, kity a roztoky

##### Chemikálie

- 100% Formamid (Sigma-Aldrich, kat. č. 295876)
- 99,8% Ethanol (Lach-ner, s.r.o., kat. č. 20025-A96)
- 35% Kyselina chlorovodíková (HCl) (Lach-ner, s.r.o., kat. č. 10033-A25)
- 99,8% Kyselina octová (Lach-ner, s.r.o., kat. č. 10047-A80)
- Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments  $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Roche Diagnostics GmbH, kat. č. 11207741910)
- Blokovací činidlo (Amersham Biosciences, kat. č. 11096176001)



- Dextran sulfát sodná sůl (SERVA Elctrophoresis GmbH, kat. č. 18706)
- DIG-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH, kat. č. 11 745 816 910)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 03620)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Lach-ner, s.r.o., kat. č. 10006-AP2)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-ner, s.r.o., kat. č. 30093-AP0)
- Imerzní olej (Olympus, kat. č. 1.04699)
- Karmín (Sigma-Aldrich, kat. č. C1022)
- Kyselina citrónová monohydrát (Penta, s.r.o., kat. č. 18830-31000)
- Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek GmbH, kat. č. 1037100300)
- Octan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. S2889)
- Redestilovaná voda
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P2287)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, Inc., kat. č. H-1200)

#### Kity

- NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Německo; kat. č. 11912262)

#### Roztoky a jejich příprava

##### 1% acetokarmín

- 10 g karmínu rozpustit v 1 l 45% kyseliny octové. Uchovávat při laboratorní teplotě.

##### 1% blokovací pufr

- Navážit 0,5 g blokovacího činidla a rozpouštět v 50 ml 4× SSC + Tween 20 jednu hodinu při 70 °C. Autoklávovat a skladovat při -20 °C.

##### 50% dextran sulfát

- 2,5 g dextran sulfátu rozpustit za mírného zahřátí v 5 ml redestilované vody. Uchovávat při -20 °C.

##### 0,5 mol·l<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0)

- Navážit 18,61 g EDTA a rozpustit v 80 ml redestilované vody. Upravit pH na 8,0 přidáním NaOH. Vyautoklávovat a uchovávat při laboratorní teplotě.

##### Fixážní roztok Carnoy I

- Smíchat 99,8% ethanol a 99,7% kyselinu octovou v poměru 3:1.

#### 45% kyselina octová

- Pro přípravu 50 ml smíchat 22,5 ml zásobního roztoku 99,7% kyseliny octové a 27,4 ml redestilovaná vody.

#### 20× SSC

- Navážít 175,3 g  $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl a 88,2 g  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dihydrátu citronanu sodného a rozpustit v části redestilované vody a následně doplnit redestilovanou vodou na 1 l. Upravit pH na 7,0, přefiltrovat a autoklávovat 25 min. Uchovávat při laboratorní teplotě.

#### 2× SSC

- 100 ml zásobního roztoku 20× SSC doplnit do 1000 ml redestilovanou vodou. Upravit pH na 7,0 ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl nebo  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH), vyautoklávovat a uchovávat při laboratorní teplotě.

#### $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Octan sodný (pH 5,2)

- 40,82 g octanu sodného rozpustit ve 100 ml redestilované vody a upravit pH na 5,2 koncentrovanou kyselinou octovou. Uchovávat při 4 °C.

#### TE (Tris-EDTA) pufr (pH 8,0)

- Smíchat 1 ml 1 M Tris-HCl s 200  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA a doplnit do 100 ml redestilovanou vodou. Upravit pH na 8,0 a vyautoklávovat. Uchovávat při 4 °C.

### **4.1.3 Přístroje a zařízení**

- Biologický termostat, BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Centrifuga Prism R (Labnet, Edison, USA)
- Digestor Merci M (Merci s.r.o., Brno, ČR)
- Fluorescenční mikroskop AX70 (Olympus, Tokio, Japonsko)
- Hybridizační komůrka SM30 (Boekel Scientific Inc., Feasterville, USA)
- Homogenizační oscilační mlýn MM 301 (Retsch, Německo)
- Lyofilizátor Jouan Heto DRYWINNER Trigon-plus (Říčany u Prahy, Česká Republika)
- PCR Termocycler PTC 200 (MJ Research Inc., Waltham, USA)
- Kamera SensiCam 12 Bit Cooled Imaging (PCO CCD Imaging, Německo)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-100 UV/VIS (NanoDrop Technologies, USA)
- Stolní mikrocentrifuga, MiniStar silverline (VWR, Pensylvania USA)
- Světelný mikroskop CX31 (Olympus, Tokio, Japonsko)

- Termocycler PTC 100 (Mj Research Inc., Waltham, USA)
- Termostat BT 120 (LABO-MS spol. s.r.o., Česká republika)
- Třepačka Reax TOP (Heidoph, Německo)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant Instruments Ltd., Cambridge, Velká Británie)
- Výrobek ledové tříště Scotsman MF26 Ice Flaker (Scotsman Ice Systems, Ipswich, Velká Británie)

## 4.2 Metodika

Experimentální část bakalářské práce byla realizována v Centru strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. v Olomouci.

### 4.2.1 Odběr prašníků

Z každé pokusné rostliny byl v době květenství odstřižen klas a následně vybírány prašníky vhodné pro studium meiózy. Pomocí preparační jehly a skalpelu byla z prašníků pod lupou odstraněna plucha a pluška. Jeden, náhodně vybraný prašník, byl použit pro přípravu roztakového preparátu za účelem potvrzení vybrané fáze meiózy. Prašník byl umístěn na ethanolem očištěné podložní sklo, obarven 2% acetokarmínem a pomocí párátko a žiletky roztlačen přes krycí sklíčko. Takto připravený preparát byl pozorován ve světelném mikroskopu při zvětšení 20x a 40x. V případě nalezení prašníku ve vhodné fázi následovalo odebrání dvou zbývajících prašníků z květu, které byly vloženy do 1 ml fixačního roztoku připraveného do řádně popsaných 1,5ml zkumavek. Na závěr byly vzorky inkubovány v termostatu 1 týden při 37 °C a uchovávány v mrazáku.

### 4.2.2 Příprava roztakových preparátů metafázních chromozomů

Odebrané prašníky byly vyjmuty z fixačního roztoku a barveny 2 hodiny ve 2% acetokarmínu. Následovalo přenesení na důkladně očištěné podložní sklo, zakápnutí 45% kyselinou octovou a překrytí krycím sklíčkem. Po krátkém ožihání nad plamenem došlo k okamžitému roztlačení pomocí párátko a žiletky, čímž se chromozomy uvolnily z cytoplazmy. Fixace byla dokončena vložением preparátu krycím sklíčkem dolů na suchý led (CO<sub>2</sub> v pevném skupenství) po dobu minimálně 1 hodiny. Po inkubaci došlo k odstranění krycího sklíčka za pomoci žiletky. Následně byl preparát umístěn na 1 minutu do kyvety se 45% kyselinou octovou při pokojové teplotě poté se 45% kyselinou octovou zahřátou na 50 °C. Na závěr byla kyveta s preparáty umístěna na 3 minuty do předehřáté vodní lázně. Po vyjmutí došlo k vysušení preparátů v digestoři a uložení ve tmě při pokojové teplotě po dobu maximálně 1 měsíce.

