

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

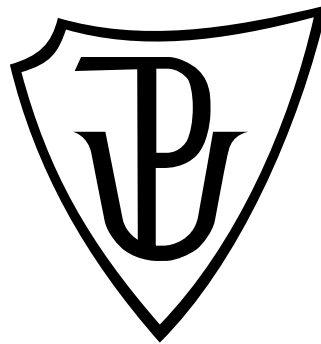
Olomouc 2018

Radka Vaculíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza buněčného cyklu rostlin pomocí
průtokové cytometrie**

Radka Vaculíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Alžběta Němečková

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Alžběty Němečkové s použitím uvedených zdrojů.

V Olomouci dne

Souhrn

Předložená bakalářská práce se zabývá analýzou buněčného cyklu vybraných rostlin, lišících se ve velikosti genomu a obsahu repetitivních DNA oblastí s myšlenkou zjistit, zdali se tyto 2 druhy liší průběhem buněčného cyklu.

Předmětem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši o průtokové cytometrii a jejím využití v mnoha oborech, zvláště v rostlinné biologii. Dále byl popsán buněčný cyklus a jeho jednotlivé fáze dělení. Poslední kapitola teoretické části je věnovaná charakterizaci použitých rostlin a jejich taxonomickému zařazení. .

V praktické části byl analyzován buněčný cyklus vybraných rostlin. První část práce je věnovaná optimalizaci samotné metody, která využívá nový přístup značení DNA pomocí 5-ethyl-2'deoxyuridinu. Druhá část praktické části je zaměřena na samotné měření délky S fáze buněčného cyklu ječmene. Vychází ze získaných optimalizací a představuje průběh buněčného cyklu ječmene. Vzhledem k omezenému množství semen válečky, která jsou nyní přemnožována, nebyla provedena celková analýza buněčného cyklu, ovšem při vypracovávání metodiky značení pro tuto rostlinu bylo pozorováno, že celková délka buněčného cyklu je kratší než u ječmene.

Summary

This bachelor thesis deals with an analysis of the cell cycle of plants by flow cytometry.

For cytometric analysis two plants with different genome size were chosen and different content of the repetitive DNA. The main idea was to compare the duration of the cell cycle in these two plants.

Theoretical part of the bachelor's thesis deals with flow cytometry especially in plant biology. All phases of the cell cycle are also described. The last chapter of theoretical part is focused on selected plant species and their taxonomic classification and description.

In practical part the cell cycle these two plants was analyzed. First of all was necessary to optimize the method with all the parameters including labelling of 5-ethyl-2'deoxyuridine. The second chapter was based on the obtained optimizations and represents results of duration of the barley cell cycle. There was big limitation, because we did not have enough seeds for whole analysis of the *Brachypodium* cell cycle, but we suppose that total length of cell cycle is shorter than barley's.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce Mgr. Alžbětě Němečkové za odborné rady, veškerou obětavou pomoc a trpělivost během vypracovávání práce. Další poděkování patří i Mgr. Janu Vránovi, PhD. a všem kolegům z laboratoře Ústavu experimentální botaniky AV ČR, kteří mi vždy pomohli. Bakalářská práce byla vypracována za podpory projektu GAČR 17-14048S.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Průtoková cytometrie	3
3.1.1 Historie.....	3
3.1.2 Princip průtokové cytometrie.....	4
3.1.3 Využití průtokové cytometrie.....	7
3.1.4 Výhody a nevýhody průtokové cytometrie v rostlinné biologii.....	11
3.2 Analýza buněčného cyklu	11
3.2.1 BrdU analog thymidinu	12
3.2.2 EdU analog thymidinu	13
3.2.3 Srovnání BrdU a EdU	14
3.3 Buněčný cyklus	15
3.3.1 Interfáze.....	15
3.3.2 M fáze.....	16
3.3.3 Rozdíly mezi rostlinným a živočišným dělením	18
3.4 Charakteristika zkoumaných rostlin.....	19
3.4.1 Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	19
3.4.2 Válečka mrvica (<i>Brachypodium distachyon</i> L.).....	20
4 Materiál a metody	21
4.1 Biologický materiál.....	21
4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy.....	21
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	22
4.4. Použité experimentální postupy	22
5 Výsledky	25
5.1 Optimalizace metody.....	25
5.1.1 Optimalizace metody pro ječmen setý	25
5.1.2 Optimalizace metody pro válečku mrvici	28

5.2 Analýza buněčného cyklu	31
6 Diskuze.....	33
7 Závěr	35
8 Seznam použité literatury.....	36

Seznam symbolů a zkratk

BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
FCM	flow cytometry method
FITC	fluoresceinizoithiokyanát
PE	phycoerythrin
PE-CY5	phycoerythrin-Cyanin 5
PerCP	peridinin-chlorophyl-protein complex
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma průtokového cytometru	5
Obrázek 2: Histogram aneuploidie u tetraploidního jedince	9
Obrázek 3: Histogram absolutní velikosti jaderné DNA (velikost genomu)	11
Obrázek 4: Strukturní vzorec BrdU	13
Obrázek 5: Strukturní vzorec EdU	13
Obrázek 6: Inkorporace EdU	14
Obrázek 7: Schématické zobrazení buněčného cyklu	18
Obrázek 8: Výstup cytometrické analýzy jader ječmene setého před optimalizací	26
Obrázek 9: Výstup z cytometrické analýzy pro ječmen setý po optimalizaci otáček u homogenizace	27
Obrázek 10: Výstup cytometrické analýzy pro ječmen setý po optimalizaci.....	28
Obrázek 11. Histogram cytometrické analýzy válečky v průběhu optimalizace	29
Obrázek 12: Histogram cytometrické analýzy válečky v průběhu optimalizace	30
Obrázek 13: Finální histogram cytometrické analýzy válečky po optimalizaci.....	31

