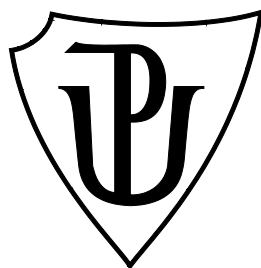


Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a cytogenetické mapování
tandemově se opakujících repetitivních
sekvencí v příbuzných genomech druhů
Festuca sp. a *Lolium* sp.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Jana Zwyrtková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Hřibové, Ph.D. a s pomocí citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce Mgr. Evě Hřibové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při práci v laboratoři i při zpracování této práce.

Dále bych poděkovala zaměstnancům Centra strukturní a funkční genomiky rostlin (Ústav experimentální botaniky AV ČR) za pomoc a rady při práci v laboratoři, zejména pak Mgr. Veronice Burešové, Ph.D.

Děkuji také mému příteli Honzovi a rodině za podporu a pomoc při vzniku této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Zwyrtková
Název práce	Analýza a cytogenetické mapování tandemově se opakujících repetitivních sekvencí v příbuzných genomech druhů <i>Festuca</i> sp. a <i>Lolium</i> sp.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR
Vedoucí práce	Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	Tato diplomová práce ve své teoretické části obsahuje rešerši týkající se významu a využití trav s popisy některých konkrétních druhů. Dále jsou zařazeny informace o struktuře genomu, repetitivních DNA sekvencích, jejich využití při výzkumu trav a nakonec přehled cytogenetických metod. Práce je zaměřena na výzkum v oblasti molekulární biologie a rostlinné cytogenetiky. Tandemové repetice byly v experimentální části práce analyzovány pomocí Southern hybridizace a mapovány na metafázní chromozómy pomocí fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.
Klíčová slova	Cytogenetické mapování, <i>Festuca</i> L., fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace, fluorescenční mikroskopie, <i>Lolium</i> L., Southern hybridizace, tandemové repetice.
Počet stran	67
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Jana Zwyrtková
Title	Analysis and cytogenetic mapping of tandemly organized repeats in the genomes of <i>Festuca</i> spp. and <i>Lolium</i> spp.
Type of thesis	Diploma
Department	Centre of Plant Structural and Functional Genomics, Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	Theoretical part of this diploma thesis includes research of importance and use of grasses with description of selected species. Next section describes genome structure focused on repetitive DNA sequences and their use in grass research including molecular cytogenetics methods. The thesis is focused on research in field of molecular biology and plant cytogenetics. In the experimental part, tandem organized repeats were analyzed using Southern hybridization, and mapped onto mitotic metaphase chromosomes by fluorescence <i>in situ</i> hybridization.
Keywords	Cytogenetic mapping, <i>Festuca</i> L., fluorescence <i>in situ</i> hybridization, fluorescence microscopy, <i>Lolium</i> L., Southern hybridization, tandem repeats.
Number of pages	67
Number of appendices	1
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Význam a využití trav	10
3.1.1	<i>Festuca</i> L.	11
3.1.1.1	<i>Festuca pratensis</i> Huds.	13
3.1.1.2	<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	14
3.1.1.3	<i>Festuca gigantea</i> Vill.	15
3.1.2	<i>Lolium</i> L.	16
3.1.2.1	<i>Lolium perenne</i> L.	17
3.1.2.2	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	18
3.2	Struktura genomu	18
3.2.1	Repetitivní sekvence DNA	19
3.3	Cytogenetické mapování	21
3.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	22
3.4	Cytologická a cytogenetická analýza	23
4	Experimentální část	25
4.1	Materiál a metodika	25
4.1.1	Seznam použitých přístrojů	25
4.1.2	Seznam použitých chemikálií	26
4.1.3	Seznam a příprava použitých roztoků	28
4.1.4	Rostlinný materiál	32
4.1.5	Izolace genomové DNA a stanovení koncentrace	33
4.1.6	Přenos DNA z gelu na nylonovou membránu (Southern blotting)	33
4.1.7	Southern hybridizace	34
4.1.8	Roztlakové preparáty metafázních chromozómů	37
4.1.9	Příprava sond	38
4.1.10	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	39
5	Výsledky	41
5.1	Southern hybridizace	41

5.2	Cytogenetická lokalizace tandemových repetic.....	45
6	Diskuze.....	52
7	Závěr	55
8	Literatura	56
9	Přílohy.....	66
9.1	Seznam použitých zkratk	66

1 Úvod

Travní porosty jsou široce rozšířené ekosystémy hrající roli v evropské biodiverzitě. Mají již od dávných dob velkou funkci ve vývoji zemědělství. Svými podmínkami slouží jako místo pro život různých druhů živočichů, zároveň jako potrava hospodářských zvířat – skotu, ovcí, koz, koní, jež jsou pro další konzumenty zdrojem masa, mléčných výrobků, vlny a kůže. Jelikož objem populace roste, přímo úměrně roste i potřeba potravy, a tudíž i hektary využívaných zemědělských ploch, ať už polí nebo pastvin. V neposlední řadě fungují tyto zelené plochy jako místa pro rekreaci a odpočinek, což pro danou oblast může znamenat zvýšení turismu, respektive růst ekonomiky.

Znalost struktury, variability a pochopení funkce jaderných genomů rostlin představuje v posledních letech velmi důležité a nezbytné informace v oblasti šlechtění odolnějších druhů rostlin, respektive druhů s požadovanými vlastnostmi. Předkládaná diplomová práce se zabývá charakterizací repetitivních DNA sekvencí se zaměřením na tandemově organizované repetitivní sekvence DNA, které byly identifikovány v illumina sekvenačních datech šesti vybraných zástupců rodu *Festuca* a dvou zástupců rodu *Lolium*.

2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se repetitivní DNA a molekulárních a cytogenetických metodik používaných pro charakterizaci repetitivních sekvencí DNA u trav.

V experimentální části práce bylo mým úkolem ověřit rozdíly v počtech kopií vybraných tandemově organizovaných repetitivních sekvencí DNA identifikovaných *in silico* v genomech osmi studovaných zástupců rodů *Festuca* a *Lolium* pomocí Southern hybridizace. Následně byly cytogeneticky lokalizovány tandemové repetice na metafázní chromozómy vybraných druhů trav pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace.

3 Teoretická část

3.1 Význam a využití trav

Travníky, louky, pastviny patří k nejrozsáhlejším ekosystémům na světě. Dle UNESCO jsou travní porosty oblastmi či pozemky porostlé bylinami s méně než 10 % stromů a keřů. Často plní funkci pastvin (Reheul *et al.*, 2010; Suttie *et al.*, 2005). Plocha těchto porostů byla v roce 2000 vyčíslena na 40,5 % zemského povrchu s výjimkou Grónska a Antarktidy (Suttie *et al.*, 2005). Evropské travníky jsou z velké části modifikovány činností lidí a často jsou založeny a udržovány pro zemědělskou činnost. Nazývají se pak travníky polopřírodní (Reidsma *et al.*, 2006). Pastviny vsakují vodu lépe, než orná půda (Benoit *et al.*, 2004) a je v nich uloženo asi 34 % celosvětových suchozemských zásob uhlíku (Pedro Silva *et al.*, 2008), z čehož je půdního organického uhlíku o 50 % více v trvalých, než v dočasných pastvinách (Mestdagh *et al.*, 2006). Kumulace uhlíku působí příznivě v boji o snížení hladiny skleníkových plynů v atmosféře (Pedro Silva *et al.*, 2008). Samozřejmě se travní porosty, nejen v Evropě, vyvíjejí odlišně, a to podle klimatických a geografických rozdílů. Nutno zmínit také ekonomický a ekologický dopad těchto rozdílů. Trávy, jakožto zdroj potravy mnohých zvířat, jsou pro ekonomiku nejmenší zátěží. Ostatní krmiva patří mezi finančně nákladnější. Jako ekologický dopad lze pak uvést změny v biodiverzitě (Reheul *et al.*, 2010). Regulace travních porostů se provádí spásáním nebo sečením. V dnešní době ale dochází k jejich alarmujícímu úbytku z důvodu častých přeměn na zemědělskou ornou půdu (Pedro Silva *et al.*, 2008).

Travní porosty jsou nejen důležité pro oblast zemědělství, ale také jako samotný ekosystém. Jsou studovány hlavně z důvodu svého rozsáhlého využití jakožto krmiva. Z tohoto důvodu je nutné pohlížet na trávy jako na důležitý zdroj potravy, a proto každé další pochopení struktury a funkce genomu těchto rostlin přispívá k rychlejšímu postupu při jejich šlechtění. Tímto by mělo být do budoucna zajištěno dostatečné množství dostupných zdrojů kvalitní potravy pro zvířata (Kopecký *et al.*, 2014).

Existují tři hlavní aspekty zdůvodňující význam travních porostů – ekologický, ekonomický a estetický. Některé typy trávníků lze využít jako povrch pro golfové hřiště nebo jiná sportoviště, dále jako okrasné plochy v parcích, kolem budov, jako rekultivace areálů či jako pokryv půdy s nenáročnou údržbou (Kopecký *et al.*, 2014). Trvalé trávníky jsou výhodné pro produkci biomasy, hlavně pro svou odolnost, rychlé založení a zmíněné nízké nároky na údržbu (Searchinger *et al.*, 2008). Druh *Lolium perenne* L. obsahuje významné ve vodě rozpustné cukry ve formě polymerního fruktanu, který se snadno extrahuje, štěpí na jednotlivé fruktózoové jednotky a fermentuje na bio-ethanol (Farrar *et al.*, 2012).

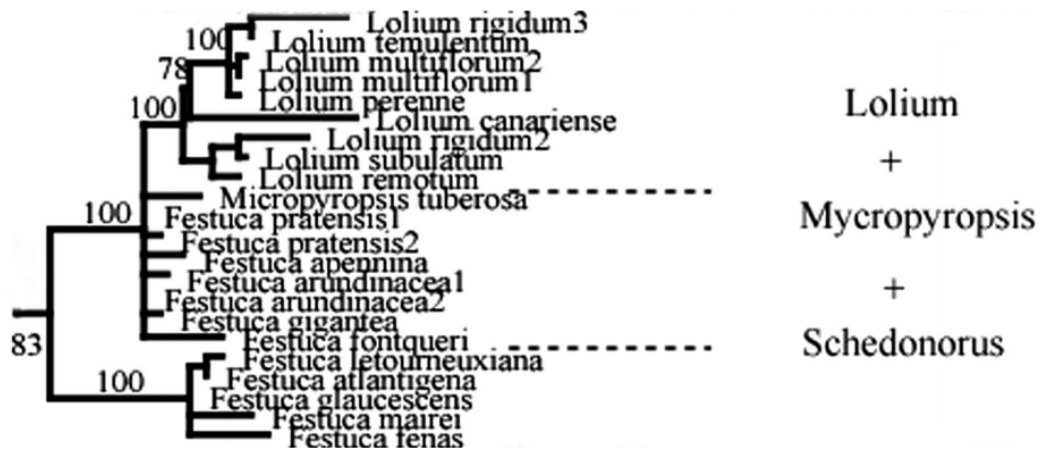
Přestože se v přírodních travních porostech nachází velké množství druhů, je jen málo z nich vhodných k produkci dočasných trávníků. Celosvětově nejdůležitějším druhem vyskytujícím se v těchto trávnících je *Lolium perenne* L. (jílek vytrvalý) následovaný *Lolium multiflorum* Lam. (jílek mnohokvětý). Mezi zemědělsky důležité druhy zase patří *Festuca rubra* L. (kostřava červená), *Festuca arundinacea* Schreb. (kostřava rákosovitá) a *Festuca pratensis* Huds. (kostřava luční). Jako méně zastoupené druhy v travních porostech se vyskytují například *Poa pratensis* L. (lipnice luční), *Dactylis glomerata* L. (srha laločnatá) či *Phleum pratense* L. (bojínek luční) a další (Kopecký *et al.*, 2014). Velký význam mají také některé mezidruhové a mezirodové hybridní rostliny typu jílku, tj. *Lolium multiflorum* × *Lolium perenne* nebo kostřavy a jílku, tj. *Festuca* × *Lolium* → *Festulolium* (Thomas *et al.*, 2003). Základní počet chromozómů v genomech rodů *Festuca* i *Lolium* je $n = 7$. Druhy *Lolium perenne* L. i *Lolium multiflorum* Lam. jsou diploidní, nicméně jako krmivo pro hospodářská zvířata se využívají především tetraploidní odrůdy. U kostřav se ploidie obecně uvádí od diploidních po dekaploidní. Nejrozšířenější v zemědělství jsou diploidní a několik autotetraploidních odrůd kostřav lučních, hexaploidní kostřava rákosovitá a hexaploidní a oktaploidní kostřava červená (Loureiro *et al.*, 2007).

3.1.1 *Festuca* L.

Kostřava (*Festuca* L.) je největším rodem patřícím do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), obsahuje více než 600 druhů trav. Rozšířené jsou téměř po celém světě – od suchých oblastí přes stepi až do chladných a mírných oblastí jižní polokoule. Jednotlivé druhy rostou na různých specifických stanovištích, od mokřadů až po suché oblasti. Jsou dobře přizpůsobeny extrémním podmínkám v horských, arktických a subantarktických

oblastech (Inda *et al.*, 2008), dále je lze najít na alpských loukách, pastvinách a v lesích (Šmarda *et al.*, 2007). Již starověcí Římané používali pro stébelnatou plevel název „festuca“ (od keltského fest = píce). Carl Linné pak název přenesl na tento rod (Polívka, 1902). Jednotlivé druhy rodu se odlišují morfologií a ploidií. Polyploidních je až 70 % druhů. Většina polyploidních druhů patří do podrodu *Schedonorus* (Hand *et al.*, 2010) a jsou převážně allopolyploidní (Loureiro *et al.*, 2007). Diploidní druhy rostou hlavně v Eurasii (Šmarda *et al.*, 2007). Rody *Festuca* a *Lolium* představují úzce příbuzný komplex druhů.

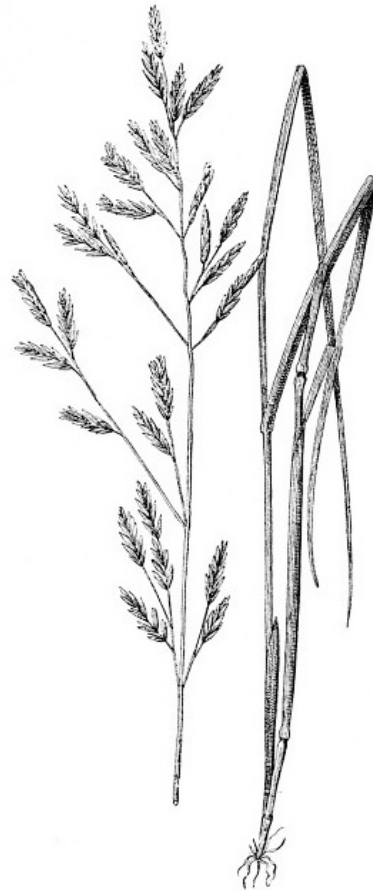
Podrod *Schedonorus* je komplexní skupina druhů s různými ploidiemi, jež jsou důsledkem hybridizací. Patří sem například diploidní *Festuca pratensis* Huds. (kostřava luční, $2n = 2x = 14$), tetraploidní *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* Boiss. (kostřava rákosovitá var. *glaucescens*, $2n = 4x = 28$), tetraploidní *Festuca mairei* (kostřava atlaská, $2n = 4x = 28$), hexaploidní *Festuca arundinacea* Schreb. (kostřava rákosovitá, $2n = 6x = 42$), hexaploidní *Festuca gigantea* (L.) Vill. (kostřava obrovská, $2n = 6x = 42$) a další (Hand *et al.*, 2010). Blízká příbuznost jednotlivých druhů je zřejmá z následujícího obrázku (Obr. 1). Vybrané druhy jsou popsány detailněji.