### 4.2.3 Izolace celogenomové DNA

Jako rostlinný materiál pro izolaci DNA byly použity listy *F. glaucescens* nebo *L. multiflorum*, které byly nastříhány do zkumavek a umístěny na minimálně 24 hodin do lyofilizátoru. Následovala homogenizace vzorku za pomoci třepání se skleněnými kuličkami v homogenizačním oscilačním mlýnku. Genomová DNA (gDNA) byla izolována pomocí NucleoSpin Plant II kitu od firmy Machrey-Nagel dle daného protokolu:

#### 1. Lýze homogenátu

Homogenát byl přenesen do nové zkumavky a následovalo připipetování 400  $\mu$ l Lyzačního Pufru PL1 a 10  $\mu$ l RNasy A. Poté došlo k promíchání za pomoci vortexu a vzorek byl inkubován ve vodní lázni předehřáté na 65 °C po dobu 30 minut.

#### 2. Filtrace lyzačního roztoku

Do nové zkumavky byl umístěn NucleoSpin fitr a na jeho povrch byl nanesen lyzační roztok. Po přenesení zkumavky do centrifugy, probíhala filtrace po dobu dvou minut při 11, 000  $\times$  g. Následovalo odstranění peletu a dále se pracovalo pouze se vzniklým supernatantem.

#### 3. Navázání DNA

K filtrátu bylo přidáno 450  $\mu$ l DNA vazebného pufru PC a opatrným převrácením došlo k promíchání. Po umístění NucleoSpin fitru do nové zkumavky bylo na jeho povrch přeneseno maximálně 700  $\mu$ l vzorku. Následovala filtrace pomocí centrifugy nastavené na 11, 000  $\times$  g po dobu 1 minuty. Filtrát byl odstraněn a NucleoSpin fitr umístěn do nové mikrozukavky.

#### 4. Promývání

Na NucleoSpin fitr bylo nejdříve přidáno 400  $\mu$ l promývacího pufru PW1 a poté probíhala centrifugace 1 minutu při 11 000  $\times$  g. Po odstranění filtrátu následovalo aplikování 700  $\mu$ l promývacího pufru PW2 a centrifugování při 11, 000  $\times$  g po dobu 1 minuty. Poté opět došlo k odstranění filtrátu, připipetování 200  $\mu$ l promývacího pufru PW2 a centrifugování při 11, 000  $\times$  g po dobu 2 minut.

## 5. Eluce

NucleoSpin fitr byl přenesen do nové 1,5ml zkumavky a převrstven 50 µl elučního pufru PE předeřtáého na 65 °C. Následovala inkubace při stejné teplotě, která trvala 5 minut. Tímto krokem došlo k rozpuštění DNA a vzorek byl nejdřív centřugován 1 minutu při 11, 000 × g. Poté bylo aplikováno dalších 50 µl elučního pufru PE (65 °C) a centřugace se opakovala.

### 4.2.4 Měření čistoty a koncentrace DNA

Čistota a koncentrace gDNA byla měřena pomocí spektřofotometru typu NanoDrop. Po očištění přístroje se nejdřív nanesla redestilovaná H<sub>2</sub>O a proběhla kalibrace. Poté došlo k měření vzorku a pokud koncentrace DNA nepřesahovala 75 ng·ml<sup>-1</sup>, izolace byla provedena znova. Vzorky se uchovávaly v mrazícím boxu.

### 4.2.5 Příprava fluorescenčně značených sond

Celogenomová sonda značená metodou nick translace se připravovala z vyizolované gDNA druhu *F. glaucescens*. K vypočtenému množství gDNA a redestilované vody (Výpočet 1) byly přidány 4 µl Nick translačního mixu. Následovala inkubace směsi po dobu 120 minut v termocyleru při teplotě 15 °C. Po inkubaci došlo k zastavení reakce přidáním 1 µl 0,5 mol·l<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0). Poté byla sonda vrácena na 10 minut do termocyleru zahřtého na 65 °C.

**Výpočet 1:** Výpočet objemu gDNA na základě změřené koncentrace.

$$V_{\text{DNA}} = \frac{1000}{\text{koncentrace vzorku DNA}}$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = 16 - V_{\text{DNA}}$$

### 4.2.6 Příprava blokovací DNA

Do 2ml mikřozkumavky bylo napipetováno 400 µl gDNA druhu *L. multiflorum* a přidáno 16 µl 10 mol·l<sup>-1</sup> NaOH. Mikřozkumavka s připraveným roztokem byla vařena 45 minut v hrnci s vodou, čímž došlo k naštípání gDNA na fragmenty o velikosti 200-500 bp. Po přidání 400 µl 3 mol·l<sup>-1</sup> octanu sodného (pH 5,2), 800 µl 99,8% ethanolu byla směs vložena do mrazáku nastaveného na -80 °C na 30 minut. Následovala centřugace směsi při -4 °C a 14 000 rpm po dobu 30 minut. Vzniklý supernatant byl pomocí pipety odstraněn a pelet dvakrát dehydratován v 1 ml 70% ethanolu. Po úplném

vysušení zbytkového ethanolu bylo přidáno 60  $\mu$ l TE pufru, ve kterém došlo k rozpuštění peletu. Blokovací DNA se uchovávala při -20 °C.

#### 4.2.7 Genomová *in situ* hybridizace

Genomová *in situ* hybridizace (GISH) byla prováděna na připravených roztakových preparátech metafázních chromozomů mezidruhového křížence *Festulolium* kultivaru Lueur vždy podle stejného protokolu.

Na podložní sklo s fixovanými chromozomy bylo nanášeno 20  $\mu$ l hybridizační směsi. Hybridizační směs obsahovala 16  $\mu$ l 87% hybridizačního premixu (viz Tabulka 1), 2  $\mu$ l blokovací DNA připravené z gDNA druhu *L. multiflorum* a 2  $\mu$ l fluorescenčně značené sondy z gDNA druhu *F. glaucescens*. Následovalo překrytí preparátu krycím sklíčkem a denaturace při 80 °C po dobu 3 minut. Na závěr byly preparáty přeneseny do hybridizační komůrky a inkubovány ve tmě přibližně 16 hodin při 37 °C. Druhý den bylo odstraněno krycí sklíčko pomocí stříčky s redestilovanou vodou a následovalo ponoření preparátu do 2 $\times$ SSC po dobu 10 minut. Poté byl preparát několikrát promyt redestilovanou vodou a vysušen jemným překlápěním po papírovém ubrousku.