1 Úvod

Průtoková cytometrie je moderní, rychle se rozvíjející metoda, která je úspěšně využívána v mnoha lékařských a biologických oborech. Metoda je založena na analýze částic, které jsou unášeny v proudu kapaliny jednotlivě za sebou a následně analyzovány. Před experimentem je nutné specificky nabarvit analyzované částice tzv. fluorochromem, protože tyto částice jsou po ozáření excitovány na vyšší energetickou hladinu, ale tento stav je nestabilní, a po návratu na původní energetickou hladinu dojde k částečnému uvolnění světla a tepla. Právě uvolněné světlo je měřeno pomocí detektorů. Mezi největší výhody patří rychlost, přesnost a rychlá příprava vzorků. Pro svou jednoduchost má tato metoda využití v rostlinné biologii při určení velikosti genomu, stanovení stupně ploidie a analýze buněčného cyklu, který je rozebrán v této práci.

Buněčný cyklus je jedním ze základních znaků eukaryotických buněk. Je to řada pochodů, které vedou ke zdvojení genetické informace a následnému rozdělení mateřské buňky ve dvě dceřiné. Délka buněčného cyklu je velmi proměnlivá a nelze předpokládat, že podobné organismy mají stejnou frekvenci dělení. V průběhu cyklu se střídají různé fáze, a to ve stejném pořadí: G1, S, G2 a M fáze. M fáze dělí na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi. K největším morfologickým změnám dochází v průběhu profáze a cytokineze, avšak nejdelší dobu celého cyklu zabírá interfáze.

2 Cíle práce

- 1) Vypracovat literární rešerši o průtokové cytometrii, buněčném cyklu a analyzovaných rostlinách.
- 2) Vypracovat metodiku měření a provést analýzu buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.

3 Literární přehled

3.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (anglicky *flow cytometry method*, dále jen FCM) se řadí mezi moderní a v současné době hojně využívané metody základního i aplikovaného výzkumu s širokým uplatněním v mnoha oborech klinického výzkumu, zoologii, mikrobiologii, molekulární biologii, genetice a botanice. V rostlinné biologii se používá ke stanovení obsahu jaderné DNA, určení stupně ploidie a při analýze buněčného cyklu (Doležel, 1997, Shapiro, 2003). Základní princip je založen na schopnosti průtokového cytometru analyzovat fyzikálně-chemické vlastnosti částic, které jsou rozptýleny v suspenzi (Marinov, 2003; Díaz *et al.*, 2010). V průtokovém cytometru jsou jednotlivé specificky nabarvené částice (buňky či chromozomy) unášeny proudem kapaliny jedna za druhou. Tyto částice procházejí proudem světla (laserový paprsek), který je dle změny jejich průchodu detekován a vyhodnocen (Shapiro, 2003).

3.1.1 Historie

Metoda průtokové cytometrie patří k mladším analyzačním metodám. Nejprve byla používána při studiu bakterií a postupem času pronikla do dalších oborů, kde je dodnes hojně využívána (Doležel, 1997).

První zmínky o průtokovém cytometru pocházejí z roku 1934. Ve zmíněném přístroji byly buňky poprvé kontinuálně a jednotlivě unášeny proudem kapaliny skrze kapiláru a byly vyhodnocovány s pomocí fotoelektrického aparátu (Moldavan, 1934). Vývoj cytometru pokračoval během druhé světové války, kde se jeho schopnosti využívaly především při analýze bakterií (Gucker *et al.*, 1947). Na rozdíl od přechozího cytometru byly buňky v tomto přístroji fokusovány proudem vzduchu. Již v roce 1953 byla poprvé použita metoda hydrodynamické fokusace, která je používána ve všech dnešních moderních průtokových cytometrech (Crosland-Taylor, 1953). V roce 1965 M. J. Fulwyer sestrojil a popsal přístroj pro třídění buněk, tzv. sorter, který umožnil dělit buňky na základě velikosti a bylo tak možné oddělit např. subpopulaci z heterogenní populace.

Přestože je využití průtokového cytometru známé již od roku 1934, první práce využívající tuto metodu u rostlin byla zveřejněna až v roce 1973 (Heller, 1973). Zpožděné využití cytometrických metod při studiu rostlinných buněk bylo ovlivněno problematickým zpracováním rostlinných vzorků. Rostlinné buňky totiž obsahují pevnou buněčnou stěnu, která může obsahovat vedlejší rostlinné metabolity a přirozené fluorochromy, které komplikují měření (Doležel *et al.*, 2007).