Obr. 1: Výřez fylogenetického stromu vytvořeného s použitím ITS sekvencí.
(Převzato a upraveno: Catalán *et al.*, 2004)

3.1.1.1 *Festuca pratensis* Huds.

Festuca pratensis Huds. (Obr. 2) tvoří volné trsy až 80 cm vysokých listnatých stébel zakončených jednostrannými latami. Listy jsou ploché, přízemní i stébelní, široké asi 5 cm. Klásky jsou podlouhlé, velké, o 6–10 květech. Často se vyskytuje, mimo luk a pastvin, ve světlých lesích. Kvete v červnu a červenci (Polívka, 1902).



Obr. 2: *Festuca pratensis* Huds. (kostřava luční).

(Převzato a upraveno, zleva: Polívka, 1902; Hanuš, 1999)

3.1.1.2 *Festuca arundinacea* Schreb.

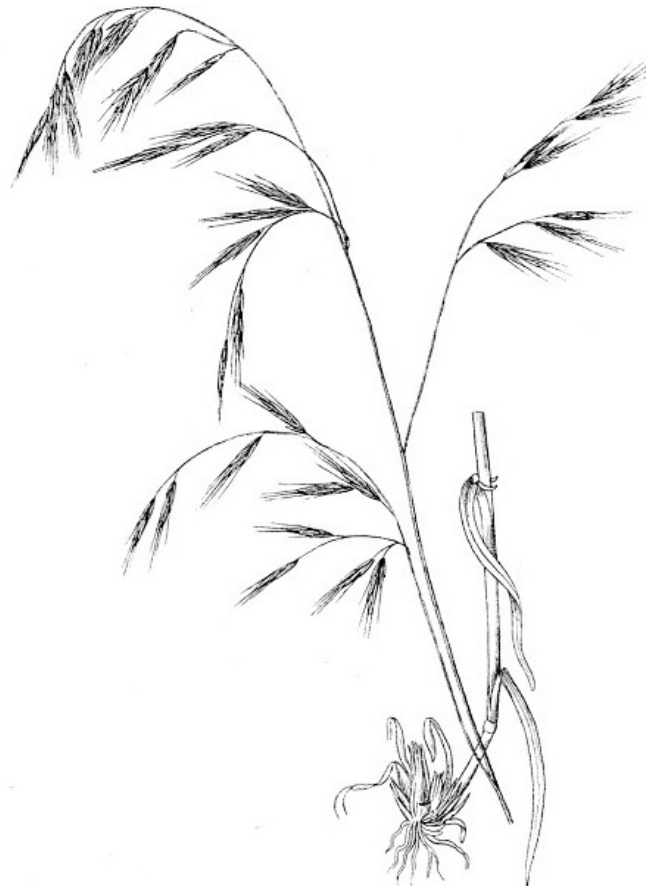
Festuca arundinacea Schreb. (Obr. 3) má podobné morfologické znaky jako *Festuca pratensis* Huds., je ale statnějšího vzrůstu. Listnatá stébla mají výšku kolem 150 cm, přízemní listy jsou široké až 1 cm. Roste ve vlhkém prostředí, v příkopech a pěstuje se pro účely pastvin v mírném klimatickém pásmu celého světa. Kvete v červnu a červenci (Polívka, 1902).



Obr. 3: *Festuca arundinacea* Schreb. (kostřava rákosovitá).
(Převzato a upraveno: Polívka, 1902)

3.1.1.3 *Festuca gigantea* Vill.

Festuca gigantea Vill. (Obr. 4) je vytrvalý druh, tvořící volné přímé i nakloněné trsy o výšce až 120 cm. Stéblo je listnaté, listy mají šířku až 1 cm. Roste ve stinných lesích, u potoků. Kvete v červenci a srpnu (Polívka, 1902).



Obr. 4: *Festuca gigantea* Vill. (kostřava obrovská).
(Převzato a upraveno: Polívka, 1902)

3.1.2 *Lolium* L.

První zmínka o vysetí semen jílku (*Lolium* L.) do půdy, za účelem přeměny orné půdy na zatravněnou, pochází z roku 1677 z Velké Británie (Jenkin, 1949). Jílky jsou přirozeně diploidní druhy ($2n = 2x = 14$) s relativně velkým genomem ($1C = 2 \text{ Gb}$; Hutchinson *et al.*, 1979). Přirozeně se mezi sebou kříží, což vede ke vzniku tetraploidních zástupců (Humphreys *et al.*, 2010). Odrůdy obou druhů – *Lolium perenne* L. (jílek vytrvalý, $2n = 4x = 28$) i *Lolium multiflorum* L. (jílek mnohokvětý, $2n = 4x = 28$) patří mezi hlavní krmné trávy (Obr. 5). Zástupci tohoto rodu se vyskytují na severozápadě Evropy, na Novém Zélandu, v oblastech mírného pásma Japonska, Austrálie, Jižní Afriky a Jižní Ameriky. Jílek vytrvalý je široce používán jako povrch sportovních hřišť a tvoří zhruba 23 % z 52 milionů hektarů evropských luk a pastvin. Listy a stonky jílků jsou pro zvířata nejlépe stravitelné ze všech druhů trav (Frame, 1991).



Obr. 5: *Lolium perenne* L. (vlevo), *Lolium multiflorum* Lam. (vpravo).
(Převzato a upraveno: Hanuš, 1999)

3.1.2.1 *Lolium perenne* L.

Lolium perenne L. (Obr. 6) je vytrvalá tráva tvořící trsy hladkých, přímých nebo poléhavých stébel, dlouhých až 70 cm se svazky úzkých přízemních listů. Množí se pomocí odnoží. Roste často u cest. Je produktivní po dlouhá vegetační období a kvete od června do října (Polívka, 1902).



Obr. 6: *Lolium perenne* L. (jílek vytrvalý).
(Převzato a upraveno: Polívka, 1902)

3.1.2.2 *Lolium multiflorum* Lam.

Lolium multiflorum Lam. (Obr. 7) je také vytrvalá, trsnatá tráva se stébly i vyššími než 70 cm. Má měkké listy, které jsou v mládí svinuté (Polívka, 1902). Je to dvouletý druh s vysokou mírou stravitelnosti a chutnosti. Hraje proto velký význam ve složení krmných směsí. Oproti jílku vytrvalému je však méně odolný vůči stresu (Humphreys *et al.*, 2010). Původem je z jižní Evropy. Roste u cest. Kvetे od června do října (Polívka, 1902).



Obr. 7: *Lolium multiflorum* Lam. (jílek mnohokvětý).

(Převzato a upraveno: Polívka, 1902)

3.2 Struktura genomu

Eukaryotické organismy mají své genomy organizovány do chromozómů, jejichž počet se různí mezi jednotlivými druhy. Základní struktury, jako jsou centromery a telomery, jsou konzervované v rámci všech vyšších eukaryot (Heslop-Harrison *et* Schwarzacher, 2011). Velké genomy rostlin mají sice podobné počty genů jako rostliny s malými

genomy, například *Arabidopsis thaliana* nebo *Oryza sativa*, ale liší se v zastoupení různých typů repetitivní DNA (Heslop-Harrison, 1991; Meyerowitz, 1989; Somerville, 1989). Mezi nejčtenější repetitivní sekvence DNA patří transponovatelné elementy, které mohou u velkých genomů trav představovat více než polovinu jejich genomu. Mezi další typy repetitivních sekvencí DNA patří tandemově organizované repetic, které jsou často druhově specifické. Povahu tandemově organizovaných repetic mají i geny kódující ribozomální RNA, které se v genomech všech vyšších eukaryot vyskytují ve vysokém počtu opakování (Heslop-Harrison *et* Schwarzacher, 2011).

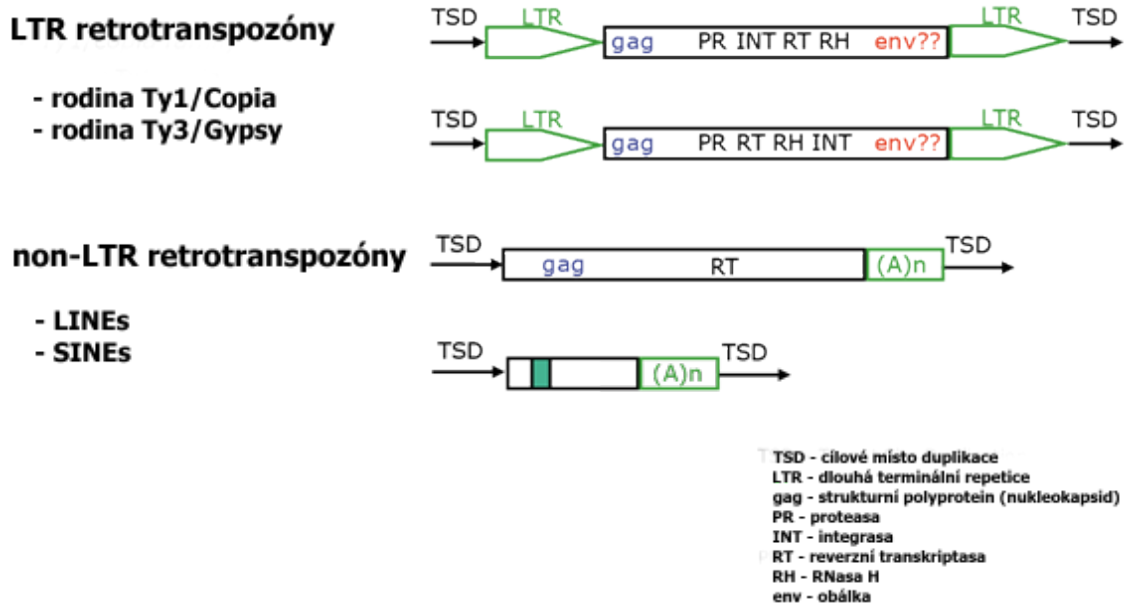
Jaderný genom trav je obecně velký (1C ~ 2–10 Gb). Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena velikost monoploidního genomu jílků, kostřavy rákosovité a luční, která se pohybovala v rozmezí $1Cx = 2,62\text{--}3,25$ pg (Kopecký *et al.*, 2010). Polyploidní charakter mnoha významných druhů trav a vysoké procento různých typů repetitivních DNA sekvencí v jaderných genomech trav znesnadňuje genomické a sekvenační analýzy. V nedávné době byl s využitím sekvenačních technologií nové generace (zkr. NGS) sekvenován genom druhu *Lolium perenne* L. (Studer *et al.*, 2012) a chromozóm 4F druhu *Festuca pratensis* Fure. Získaná data byla využita pro identifikaci kódujících genových sekvencí DNA. Cílem bylo vytvořit virtuální genovou mapu na základě srovnání s již sekvenovanými modelovými druhy s malým genomem (*Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Hordeum vulgare*) a získat tak informace o struktuře a případných přestavbách v genomu trav (Kopecký *et al.*, 2013; Studer *et al.*, 2012).

Obecně lze říci, že převážná většina genů se nachází v distálních oblastech chromozómů, zatímco centromerické a pericentromerické oblasti stejně jako telomerické a subtelomerické oblasti jsou charakteristické velkým zastoupením různých typů repetitivních sekvencí DNA.

3.2.1 Repetitivní sekvence DNA

Jak již bylo zmíněno, rostliny s velkými genomy, ke kterým patří také genomy trav, obsahují vysoké procento repetitivní DNA (Britten *et* Kohn, 1968). Z hlediska jejich uspořádání v genomu rozlišujeme repetitivní sekvence na disperzní (rozptýlené) a tandemově uspořádané. Rozptýlené repetitivní sekvence DNA jsou lokalizovány různě mezi geny anebo mezi jinými rodinami repetic. Patří mezi ně především různé

typy mobilních elementů (Obr. 8). Mobilní elementy bývají velmi často autonomní nebo semiautonomní a mají schopnost se v genomu replikovat a pohybovat.



Obr. 8: Typy mobilních elementů.

(Převzato a upraveno: <http://gydb.org/index.php/Intro>)

LTR retrotranspozóny a DNA transpozóny se v rostlinných genomech vyskytují nejčastěji, a představují tak jeho hlavní část (Wicker *et al.*, 2007). Například okolo 85 % genomu kukuřice je složeno ze stovek rodin různých transpozónů, které měly mimo jiné vliv i na polohu centromer některých chromozómů (Schnable *et al.*, 2009).

Tandemově organizované typy sekvencí se skládají z opakujících se repetitivních jednotek uspořádaných těsně za sebou (Flavell, 1980). Na základě délky tohoto opakujícího se monomeru se rozlišují mikrosatelity (1–20 bp), minisatelity (20–100 bp) a satelitní DNA (Charlesworth *et al.*, 1994). Původně se uvádělo, že klasická satelitní DNA se skládá z monomerů o velikosti 100–400 bp. V novějších studiích se však stále častěji daří identifikovat i satelitní DNA, která je složena z několika kilobází dlouhých monomerů (Elisaphenko *et al.*, 1998; Gondo *et al.*, 1998; Hříbová *et al.*, 2010; Kojima *et al.*, 2002; Macas *et al.*, 2009; O’Hare *et al.*, 2002). Tandemové uspořádání a seskupení na jednom nebo více místech mají některé eukaryotické geny, například rRNA geny nebo telomerické sekvence (Lapitan, 1992).

Repetitivní sekvence DNA mají své využití jako molekulární a cytogenetické markery. Tandemové repetice jsou považovány za rychle se vyvíjející součást

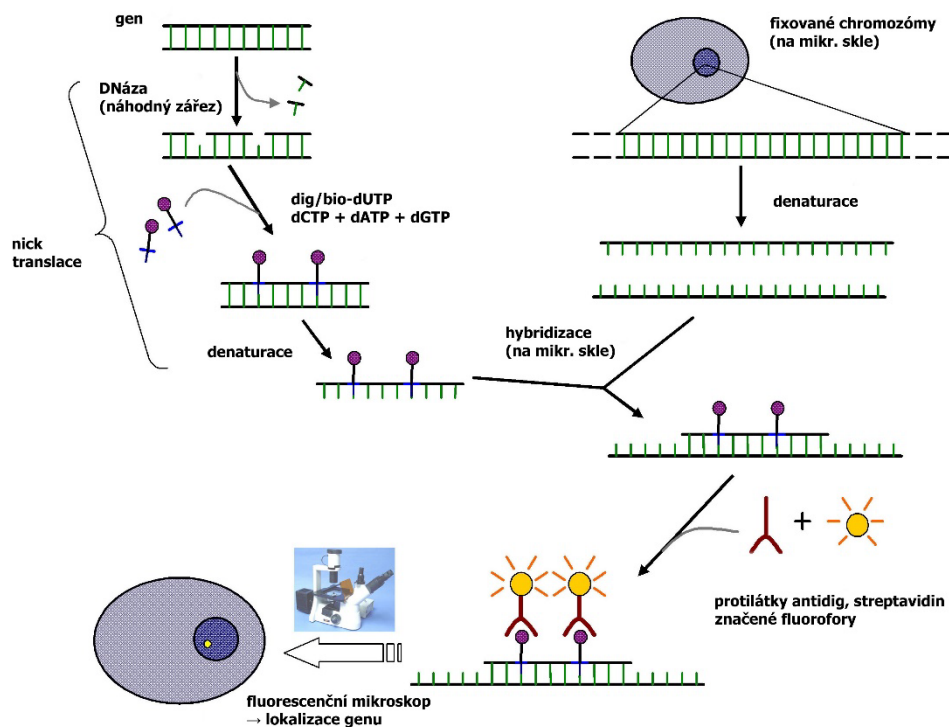
eukaryotického genomu (Alexandrov *et al.*, 2002; Vershinin *et al.*, 1996; Wayne *et Willard*, 1989) a velmi často bývají druhově specifické nebo vykazují chromozómově specifickou lokalizaci. Vzhledem k jejich uspořádání, kdy tvoří i několik megabází dlouhé úseky v genomu, patří tandemové repetice k nejméně prosekvenovaným úsekům genomů (Alkhimova *et al.*, 2004). V genomech některých rostlin, například *Zea mays* (Ananiev *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Heslop-Harrison *et al.*, 1999; Kumekawa *et al.*, 2000) a *Oryza sativa* (Nonomura *et Kurata*, 2001) byla zjištěna přítomnost specifické tandemové repetice (s asi 120 bp dlouhou opakující se repetitivní jednotkou) v centromerické oblasti. Vzhledem k tomu, že tyto rostliny patřily k prvním sekvenovaným genomům rostlin, dlouhou dobu se věřilo, že přítomnost této satelitní DNA je nezbytná pro správnou funkci centromery. Až s rozvojem NGS technologií a jejich použitím u dalších druhů rostlin, bylo zjištěno, že některé druhy ve svých centromerických oblastech satelitní DNA neobsahují (Hřibová *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2002; Macas *et al.*, 2007). Přítomnost typické centromerické satelitní DNA sekvence nebyla prokázána ani u rodu *Festuca* a *Lolium*. V posledních letech byly identifikovány specifické typy LTR retrotranspozónů z rodiny Ty3/Gypsy obsahující chromodoménu, které se vyskytují v centromerických oblastech velkého počtu studovaných druhů rostlin (Kiseleva *et al.*, 2014; Neumann *et al.*, 2011; Novák *et al.*, 2014).