**Tabulka 1:** Složky použité na přípravu 1 ml 87% hybridizačního premixu.

| Reagencie          | Objem použitých reagensů [ $\mu$ l] | Koncentrace zásobního roztoku | Výsledná koncentrace |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| SSC                | 25                                  | 20 $\times$                   | 0,5 $\times$         |
| Dextran sulfát     | 200                                 | 50%                           | 10%                  |
| Formamid           | 500                                 | 100%                          | 50%                  |
| Redestilovaná voda | 275                                 | -                             | -                    |

Hybridizovaná sonda byla detekována pomocí Anti-DIG-FITC konjugátu, kdy 30  $\mu$ l směsi, tvořené 29,4  $\mu$ l 1% blokovacího pufru a 0,6  $\mu$ l značené protilátky, bylo napipetováno na preparát a překryto krycím sklem. Následovala inkubace ve tmě po dobu 90–120 minut v hybridizační komůrce nastavené na 37 °C. Poté se z preparátu pomocí stříčky s redestilovanou vodou smylo krycí sklíčko a preparát byl opláchnut redestilovanou vodou a vysušen pomocí ubrousku. Posledním krokem před mikroskopováním bylo nanášení 15  $\mu$ l DAPI a překrytí krycím sklíčkem. Takto připravené preparáty se uchovávaly v ledničce.

Pro zlepšení kvality FISH byly vybrané preparáty před nanesením hybridizačního mixu postfixovány. Nejdříve došlo k ponoření sklíček do 2× SSC po dobu 2×5 minut. Následovalo přenesení preparátů na 10 minut do 4% formaldehydu a 3× promytí ve 2×SSC po dobu 4 minut. Na závěr proběhla dehydratace preparátu pomocí 70, 90 a 100% ethanolu, kdy každý krok trval 2 minuty. Po vysušení se sklíčka ukládala ve tmě při pokojové teplotě.

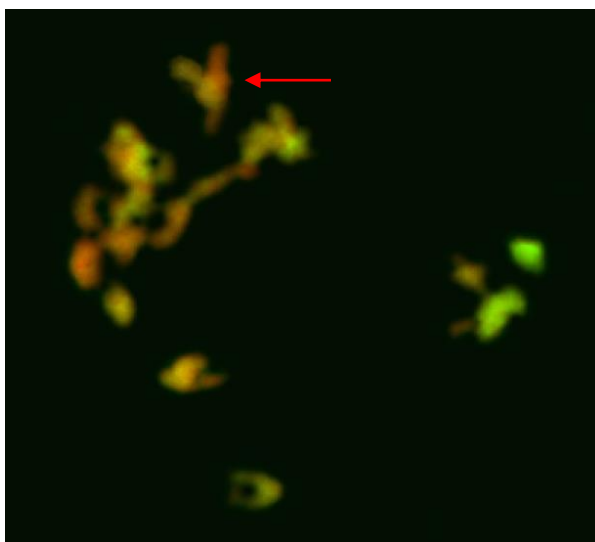
#### **4.2.8 Mikroskopování**

Hybridizovaná sklíčka byla pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu typu Olympus AX70. Na povrch krycího sklíčka se kapátkem přidal imerzní olej. Po umístění preparátu na křížový stolek mikroskopu následovalo nastavení zvětšení 65x a filtr pro DAPI z důvodu usnadnění hledání metafází. CCD kamera zprostředkovávala přenos obrazu pozorovaného v okulárech na monitor počítače, kde v programu MicroImage došlo k nasnímání. Nejdříve byla v mikroskopu pozorována modrá fluorescence (DAPI) a poté zelená (FITC). Snímku reprezentujícímu DAPI barvení se z důvodu odlišení chromozomů přiřadila červená pseudobarva a snímku zobrazujícímu fluorescenci FITC pak zelená pseudobarva. Na závěr došlo ke spojení snímků do výsledné fotografie, kde bylo možné pozorovat zelené a červené chromozomy na černém pozadí.

## 5 VÝSLEDKY

Ve své práci jsem se zabývala párováním chromozomů v metafázi prvního meiotického dělení (MI) u vybraného kultivaru *Festulolium* označovaného Lueur. Cílem bylo určit počet univalentů (I), bivalentů (II), trivalentů (III) a kvadrivalentů (IV) a následně analyzovat, zda dochází přednostně k homolognímu nebo homeolognímu párování. Kultivar Lueur je tetraploidní hybrid *Festulolium* (*FgFg'LmLm*), který má celkem 28 chromozomů. Pro analýzu jejich párování během MI bylo použito celkem 148 figur z 12 rostlin. Chromozomy značeny pomocí metody GISH vykazovaly na snímcích odlišnou barvu. Chromozomy kostřavy měly zelenou pseudobarvu a chromozomy jílku červenou.

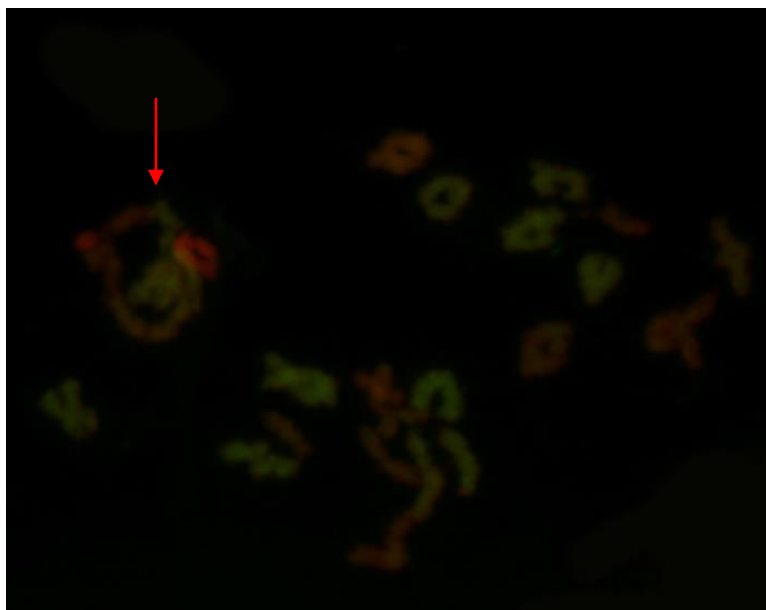
Prvním cílem bylo zjistit, v jakém množství dochází ke tvorbě univalentů, bivalentů, trivalentů a kvadrivalentů a zda některý typ převládá nad ostatními. V Tabulce 2 je možné vidět, že se ve všech studovaných rostlinách objevovalo přednostní párování ve formě bivalentů nebo tvorba univalentů, zatímco trivalenty a kvadrivalenty byly pozorovány minimálně. Trivalenty (Obrázek 6) a kvadrivalenty (Obrázek 7) se vyskytovaly ve 13 (8,8 %) buňkách. Z toho v 7 (4,7 %) chromozomových konfiguracích byl 1 trivalent a ve 2 (1,3 %) buňkách byly 2 trivalenty. Průměr jejich výskytu je roven 0,06 (0–0,24) trivalentů na jednu figuru. Kvadrivalenty byly nalezeny ve 4 (2,7 %) buňkách, a to vždy po jednom v každé buňce. Jejich průměr je 0,04 (0–0,25) kvadrivalentů na jednu buňku.