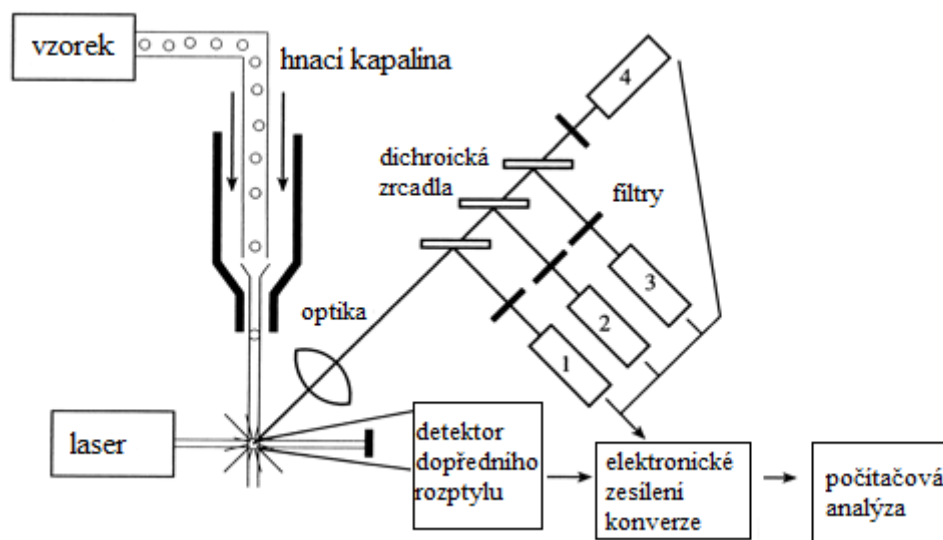
Některé techniky ze začátku vývoje přetrvávají dodnes, avšak postupné zlepšování laserů, optiky a elektroniky značně vylepšilo původní metodu, která se tak stala běžně užívanou v mnoha oborech výzkumu a měření se tak dostalo na dnešní, velmi vysokou úroveň (Herzenberg *et al.*, 2002).

3.1.2 Princip průtokové cytometrie

Základní princip měření pomocí FCM spočívá v usměrnění proudu částic tak, aby byly v proudu unášeny jednotlivě za sebou. Částice procházejí proudem světla, který je podle změny po průchodu částic detekován a elektronicky vyhodnocen.

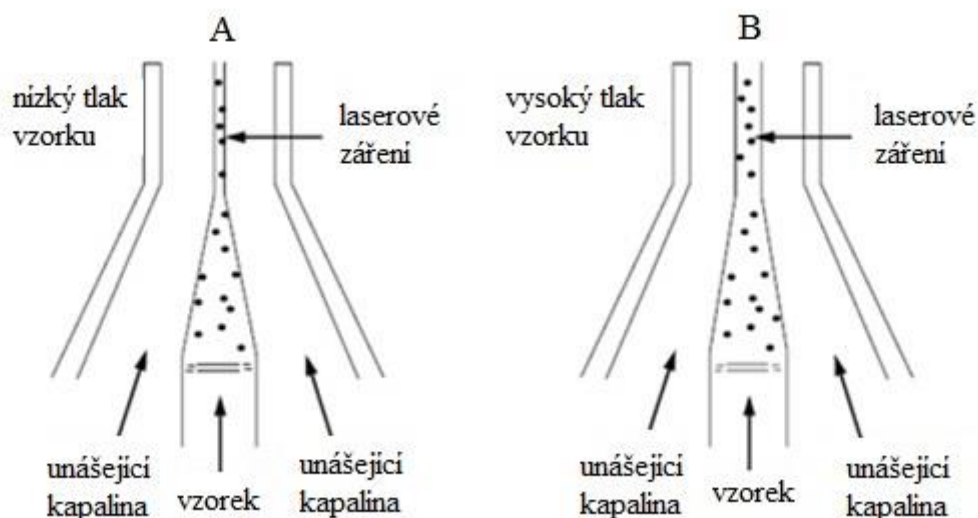
Před samotným měřením je potřeba nejprve připravit vzorek částic, což představuje specifické nabarvení dvouvláknové DNA pomocí fluorescenčního barviva (fluorochromu). Je důležité, aby barvení bylo specificky cílené na studovaný objekt a zamezilo se obarvení jiných organel a ostatních součástí buňky. V případě nespecifického barvení by mohlo docházet k detekci jiných částic a ovlivnění konečných výsledků. Zároveň je třeba, aby množství specifického barviva bylo přímo úměrné množství obarvené DNA. Po průchodu částic se specificky naznačenou DNA a ozáření paprskem laseru o určité vlnové délce dojde k přechodu elektronů na vyšší energetickou hladinu. Tento stav je nestabilní a vzápětí se elektrony vrací zpět na původní energetickou hladinu. Při tomto jevu dochází k uvolnění energie ve formě tepla a světla, které je zaznamenáno jako fluorescence. Světelná energie má nižší energii a tím pádem větší vlnovou délku než laserový paprsek, což znamená, že fluorescenci lze oddělit pomocí vhodných filtrů na základě vlnových délek a následně detekovat a hodnotit (Suda, 2005).

Průtokový cytometr (obrázek č. 1) se skládá ze tří nejdůležitějších částí – z fluidního, optického a elektronického systému, který je doplněn o vhodný software pro zpracování dat.



Obrázek 1: Schéma průtokového cytometru (převzato a upraveno podle: <http://clinchem.aaccjnl.org/content/46/8/1221>)

Vzorek částic je pomocí hnací kapaliny přiváděn kapilárou do průtokové komůrky, která tvoří nejdůležitější část, jádro přístroje. Dochází zde k ozáření pozorovaných částic zdrojem záření a k excitaci (Ormerod, 2008). Hlavním úkolem komůrky je zajistit plynulý průchod částic a usměrnit částice tak, aby procházela jedna za druhou, tento jev, jež zlepšuje účinnost měření, se nazývá hydrodynamická fokusace (Crosland-Taylor, 1953). Princip spočívá v tom, že unášející kapalina je kapilárou přiváděna pod vyšším tlakem, než je tlak suspenze (nosná kapalina) v její užší části. Při výstupu vodního paprsku z komůrky dochází ke zrychlení a částice jsou tak nuceny k uspořádanému pohybu za sebou. Průtok vzorků kontroluje regulátor tlaku, který mění relativní rozdíly tlaků kapalin. Když se zvýší tlak unášející kapaliny, dojde k zvýšení rychlosti, ale také k rozšíření toku (viz obrázek č. 2). To způsobí, že se částice nepohybují jedna za druhou a mohou se odchylovat od měřených úhlů laseru (Doležel, 1991; Shapiro, 2003; Rowley, 2012).