3.3 Cytogenetické mapování

Pomocí cytogenetického mapování lze zobrazit strukturu genomu na úrovni chromozómů. Mezi moderní cytogenetické metody dnes patří fluorescenční *in situ* hybridizace a genomová *in situ* hybridizace. Tyto metody umožňují fyzické mapování různých DNA sekvencí přímo na chromozómy fixované na mikroskopickém skle. U trav se velmi často používá metoda GISH, která je vhodná k rozlišení chromozómů pocházejících z odlišných rodičovských genomů v hybridních druzích *Festulolium* (Kopecký *et al.*, 2006; Kopecký *et al.*, 2008a). Mezi nejčastěji používané DNA sekvence mapované v jaderných genomech rostlin patří rRNA geny, satelitní DNA a další typy repetitivních sekvencí nebo dlouhé fragmenty DNA klonované ve vektoru BAC (Chen *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 2004; Kopecký *et al.*, 2008b).

3.3.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace, ve zkratce FISH (Obr. 9), je metoda, díky které můžeme lokalizovat specifické DNA sekvence v jaderném genomu, například na chromozómy. FISH musí probíhat za přísně stanovených podmínek, tzv. stringence reakce, aby v průběhu hybridizace nedocházelo ke vzniku nekomplementárních molekul mezi sondou a templátovou DNA. Stringence hybridizační reakce je ovlivněna koncentrací formamidu, SSC, délkou a obsahem GC bází sondy.



Obr. 9: Schéma fluorescenční *in situ* hybridizace.

(Převzato a upraveno: <http://www.flogentec.com/en/applications-en/fish/>)

Mezi hlavní parametry metody patří prostorové rozlišení závisící na difrakčním limitu mikroskopu a na kondenzaci chromozomálního či chromatinového vlákna, citlivost detekce, jež je omezena dynamickým rozsahem a citlivostí používané CCD kamery, kvalitou mikroskopu, počtem přímo či nepřímo značených sond (Szinay *et al.*, 2010).

FISH se využívá nejen ke studiu organizace jaderných genomů, ukotvení genetických vazebných skupin na jednotlivé chromozómy, ale také v evolučních studiích (Mandáková *et Lysák*, 2008). S rychlým rozvojem sekvenačních technologií

nové generace a se zvyšujícím se počtem alespoň částečně složených celogenomových sekvencí rostlin se FISH používá také k potvrzení nebo k identifikaci pozic jednotlivých *in silico* složených kontigů DNA na chromozómech (Shearer *et al.*, 2014).

Modifikací FISH je genomová *in situ* hybridizace, ve zkratce GISH, která umožňuje rozlišení chromozómů pocházejících z rodičovských genomů u mezidruhových nebo mezirodových hybridů (Raina *et Rani*, 2001). Metoda GISH je založena na hybridizaci celkové genomové DNA s chromozomální DNA, která je umístěna na mikroskopickém skle (Schwarzacher *et al.*, 1989). GISH se stala metodou využívanou pro detekování rodičovského chromatinu v hybridních genotypch (Thomas *et al.*, 1994). Pomocí ní je možno analyzovat také párování a rekombinace homeologních chromozómů (Kopecký *et al.*, 2010; Kopecký *et al.*, 2008b). U trav je GISH tedy vhodnou metodou pro zjišťování genomového složení mezirodových hybridů *Festulolium* (Kopecký *et Studer*, 2014).

3.4 Cytologická a cytogenetická analýza

Festuca L. patří k nejsložitějším a velmi početným rodům rodiny *Poaceae*. Na Pyrenejském poloostrově je kolem stovky taxonů (Loureiro *et al.*, 2007) a byly zde provedeny četné taxonomické a karyologické studie (de la Fuente *et al.*, 2001; Ortúñez *et de la Fuente*, 2004). Morfologická podobnost mezi jednotlivými kostřavami a zároveň velké množství odrůd ztěžují určování a klasifikaci jednotlivých druhů tohoto rodu (Huff *et Palazzo*, 1998). Mezi dva důležité přístupy k určování druhů patří počet chromozómů a zmíněné morfologické znaky. Znalosti obsahů jaderné DNA mohou sloužit k analýze fylogenetických vztahů (Loureiro *et al.*, 2007) nebo jako informace o komplexitě genomu (Doležel, 1997). Dříve byl odhadován obsah jaderné DNA u kostřav pomocí Feulgenovy mikrodenzitometrie (Bennett *et al.*, 1982; Ceccarelli *et al.*, 1992; Grime *et Mowforth*, 1982; Seal, 1983) a nyní pomocí průtokové cytometrie (Arumuganathan *et al.*, 1999; Huff *et Palazzo*, 1998). Určení ploidie se stalo hlavním taxonomickým nástrojem pro identifikaci kostřav (Huff *et Palazzo*, 1998). Mnoho druhů je polyploidních, avšak pouze dva diploidní druhy jsou určeny jako předci těchto polyploidních druhů (Harper *et al.*, 2004). Fylogeneze hexaploidní *Festuca arundinacea* Schreb. byla určena pomocí genomové *in situ* hybridizace. Celková genomová DNA domnělých ancestrálních druhů byla značena rhodaminem a hybridizována na preparáty hybridů obsahující právě tyto druhy a *Festuca arundinacea*. Stupeň hybridizace

na chromozómy určil homologii se sondou také na genomu *Festuca arundinacea*. Bylo zjištěno, že na vzniku této allohexaploidní kostřavy se podílela dvěma genomy tetraploidní *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* a jedním genomem diploidní *Festuca pratensis* (Humphreys *et al.*, 1995).

Na dvou diploidních druzích *Lolium multiflorum* odolných vůči suchu, které byly odvozeny od hybridu *Lolium multiflorum* a *Festuca arundinacea*, byla provedena GISH. Při použití DNA z *Festuca arundinacea* jako sondy pro tuto GISH bylo zjištěno, že každá introgresní linie nese jeden *Festuca* rekombinantní chromozómový segment, a to v obou diploidech na dlouhém rameni chromozómu 2 tohoto hybridu. Dále bylo popsáno, že DNA sonda z *Festuca pratensis*, což je jeden z předků druhu *Festuca arundinacea*, hybridizoval s introgresním chromozómovým segmentem *Festuca arundinacea*. Je tedy pravděpodobné, že geny způsobující rezistenci vůči suchu jsou přeneseny už z druhu *Festuca pratensis*, tedy subgenomu hybridu *Festuca arundinacea* a *Lolium multiflorum*. Z těchto poznatků je zřejmé, že tento chromozóm 2 nese geny, které rostlině pomáhají přežít v suchém prostředí (Humphreys *et Pasakinskiene*, 1996).

Nejčastějším cytogenetickým markerem používaným v analýze karyotypu trav jsou geny pro rRNA. V genomech blízké příbuzných druhů velmi často poskytují specifickou lokalizaci – rozdílný počet lokusů a pozic na chromozómech (Harper *et al.*, 2004). U trav byly rRNA geny lokalizovány v genomech diploidních i polyploidních druhů. Thomas *et al.* (1997) studovali rozmístění rRNA genů v genomech ekonomicky významných polyploidních kostřav, např. *Festuca arundinacea* Schreb., *Festuca pratensis* Huds., či *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* Boiss. Geny pro rRNA byly také využity pro identifikaci pravděpodobných diploidních předků polyploidních druhů trav (Harper *et al.*, 2004). Kromě rRNA genů bylo v cytogenetických studiích trav využito také tandemových repetitiv a BAC klonů (Kopecký *et al.*, 2008b; Kopecký *et al.*, 2013).

Umístění a počet lokusů rRNA genů byl také studován u tří generací hybridního druhu *Festuca pratensis* × *Lolium perenne*. U různých generací tohoto hybridního klonu byly rRNA geny lokalizovány na rozdílné chromozómy, respektive na různé úseky na chromozómech, což naznačuje přítomnost mezigeneračních chromozomálních přestaveb. Mezi rodičovskými genomy hybridů byly pozorovány změny v počtu rekombinovaných ramen s rDNA nebo bez rDNA (Ksiazczyk *et al.*, 2015).

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metodika

4.1.1 Seznam použitých přístrojů

- výrobník ledové tříště Scotsman MF 26 Ice Flaker (Scotsman Ice Systems, Ipswich, Velká Británie)
- přístroj na úpravu vody Aqua Osmotic 04 (AquaOsmotic s.r.o., Tišnov, Česká republika)
- termostat BT 120 (LABO-MS spol. s.r.o., Praha, Česká republika)
- lyofilizátor Heto Drywinner (Trigon-plus spol. s r.o., Říčany u Prahy, Česká republika) a vakuová pumpa (Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Německo)
- oscilační mlýn MM301 (Retsch, Haan, Německo)
- vortex Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- vodní lázeň WB14 (Memmert, Schwabach, Německo)
- centrifuga IEC Micromax RF Refrigerated Microcentrifuge (International Equipment Company, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- elektroforetická aparatura Owl A6 (Owl Separation Systems, Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- zdroj MP – 300V (Major Science, Saratoga, Kalifornie, USA)
- váhy Vibra AJ – 820CE (Shinko Denshi Co., Ltd., Tokio, Japonsko)
- mikrovlnná trouba KOR-6C2B (Daewoo, Soul, Jižní Korea)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene, Synoptics, Cambridge, Velká Británie) a software GeneSnap V 7.07 (Syngene, Synoptics, Cambridge, Velká Británie)
- tiskárna Digital Graphic Printer UP – D897 (Sony Corporation, Tokio, Japonsko)
- spektrofotometr NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a software ND-1000 V3.1.2 (Coleman Technologies, Inc., Newtown Square, Pennsylvania, USA)

- mikrocentrifuga Mini Star silverline (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- SpeedVac Savant SPD1010 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- flowbox Herasafe KS 15 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- třepačka Duomax 1030 (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- autokláv 2340E (Tuttnauer, Breda, Nizozemsko)
- UV Stratalinker 2400 (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA)
- hybridizační pec Hybridization Incubator Model 1000 pro Southern hybridizace (Robbins Scientific, Sunnyvale, Kalifornie, USA)
- hybridizační pec SM30 pro FISH (Boekel Scientific, Feasterville, Pennsylvania, USA)
- termocykler Mastercycler pro FISH (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- termocykler na 96-jamkové desky C1000 Touch (Bio – Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornie, USA)
- termocykler na mikrozkušavky PTC-200 (Major Science, Saratoga, Kalifornie, USA)
- světelný mikroskop Primo Star (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)
- fluorescenční mikroskop Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) s CCD kamerou, zdroj Power Supply 232 (Eplax GmbH, Bremen, Německo), UV lampa X-Cite exacte (Excelitas, Technologies, Waltham, Massachusetts, USA), software MMC v. 2.4.1 a ISIS v. 5.4.7

4.1.2 Seznam použitých chemikálií

- 99,8% kyselina octová p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 99,8% ethylalkohol pro UV spektroskopii (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 35% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- chlorid sodný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- kyselina boritá (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)

- dihydrát citronanu sodného (PLIVA – Lachema, a.s., Brno, Česká republika)
- koncentrát vývojky pro ruční zpracování RTG filmů FOMA LP-T (FOMA Bohemia spol. s r.o., Hradec Králové, ČR)
- koncentrát rychloustalovače pro ruční zpracování RTG filmů FOMA FIX (FOMA Bohemia spol. s r.o., Hradec Králové, ČR)
- 50× Denhardt's Solution (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Cy®3 – Streptavidin 1 mg/ml (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Anti – Digoxigenin – Fluorescein, Fab fragments 200 µg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- Biotin – Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- DIG – Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- dUTP 1 mmol/l (Jena Bioscience GmbH, Jena, Německo)
- agaróza (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- karmín (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Trizma® base (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- xylenecyanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- 99,9% glycerol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- hexahydrát chloridu hořečnatého (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Taq DNA polymeráza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- pufr pro polymerázu 10× Standard Taq (Mg-free) Reaction Buffer (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- 10× NEBuffer3 (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- *Pst*I 20 U/µl (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- *Hae*III 10 U/µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

- pufr pro štěpení DNA 10 mmol/l Tris-HCl – pH 8,5, 10 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l KCl, 0,1 mg/ml BSA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- λ DNA 300 ng/μl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Sheared Salmon sperm DNA 10 mg/ml (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- dodecylsírán sodný (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- dextran sulfát sodná sůl (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- roztok formaldehydu min. 37% p.a. (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velká Británie)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornie, USA)
- imerzní olej Immersol 518F (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)

4.1.3 Seznam a příprava použitých roztoků

Fixáž 3 : 1 (pro kořínky)

- 99,8% ethylalkohol pro UV spektroskopii
- 99,8% kyselina octová p.a.

Pro přípravu 10 ml fixáže v poměru 3 dílů 99,8% ethylalkoholu a 1 dílu 99,8% kyseliny octové bylo použito 7,5 ml 99,8% ethylalkoholu a 2,5 ml 99,8% kyseliny octové.

1% acetokarmín

- karmín
- 45% kyselina octová

10 g karmínu bylo rozpuštěno v 1 l 45% kyseliny octové. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

5× TBE (pH 8,0)

- Trizma[®] base
- kyselina boritá
- 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)
- redestilovaná voda

54 g Trizma[®] base, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 mol/l EDTA bylo doplněno do 1 l redestilovanou vodou. pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 pomocí 0,1 mol/l HCl. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

6× STOP C

- 0,5 mol/l EDTA
- 10% SDS
- bromfenolová modř
- xylenecyanol
- 99,9% glycerol
- redestilovaná voda

2 ml 0,5 mol/l EDTA, 1 ml 10% SDS, 4,3 ml 99,9% glycerolu, 5 mg bromfenolové modři a 5 mg xylenecyanolu bylo doplněno do 10 ml redestilovanou vodou.