**Obrázek 6:** Chromozomová konfigurace (7 I + 9 II + 2 III) s příkladem trivalentu.

**Legenda:** Červené chromozomy – *L. multiflorum*, zelené chromozomy – *F. glaucescens*, červená šipka – trivalent.

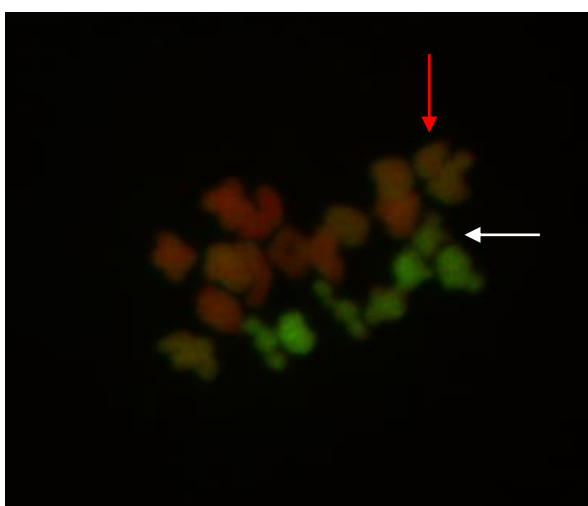




**Obrázek 7:** Chromozomová konfigurace (14 I +4 II + 2 IV) s příkladem kvadrivalentu.

**Legenda:** Červené chromozomy – *L. multiflorum*, zelené chromozomy – *F. glaucescens*, červená šipka – kvadrivalent.

Univalenty (Obrázek 8) byly pozorovány ve 136 (91,9 %) buňkách v průměrném počtu od 2,5 do 9,00 na jednu chromozomovou konfiguraci. Nejvyšší počet univalentů v jedné buňce odpovídal 19 (12,8 %). V 11 (7,4 %) chromozomových konfiguracích se univalenty vůbec nenacházely. Celková průměrná chromozomová konfigurace pro všech 12 analyzovaných rostlin byla 6,48 I +10,6 II + 0,06 III + 0,04 IV (Tabulka 2).



**Obrázek 8:** Chromozomová konfigurace (14 I +7 II) s příklady univalentů.

**Legenda:** Červené chromozomy – *L. multiflorum*, zelené chromozomy – *F. glaucescens*, červená šipka – univalent (*F. glaucescens*), bílá šipka – univalent (*L. multiflorum*).

Bivalenty (II) představovaly nejčastější typ párování chromozomů. Vyskytovaly se v průměrném počtu od 9,31 do 12,25 na jednu buňku a objevovaly se ve všech 148 (100 %) analyzovaných konfiguracích. Celkový průměrný počet bivalentů na jednu rostlinu odpovídal 10,6. U 32 (21,6 %) figur bylo pozorováno méně jak 10 bivalentů. Jejich minimální počet v jedné buňce je roven 3, maximální pak 14 bivalentům (II), což bylo pozorováno u 11 (7,4 %) figur.

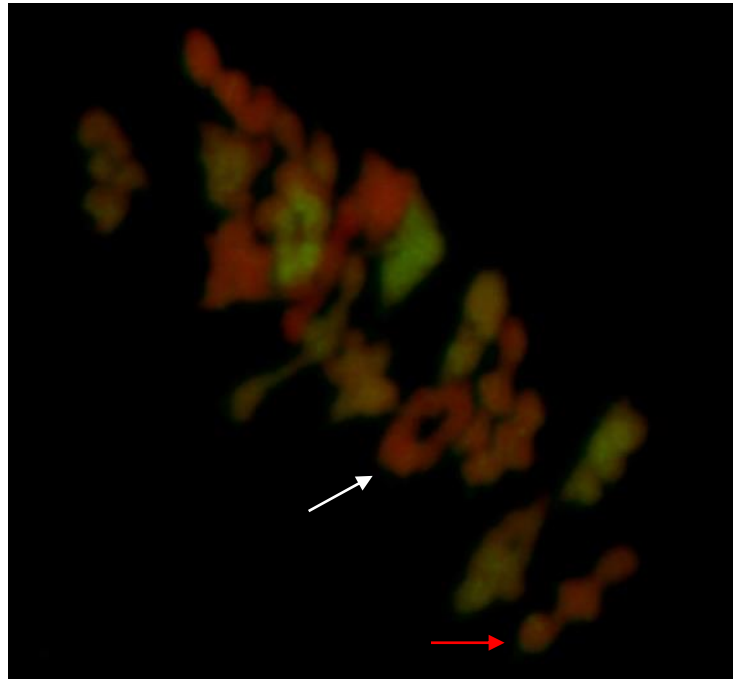
**Tabulka 2:** Průměrné množství všech způsobů párování chromozomů kultivaru Lueur v metafázi I.

| Číslo rostliny | Počet konfigurací | I                | II                | III              | IV               |
|----------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| L34            | 7                 | 7,43±3,49        | 10,28±1,75        | 0,00±0,00        | 0,00±0,00        |
| L45            | 15                | 3,87±3,53        | 12,20±1,56        | 0,07±0,25        | 0,00±0,00        |
| L54            | 17                | 4,05±1,87        | 11,59±1,72        | 0,24±0,55        | 0,00±0,00        |
| L115           | 13                | 9,00±4,47        | 9,31±2,49         | 0,00±0,00        | 0,00±0,00        |
| L116           | 13                | 7,00±2,42        | 10,46±1,22        | 0,00±0,00        | 0,00±0,00        |
| L120           | 8                 | 6,88±3,59        | 10,13±1,96        | 0,13±0,30        | 0,13±0,33        |
| L124           | 27                | 8,59±4,18        | 9,92±1,90         | 0,00±0,00        | 0,00±0,00        |
| L133           | 13                | 7,77±3,68        | 9,85±2,38         | 0,08±0,56        | 0,08±0,27        |
| L162           | 7                 | 6,29±2,91        | 10,86±1,46        | 0,00±0,00        | 0,00±0,00        |
| L166           | 10                | 8,60±3,47        | 9,70±1,74         | 0,00±0,00        | 0,00±0,00        |
| L169           | 10                | 5,80±4,24        | 10,60±1,96        | 0,20±0,39        | 0,00±0,00        |
| L209           | 8                 | 2,50±0,99        | 12,25±1,39        | 0,00±0,00        | 0,25±0,43        |
| <b>Celkem</b>  | <b>148</b>        | <b>6,48±1,99</b> | <b>10,60±0,92</b> | <b>0,06±0,08</b> | <b>0,04±0,08</b> |

**Legenda:** I – univalent, II – bivalent, III – trivalent, IV – kvadrivalent.

Celkový počet bivalentů u kostřavy a jílku byl téměř shodný. Chromozomy kostřavy tvořily v průměru 4,99 (4,37–5,75) a chromozomy jílku 5,17 (4,5–5,75) bivalentů na jednu konfiguraci (Tabulka 3). V našem experimentu bylo pozorováno i zastoupení dvou způsobů párování chromozomů, konkrétně rod a ring (Obrázek 9). Chromozomy kostřavy i jílku tvořily jak rod bivalenty, tak ring bivalenty v přibližně stejné míře, přičemž rod bivalenty mírně převažovaly nad uspořádáním typu ring (Tabulka 3). Kostřavové chromozomy tvořily v průměrném počtu 2,59 (1,00–4,63) rod bivalentů a 2,40 (1,13–3,88) ring bivalentů na jednu buňku. V případě jílkových chromozomů byl průměrný počet rod bivalentů roven 2,86 (2,00–4,13) a ring bivalentů 2,31 (1,62–4,00) na jednu buňku. Z hodnot uvedených v Tabulce 3 vyplývá, že se u hybridního párování mezi kostřavou a jílkem častěji vyskytovaly rod bivalenty než ring.