Obrázek 2: Hydrodynamická fokusace v průtokové cele s nízkým a vysokým tlakem vzorku (převzato a upraveno podle: Rowley, 2015)

Druhou klíčovou část průtokového cytometru tvoří optický systém, ve kterém se jako zdroj světla využívá laser nebo rtuťová výbojka. U obou těchto zdrojů je žádoucí, aby ozářily každou částici vzorku (Doležel *et al.*, 2007). Nevýhodou laseru jako zdroje světla je vysoká pořizovací cena. V cytometrech se běžně používají modré lasery emitující záření o vlnové délce 488 nm a červené lasery, které emitují při 635 nm. Rtuťové výbojky jsou cenově dostupnější a nabízejí větší rozsah vlnových délek, což ale přináší i nevýhodu spojenou s nutností nastavit požadovanou vlnovou délku a intenzitu světla a další značnou nevýhodou může být jejich krátká životnost (Suda, 2005).

Další část optického systému představují sběrné kanálky, které jsou tvořeny čočkami. Zabudovaná dichroická zrcadla slouží k rozdělení a usměrnění paprsků na detektory (Roubalová, 2012).

Poslední ze zmíněných částí průtokového cytometru tvoří elektronický systém, který se skládá z fotodetektorů, fotonásobičů a počítačového systému. Fotodetektory přijímají částice fotonů a převádí jejich energii pomocí fotonásobičů na elektrický signál, který je dále detekován a vyhodnocen v podobě histogramů pomocí softwaru (Doležel *et al.*, 2007).

Fluorescence

Cytometrické analýzy využívají mimo jiné i principu fluorescence, kdy některé látky mají tu schopnost, že jsou po ozáření schopny emitovat světlo o vyšší vlnové délce, než byla původní. Jednotlivé částice procházející cytometrem jsou před analýzou obarveny

fluorochromem a na základě znalosti jejich vlnové délky je pak možné využít optických filtrů pro jejich oddělení (viz tabulka 1). Mezi často využívané fluorescenční látky patří fluoresceinizothiokyanát (FITC), phycoerythrin (PE), phycoerythrin-Cyanin 5 (PE-CY5), peridinin-chlorophyl-protein complex (PerCP), Alexa fluor 488. Mezi často využívané fluorochromy patří propidium jodid, ethidium bromid, Hoechst 33258, 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) a dále pak chromomycin a mitramycin (Shapiro, 2003).

Tabulka 1: Příklady používaných flouorochromů v průtokové cytometrii

Fluorochrom	Excitační vlnová délka (nm)	Emisní vlnová délka (nm)
FITC	488	530
Alexa fluor 488	495	519
PE-CY5	488	670
APC	630	661
PerCP	488	675
Propidium jodid	540	615
Ethidium bromid	530	605
DAPI	365	450
Hoechst 33258	365	465
Chromomycin A3	445	570
Mitramycin	445	575

3.1.3 Využití průtokové cytometrie

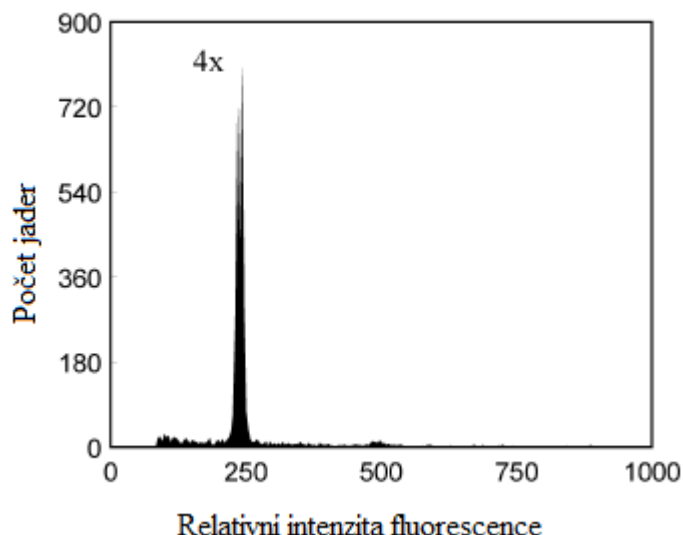
Průtoková cytometrie je velmi progresivní metoda, která umožňuje multiparametrickou analýzu. Poskytuje široké množství aplikací, které lze uplatnit jak při výzkumných činnostech, tak při každodenních rutinních analýzách. Pomocí průtokové cytometrie je možné stanovit obsah jaderné DNA, analyzovat buněčný cyklus, zjišťovat počet buněk, třídit buňky, měřit ploidii, sledovat buněčné struktury, detekovat specifické geny, měřit kumulaci sekundárních metabolitů v buňce (Suda, 2005). V lékařství se využívá při diagnostice hematologických chorob, při zjišťování antibiotické aktivity látek, diagnostice patogenních mikroorganismů a charakterizaci krevních malignit (leukémií a lymfomů). Dále se používá k detekci membránových, cytoplazmatických

a jaderných antigenů nádorových buněk, diagnostice vrozených defektů a fenotypické analýze lymfocytů či monitorování HIV pozitivních pacientů (Šinkorová, 2008; Marinov, 2003). Metoda průtokové cytometrie nalézá uplatnění dokonce v potravinářském průmyslu, kde se používá při vyhodnocení účinnosti konzervace potravin, posuzování antibakteriálních účinků, sledování fermentačních procesů, kontrole životnosti kvasinek nebo při stanovení toxicity chemických látek (Díaz *et al.*, 2010).