0,5 mg/ml ethidium bromid

- ethidium bromid
- redestilovaná voda

50 mg ethidium bromidu bylo naváženo do uzavíratelné nádoby a rozpuštěno ve 100 ml redestilované vody. Zásobní roztok byl uchováván při laboratorní teplotě ve tmě. Pracovní roztok byl připraven zředěním zásobního roztoku 10× – 100 ml zásobního roztoku bylo doplněno do 1 l redestilovanou vodou.

0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)

- dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové
- redestilovaná voda

18,61 g soli kyseliny ethylendiamintetraoctové bylo doplněno do 100 ml redestilovanou vodou. pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 pomocí 0,1 mol/l NaOH. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

20× SSC

- chlorid sodný
- dihydrát citronanu sodného
- redestilovaná voda

175,3 g chloridu sodného (ve výsledném roztoku 3 mol/l) a 88,2 g dihydrátu citronanu sodného (ve výsledném roztoku 0,3 mol/l) bylo doplněno do 1 l redestilovanou vodou. pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl přefiltrován, 25 min autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

4× SSC (4× SSC/Tween 20)

- 20× SSC
- Tween 20
- redestilovaná voda

200 ml 20× SSC bylo doplněno do 1 l redestilovanou vodou a poté přidány 2 ml Tweenu 20 (ve výsledném roztoku 0,2%). pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

2× SSC

- 20× SSC
- redestilovaná voda

100 ml 20× SSC bylo doplněno do 1 l redestilovanou vodou. pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

0,1× SSC (0,1× SSC/ MgCl₂·6H₂O/Tween 20)

- 20× SSC
- hexahydrát chloridu hořečnatého
- Tween 20
- redestilovaná voda

5 ml 20× SSC bylo doplněno do 1 l redestilovanou vodou, přidáno 0,406 g hexahydrátu chloridu hořečnatého (ve výsledném roztoku 2 mmol/l) a 1 ml Tweenu 20 (ve výsledném roztoku 0,1%). pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

Hybridizační pufr (5× Denhardt's Solution + 5× SSC + 2% SDS)

- 50× Denhardt's Solution
- 20× SSC
- 10% SDS
- redestilovaná voda

K 50 ml redestilované vody bylo přidáno 20 ml 50× Denhardt's Solution, 50 ml 20× SSC a 40 ml 10% SDS. Doplněno do 200 ml redestilovanou vodou. Roztok byl uchováván zamražený.

Promývací pufr WASH 1 – RT

- 20× SSC
- 10% SDS
- redestilovaná voda

K 500 ml redestilované vody bylo přidáno 100 ml 20× SSC a 10 ml 10% SDS a doplněno do 1 l redestilovanou vodou. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

Promývací pufr WASH 2 – RT a WASH 1 – TM

- 20× SSC
- 10% SDS
- redestilovaná voda

K 500 ml redestilované vody bylo přidáno 10 ml 20× SSC a 10 ml 10% SDS a doplněno do 1 l redestilovanou vodou. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

Promývací pufr WASH 2 – TM

- 20× SSC
- 10% SDS
- redestilovaná voda

K 500 ml redestilované vody bylo přidáno 5 ml 20× SSC a 10 ml 10% SDS a doplněno do 1 l redestilovanou vodou. Roztok byl autoklávován a poté uchováván při laboratorní teplotě.

10% SDS

- dodecylsírán sodný
- redestilovaná voda

10 g dodecylsírany sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml redestilované vody. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

4% formaldehyd

- roztok formaldehydu min. 37% p.a.
- 2× SSC

10,8 ml 37% formaldehydu bylo doplněno do 100 ml 2× SSC.

50% dextran sulfát

- dextran sulfát sodná sůl
- redestilovaná voda

2,5 g sodné soli dextran sulfátu bylo přidáno do sterilní kádinky s 5 ml redestilované vody a rozpuštěno při mírném zahřátí. Roztok byl sterilně rozpipetován ustríženou špičkou po 200 µl do 600µl mikrozkuvek a poté zamražen při –20 °C.

1% blokovací činidlo

- Blocking reagent
- 4× SSC/Tween 20

0,5 g Blocking reagent bylo rozpuštěno a mícháno v 50 ml 4× SSC/Tween 20 při 70 °C po dobu 1 h. Roztok byl autoklávován, sterilně rozpipetován po 1 ml do 1,5ml mikrozkuvek a poté zamražen při –20 °C.

4.1.4 Rostlinný materiál

V této diplomové práci bylo pracováno se semínky osmi druhů trav, která byla získána z genové banky IPK, Gatersleben, Německo. Jednalo se o tyto rostlinné druhy: *Festuca pratensis* Fure (FPF), *Festuca pratensis* Westa (FPW), *Festuca arundinacea* (FAR), *Festuca gigantea* (FGI), *Festuca glaucescens* (FGL), *Festuca mairei* (FMA), *Lolium multiflorum* Mitos (LMM), *Lolium perenne* Neptun (LPN).

4.1.5 Izolace genomové DNA a stanovení koncentrace

Asi 20 mg rostlinného materiálu bylo homogenizováno využitím oscilačního mlýnu MM301 s nastavením frekvence 27 Hz a času 4 min. Genomová DNA všech osmi studovaných druhů byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo). Postupováno bylo dle protokolu přiloženého ke kitu. Kvalita genomové DNA byla analyzována pomocí gelové elektroforézy. Jako molekulárního markeru bylo využito 100 ng λ /PstI. Elektroforéza probíhala 90 min při 4 V/cm a byla vyhodnocena po barvení v ethidium bromidu na UV transiluminátoru InGenius.

Koncentrace vyizolované DNA byla stanovena použitím spektrofotometru NanoDrop ND – 1000.

4.1.6 Přenos DNA z gelu na nylonovou membránu (Southern blotting)

Pro Southern blotting bylo použito 3×10^6 ekvivalentů monoploidního genomu. Hodnoty velikostí genomů jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1).

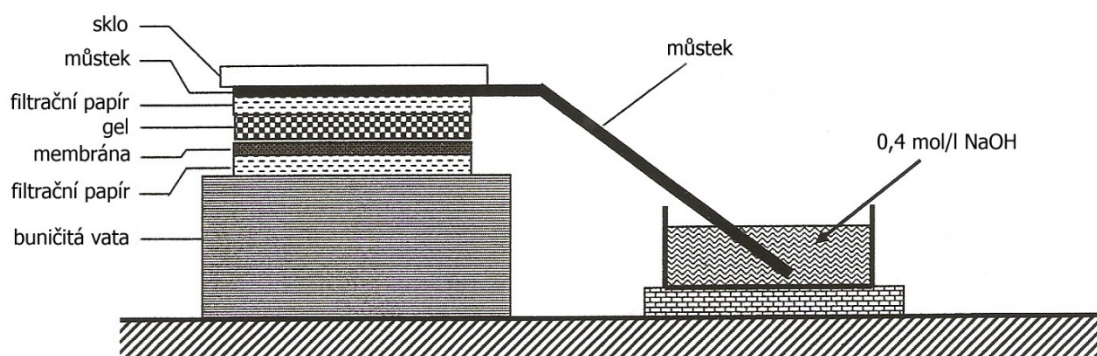
Tab. 1: Komparativní analýza jednotlivých druhů trav. Uvedeny hodnoty ploidie, 1C v Gb a 1C v pg.

zkratka druhu	ploidie	1C [Gb]	1C [pg]
<i>F. pratensis</i> Fure	2n = 2x	3,14	3,21
<i>F. pratensis</i> Westa	2n = 4x	3,05	3,12
<i>F. glaucescens</i>	2n = 4x	2,52	2,58
<i>F. mairei</i>	2n = 4x	2,51	2,57
<i>F. arundinacea</i>	2n = 6x	2,60	2,66
<i>F. gigantea</i>	2n = 6x	3,31	3,38
<i>L. multiflorum</i> Mitos	2n = 4x	2,48	2,54
<i>L. perenne</i> Neptun	2n = 4x	2,58	2,64

Genomová DNA byla štěpena pomocí restriční endonukleázy *Hae*III při 37 °C po dobu 3 h v příslušném pufru (10 mmol/l Tris-HCl – pH 8,5, 10 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l KCl, 0,1 mg/ml BSA). Úspěšnost štěpení byla zkontrolována pomocí

gelové elektroforézy. Následně byly vzorky zakoncentrovány na SpeedVacu Savant SPD1010 na výsledný objem cca 20–25 μl , nanесeny na 1,2% agarózový gel a separovány přes noc při 0,6 V/cm. Po separaci DNA v gelu následovala 30min depurinace gelu v 200 ml 0,25mol/l HCl (w/v) a poté 20min denaturace gelu v 200 ml 0,4mol/l NaOH (w/v). Oba procesy probíhaly v misce na třepačce Duomax 1030.

Přenos DNA z gelu na nylonovou membránu HybondTM – N+ (GE Healthcare, Chicago, USA) byl proveden pomocí tzv. „downward capillary“, jejíž uspořádání je znázorněno na Obr. 10.



Obr. 10: Provedení Southern blottingu.

Přenos DNA probíhal po dobu 4 h. Poté bylo sestavení rozebráno, membrána krátce promyta v 200 ml 2 \times SSC a ponechána sušit ve flowboxu na sterilním filtračním papíře. Po usušení byla DNA na membráně zafixována pomocí UV Stratalinker 2400.

Gel byl po transferu DNA 15 min barven v ethidium bromidu a cílem bylo zjistit, zda veškerá DNA byla přenesena na membránu a nezůstala v agarózovém gelu.

4.1.7 Southern hybridizace

Hybridizační pec Hybridization Incubator Model 1000, sterilní tlustostěnné hybridizační válce (Robbins Scientific, Sunnyvale, Kalifornie, USA) a hybridizační pufr byly vyhřáty na 68 °C. Čistou pinzetou byla do válce vložena membrána a k ní přilito 15 ml předehřátého hybridizačního pufru. Membrána byla prehybridizována se 150 μl Sheared Salmon sperm DNA (10 mg/ml), která byla denaturována 10 min varem a následně 10 min chlazená v ledové tříšti. Prehybridizace membrány probíhala po dobu 1 h. Po prehybridizaci byl pufr s blokovací DNA vyměněn za nový předehřátý hybridizační pufr, ke kterému byla přidána sonda – bitiněm značený PCR produkt nebo biotiněm

značený 50-mer (Tab. 2, Tab. 3) v koncentraci 200 ng/μl, a hybridizace membrány probíhala přes noc při 68 °C.

Další den následovalo odmyváání nenavázané sondy. Membrána byla vložena do plastové misky na třepačku, ve které byly po 200 ml při laboratorní teplotě postupně střídány tyto promývací roztoky: 2× 5 min WASH1 – RT, 2× 5 min WASH2 – RT. Poté, pro stringentní odmyváání při vyšší teplotě, kdy teplota závisí na T_m sondy a zvolené stringenci, ve válci v hybridizační peci: 2× 15 min WASH1 – TM, 1× 15 min WASH2 – TM.

Po odmytí nenavázané sondy následoval postup pro detekci imobilizované nukleové kyseliny, který byl proveden dle pokynů uvedených v použitém kitu Chemiluminescent Nucleic Acid Module (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Tento proces obsahoval následující kroky: 1) blokování membrány 16 ml blokovacího pufru a inkubace při 40 °C v hybridizační peci po dobu 15 min; 2) navázání streptavidinové protilátky při 40 °C po dobu 15 min; 3) promývání membrány 4× 5 min vždy v 20 ml promývacího roztoku; 4) inkubace s chemiluminiscenčním substrátem. Membrána byla nakonec zabalena do potravinářské fólie a ve správné orientaci vložena do kovových desek spolu s rentgenovým filmem Medical X-Ray Film Blue (Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgie). Tyto kroky probíhaly za tmy. Doba expozice se lišila, nejčastěji však byla 30 min. Po uplynutí této doby byl rentgenový film vyjmut z desek, ponořen na 1 min do roztoku vývojky, krátce opláchnut v redestilované vodě a nakonec ponořen na 1 min do roztoku ustalovače a znovu opláchnut redestilovanou vodou.

Vzhledem k tomu, že membrány byly použity pro více hybridizací, bylo nutné po každém experimentu odmyt navázanou sondu. Membrána byla vložena do 800 ml horké redestilované vody s 10 ml 10% SDS na dobu 40 min. Poté byla membrána promyta na třepačce 2× 2 min ve 200 ml 2× SSC. Membrána byla usušena na sterilním filtračním papíře ve flowboxu a uchována při laboratorní teplotě, nebo mohla být hned znovu použita na další Southern hybridizaci.

Tab. 2: Tandemové repetice, použité pro Southern hybridizaci, respektive pro cytogenetickou analýzu.

označení tandemové repetice	název primeru	sekvence primeru
TR1	CL46/120_L	5'-TGCAATAGCTCAGAGCGAAA
	CL46/120_R	5'-CGCATGTCATCCTCTCAGAA
TR4	CL206/107_L	5'-GCCACACCTGGTTTTCCATA
	CL206/107_R	5'-GCGAGGGTGAACCAATGTA
TR5	CL231/50_L	5'-GCCAATGTGTAGACCCCTTC
	CL231/50_R	5'-GCCTGAACATGGGTTTTAGG
TR6	CL286/19_L	5'-GCACTTCTTGGGCAAATCAAG
	CL286/19_R	5'-GATGCCAAGGGTAGCAGTGT
TR7	CL294/18_L	5'-GGGAAGGGCTAACCAGAGG
	CL294/18_R	5'-TGGCATTGTGACTTCGTTTG
TR11	CL411/20_L	5'-ATCATCCATCGCGTTGTCTT
	CL411/20_R	5'-TACCGAGAAGGGTGGCTCAT
TR12	CL414/18_L	5'-GCCCCAGCTATGGATGTCTA
	CL414/18_R	5'-ATGCTTTCTAAACGGCCTCA
TR15	CL437/2_L	5'-AAAACCCATGGCTTGAAGTG
	CL437/2_R	5'-CCTTGCCTAGCTACCTCACG
TR25	FPW_TR25new_L	5'-CCCGTTTTTTCATTTTCATGG
	FPW_TR25new_R	5'-CCCTAGTTCAAATCCGGTCA

Tab. 3: Syntetické oligonukleotidy použité pro Southern hybridizaci.

název tandemové repetice	sekvence primeru
TR2	GCTTGACTTCATAAGACAGAGTTTAGGGTTAGGGGGTAGATACATGATTT
TR9	ATGTTCTGCACGCTTTTCCCCTTATGCTTGCCCCTCCCGCTCCTTCTCTC
TR10	TATGGCCATATTTGTGGCATAGCTTGTTATAACGTGCCCGAATTGCGCAT
TR13	ACACGCGCTTGCACTTCTCGTGCTATGAGGTTGAACTGCCCGACGCGGTT
TR14	CCCGACGTACGGGGACTTTTCCGTTTTTAGCCGATTCGGCCGTATTCGCT
TR16	TCCCTCCTCTGCTCACCATCAGCTCTGGCTTCATCTTCGTACTACTCCTC

4.1.8 Roztlakové preparáty metafázních chromozómů

Semínka jednotlivých druhů trav byla vložena na 2 h do menších kádinek s redestilovanou vodou, vyseta na Petriho misky, do níž byly vloženy dvě vrstvy buničité vaty a jedna vrstva filtračního papíru, a uložena na 1 den do lednice. Další den byly Petriho misky se semínky přesunuty na laboratorní stůl nebo do termostatu BT 120, kde byla udržována teplota 27 °C. Samotné klíčení semínek probíhalo asi 5–7 dní, dle ročního období.