Jejich průměrný počet na jednu buňku odpovídal 0,3 rod bivalentu a 0,12 ring bivalentu. V případě srovnání homologního a homeologního párování se homeologní bivalenty objevovaly výrazně méně, konkrétně 0,42 na jednu buňku. Zatímco kostřavové chromozomy tvořily homologní bivalenty v počtu 4,99 a jílkové 5,17 na jednu buňku.



**Obrázek 9:** Chromozomová konfigurace (4 I +12 II) s příkladem homologních rod a ring bivalentů.

**Legenda:** Červené chromozomy – *L. multiflorum*, zelené chromozomy – *F. glaucescens*, červená šipka – rod bivalent, bílá šipka – ring bivalent.

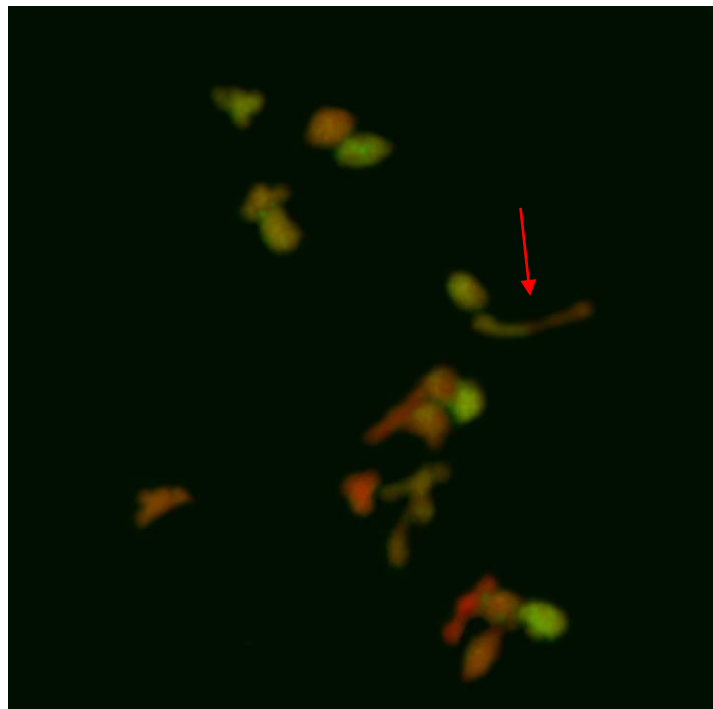
**Tabulka 3:** Průměrný výskyt bivalentů u kultivaru Lueur rozdělen na rod a ring způsob párování a jejich celková průměrná hodnota.

| Číslo rostliny | Homologní párování<br><i>Fg (Fg') × Fg (Fg')</i> |                    |                    | Homologní párování<br><i>Lm × Lm</i> |                    |                  | Homeologní párování<br><i>Fg × Lm / Fg' × Lm</i> |                   |                    |
|----------------|--|--------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------|------------------|--|-------------------|--------------------|
|                | Celkem   | Rod                | Ring               | Celkem                               | Rod                | Ring             | Celkem   | Rod               | Ring               |
| <b>L34</b>     | 5,29 ± 1,45                                      | 2,71 ± 1,35        | 2,57 ± 1,50        | 4,86 ± 1,55                          | 2,43 ± 1,29        | 2,43±1,76        | 0,14 ± 0,26                                      | 0,14 ± 0,35       | 0,00 ± 0,00        |
| <b>L45</b>     | 5,73 ± 1,96                                      | 3,40 ± 2,03        | 2,33 ± 1,81        | 5,73 ± 1,59                          | 3,73 ± 1,39        | 2,00±1,27        | 0,33 ± 0,37                                      | 0,20 ± 0,04       | 0,13 ± 0,35        |
| <b>L54</b>     | 5,41 ± 1,74                                      | 1,53 ± 1,09        | 3,88 ± 1,53        | 6,00 ± 1,44                          | 2,00 ± 0,84        | 4,00±1,18        | 0,24 ± 0,32                                      | 0,12 ± 0,32       | 0,12 ± 0,32        |
| <b>L115</b>    | 4,39 ± 1,44                                      | 1,92 ± 1,14        | 2,46 ± 1,65        | 4,61 ± 1,33                          | 2,23 ± 1,04        | 2,39±1,55        | 0,31 ± 0,46                                      | 0,31 ± 0,61       | 0,00 ± 0,00        |
| <b>L116</b>    | 4,69 ± 1,21                                      | 2,92 ± 1,07        | 1,77 ± 1,05        | 5,54 ± 1,45                          | 3,92 ± 0,73        | 1,62±1,00        | 0,15 ± 0,39                                      | 0,15 ± 0,53       | 0,00 ± 0,00        |
| <b>L120</b>    | 4,88 ± 1,12                                      | 2,88 ± 1,05        | 2,00 ± 1,00        | 4,50 ± 1,09                          | 2,38 ± 0,70        | 2,13±1,36        | 1,25 ± 0,60                                      | 0,87 ± 0,63       | 0,38 ± 0,47        |
| <b>L124</b>    | 4,37 ± 1,38                                      | 2,44 ± 1,37        | 1,93 ± 1,33        | 5,00 ± 1,39                          | 2,96 ± 1,40        | 2,04±1,20        | 0,52 ± 0,52                                      | 0,30 ± 0,54       | 0,22 ± 0,50        |
| <b>L133</b>    | 4,85 ± 1,74                                      | 2,23 ± 1,85        | 2,62 ± 1,64        | 4,77 ± 1,71                          | 2,62 ± 1,50        | 2,15±1,88        | 0,31 ± 0,48                                      | 0,23 ± 0,61       | 0,08 ± 0,27        |
| <b>L162</b>    | 5,43 ± 1,22                                      | 2,29 ± 0,88        | 3,14 ± 1,36        | 5,28 ± 1,12                          | 2,71 ± 1,03        | 2,57±1,18        | 0,14 ± 0,26                                      | 0,14 ± 0,35       | 0,00 ± 0,00        |
| <b>L166</b>    | 4,60 ± 1,45                                      | 3,10 ± 1,94        | 1,50 ± 1,43        | 5,10 ± 1,07                          | 2,90 ± 1,94        | 2,20±1,08        | 0,00 ± 0,00                                      | 0,00 ± 0,00       | 0,00 ± 0,00        |
| <b>L169</b>    | 4,50 ± 1,73                                      | 1,00 ± 1,18        | 3,50 ± 1,20        | 4,90 ± 1,20                          | 2,40 ± 0,80        | 2,50±1,5         | 1,2 ± 0,66                                       | 0,86 ± 0,66       | 0,40±0,66          |
| <b>L209</b>    | 5,75 ± 2,20                                      | 4,63 ± 1,22        | 1,13 ± 1,45        | 5,75 ± 1,90                          | 4,13 ± 1,36        | 1,63±1,50        | 0,50 ± 0,56                                      | 0,37 ± 0,70       | 0,13 ± 0,33        |
| <b>Celkem</b>  | <b>4,99 ± 0,49</b>                               | <b>2,59 ± 0,90</b> | <b>2,40 ± 0,77</b> | <b>5,17 ± 0,45</b>                   | <b>2,86 ± 0,67</b> | <b>2,31±0,59</b> | <b>0,42 ± 0,39</b>                               | <b>0,30± 0,26</b> | <b>0,12 ± 0,14</b> |