3.1.3.1 Využití v rostlinné biologii

Jak již bylo zmíněno výše, průtoková cytometrie nalézá v dnešní době i velmi široké uplatnění v rostlinné biologii, kde se využívá při analýze dědičné informace, při sledování mikroorganismů při raných infekcích či odlišení a analýze populací příbuzných druhů rostlin. Cytometrie může být použita pro analýzu protoplastů, jader i chromozomů. U protoplastů je možné zkoumat jejich velikost, obsah chlorofylu v buňce, obsah alkaloidů a také celkový obsah DNA, RNA a proteinů. U jader umožňuje analýzu celkového obsahu DNA, RNA i proteinů, poměru AT-GC bází, délku buněčného cyklu a umožňuje také třídít jádra v určité fázi buněčného cyklu (Doležel *et al.*, 2007). Díky specifickému fluorescenčnímu barvení je možné pozorovat zastoupení AT-GC bází, obsahu DNA a dokonce je možné i analyzovat některé populace chromozomů či chromozomy samotné a ty pak třídít (Doležel, 2000).

Cytometrické analýzy jsou tak přesné, že umožňují zjišťovat rozdíly v DNA u aneuploidních jedinců, kteří se vyznačují absencí nebo přebytkem chromozomu. Aneuploidní stav se odlišuje posunem píku analyzovaného jedince oproti standardu (viz obrázek č. 2) (Doležel *et Bartoš*, 2005). Dále umožňuje pozorovat způsob rozmnožování rostlin a na základě ploidie je možné určit, zda byly oplozeny rostliny pohlavně nebo zda semena vznikla z neredukovaných vajíček či pylových zrn (Suda, 2005).



Obrázek 2: Histogram aneuploidie u tetraploidního jedince (převzato a upraveno: Suda, 2004)

Před samotnou analýzou je třeba každý vzorek upravit s ohledem na složení studovaného materiálu. Např. některé dužnaté rostliny mohou obsahovat vysoký obsah slizovitých látek, které způsobují problémy při samotné přípravě (Suda, 2005). Další druhy mohou obsahovat více sekundárních metabolitů nebo křemičité látky. Sekundární metabolity je nutné odstranit, a proto se do některých pufrů přidává β -merkapt ethanol či jiná redukční činidla, která potlačují interferenci fenolických látek s fluorescenčním barvením DNA (Doležel *et* Bartoš, 2005).

Měření může být ovlivněno i jinými faktory, jako je třeba různá barvitelnost částic či nepřesnosti přístroje. Míra přesnosti je určena tzv. variačním koeficientem CV, který je dán podílem směrodatné odchylky a průměrné pozice píku (Suda, 2005). Tento koeficient je vyjádřen v procentech a určuje rozlišovací schopnost měření.

$$CV = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměrná pozice píku}} \times 100 (\%)$$

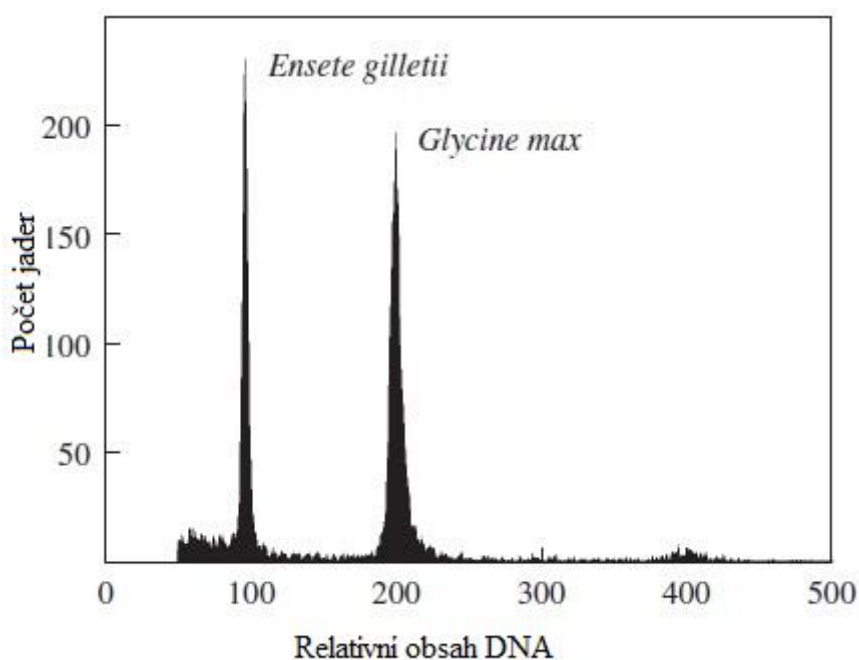
Pro přesné měření je nutné, aby se variační koeficient pohyboval kolem hranice 3 %. U některých rostlin není možné této hodnoty dosáhnout, protože obsahují velké množství sekundárních metabolitů a ty tuto hodnotu zvyšují, proto se u některých rostlin akceptují hodnoty až do 7 % (Suda, 2004). Pro maximální přesnost výsledků je nutné přístroj pravidelně kalibrovat a optimalizovat, aby se snížily nespécifické signály na pozadí. Ke snížení chybovosti se užívají tzv. kalibrační částice, jejich nezpochybnitelnou výhodou je, že nemají vysoké hodnoty rozptylu fluorescenčního záření a zároveň jsou schopny tvořit shluky. K tomuto účelu se využívají fluorescenčně

značené mikrokuličky nebo přírodní látky jako například kuřecí či pstruží erythrocyty (Doležel, 1991).