Kořínky naklíčených semínek byly odebrány pomocí pinzety do kádinek naplněných redestilovanou vodou a umístěných v krabici s ledovou tříští. Odběr byl proveden v době mezi 11:00–13:00, kdy jsou buňky v koříncích nejvíce mitoticky aktivní. Odebrané kořínky v kádinkách s ledovou vodou byly přes noc ponechány při teplotě 4 °C. Další den v době mezi 13:00–14:00, čili minimálně po 26–27 h v ledové vodě, byly kořínky osušeny na buničité vatě a přeneseny do 1 ml čerstvě připravené fixáže (3 : 1). Mikroskopické sklo s kořínky bylo na 5–7 dní umístěno do termostatu s teplotou 37 °C. Po uplynutí této doby byly kořínky osušeny na buničité vatě a barveny 1% roztokem acetokarmínu po dobu 2 h. Tímto byly přichystány pro přípravu roztlakových preparátů metafázních chromozómů nebo pro zamrazení v původní fixáži.

Zamražené kořínky byly ještě 15 min dobarčovány v 1% acetokarmínu. Mikroskopická skla Knittel Glass (76 × 26 mm, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs – GmbH, Braunschweig, Německo) byla očištěna pomocí 70% ethanolu. Z kořínku byla skalpelem odstraněna kořenová čepička a do kapky 50% kyseliny octové (w/v) byla přenesena uříznutá kořenová špička o velikosti asi 0,5 mm. Připravený preparát byl přikryt krycím sklem (P-LAB, Praha, Česká republika). Mikroskopické sklo bylo označeno názvem vzorku. Pomocí párátko byl opatrným roztukáním meristému proveden roztlak a preparát následně zafixován opálením nad kahanem. Diamantovým perem byla označena poloha krycího skla. Preparát byl překryt filtračním papírem a na místo krycího skla bylo velkým tlakem zatlačeno. Preparát byl na 1 h položen krycím sklem dolů na blok suchého ledu. Poté byla sklíčka promyta 20 s v roztoku 45% kyseliny octové (w/v) při laboratorní teplotě a následně vložena do 45% kyseliny octové předehřáté na 50 °C, kde byla inkubována 3 min. Skla byla při laboratorní teplotě usušena v digestoři, prohlédnuta pod světelným mikroskopem Zeiss, Primo Star a podle

vzhledu roztlaků metafázních chromozómů byly vybrány nejlepší preparáty, se kterými bylo dále pracováno.

Následovala postfixace preparátů, která zahrnovala jejich inkubaci 2× 5 min v roztoku 2× SSC, dále 10 min fixaci v 4% formaldehydu, inkubaci 3× 4 min ve 2× SSC a dehydrataci ve vzestupné ethanolové řadě, tj. 2 min v 70% ethanolu, 2 min v 90% ethanolu a 2 min v 99,8% ethanolu. Postfixace zajistila větší stabilitu chromozómů při denaturaci a dalších krocích prováděných za zvýšené teploty. Preparáty byly uchovávány v deskách při laboratorní teplotě.

4.1.9 Příprava sond

PCR byla provedena v celkovém objemu 20 µl a obsahovala 1 µmol/l specifické primery (Tab. 2), 200 µmol/l biotinem nebo digoxigeninem značený nukleotidový mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo), 0,5 U Taq polymerázy (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) a 30 ng templátové genomové DNA. PCR byla provedena za použití programu uvedeného v Tab. 4. rDNA byla amplifikována pomocí specificky navržených primerů.

Pro 45S rDNA se jednalo o primery:

FPF_18S_L: ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG,

FPF_18S_R: GTACAAAGGGCAGGGACGTA.

Pro 5S rDNA potom o primery:

FPF_5S_L: CTAGGATGGGTGACCTCCTG,

FPF_5S_R: ACGCTTTTCCCCTTATGCTT.

Tab. 4: Nastavení termocykleru pro PCR.

krok	teplota	doba	počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	5 min	1
denaturace	94 °C	50 s	35
navazování primerů	56 °C	1 min	
extenze	72 °C	1 min	
závěrečná extenze	72 °C	5 min	1
chlazení	4 °C	∞	-

Sondy z ribozomální DNA – 45S značené biotinem a digoxigeninem byly připraveny pomocí nick translace (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) a reakce proběhla za podmínek doporučených výrobcem. 1 µg templátové DNA – vyizolovaného klonu pTa (Barker *et al.*, 1988) nesoucího 4642 bp dlouhý úsek, byl přidán k Biotin nebo Digoxigenin – Nick translačnímu mixu do celkového objemu 20 µl. Nick translační reakce probíhala při 15 °C po dobu 4 h. Poté byla provedena kontrolní elektroforéza v 1,2% agarózovém gelu. Pokud nick translační reakce vedla k vytvoření fragmentů DNA kratších než 500 bp, byla reakce zastavena přidáním 0,5mol/l EDTA a sonda byla následně použita pro fluorescenční *in situ* hybridizaci.

4.1.10 Fluorescenční *in situ* hybridizace

FISH – mix obsahoval 50% formamid, 1× SSC, značené sondy v koncentraci ~ 50 ng/µl a 50% dextran sulfát. Stringence byla stanovena na základě koncentrace formamidu a SSC dle Schwarzacher *et Heslop-Harrison* (2000), tedy 82%.

Hybridizační FISH – mix byl napipetován na mikroskopické sklo s preparátem, ten byl přikryt krycím sklem a denaturován v termocykleru Mastercycler při 80 °C po dobu 4 min. Skla byla poté přenesena do hybridizační pece SM30, kde přes noc při 37 °C probíhala hybridizace sondy na fixované denaturované chromozómy.

Další den bylo provedeno odmyváání nenavázané sondy. Preparáty byly postupně při 42 °C promývány 10 min 2× SSC, 5 min 0,1× SSC, 5 min 2× SSC. Poté bylo provedeno promývání při laboratorní teplotě 10 min ve 4× SSC. Ihned po odmytí nenavázané sondy bylo na preparáty pipetováno po 90 µl 1% blokovačního činidla, přikryto parafilmem a ponecháno inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. Poté byly aplikovány fluorescenčně značené protilátky – streptavidin Cy3 (detekce biotinem značených sond) a antidigoxigenin FITC (detekce digoxigeninem značených sond). Na preparáty bylo pipetováno po 100 µl směsi 1% blokovací činidlo s protilátkou streptavidin Cy3 (ředění 1 : 1000) a protilátkou antidigoxigenin FITC (ředění 1 : 200), přikryto parafilmem a přeneseno na 1 h do hybridizační pece s teplotou 37 °C. Po uplynutí této doby byly preparáty promyty 3× 5 min ve 4× SSC při 42 °C. Skla byla ze spodní strany osušena a na horní stranu bylo přiloženo krycí sklo s 14 µl montovačního média Vectashield s DAPI. Tlakem na krycí sklo nebo pinzetou byly odstraněny vzduchové bubliny a preparáty byly vloženy na 1 h do lednice.

Všechny preparáty byly prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss, Axio Imager.Z2 a snímány pomocí CCD kamery s vysokým rozlišením. Barevné obrázky byly získány pomocí softwaru ISIS v. 5.4.7. Nejvhodnější chromozomální figury byly nasnímány, uloženy a zpracovány pomocí software Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Systems, San José, Kalifornie, USA).

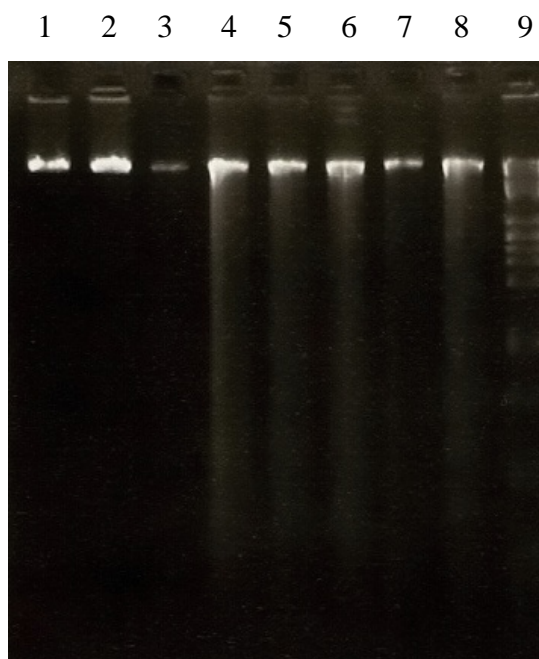
5 Výsledky

Na základě *in silico* analýzy částečných illumina sekvenačních dat osmi studovaných zástupců trav (*Festuca pratensis* Fure, *Festuca pratensis* Westa, *Festuca arundinacea*, *Festuca gigantea*, *Festuca glaucescens*, *Festuca mairei*, *Lolium multiflorum* Mitos, *Lolium perenne* Neptun) byly identifikovány pravděpodobné tandemově organizované repetitivní sekvence DNA. Cílem experimentální části předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda se tandemové sekvence DNA získané *in silico* analýzou nachází v genomech studovaných rostlinných druhů a nepředstavují např. sekvenační artefakty.

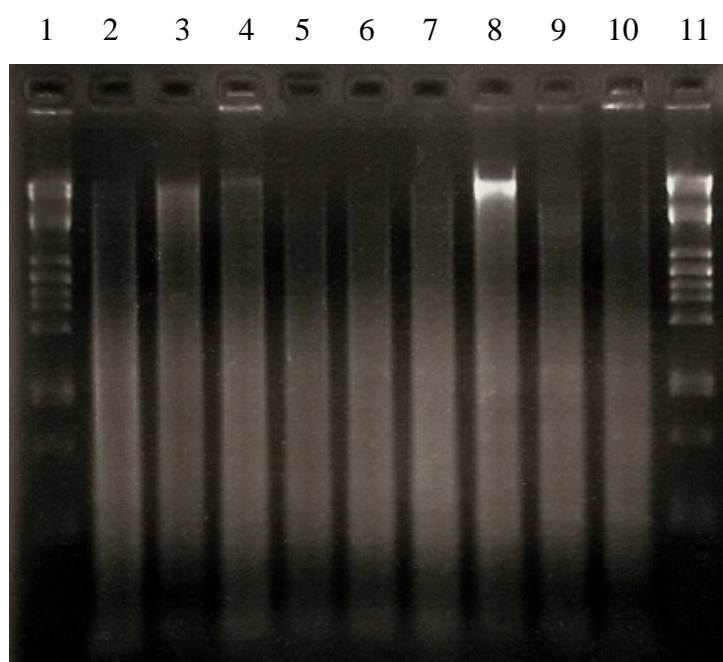
5.1 Southern hybridizace

Pro Southern blotting a následnou Southern hybridizaci byla postupně izolována genomová DNA z osmi druhů trav. Pro příklad je jeden z mnoha výsledků izolací na následujícím výstupu gelové elektroforézy (Obr. 11). Jako molekulární markery byla využita λ DNA a λ /PstI. Oba v zásobní koncentraci 50 ng/ μ l. Elektroforéza probíhala při 130 V po dobu 70 min.

Vzhledem k tomu, že Southern hybridizace je založena na navázání sondy na naštěpenou genomovou DNA uchycenou na nylonové membráně, byla vyizolovaná genomová DNA štěpena enzymem *Hae*III při 37 °C po dobu 4 h. Výsledek štěpení byl zkontrolován pomocí gelové elektroforézy (Obr. 12).



Obr. 11: Příklad několika vyizolovaných genomových DNA v 1,2% agarózové elektroforéze. Dráhy: 1 – 50 ng λ DNA, 2 – 100 ng λ DNA, 3 – FPF, 4 – FMA, 5 – FAR, 6 – FPW, 7 – LPN, 8 – LMM, 9 – 100 ng $\lambda/PstI$.

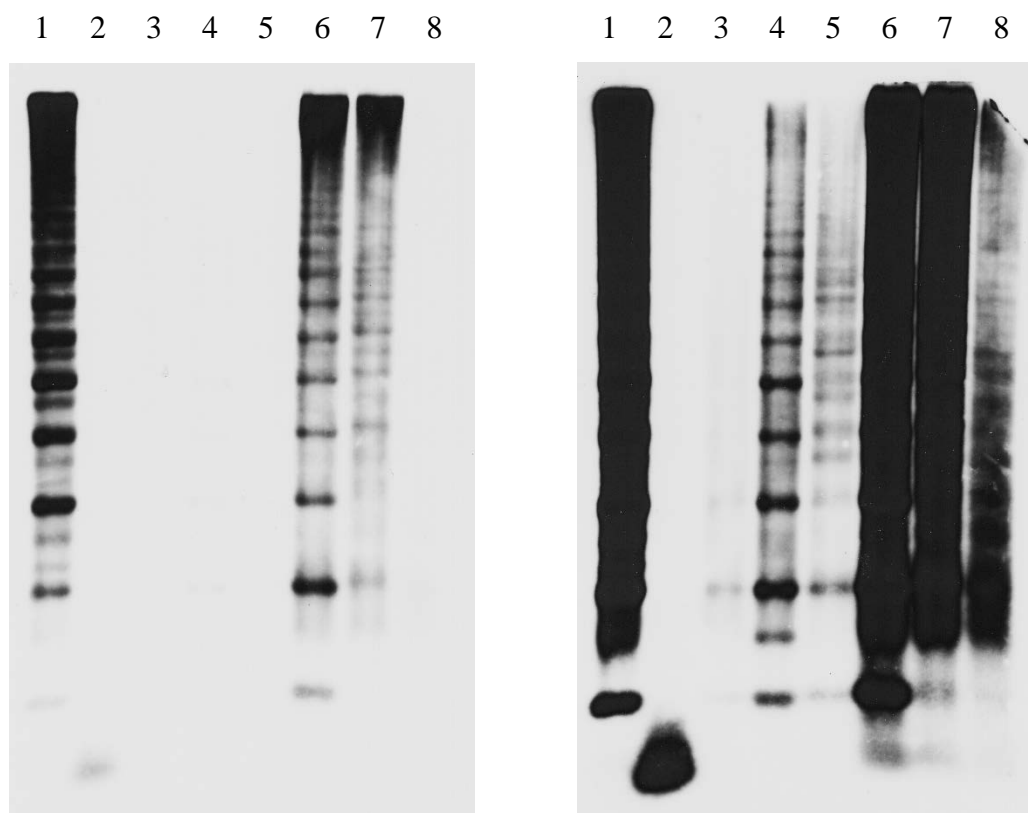


Obr. 12: Příklad naštěpených genomových DNA v 1,2% agarózové elektroforéze. Dráhy: 1 – 100 ng $\lambda/PstI$, 2 – FPF, 3 – FAR, 4 – FGI, 5 – FGL₁, 6 – FGL₂, 7 – FMA, 8 – FPW, 9 – LMM, 10 – LPN, 11 – 100 ng $\lambda/PstI$.

Pokud nastala situace, která je dobře vidět v případě štepení druhu FPW (*Festuca pratensis* Westa) na obrázku 12, byl ke vzorku přidán znovu enzym *Hae*III tak, aby bylo docíleno naštěpení genomové DNA, jako je tomu u ostatních vzorků. Dobře naštěpená genomová DNA je nezbytná pro vznik specifického vzoru (paternu) po Southern hybridizaci se sondou specifickou pro jednotlivé repetitivní sekvenční DNA, v tomto případě tandemově organizované repetice.

Po úspěšném štěpení byla DNA přenesena na nylonovou membránu pomocí Southern blotting metody a membrány byly následně využity pro Southern hybridizaci.

Vzhledem k tomu, že hybridizace tandemově uspořádaných sekvencí DNA poskytuje po Southern hybridizaci specifické uspořádání proužků, tzv. ladder-like pattern, byla tato metoda zvolena pro ověření tandemové povahy analyzovaných repetitivních identifikovaných pomocí *in silico* analýzy. Southern hybridizace potvrdila přítomnost specifického, tzv. ladder-like paternu u všech studovaných tandemových repetitivních. Příklad tohoto specifického vzoru je uveden na obrázku 13.