**Legenda:** *Fg (Fg')* – *Festuca glaucescens*, *Lm* – *Lolium multiflorum*.

Dalším cílem práce bylo určit výskyt homologního a homeologního párování a zjistit, zda existuje u studovaných rostlin preference pro jeden z uvedených způsobů. Kultivar Lueur je allotetraploid, který má dvě sady chromozomů z každé rodičovské rostliny (*FgFg'LmLm*). Proto má náhodně vybraný chromozom větší pravděpodobnost spárování s homeologním chromozomem než s homologním, a to konkrétně v poměru 2:1.

V Tabulce 4 je ale možné pozorovat výrazně převládající homologní párování. Z celkem 148 studovaných buněk se vyskytovalo v průměrném počtu 10,16 (67.82 %) na jednu konfiguraci. Nejmenší průměrný počet homologního párování byl roven 9 a největší 11,5 na jednu buňku. Naopak homeologní párování (Obrázek 10) bylo pozorováno pouze v počtu 0,47 (0,03 %) na jednu buňku. V případě homeologního největší průměrná hodnota odpovídala 1,5 na jednu buňku. Byla nalezena i jedna rostlina, ve které homeologní párování nebylo pozorováno vůbec. Párování mezi kostřavou a jílkem se vyskytovalo nejenom v kvadrivalentech a trivalentech, ale také v bivalentech.



**Obrázek 10:** Chromozomová konfigurace (10 I + 9 II) s příkladem homeologního párování u rod bivalentu.

**Legenda:** Červené chromozomy – *L. multiflorum*, zelené chromozomy – *F. glaucescens*, červená šipka – homeologní párování.

**Tabulka 4:** Průměrný výskyt homologního a homeologního párování u kultivaru Lueur

| Číslo rostliny | Počet konfigurací | Homologní párování             | Homeologní párování            |
|----------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                |                   | $Fg \times Fg' / Lm \times Lm$ | $Fg \times Lm / Fg' \times Lm$ |
| <b>L34</b>     | 7                 | 10,14±1,50                     | 0,14±0,35                      |
| <b>L45</b>     | 15                | 11,47±1,80                     | 0,40±0,61                      |
| <b>L54</b>     | 17                | 11,41±1,62                     | 0,52±1,04                      |
| <b>L115</b>    | 13                | 9,00±1,41                      | 0,30±0,59                      |
| <b>L116</b>    | 13                | 10,23±1,35                     | 0,15±0,53                      |
| <b>L120</b>    | 8                 | 9,38±1,12                      | 1,13±0,66                      |
| <b>L124</b>    | 27                | 9,37±0,39                      | 0,52±0,78                      |
| <b>L133</b>    | 13                | 9,61±1,71                      | 0,38±0,84                      |
| <b>L162</b>    | 7                 | 10,71±1,16                     | 0,29±0,35                      |
| <b>L166</b>    | 10                | 9,70±1,28                      | 0,00±0,00                      |
| <b>L169</b>    | 10                | 9,40±1,49                      | 1,50±0,92                      |
| <b>L209</b>    | 8                 | 11,5±2,06                      | 1,25±1,48                      |
| <b>Celkem</b>  | <b>148</b>        | <b>10,16±0,87</b>              | <b>0,47±0,46</b>               |

**Legenda:** *Fg, Fg'* – *Festuca glaucescens*, *Lm* – *Lolium multiflorum*

## 6 DISKUZE

V provedeném experimentu byl použit allotetraploidní kultivar Lueur (*FgFg'LmLm*), který je řazen mezi křížence kostřav a jílků známých jako *Festulolium*. Těmto hybridním formám rostlin je pro jejich vlastnosti a následné využití věnována velká pozornost. Hlavním cílem šlechtitelských programů je neustálá snaha vnášet do genomů hybridních rostlin nové alely a vytvářet tak odolnější kultivary (Humphreys, 1988; Morgan *et al.*, 2001; Zwierzykowski *et al.*, 2008). Šlechtění u polyploidů ale komplikuje nepravidelný průběh meiózy, během kterého často dochází k nestandardnímu párování chromozomů a tvorbě univalentů nebo multivalentů. Výsledkem takového křížení pak bývá sterilní jedinec (Jauhar, 1975; Kosmala *et al.* 2006; Kopecký *et al.*, 2008b; Zwierzykowski *et al.*, 2008). Tato práce měla přispět k pochopení systému párování chromozomů u mezidruhových hybridů *Festulolium* během metafáze prvního meiotického dělení pomocí metody genomové *in situ* hybridizace (GISH).

Byla pozorována tvorba univalentů (I) a zejména bivalentů (II), která výrazně převyšovala počty trivalentů (III) nebo kvadrivalentů (IV). U bivalentů bylo dále analyzováno, zda během párování dochází k formování rod nebo ring typu. Klíčovými výsledky bylo potvrzení, že homologní způsob párování výrazně převyšuje nad homeologním. Toto zjištění potvrzuje hypotézu, že chování chromozomů není zcela náhodné a pravděpodobně u těchto hybridů existuje preference pro homologní způsob párování (Kopecký *et al.*, 2008b).

Allotetraploidní hybridi mezi kostřavou a jílkem mají většinou 28 chromozomů, které by se v metafázi prvního meiotického dělení měly párovat s homologním partnerem, a tak vytvořit 14 bivalentů, kdy 7 by vzniklo spojením chromozomů kostřavy a 7 bivalentů by bylo tvořeno dvěma jílkovými (Morgan *et al.*, 2001). Z literatury je známo, že každý chromozom má větší pravděpodobnost se spárovat homeologně než homologně, a to v poměru 2:1. Problematikou párování chromozomů v rámci hybridů *Festulolium* se zabýval Jauhar (1975), který studoval křížence mezi *L. perenne* × *L. multiflorum* a *F. pratensis* × *L. multiflorum*. V případě křížení diploidů výsledky ukázaly, že chromozomy kostřavy a jílku se spolu párují překvapivě snadno. Naproti tomu allotetraploidní hybridi čelí volbě mezi homologním a homeologním chromozomem a potom je volba dána preferencí daného chromozomu (Kopecký *et al.*, 2008b). V námi provedeném experimentu bylo zjištěno, že výrazně převládá homologní způsob párování, a to v průměrném počtu 10,16 na jednu buňku oproti homeolognímu

(0,47 na jednu buňku). To může poukazovat na skutečnost, že chování chromozomů by opravdu mohlo být kontrolováno systémem, který prozatím nebyl popsán, avšak mnohé studie na jeho existenci poukazují (Kopecký *et al.*, 2008b). Nicméně za slabinu našeho výzkumu považujeme nízké množství dat, která by přesvědčivě potvrdila přítomnost tohoto systému.