Stanovení stupně ploidie

Častou a hojně využívanou aplikací v rostlinné cytogenetice je stanovení ploidního stupně (obrázek č. 3), který představuje spolu s velikostí genomu jednu ze základních charakteristik každého genomu. Jedná se o jednu ze spolehlivých informací o testovaném jedinci, která pomáhá objasnit nejasnosti v těžko definovatelných taxonomických skupinách (Doležel *et al.*, 2007).

Pro stanovení ploidie je nutné použít tzv. interní standard druhu, u kterého je známa ploidie či velikost genomu a na základě porovnání je pak možné stanovit ploidii i u nově analyzovaných položek. Jako standard se často využívají komerční plodiny (hrách, rajče, sója, kukuřice) (Doležel *et al.*, 1998) nebo např. kuřecí erythrocyty, které se osvědčily při analýzách banánovníků (Roux *et al.*, 2003).



Obrázek 3: Histogram stanovení relativního obsahu jaderné DNA.

Buněčná jádra banánovníku *Ensete gillettii* spolu s jádry druhu *Glycine max*, který byl použit jako vnitřní standard, byla barvena propidium jodidem (převzato a upraveno: Doležel *et Bartoš*, 2005).

Stanovení velikosti genomu

Genom představuje veškerou genetickou informaci organismu a určení jeho velikosti poskytuje jednu ze základních informací o organismu. V tomto směru může průtoková cytometrie poměrně snadno a jednoduše zjistit absolutní množství DNA v G1 fázi buněčného cyklu (Doležel *et* Bartoš, 2005). Při měření obsahu jaderné DNA se opět používá rostlina se známým obsahem jaderné DNA, která je použita jako vnitřní standard a na základě měření je pak možné určit velikost genomu studované rostliny pomocí následujícího vztahu, kdy je počet párů bází přepočítán na pikogramy DNA (Doležel, 2003).

$$\text{Obsah 2C DNA vzorku} = \frac{\text{průměr G1 píku vzorku}}{\text{průměr G1 píku standardu} \times \text{obsah 2C DNA standard (pg DNA)}}$$

3.1.4 Výhody a nevýhody průtokové cytometrie v rostlinné biologii

Mezi největší výhody FCM patří citlivost, relativně jednoduchá příprava vzorků a nízká cena analýzy, která se pohybuje v řádech korun. Cytometrické měření probíhá velkou rychlostí, což umožňuje zanalyzovat rozsáhlé množství vzorků během krátké doby a získat tak soubor statisticky reprezentativních údajů. Moderní průtokové cytometry jsou schopny analyzovat až desítky parametrů najednou s rychlostí až 150 000 částic za sekundu (Doležel, 2000). Díky tomu lze pozorovat buněčné atributy jak rozptylu světla, tak i parametry založené na fluorescenčním záření (Ormerod, 2008).

Další nespornou výhodou je, že při analýzách rostlinných vzorků lze použít téměř všechny části rostliny (kořeny, semena, lodyhy, korunní a kališní lístky). Další výhodou je určitá ohleduplnost vůči vzorkům, protože pro analýzu stačí jen malé množství biologického materiálu, čehož se může využívat u ohrožených druhů. Nevýhodou metody je potřeba čerstvého materiálu, protože jakékoliv nečistoty či kontaminace mohou způsobit nepřesnosti při měření.

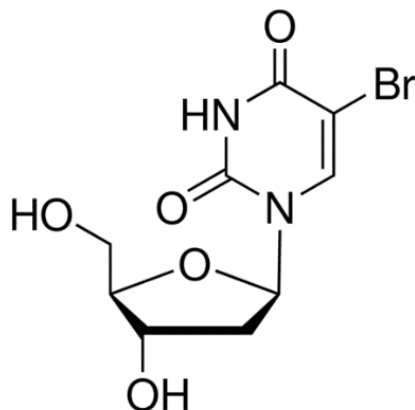
3.2 Analýza buněčného cyklu

Při dělení buňky dochází ke změnám v morfologii a zároveň se cyklicky mění obsah DNA. Během G1 fáze má jádro buňky základní množství DNA 2C (jako hodnota C se označuje množství jaderné DNA v haploidní sádce). V průběhu replikace (S fáze) dochází ke zdvojnásobení množství DNA na hodnotu 4C. V průběhu G2 fáze se obsah jaderné DNA nemění až do průběhu mitózy, kdy při vzniku dceřiných buněk dochází k redukci obsahu na 2C (Doležel, 1991; Suda 2005).