Obr. 13: Výsledné tandem-like paterny po Southern hybridizaci se sondou TR7. Dráhy: 1 – FPF, 2 – FPW, 3 – FGL, 4 – FMA, 5 – FAR, 6 – FGI, 7 – LMM, 8 – LPN. Vlevo kratší a vpravo delší doba expozice.

Kromě potvrzení přítomnosti tandemově se opakujících jednotek v genomu studovaných druhů byla Southern hybridizace využita také k potvrzení rozdílů počtů kopií studovaných repetit v jaderných genomech jednotlivých druhů. Za tímto účelem bylo pro Southern hybridizaci použito vždy stejné množství monoploidních jaderných genomů studovaných druhů (kap. 4.1.6, Tab. 1). Rozdíly v četnosti daných tandemových repetit mezi analyzovanými druhy potvrdila také *in silico* data.

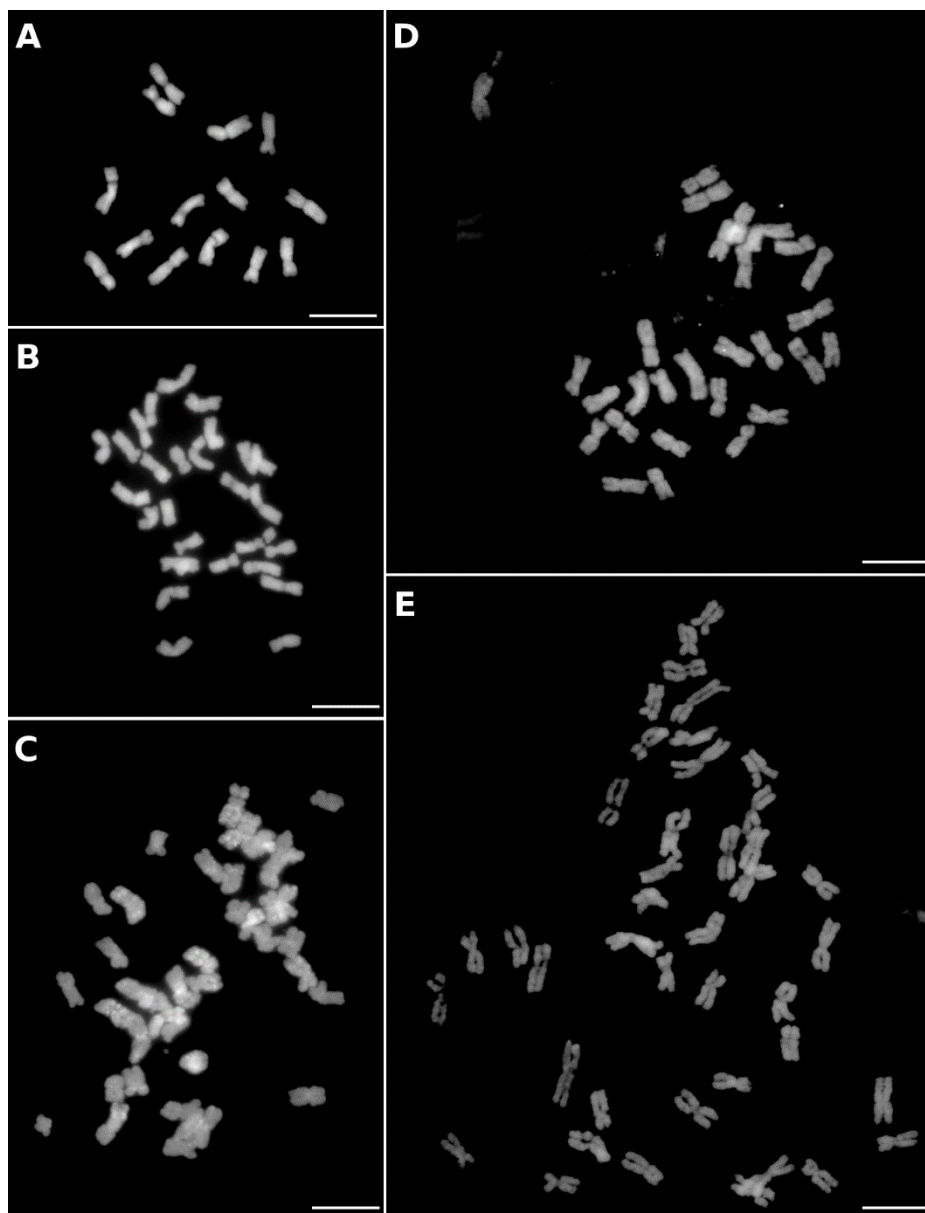
Údaje o četnosti tandemových repetit, stejně tak jako potvrzení tandemového charakteru těchto repetit identifikovaných *in silico* (Tab. 5), byly následně využity pro další část experimentální práce – cytogenetické mapování. Například, pokud se daná tandemová repetice podle *in silico* analýzy a také na základě výsledků Southern analýzy nevyskytovala v daném druhu – poskytla jen velmi slabé nebo žádné signály na genomové DNA po Southern hybridizaci, nebyla použita pro cytogenetické mapování. V případě tandemové repetice TR7 (Obr. 13), byly po Southern hybridizaci získány silné signály v genomech tří zástupců trav – *Festuca pratensis* Fure, *Festuca gigantea* a *Lolium multiflorum* Mitos. U dalších druhů byly získány slabší signály, což koreluje s rozdílnými počty kopií této repetice v genomech jednotlivých zástupců trav.

Tab. 5: Tandemové repetice identifikované *in silico* v illumina sekvenačních datech osmi zástupců trav (/// – tandemová repetice nebyla odhalena v illumina datech, *** – tandemová repetice je součástí spojeného klastru obsahujícího LTR element).

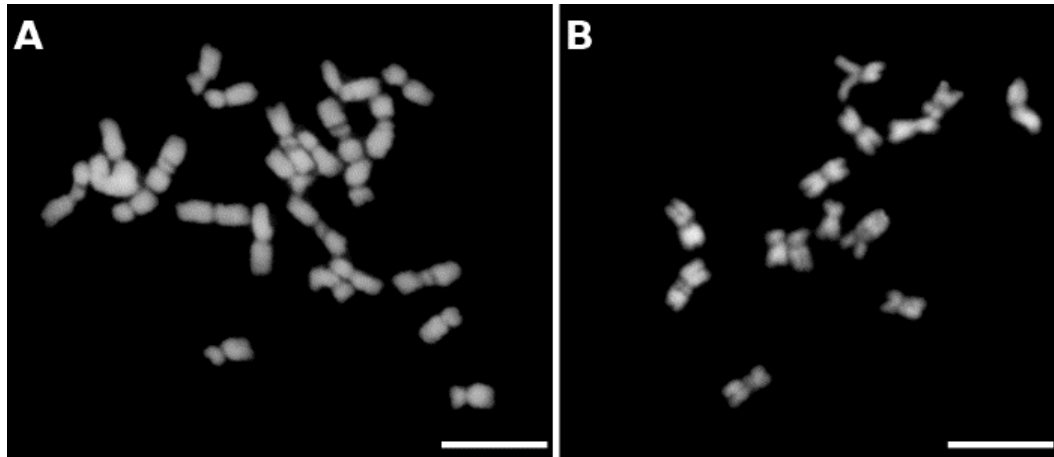
název tandemové repetice	FPF	FPW	FAR	FGI	FGL	FMA	LMM	LPN
	podíl genomu, který představují tandemové repetice [%]							
TR1	0,36	0,52	0,31	0,50	0,09	0,35	1,41	0,77
TR2	0,81	1,00	0,40	***	0,05	0,07	4,64	1,77
TR4	0,39	0,26	0,21	0,54	///	///	0,08	0,11
TR5	0,19	0,12	0,19	1,88	0,33	0,32	///	0,02
TR6	0,13	0,09	0,08	0,68	0,07	0,09	0,08	0,05
TR7	0,98	0,43	0,23	0,80	0,13	///	0,53	0,30
TR9	0,03	0,07	0,11	0,05	0,10	0,08	0,06	0,12
TR10	///	///	0,21	0,87	///	///	///	///
TR11	0,04	///	0,04	0,63	0,10	0,14	///	///
TR12	0,11	0,07	0,09	0,09	0,29	0,20	0,06	0,17
TR13	0,07	0,10	0,06	0,10	0,07	///	///	///
TR14	///	///	///	///	0,11	0,21	0,91	0,72
TR15	0,06	0,03	0,04	0,27	0,02	0,02	///	0,02
TR16	///	///	0,12	0,08	0,14	///	///	///
TR25	///	0,26	///	0,28	0,06	0,08	0,21	0,22

5.2 Cytogenetická lokalizace tandemových repetic

Tandemové repetitivní sekvence DNA byly lokalizovány na metafázní mitotické chromozómy všech studovaných druhů s výjimkou druhu *Festuca glaucescens*, u kterého se nepodařilo získat klíčivá semena. Také semena tetraploidního duhu *Lolium perenne* Neptun neměla dostatečnou klíčivost, a proto byla tato odrůda pro cytogenetické mapování nahrazena diploidním zástupcem *Lolium perenne* L. GR 3320 získaným z genové banky IPK Gatersleben. Kondenzované metafázní chromozómy všech analyzovaných zástupců rodu *Festuca* sp. (Obr. 14) i *Lolium* sp. (Obr. 15) jsou velké podobně jako metafázní chromozómy obilovin a je na nich dobře patrná pozice centromery a často rozlišitelná sekundární konstriktce.



Obr. 14: Mitotické metafázní chromozómy druhů *Festuca pratensis* Fure (A; $2n = 2x = 14$); *Festuca pratensis* Westa (B; $2n = 4x = 28$); *Festuca gigantea* (C; $2n = 6x = 42$); *Festuca mairei* (D; $2n = 4x = 28$) a *Festuca arundinacea* (E; $2n = 6x = 42$). Měřítko v dolním pravém rohu odpovídá 10 μm .



Obr. 15: Mitotické metafázní chromozómy druhu *Lolium multiflorum* Mitos (A; $2n = 4x = 28$) a druhu *Lolium perenne* L. GR 3320 (B; $2n = 2x = 14$). Měřítko v dolním pravém rohu odpovídá 10 μm .

Tandemové repetice vybrané na základě Southern hybridizace a informací, které poskytla *in silico* analýza illumina sekvenačních dat (Tab. 5), byly mapovány na metafázní chromozómy společně s geny pro 45S a 5S rRNA pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Informace o lokalizaci rRNA genů sloužila pro částečnou identifikaci chromozómů a také jako kontrola zdárného průběhu FISH.

Bylo zjištěno, že geny pro 45S rRNA jsou lokalizovány v sekundárních konstrikcích metafázních chromozómů. Počet lokusů je variabilní mezi druhem *Festuca* a druhem *Lolium* (Tab. 6). U některých zástupců, především polyploidních, byla velmi častým jevem přítomnost neúplné metafáze a nepodařilo se tak jednoznačně určit počet lokusů rRNA genů. U většiny analyzovaných zástupců rodu *Festuca* sp. odpovídal počet 45S rDNA lokusů ploidnímu stupni těchto druhů. Jedinou výjimkou byl hexaploidní druh *Festuca gigantea*, u kterého byla 45S rDNA lokalizována pouze na dvou chromozómech a 5S rDNA na čtyřech chromozómech (Tab. 6). V genomu *Lolium perenne* GR 3320 se 45S rDNA nachází v sekundárních konstrikcích osmi chromozómů a u *Lolium multiflorum* se jednoznačný počet lokusů nepodařilo zjistit, ale podobně jako u jílku vytrvalého i tento druh obsahuje více chromozómů se sekundární konstrikcí, kam je lokalizována 45S rDNA.

Tab. 6: Počty lokusů 45S a 5S rDNA u zástupců sledovaných druhů.

název druhu	ploidie	počet lokusů 45S rDNA (2C)	počet lokusů 5S rDNA (2C)
<i>F. pratensis</i> Fure	2n = 2x = 14	2	2
<i>F. pratensis</i> Westa	2n = 4x = 28	4	4
<i>F. mairei</i>	2n = 4x = 28	nelokalizováno	8
<i>F. arundinacea</i>	2n = 6x = 42	6	12 (2 slabší signály)
<i>F. gigantea</i>	2n = 6x = 42	2	4
<i>L. multiflorum</i> Mitos	2n = 4x = 28	nelokalizováno	nelokalizováno
<i>L. perenne</i> GR 3320	2n = 2x = 14	8 (2 slabší signály)	2

Mezi nejčetnější tandemové DNA sekvence u diploidního druhu *Festuca pratensis* Fure (Obr. 16) patří TR7, která poskytla osm viditelných signálů v genomu. K dalším bohatě zastoupeným tandemovým repeticím u tohoto druhu patří TR4, která poskytla čtyři silné a dva slabé, ne vždy viditelné, signály na metafázních chromozómech a TR12, která byla lokalizována na čtyři metafázní chromozómy.

U tetraploidního zástupce *Festuca pratensis* Westa byla po *in silico* analýze přítomnost tandemové repetice TR7 zjištěna v relativně vysokých počtech kopií. I když Southern analýza tuto skutečnost nepotvrdila (Obr. 13), byla tato repetice použita pro cytogenetické mapování. Po FISH na metafázních chromozómech odrůdy Westa poskytla TR7 slabší, ale viditelné signály na čtyřech chromozómech. Slabší, ale viditelné signály na čtyřech chromozómech (dva signály byly velmi slabé a byly pozorovány jen u některých preparátů) poskytla také tandemová repetice TR4. Počet signálů repetice TR12 se u tohoto tetraploidního druhu nepodařilo jednoznačně identifikovat, vzhledem k přítomnosti neúplných metafází.

U dalšího tetraploidního druhu, *Festuca mairei*, patřily k nejčetnějším tandemovým repeticím TR5, TR12 a TR14. Tandemová repetice TR12 poskytla slabé, ale viditelné signály v telomerických oblastech čtyř chromozómů a u některých preparátů byly vidět ještě další dva mnohem slabší signály této repetice (také v telomerických oblastech). Počty signálů dalších tandemových repetic se nepodařilo jednoznačně určit.