Další zajímavou otázkou bylo určit, v jaké míře dochází k tvorbě univalentů (I), bivalentů (II), trivalentů (III) a kvadrivalentů (IV) a zda některý typ převládá. Jauhar (1975) u tetraploidního hybridu *LpLpLmLm* pozoroval velké množství kvadrivalentů a trivalentů. Jejich průměrná frekvence byla rovna 3,08 na jednu buňku. U allotetraploidního hybridu *FpFpLmLm* byla tato frekvence o trochu menší a odpovídala 2,1 trivalentů a kvadrivalentů na jednu buňku (Jauhar, 1975). Nicméně v řadě dalších experimentů byl pozorován mnohem menší výskyt multivalentů. Například Zwierzykowski *et al.* (2008) studovali tetraploidní hybridy mezi *F. pratensis* a *L. perenne*, kde průměrný počet trivalentů byl roven 0,32 (0,2-0,6) a kvadrivalentů 0,72 (0,43-1,06) na jednu buňku. Humphreys *et al.* (2005), který ve svém experimentu použil hybridy *L. multiflorum* (4x) a *F. glaucescens* (4x), zjistil, že dochází převážně k homolognímu párování a tvorbě bivalentů (II). Průměrná chromozomová konfigurace byla 2.40 I + 9.64 II + 0.40 III + 1.28 IV. Kultivar Lueur vznikl syntetickým křížením mezi *FgFg'LmLm* a *FgFg'LmLm*. Průměrná celková chromozomová konfigurace v námi provedeném experimentu byla 6,48 I + 10,6 II + 0,06 III + 0,04 IV. V porovnání s výše uvedenými experimenty (Humphreys *et al.*, 2005; Zwierzykowski *et al.*, 2008) je možné pozorovat nejenom převažující bivalentní párování ale navíc také vysoký výskyt univalentů. Naproti tomu trivalenty a kvadrivalenty byly pozorovány pouze v 8,8 % všech buněk. U bivalentů bylo navíc analyzováno, zda dochází k rod nebo ring způsobu párování. Homologní bivalenty se v obou typech párování vyskytovaly přibližně stejně. V případě kostřavových chromozomů byl průměrný počet rod bivalentů roven 2,59 a ring bivalentů 2,40 na jednu buňku. U jílkových chromozomů se vyskytoval nepatrně větší rozdíl. Průměrný počet rod bivalentů byl 2,86 a v případě ring bivalentů 2,31 na jednu buňku. Homeologní párování ve formě rod bivalentů bylo pozorováno v počtu 0,3 na jednu buňku, přičemž přibližně dvakrát převyšovalo homeologní ring uspořádání s průměrným počtem 0,12 bivalentu na jednu buňku. Z těchto dat vyplývá, že se u homeologního párování častěji vyskytovaly rod bivalenty než ring, což je u mezidruhových kříženců obvyklé (Bothmer, 1988; Mujeeb-Kazi, 1989).



## 7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo určit způsob párování chromozomů v metafázi prvního meiotického dělení u mezidruhového hybridu *Festulolium* kultivaru Lueur pomocí metody genomové *in situ* hybridizace (GISH). Výsledky ukázaly, že přednostně mezi chromozomy dochází k homolognímu párování. Naopak homeologní způsob párování byl pozorován minimálně, což potvrzuje hypotézu, že chování chromozomů není zcela náhodné a pravděpodobně u těchto hybridů existuje jistá párovací preference. Dále bylo zjištěno, že v metafázních konfiguracích výrazně převládaly bivalety (II), zatímco multivalenty (III, IV) byly pozorovány jen zřídka. U homologních bivalentů se vyskytoval zhruba stejný počet rod a ring párování. V případě homeologních bivalentů převládal typ rod. Závěrem lze říci, že výsledky této práce přispěly k rozšíření poznatků o systému párování chromozomů během metafáze prvního meiotického dělení u hybridních forem *Festulolium*, čehož bude využito k dalším experimentům.

## 8 LITERATURA

- Banfi, E., Galasso, G., Foggi, B., Kopecký, D., Ardenghi, N. M. G. (2017):** From Schedonorus and Micropyropsis to *Lolium* (*Poaceae: Loliinae*): New combinations and typifications. *Taxon* 66(3): 708–717.
- Bothmer, R. von, Flink, J., Landström, T. (1988):** Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. IV. Tetraploid ( $4x \times 4x$ ) hybrids. *Genome* 30(4): 479–485.
- Caryl, A. P., Jones, G. H., Franklin, F. Ch. H. (2003):** Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *Journal of Experimental Botany* 54(380): 25–38.
- Comai, L. (2005):** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6(11): 836–846.
- Czaban, A., Sharma, S., Byrne, S. L., Spannagl, M., Mayer, K. FX., Aps, T. (2015):** Comparative transcriptome analysis within the *Lolium/Festuca* species complex reveals high sequence conservation. *BMC Genomics* 16(1): 249.
- Černoč, V., Našinec, I., Šramek, P. (2003):** Share of grassland on landscape forming in the Czech Republic. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 39: 158–162.
- Dawe, R. K. (1998):** Meiotic chromosome organization and segregation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:371–95.
- Gairdner, A. E. et Darlington, C. D. (1931):** Ring-formation in diploid and polyploid *campanula persicifolia*. *Genetica* 13(1-2): 113–150.
- Ghesquiere, M., Humphreys, M. W., Zwierzykowski, Z. (2010):** *Festulolium*. In: Boller, B., Posselt, U. K., Veronesi, F., (ends.): Fodder crops in amenity grasses, book series: Handbook of plant breeding 5, pp. 296–316, Springer Science + Business Media, Berlin.
- Hamant, O., Ma, H., Cande, W. Z. (2006):** Genetics of meiotic prophase I in plants, *Annual Review of Plant Biology* 57:267–302.
- Hindkjær, J., Koch, J., Terkelsen, C., Brandt, C. A., Kølvraa, S., Bolund, L. (1994):** Fast, sensitive multicolor detection of nucleic acids in situ by PRimed IN Situ labeling (PRINS). *Cytogenetic and Genome Research* 66:152–154.
- Humphreys, M. W. (1988):** The controlled introgression of *Festuca arundinacea* genes into *Lolium multiflorum*. *Euphytica* 42: 105–116.