Při analýze buněčného cyklu se v dnešní době s úspěchem využívají prekurzory značené pomocí fluorochromů, které se v průběhu replikace (S fáze) inkorporují do nově vznikající DNA a následně jsou analyzovány pomocí průtokové cytometrie. K tomuto účelu se v dnešní době využívají thymidinové analogy, které jsou schopné inkorporace do specifických míst DNA. Tyto analogy jsou následně značeny specifickými azidy či protilátkami nesoucími fluorochrom. Mezi nejpoužívanější analogy se řadí 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), dříve hodně využívaný 5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU) a další, jako je např. 5-chlorodeoxyuridin (CldU) a 5-jododeoxyuridin (IdU) (Tuttle *et al.*, 2010). Na začátku výzkumu se k tomuto účelu značení dělicích se buněk a jejich charakterizaci používala metoda autoradiografie pomocí tritovaného (H3) thymidinu, která byla oproti dnes využívaným metodám časově i technicky velmi náročná (Howard *et Pelc*, 1953). Pomocí této metody bylo ovšem poprvé zjištěno, že se DNA replikuje semikonzervativně (Taylor *et al.*, 1957).

3.2.1 BrdU analog thymidinu

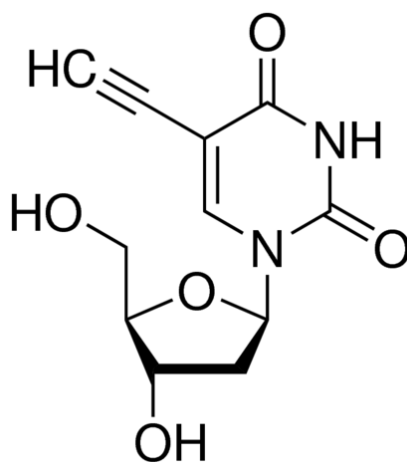
Zmíněný 5-bromo-2-deoxyuridin nahradil časově a technicky náročnou autoradiografii. Princip této metody spočívá v chemickém a enzymatickém narušení dvoušroubovice DNA (teplo, kyseliny a nukleázy) (Vanderlaan *et*, Thomas, 1985). Vlivem denaturace a enzymatického štěpení pomocí DNázy I vznikne jednovláknový řetězec DNA, na který jsou následně navázány specifické monoklonální protilátky. Ve srovnání s autoradiografickou metodou je tato metoda rychlejší, při nižších nákladech na detekci, ovšem s vyšší citlivostí a schopností rozlišit jednotlivé buňky v S fázi buněčného cyklu (Grey *et al.*, 1990). Hlavní nevýhodou BrdU značení je poškození vzorku při vizualizaci analogů (Choi *et* Berdis 2016).



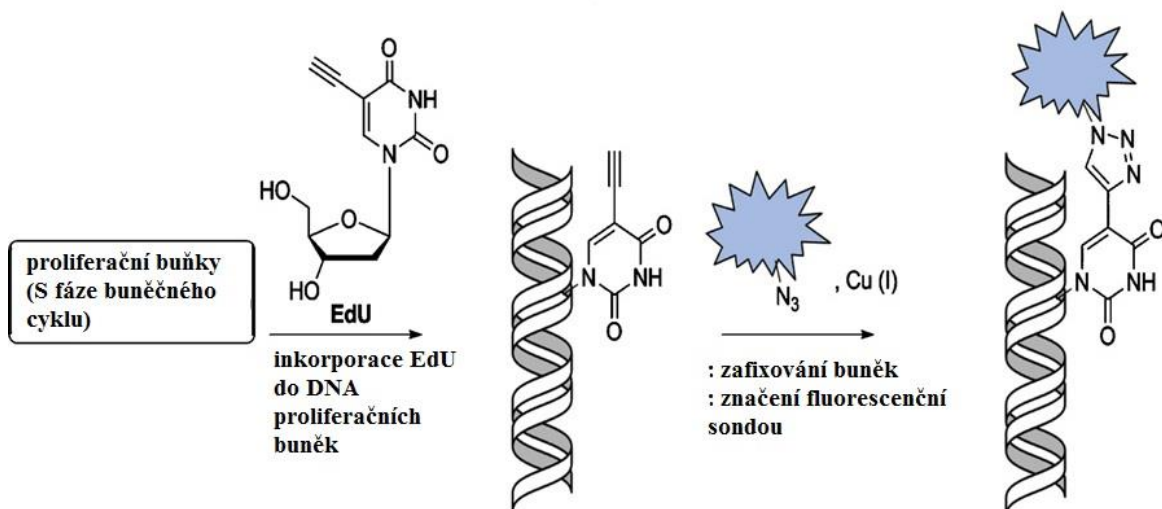
Obrázek 4: Strukturní vzorec BrdU (převzato z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/850187>)

3.2.2 EdU analog thymidinu

Hojně využívané značení pomocí BrdU bylo ve většině případů nahrazeno dalším analogem thymidinu, což je EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) (viz obrázek č. 6). Metodický princip založený na tomto analogu spočívá v inkorporaci EdU do DNA v průběhu dělení buněk. Hlavním principem metody je nahrazení methylové skupiny, na jejíž místo se naváže terminální alkynová skupina v pyrimidinovém kruhu v poloze 5. Po transportu se vytvoří trisfosfát a ten se inkorporuje do DNA namísto adeninu během replikace DNA. Toto začlenění je následně detekováno fluorescenčním azidem a celý proces je katalyzován měďnými ionty (obrázek č. 7) (Salic *et* Mitchison, 2008).



Obrázek 5: Strukturní vzorec EdU (převzato z: Salic *et* Mitchison, 2008)



Obrázek 6: Inkorporace EdU (převzato a upraveno z: Chehrehasa *et al.*, 2008)

3.2.3 Srovnání BrdU a EdU

BrdU i EdU se inkorporuje během S fáze buněčného cyklu (Salic *et Mitchison*, 2008). Standardní inkorporace BrdU vyžaduje 4 hodiny inkubace, kdežto EdU jen 1,5 – 2 hodiny. Na rozdíl od BrdU, EdU zachovává helikální strukturu DNA a dalších buněčných epitopů. Helikální struktura je důležitá pro buněčný cyklus, pro vázání barviva a další značení. Molekuly azidu (fluorochromy) jsou o mnoho menší než protilátky, a právě proto mají snadnější přístup k začleněným nukleosidům v dvouvláknové DNA (Buck *et al.*, 2008).