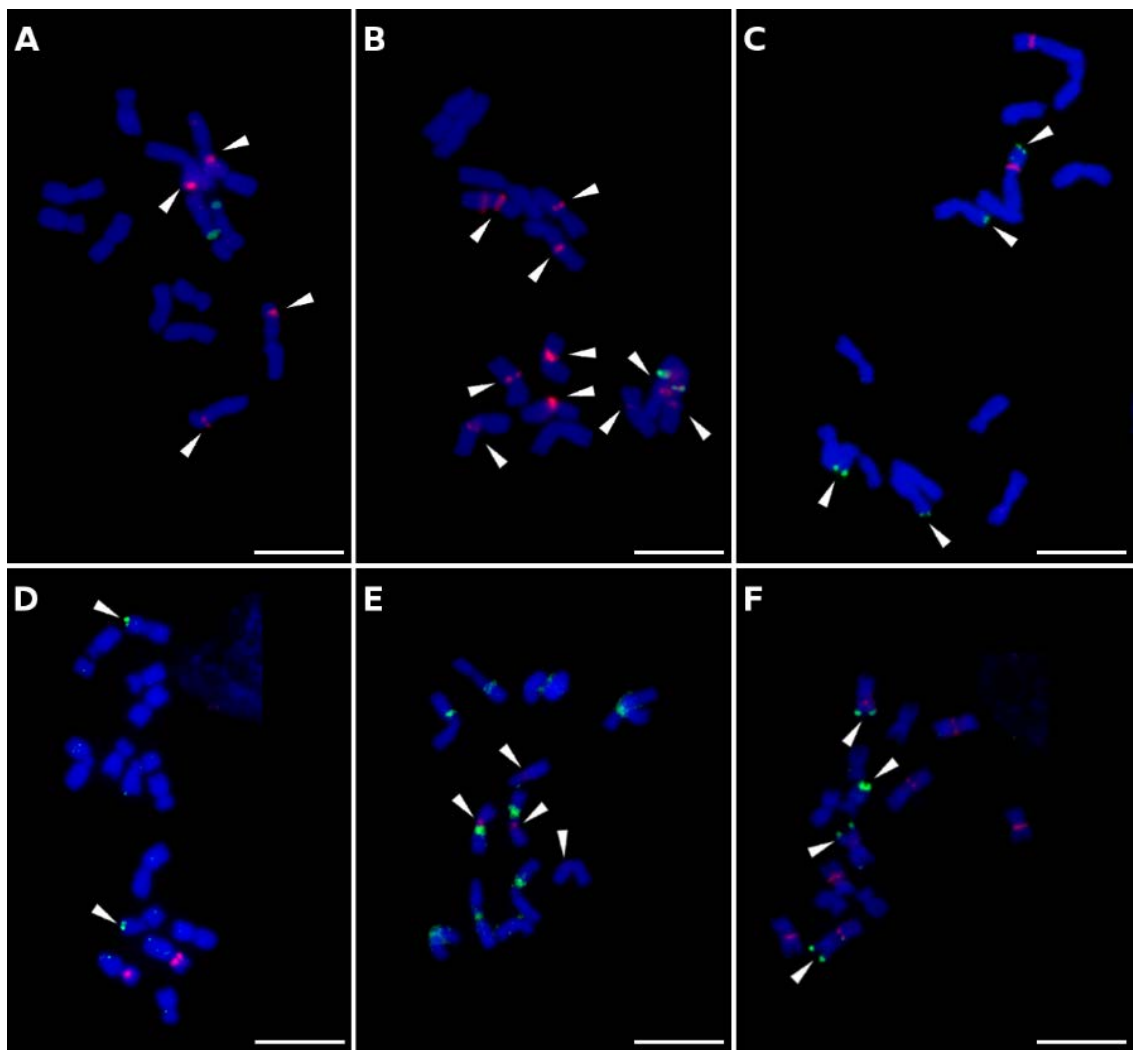
U hexaploidních zástupců *Festuca arundinacea* a *Festuca gigantea* se podařilo zamapovat tandemovou repetici TR6 a to na osm, respektive dvanáct až šestnáct chromozómů v případě *Festuca gigantea*. Cytogenetická lokalizace velmi často

neuspěla díky přítomnosti malého mitotického indexu a neúplných metafází na preparátech těchto dvou polyploidních kostrav. Dalším velmi častým jevem, především u analýzy polyploidních druhů trav, byla přítomnost překrývajících se chromozómů, což znesnadňovalo jejich identifikaci a také identifikaci počtu lokusů mapovaných tandemových repetic.

Podobná situace byla pozorována také u roztakových preparátů druhů *Lolium multiflorum* Mito. Kromě nízkého mitotického indexu obsahovaly preparáty neúplné metafáze a nebylo tak možné jednoznačně identifikovat počty lokusů vybraných tandemových repetic, až na tandemovou repetici TR7, která poskytuje slabé signály a vyskytuje se v pericentromerických oblastech na čtyřech chromozómech. Stejnou lokalizaci poskytla tato repetice i v genomu diploidního zástupce druhu *Lolium perenne* (Obr. 16). Na metafázní chromozómy tohoto druhu se dále podařilo zamapovat a jednoznačně identifikovat počet a pozici tandemových repetic TR4, která se vyskytovala na dvou chromozómech a TR12, která byla zjištěna na čtyřech chromozómech. Výsledky cytogenetického mapování jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7: Počty lokusů mapovaných tandemových repetitiv u sledovaných zástupců.

název druhu	ploidie	počet lokusů TR4	počet lokusů TR6	počet lokusů TR7	počet lokusů TR12
<i>F. pratensis</i> Fure	$2n = 2x = 14$	4 silné (+ 2 slabé)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	8 (2 lokalizují na stejných chromozómech jako 5S rDNA)	4 (2 silnější lokalizují na stejných chromozómech jako 45S rDNA)
<i>F. pratensis</i> Westa	$2n = 4x = 28$	2–4 (nelokalizují na stejných chromozómech jako rDNA)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	4 (nelokalizují na stejných chromozómech jako 5S rDNA)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>
<i>F. mairei</i>	$2n = 4x = 28$	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	4–6 (telomerické oblasti chromozómů; nelokalizují na stejných chromozómech jako 5S rDNA)
<i>F. arundinacea</i>	$2n = 6x = 42$	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	8 (2 telomerické a 6 pericentromerických)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	telomerické oblasti 6 chromozómů (2 slabší signály; nelokalizují na stejných chromozómech jako 5S rDNA)
<i>F. gigantea</i>	$2n = 6x = 42$	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	slabší signály na velkém počtu chromozómů (12–16)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>
<i>L. multiflorum</i> Mitos	$2n = 4x = 28$	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	2–4 (na jednom páru lokalizují na stejných chromozómech jako 45S rDNA)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>
<i>L. perenne</i> GR 3320	$2n = 2x = 14$	2 (nelokalizují na stejných chromozómech jako 5S rDNA)	<i>nepodařilo se jednoznačně určit počet lokusů</i>	2–4 (na jednom páru lokalizují na stejných chromozómech jako 45S rDNA)	4 (lokalizují na stejných chromozómech jako 45S rDNA)



Obr. 16: Fluorescenční *in situ* hybridizace tandemových repetic na diploidním druhu *Festuca pratensis* Fure: (A) lokalizace TR4 (červený signál) a 5S rDNA (zelený signál); (B) lokalizace TR7 (červený signál) a 5S rDNA (zelený signál); (C) lokalizace TR12 (zelený signál) a 45S rDNA (červený signál). FISH na diploidním zástupci *Lolium perenne* L.: (D) lokalizace TR4 (zelený signál) a 5S rDNA (červený signál); (E) lokalizace TR7 (červený signál) a 45S rDNA (zelený signál); (F) lokalizace TR12 (zelený signál) a 45S rDNA (červený signál). Signály tandemových repetic jsou zvýrazněny šipkami, měřítko odpovídá 10 μm .

6 Diskuze

Velikosti genomů trav se pohybují okolo $1C \sim 2\text{--}10\text{ Gb}$ a řadí se tedy mezi rostliny s velkými a často polyploidními genomy. Převážnou část velkých rostlinných genomů představují různé typy repetitivních sekvencí DNA. Dříve se o repetitivní DNA mluvilo jako o tzv. „odpadní DNA“, pozdější studie však prokázaly její nezastupitelnou roli v genomech rostlin. Mezi tyto repetitivní sekvence DNA patří především telomerické a centromerické repetice, které jsou nezbytné pro správnou funkci těchto oblastí chromozómů, respektive genomu. Povahu repetitivních sekvencí mají také geny kódující ribozomální DNA, které se v genomech vyskytují ve vysokém počtu kopií, uspořádaných tandemově za sebou. Nejčtenějšími repetitivními sekvencemi DNA v genomech rostlin jsou však různé typy transponovatelných elementů. Tyto elementy bývají autonomní nebo semiautonomní a jsou schopny se v jaderných genomech replikovat a své kopie vkládat do nových genomových oblastí. Tímto způsobem se podílejí velkým dílem na variabilitě genomů, ale také na umlčování některých genů (pokud se nová kopie, nebo v případě DNA transpozónů samotný element, integruje do promotorových nebo jiných oblastí genů). Repetitivní DNA sekvence jsou, na rozdíl od genových sekvencí DNA, rychle se vyvíjející oblasti DNA. Této skutečnosti je využíváno při použití repetice jako molekulárních a cytogenetických markerů.

Identifikovat druhově specifické repetitivní sekvence DNA je v dnešní době velmi usnadněno použitím masivně paralelních sekvenačních technologií. Toto sekvenování nové generace umožňuje ve velmi krátkém čase vyprodukovat miliony sekvenačních čtení. Sekvenování nové generace, illumina sekvenování, bylo aplikováno i na osm blízce příbuzných zástupců trav. Šest genotypů rodu *Festuca* – *Festuca pratensis* Fure (diploid), *Festuca pratensis* Westa (tetraploid), *Festuca arundinacea* (hexaploid), *Festuca gigantea* (hexaploid), *Festuca glaucescens* (tetraploid), *Festuca mairei* (tetraploid) a dva genotypy rodu *Lolium* – *Lolium multiflorum* Mítos (tetraploid) a *Lolium perenne* Neptun (tetraploid). Illumina sekvence byly použity pro analýzu specifických repetitivních sekvencí DNA (Hřibová, nepublikováno). *In silico* metody dnes relativně jednoduše umožňují nejen identifikovat a charakterizovat jednotlivé

sekvence DNA, ale u repetice také stanovit jejich pravděpodobné počty kopií v genomu (Hřibová *et al.*, 2010; Macas *et al.*, 2007; Macas *et al.*, 2015; Novák *et al.*, 2010). Zatímco počty kopií stanovené na základě *in silico* analýzy u různých typů transponovatelných elementů korelují s experimentálním ověřením, u tandemových repetice se mnohdy setkáme s velkými rozdíly mezi *in silico* a experimentálními daty (Macas *et al.*, 2007; Macas *et al.*, 2015; Novák *et al.*, 2010).

Vhodnou experimentální metodou pro ověření tandemové povahy repetitivní DNA a také pro stanovení, respektive ověření rozdílů v četnosti daných repetice mezi studovanými druhy, je Southern hybridizace (Southern, 1975). Tato metoda byla využita i v předkládané diplomové práci. Bylo analyzováno celkem patnáct *in silico* identifikovaných tandemových repetice. U všech bylo experimentálně ověřeno jejich tandemové uspořádání v genomu a zároveň potvrzeny rozdíly v četnosti mezi osmi analyzovanými zástupci trav. Veškeré Southern hybridizace byly prováděny při vysoké, 90%, stringenci proto, aby nedocházelo k tvorbě nekomplementárních dvouvláknových úseků mezi sondou a genomovou DNA uchycenou na nylonové membráně. Kdyby hybridizace probíhala za nižší stringence, mohly by být výsledky, týkající se rozdílů četností jednotlivých tandemových repetice v genomech trav, velmi zavádějící.

Jak již bylo uvedeno, na základě Southern hybridizace byly vybrány tandemové repetice s vysokým počtem opakování v genomech příslušných druhů trav a použity pro cytogenetické mapování pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace na roztlakových preparátech metafázních chromozómů.

Tandemově organizované repetitivní sekvence DNA se na chromozómech vyskytují v tzv. klastrech, které mohou být až několik megabází dlouhé, a patří tak k nejpoužívanějším a nejoblíbenějším cytogenetickým markerům (Alkhimova *et al.*, 2004; Ceccarelli *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2000; Čížková *et al.*, 2013; Kopecký *et al.*, 2013). Tandemové repetice jsou jedny z nejrychleji se vyvíjejících DNA sekvencí v genomu, a proto bývají velmi často druhově specifické – v jaderných genomech jsou často lokalizovány jen na některých chromozómech. Z těchto důvodů bývají využívány pro analýzu karyotypu, identifikaci jednotlivých chromozómů, stejně tak i v evolučních studiích (Alkhimova *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2005; Mandáková *et Lysák*, 2008).

Neméně důležitou metodou využívanou v experimentální části této diplomové práce byla cytogenetická metoda FISH. Hybridizace *in situ* jsou obecně velice častým přístupem v problematice genomiky, respektive cytogenetiky trav, jelikož umožňují

poznání struktury genomu na chromozomální úrovni a poskytují tak například požadované informace o lokalizaci druhově specifických genů. Jelikož se v rostlině říši, a u trav nevyjímaje, často děje či cíleně provádí křížení nebo jiné postupy využitelné ve šlechtění, jsou cytogenetické metody nezbytné pro určování ancestrálních genomů těchto četných hybridů a tím přispívají k lepšímu pochopení fylogenetických vztahů. V současnosti je pozornost zaměřena na hybrida vzniklého křížením zástupců rodů *Festuca* a *Lolium*, tzv. *Festulolium* (Kopecký *et al.*, 2008a).

V rámci této práce bylo dosaženo většiny potřebných experimentálních ověření *in silico* analýzy a všechny výsledky byly přehledně zpracovány. Prakticky byl potvrzen či vyvrácen teoretický obsah a množství tandemových repetice v genomu trav – rodů *Festuca* a *Lolium*. Ne vždy však mohl být výsledek jasně určen, jelikož cytogenetickou část znesnadňovala přítomnost neúplných metafází v roztlakových preparátech. I přes tyto potíže, které mohly být způsobeny pravděpodobně zimním obdobím, ve kterém semena trav i přes inkubaci v termostatu neposkytla vysokou klíčivost a kořenové meristémy neposkytly dostatečný počet metafázních chromozómů, byly charakterizovány tandemové repetice, které mohou být využitelné jako cytogenetické markery v dalších studiích. Byly potvrzeny chromozómově specifické lokalizace u všech mapovaných tandemových repetice a lze tak jednoznačně konstatovat, že tyto nové tandemové repetice mohou být použity nejen pro identifikaci jednotlivých chromozómů, ale případně i pro evoluční studie.

7 Závěr

Teoretická část této diplomové práce se zabývá problematikou významu a využití trav, zvláště pak bližším pohledem na rody *Festuca* a *Lolium*. Další kapitoly obsahují rešerši na téma repetitivních sekvencí DNA v rostlinných genomech a cytogenetické přístupy pro jejich analýzu. Prakticky byly prováděny Southern hybridizace a fluorescenční *in situ* hybridizace na osmi druzích trav výše zmíněných rodů. Pozornost byla věnována tandemovým repetitím a jejich lokalizaci v genomu.

Analýza tandemových repetit v příbuzných genomech druhů *Festuca* a *Lolium* probíhala s využitím informací předchozí *in silico* analýzy. *In silico* data byla v předkládané diplomové práci ověřena s využitím experimentálních metod – Southern hybridizace. Všechny výsledky byly zpracovány a *in silico* analýza tak byla v mnoha aspektech potvrzena experimentálními daty. Tandemové repetice poskytly pomocí FISH signály na specifických místech v genomu (na chromozómech) a diplomová práce tak poskytla nové informace o lokalizaci těchto sekvencí DNA v genomu trav.

8 Literatura

Alexandrov, I., Kazakov, A., Tumeneva, I., Shepelev, V., Yurov, Y. (2002): Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma* 110: 253 – 266.

Alkhimova, O. G., Mazurok, N. A., Potapova, T. A., Zakian, S. M., Heslop-Harrison, J. S., Vershinin, A. V. (2004): Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes. *Chromosoma* 113: 42 – 52.

Ananiev, E. V., Phillips, R. L., Rines, H. W. (1998): Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 13073 – 13078.

Arumuganathan, K., Tallury, S. P., Fraser, M. L., Bruneau, A. H., Qu, R. (1999): Nuclear DNA content of thirteen turfgrass species by flow cytometry. *Crop Science* 39: 1518 – 1521.

Barker, R. F., Harberd, N. P., Jarvis, M. G., Flavell, R. B. (1988): Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. *Journal of Molecular Biology* 201(1): 1 – 17.

Bennett, M. D., Smith, J. B., Smith, R. I. L. (1982): DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia. *Environmental and Experimental Botany* 22(3): 307 – 318.

Benoit, M., Simon, J. C. (2004): Grassland and water resources: recent findings and challenges in Europe. *Grassland Science in Europe* 9: 117 – 128.