- Jauhar, P. P. (1993):** Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* Complex: Relevance to Breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics No. 18. Springer-Verlag, Berlin.
- Jauhar, P. P. (1975):** Chromosome relationships between *Lolium* and *Festuca* (*Gramineae*). *Chromosoma* 52: 103–121.
- Kihara H, Ono T (1926):** Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Zeitschr Zellf Mikro Anat* 4:475–481.
- Kleckner, N. (1996):** Meiosis: How could it work? *National Academy of Sciences* 93: 8167–8174.
- Kopecký, D., Bartoš, J., Lukaszewski, A. J., Baird, J. H., Černoch, V., Kölliker, R., Rogli, O. A., Blois, H., Caig, V., Lübberstedt, T., Studer, B., Shaw, P., Doležel, J., Kilian A. (2009):** Development and mapping of DArT markers within the *Festuca - Lolium* complex. *BMC Genomics* 10: 473.
- Kopecký, D., Černoch, V., Čapka, R., Doležel, J. (2005):** Genomic constitution of *Festulolium* varieties. In: Humphreys, M. O.: *Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf*, pp. 203–204, Wageningen Academic Publisher, Netherlands.
- Kopecký, D., Felder, T., Schubiger, F. X., Mahelka, V., Bartoš, J., Doležel, J., Boller, B. (2018):** Frequent occurrence of triploid hybrids *Festuca pratensis* × *F. apennina* in the Swiss Alps. *Alpine Botany* 128: 121–132.
- Kopecký, D., Lukaszewski, A. J., Doležel, J. (2008a):** Cytogenetics of *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium* hybrids). *Cytogenetic and Genome Research* 120: 370–383.
- Kopecký, D., Lukaszewski, A. J., Doležel, J. (2008b):** Meiotic behaviour of individual chromosomes of *Festuca pratensis* in tetraploid *Lolium multiflorum*. *Chromosome Research* 16: 987–998.
- Kosmala, A., Zwierzykowska, E., Zwierzykowski, Z. (2006):** Chromosome pairing in triploid intergeneric hybrids of *Festuca pratensis* with *Lolium multiflorum*, revealed by GISH. *Journal of Applied Genetics* 47: 215–220.
- Kubaláková, M., Macas, J., Doležel, J. (1997):** Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 758–763.

- Levin D. A. (1983):** Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist*: 1-25.
- Madlung, A. (2013):** Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* 110: 99–104.
- Mallet, J. (2007):** Hybrid speciation. *Nature* 446(7133): 279–283.
- Martín, A. C., Rey, M., Shaw, P., Moore, G. (2017):** Dual effect of the wheat *Ph1* locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma* 126: 669–680.
- Martínez-Sagarra, G., Abad, P., Devesa, J. A. (2017):** Study of the leaf anatomy in cross-section in the Iberian species of *Festuca L. (Poaceae)* and its systematic significance. *PhotoKeys* 83: 43–74.
- Mercier, R., Mézard, Ch., Jenczewski, E., Macaisne, N., Grelon, M. (2015):** The molecular biology of meiosis in plants. *The Annual Review of Plant Biology* 66: 297–327.
- Morgan, W.G., King, I.P., Koch S., Harper, J.A., Thomas, H.M. (2001):** Introgression of chromosomes of *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* into *Lolium multiflorum* revealed by genomic *in situ* hybridisation (GISH). *Theoretical and Applied Genetics* 103: 696–701.
- Mujeeb-Kazi, A., Roldan, S., Suh, D. Y., Ter-Kuile, N., & Farooq, S. (1989):** Production and cytogenetics of *Triticum aestivum* L. hybrids with some rhizomatous *Agropyron* species. *Theoretical and Applied Genetics*: 77(2).
- Naranjo, T. (2015):** Contribution of structural chromosome mutants to the study of meiosis in plants. *Cytogenetic and genome research* 147: 55–69.
- Nasmyth, K. (2001):** Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis. *The Annual Review of Genetics* 35: 673–745.
- Obbard, D. J., Harris, S. H., Buggs, J. A. R., Pannell, J. R. (2006):** Hybridization, polyploidy, and the evolution of sexual system in *Mercurialis (Euphorbiaceae)*. *Evolution* 60: 1801–1815.
- Peacock, S. H. (2018):** Effect of Ecosystem Literacy on Understanding the Impact of Human Population Growth on the Environment-A Multiple Case Study. *Ecopsychology* 10(3), 181–188.

- Ramsey, J., Schemske, D.W. (1998):** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467–501.
- Rijke, M. F., Florijn, J. R., Tanke, H. J., Raap, A.K. (2000):** DNA Fiber–FISH Staining Mechanism. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48(6): 743–745.
- Robertson, G. P., Swinton, S. M. (2005):** Reconciling agricultural productivity and environmental integrity: a grand challenge for agriculture. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3(1): 38–46.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W.R. (2016):** The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243: 281–296.
- Schumer, M., Rosenthal, G. G., Andolfatto, P. (2014):** How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution* 68: 1553–1560.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000):** *Practical in situ Hybridization*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Sears E. R., Okamoto M. (1958):** Intergenomic chromosome relationship in hexaploid wheat. Paper Presented at the Proceedings of the 10th International Congress of Genetics, Montreal, 258–259.
- Silva, G. S., Souza, M. M. (2013):** Genomic in situ hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research* 12: 2953–2965.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2017):** Meióza. In *Genetika*, pp. 28–32. Brno: Masarykova univerzita.
- Solovei, I., Cremer, M. (2010):** 3D-FISH on cultured cells combined with immunostaining. In: Bridger, J. M., Volpi, V.E.: *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*, pp.117–126, Humana Press, Totowa, NJ.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2009):** The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 561–88.
- Soreng, R.J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Davidse, G., Zuloaga, F. O., Judziewicz, E. J., Filgueiras, T. S., Davis, J. I., Morrone, O. (2015):** A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *Journal of Systematic and Evolution* 53: 117–137.

- Stebbins, G. L. (1940):** The Significance of Polyploidy in Plant Evolution. *The American Naturalist* 74(750): 54–66.
- Te Beest, M., Le Roux, J. J., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubesova, M., & Pysek, P. (2011):** The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109(1): 19–45.
- Wagenaar, E. B. (1960):** The cytology of three hybrids involving *Hordeum jubatum* L.: The chiasma distributions and the accuracy of pseudo ring-bivalents in genetically induced asynapsis. *Canadian Journal of Botany* 38(1): 69–85.
- Watson, L., Macfarlane, T.D., Dallwitz, M.J. (1992):** The grass genera of the world. CAB International, Wallingford.
- Weeds of Australia.** [online] [navštíveno 21.4.2019] Dostupné z [https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/lolium\\_multiflorum.htm](https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/lolium_multiflorum.htm)
- Younis, A. (2015):** FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports* 34: 1477–1588.
- Zwierzykowski, Z., Zwierzykowska, E., Taciak, M., Jones, N., Kosmala, A., Krajewski, P. (2008):** Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* revealed by genomic in situ hybridization (GISH). *Chromosome Research* 16: 575–585.