Britten, R. J., Kohn, D. E. (1968): Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529 – 541.

Catalán, P., Torrecilla, P., López Rodríguez, J. A., Olmstead, R. G. (2004): Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (*Poaceae*, *Pooideae*) inferred from ITS and trnL-F sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31(2): 517 – 41.

Ceccarelli, M., Falistocco, E., Cionini, P. G. (1992): Variation of genome size and organization within hexaploid *Festuca arundinacea*. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 273 – 278.

Ceccarelli, M., Sarri, V., Natali, L., Giordani, T., Cavallini, A., Zuccolo, A., Jurman, I., Morgante, M., Cionini, P. G. (2007): Characterization of the chromosome complement of *Helianthus annuus* by in situ hybridization of a tandemly repeated DNA sequence. *Genome* 50(5): 429 – 34.

Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994): The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215 – 220.

Chen, C. C., Chen, C. M., Hsu, F. C., Wang, C. J., Yang, J. T., Kao, Y. Y. (2000): The pachytene chromosomes of maize as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 30 – 36.

Čížková, J., Hřibová, E., Humplíková, L., Christelová, P., Suchánková, P., Doležel, J. (2013): Molecular analysis and genomic organization of major DNA satellites in banana (*Musa* spp.). *PLoS One* 8(1):e54808. doi: 10.1371/journal.pone.0054808.

de la Fuente, V., Ferrero, L. M., Ortúñez, E. (2001): Chromosome counts in the genus *Festuca* L. section *Festuca* (*Poaceae*) in the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* 137(4): 385 – 398.

Doležel, J. (1997): Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38: 285 – 302.

Elisaphenko, E. A., Nesterova, T. B., Duthie, S. M., Ruldugina, O. V., Rogozin, I. B., Brockdorff, N., Zakian, S. M. (1998): Repetitive DNA sequences in the common vole: cloning, characterization and chromosome localization of two novel complex repeats MS3 and MS4 from the genome of the East European vole *Microtus rossiaemeridionalis*. *Chromosome research* 6(5): 351 – 60.

Farrar, K., Bryant, D. N., Turner, L., Gallagher, J. A., Thomas, A., Farrell, M., Humphreys, M. O., Donnison, I. S. (2012): Breeding for bio-ethanol production in *Lolium perenne* L.: Association of allelic variation with high water-soluble carbohydrate content. *Bioenergy Research* 5(1): 149 – 157.

Flavell, R. (1980): The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 569 – 596.

Frame, J. (1991): Herbage production and quality of a range of secondary grass species at five rates of fertilizer nitrogen application. *Grass and Forage Science* 46(2): 139 – 151.

Gondo, Y., Okada, T., Matsuyama, N., Saitoh, Y., Yanagisawa, Y., Ikeda, J. E. (1998): Human megasatellite DNA RS447: copy-number polymorphisms and interspecies conservation. *Genomics* 54: 39 – 49.

Grime, J. P., Mowforth, M. A. (1982): Variation in genome size – an ecological interpretation. *Nature* 299: 151 – 153.

Han, Y. H., Zhang, Z. H., Liu, J. H., Lu, J. Y., Huang, S. W., Jin, W. W. (2008): Distribution of the tandem repeat sequences and karyotyping in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 122(1): 80 – 8.

Hand, M. L., Cogan, N. O., Stewart, A. V., Forster, J. W. (2010): Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evolutionary Biology* 10: 303.

Hanuš, J. (red.) (1999): ABC Přírody. Praha: Reader's Digest Výběr. 328 s. ISBN 80-86196-06-2.

Harper, J. A., Thomas, I. D., Lovatt, J. A., Thomas, H. M. (2004): Physical mapping of rDNA sites in possible diploid progenitors of polyploid *Festuca* species. *Plant Systematics and Evolution* 245(3): 163 – 168.

Heslop-Harrison, J. S. (1991): The molecular cytogenetics of plants. *Journal of Cell Science* 100: 15 – 21.

Heslop-Harrison, J. S., Murata, M., Ogura, Y., Schwarzacher, T., Motoyoshi, F. (1999): Polymorphism and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes. *Plant Cell* 11: 31 – 42.

Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T. (2011): Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* 66: 18 – 33.

Hřibová, E., Neumann, P., Matsumoto, T., Roux, N., Macas, J., Doležel, J. (2010): Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing. *BMC Plant Biology* 10: 204.

<http://www.flogentec.com/en/applications-en/fish/> (cit. 2016 - 04 - 25)

<http://gydb.org/index.php/Intro> (cit. 2016 - 04 - 25)

Huff, D. R., Palazzo, A. J. (1998): Fine fescue species determination by laser flow cytometry. *Crop Science* 38(2): 445 – 450.

Humphreys, M., Feuerstein, U., Vandewalle, M., Baert, J. (2010): Ryegrasses. In: Boller, B., Posselt, U. K., Veronesi, F. (eds.). *Fodder Crops and Amenity Grasses, Handbook of Plant Breeding*. Springer: 1 – 12.

Humphreys, M. W., Pasakinskiene, I. (1996): Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. *Heredity* 77: 530 – 534.

Humphreys, M. W., Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith, M. R., Harper, J. A., Thomas, H., Zwierzykowski, Z., Ghesquiére, M. (1995): Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity* 75: 171 – 174.

Hutchinson, J., Rees, H., Seal, A. G. (1979): An essay of the activity of supplementary DNA in *Lolium*. *Heredity* 43: 411 – 421.

Inda, L. A., Segarra-Moragues, J. G., Müller, J., Peterson, P. M., Catalán, P. (2008): Dated historical biogeography of the temperate *Loliinae* (*Poaceae*, *Pooideae*) grasses in the northern and southern hemispheres. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 932 – 957.

Jenkin, T. J. (1949): Selecting new grasses for breeding. *Research* 2: 502 – 506.

Kim, N. S., Armstrong, K. C., Fedak, G., Ho, K., Park, N. I. (2002): A microsatellite sequence from the rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) distinguishes between the centromeres of *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* in hybrid plants. *Genome* 45(1): 165 – 74.

Kiseleva, A. V., Kirov, I. V., Khrustaleva, L. I. (2014): Chromosomal organization of centromeric Ty3/gypsy retrotransposons in *Allium cepa* L. and *Allium fistulosum* L. *Genetika* 50(6): 670 – 6.

Kojima K. K., Kubo, Y., Fujiwara, H. (2002): Complex and tandem repeat structure of subtelomeric regions in the Taiwan cricket, *Teleogryllus taiwanemma*. *Journal of Molecular Evolution* 54(4): 474 – 85.

Kopecký, D., Havránková, M., Loureiro, J., Castro, S., Lukaszewski, A. J., Bartoš, J., Kopecká, J., Doležel, J. (2010): Physical distribution of homoeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. *Cytogenetic and Genome Research* 129(1-3): 162 – 72.

Kopecký, D., Loureiro, J., Zwierzykowski, Z., Ghesquière, M., Doležel, J. (2006): Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theoretical and Applied Genetics* 113(4): 731 – 742.

Kopecký, D., Lukaszewski, A. J., Doležel, J. (2008a): Cytogenetics of Festulolium (*Festuca* × *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(7): 987 – 98.

Kopecký, D., Martis, M., Číhalíková, J., Hříbová, E., Vrána, J., Bartoš, J., Kopecká, J., Cattonaro, F., Stočes, Š., Novák, P., Neumann, P., Macas, J., Šimková, H., Studer, B., Asp, T., Baird, J. H., Navrátil, P., Karafiátová, M., Kubaláková, M., Šafář, J., Mayer, K., Doležel, J. (2013): Flow sorting and sequencing meadow fescue chromosome 4F. *Plant Physiology* 163(3): 1323 – 37.

Kopecký, D., Studer, B. (2014): Emerging technologies advancing forage and turf grass genomics. *Biotechnology Advances* 32: 190 – 199.

Ksiazczyk, T., Zwierzykowska, E., Molik, K., Taciak, M., Krajewski, P., Zwierzykowski, Z. (2015): Genome-dependent chromosome dynamics in three successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrid. *Protoplasma* 252(4): 985 – 96.

Kumekawa, N., Hosouchi, T., Tsuruoka, H., Kotani, H. (2000): The size and sequence organization of the centromeric region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. *DNA Research* 8: 285 – 290.

Lapitan, N. L. V. (1992): Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genomes* 35: 171 – 181.

Lim, K. B., de Jong, H., Yang, T. J., Park, J. Y., Kwon, S. J., Kim, J. S., Lim, M. H., Kim, J. A., Jin, M., Jin, Y. M., Kim, S. H., Lim, Y. P., Bang, J. W., Kim, H. I., Park, B. S. (2005): Characterization of rDNAs and tandem repeats in the heterochromatin of *Brassica rapa*. *Molecules and Cells* 19(3): 436 – 44.

Loureiro, J., Kopecký, D., Castro, S., Santos, C., Silveira, P. (2007): Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. *Plant Systematics and Evolution* 269: 89 – 105.

Macas, J., Koblížková, A., Navrátilová, A., Neumann, P. (2009): Hypervariable 3' UTR region of plant LTR-retrotransposons as a source of novel satellite repeats. *Gene* 448(2): 198 – 206.

Macas, J., Neumann, P., Navrátilová, A. (2007): Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. BMC Genomics 8: 427.

Macas, J., Novák, P., Pellicer, J., Čížková, J., Koblížková, A., Neumann, P., Fuková, I., Doležel, J., Kelly, L. J., Leitch, I. J. (2015): In depth characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe *Fabeae*. PLoS One 10(11): e0143424. doi: 10.1371/journal.pone.0143424.

Mandáková, T., Lysák, M. A. (2008): Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x = 7$ crucifer species (*Brassicaceae*). Plant Cell 20(10): 2559 – 2570.

Mestdagh, I., Lootens, P., Van Cleemput, O., Carlier, L. (2006): Variation in organic-carbon concentration and bulk density in Flemish grassland soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 169(5): 616 – 622.

Meyerowitz, E. M. (1989): *Arabidopsis*, a useful weed. Cell 56: 263 – 269.

Neumann, P., Navrátilová, A., Koblížková, A., Kejnovský, E., Hříbová, E., Hobza, R., Widmer, A., Doležel, J., Macas, J. (2011): Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective. Mobile DNA 2(1): 4.

Nonomura, K. I., Kurata, N. (2001): The centromere composition of multiple repetitive sequences on rice chromosome 5. Chromosoma 110: 284 – 291.

Novák, P., Hříbová, E., Neumann, P., Koblížková, A., Doležel, J., Macas, J. (2014): Genome-wide analysis of repeat diversity across the family *Musaceae*. PLoS One 9(6): e98918. doi: 10.1371/journal.pone.0098918.

Novák, P., Neumann, P., Macas, J. (2010): Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. BMC Bioinformatics 11: 378.

O'Hare, K., Chadwick, B. P., Constantinou, A., Davis, A. J., Mitchelson, A., Tudor, M. (2002): A 5.9-kb tandem repeat at the euchromatin-heterochromatin boundary of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. Molecular Genetics and Genomics 267(5): 647 – 655.

Ortúñez, E., de la Fuente, V. (2004): Chromosome counts in the genus *Festuca* section *Eskia* (*Poaceae*) in the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146(3): 331 – 337.

Pedro Silva, J., Toland, J., Jones, W., Eldridge, J., Thorpe, E., O'Hara, E. (2008): LIFE and Europe's grasslands: Restoring a forgotten habitat. Environment Directorate-General (LIFE Unit – E.4). 56 s. ISBN 978-92-79-10159-5.

Polívka, F. (1902): *Názorná květena země koruny české. Svazek IV. R. Prombergr* 712 s.

Raina, S. N., Rani, V. (2001): GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science* 23(1): 83 – 104.

Reheul, D., De Cauwer, B., Cougnon, M. (2010): The role of forage crops in multifunctional agriculture. In: Boller, B., Posselt, U. K., Veronesi, F. (eds.). *Fodder Crops and Amenity Grasses, Handbook of Plant Breeding*. Springer: 1 – 12.

Reidsma, P., Tekelenburg, T., van den Berg, M., Alkemade, R. (2006): Impacts of land-use change on biodiversity: An assessment of agricultural biodiversity in the European Union. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 114: 86 – 102.

Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., *et al.* (2009): The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326(5956): 1112 – 5.

Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000): *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers limited. 250 s. ISBN 978-0387915968.

Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., Heslop-Harrison, J. S. (1989): *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany* 64(3): 315 – 324.

Seal, A. G. (1983): DNA variation in *Festuca*. *Heredity* 50(3): 225 – 236.

Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., Yu, T. H. (2008): Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science* 319(5867): 1238 – 1240.

Shearer, L. A., Anderson, L. K., de Jong, H., Smit, S., Goicoechea, J. L., Roe, B. A., Hua, A., Giovannoni, J. J., Stack, S. M. (2014): Fluorescence *in situ* hybridization and optical mapping to correct scaffold arrangement in the tomato genome. *G3* (Bethesda, Md.) 4(8): 1395 – 405.

Somerville, C. (1989): *Arabidopsis* blooms. *Plant Cell* 1: 1131 – 1135.

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98(3): 503 – 517.

Studer, B., Byrne, S., Nielsen, R. O., Panitz, F., Bendixen, C., Islam, M. S., Pfeifer, M., Lübberstedt, T., Asp, T. (2012): A transcriptome map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Genomics* 13: 140.

Suttie, J. M., Reynolds, S. G., Batello, C. (eds.) (2005): *Grasslands of the World*. Řím: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 535 s. ISBN 92-5-105337-5.

Szinay, D., Bai, Y., Visser, R., de Jong, H. (2010): FISH applications for genomics and plant breeding strategies in tomato and other solanaceous crops. *Cytogenetic and genome research* 129(1 - 3): 199 – 210.

Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Foggi, B., Rossi, G. (2007): Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral Expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany* 101(3): 421 – 433.

Thomas, H. M., Harper, J. A., Meredith, M. R., Morgan, W. G., King, I. P. (1997): Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by *in situ* hybridization. *Genome* 40: 406 – 410.

Thomas, H. M., Morgan, W. G., Humphreys, M. W. (2003): Designing grasses with a future – combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica* 133(1): 19 – 26.

Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith, M. R., Humphreys, M. W., Thomas, H., Leggett, J. M. (1994): Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* × *Festuca pratensis* by genomic *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 88(8): 909 – 913.

Vershinin, A. V., Alkhimova, E. G., Heslop-Harrison, J. S. (1996): Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some *Triticae* species. *Chromosome Research* 4: 517 – 525.

Waye, J. S., Willard, H. F. (1989): Concerted evolution of alpha satellite DNA: evidence for species specificity and a general lack of sequence conservation among aliphoid sequences of higher primates. *Chromosoma* 98: 273 – 279.

Wicker, T., Keller, B. (2007): Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in *Triticeae*, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual *copia* families. *Genome Research* 17(7): 1072 – 1081.

9 Přílohy

9.1 Seznam použitých zkratek

bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
Cy3	cyanin 3
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAR	<i>Festuca arundinacea</i>
FGI	<i>Festuca gigantea</i>
FGL	<i>Festuca glaucescens</i>
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
FMA	<i>Festuca mairei</i>
FPF	<i>Festuca pratensis</i> Fure
FPW	<i>Festuca pratensis</i> Westa
G	guanin
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník
LMM	<i>Lolium perenne</i> Mitos
LPN	<i>Lolium perenne</i> Neptun
NGS	sekvenování nové generace
p.a.	pro analýzu
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza A	ribonukleáza A
rDNA	ribozomální DNA

rRNA	ribozomální RNA
RT	pokojová teplota
SDS	dodecylsírán sodný
SSC	citrát sodný
T	thymín
TBE	Trizma base, kyselina boritá, EDTA
TM	teplota tání (T_m)