3.3 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je řada za sebou jdoucích pochodů, které jsou navzájem koordinovány a vedou k rozdělení genetické informace v jádře a následně k rozdělení celé buňky. Buněčný cyklus můžeme definovat jako období od vzniku buňky až po dobu, kdy dochází k opětovnému rozdělení buňky na buňky dceřiné. Této době říkáme doba generační a u různých buněk může trvat různě dlouhou dobu. U nejjednodušších organismů trvá jen pár minut, ale u buněk složitějších organismů může trvat i několik hodin. Například jaterní buňky se dělí jen párkrát do roka. Regulaci buněčného cyklu ovlivňuje velké množství látek, jako jsou například cykliny a CDK proteinkinázy (Dewitte *et* Murray, 2003).

Buněčný cyklus se dělí na dvě fáze: interfáze a mitotická fáze. Ve fázi mitotické dochází k největším změnám a součástí je cytokineze, což je samostatné dělení buňky. Doba mezi děleními se nazývá interfáze (Nečas, 2000).

3.3.1 Interfáze

Interfáze je nejdelsí část cyklu, která zabírá 90 % času dělení buňky. V této fázi je buňka velmi aktivní: roste, zdvojuje své buněčné organely, tvoří buněčnou stěnu a připravuje se na dělení. Malé organely jako lysozomy a mitochondrie jsou rozděleny rovnoměrně do dceřiných buněk, kdežto Golgiho aparát a endoplasmatické retikulum se fragmentuje do malých vezikul, které se po dělení znovu obnoví v celé orgány (Morgan, 2007). V této fázi se nacházejí dva kontrolní body, které zajišťují správný průběh buněčného cyklu. Když tyto kontrolní body neplní svou funkci, může buňka iniciovat opravné procesy nebo i naprogramovat buněčnou smrt – apoptózu.

Jednotlivé části interfáze rozdělujeme na G1 fázi, S fázi a G2 fázi (Howard, 1953).

3.3.1.1 G1 fáze (z angl. *gap* = mezera)

G1 fáze je období mezi koncem mitotické fáze a začátkem S fáze. Můžeme ji označit jako presyntetickou fázi. Doba trvání této fáze je relativně dlouhá, představuje 30–40 % z celkové doby cyklu. Časové trvání je zde však nejvariabilnější, záleží na vnějších podmínkách a extracelulárních signálech od jiných buněk. Dochází zde k zdvojení buněčných struktur, k syntéze RNA, nukleotidů, proteinů a enzymů, které budou potřeba v další fázi (Nečas, 2000). Mezi G1 fází a M fází se nachází první kontrolní bod, který na základě podmínek určí, zda buňka může pokračovat dále v cyklu nebo vstoupí do klidové fáze G0 (Baserga *et* Morrione, 1999).

V této fázi může buňka zůstat i několik let nebo až do konce života. Tento stav se nazývá senescence, která je typická pro rostlinné buňky.

3.3.1.2 S fáze (z angl. *synthetic* = syntetický)

S fáze, nebo také fáze replikace, následuje po G1 fázi, kdy buňka přechází přes kontrolní bod a vstupuje tak do další fáze buněčného cyklu. Tato část trvá asi 30 % délky cyklu. Dochází zde ke zdvojení (replikaci) DNA. Musí dojít k přesnému zdvojení genetické informace (z 2C na 4C). Po ukončení replikace má každý chromozom dvě sesterské chromatidy, které jsou spojené v místě centromery. Mají stejnou velikost, tvar a hlavně stejný obsah genetické informace (Vengrova *et* Dalgaard, 2015).

3.3.1.3 G2 fáze (z angl. *gap* = mezera)

Jako G2 fáze je označována poslední fáze před mitózou (postsyntetická). Časově je tato fáze nejméně náročná, pohybuje se mezi 10–20 % celkové délky cyklu. Probíhá zde syntéza a aktivace proteinů, které slouží ke kondenzaci chromozomů, tvorbě mitotického vřeténka a rozpuštění jaderné membrány. Na konci G2 se nachází další kontrolní bod, který rozhoduje o tom, zdali je buňka připravena k následné mitoze (Nečas, 2000).

3.3.2 M fáze

Po úplném zdvojení genetické informace v S fázi postupuje buňka do následné M neboli mitotické fáze. Jedná se o poslední fázi buněčného cyklu, která trvá asi 10 % délky cyklu. Dochází zde k dělení jádra (karyokineze) a poté k rozdělení celé buňky (cytokineze). Během této doby se rozdělí buňka na dvě identické (dceřiné) buňky (Malton *et al.*, 1997). Mitózu je možné rozdělit do 5 fází: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze.

3.3.2.1 Profáze

Profáze je rané stádium mitózy, ve kterém probíhá kondenzace chromozomů, mizí jadérko, vytváří se mitotické vřeténko. Na konci profáze je vytvořen kinetochor, proteinový komplex u centromery, který slouží k vazbě mikrotubulů dělicího vřeténka. U rostlin není centrozom jako u živočichů, ale mitotické vřeténko se vytváří v pólech s vyšší koncentrací tubulinu.

3.3.2.2 Prometafáze

V průběhu prometafáze zaniká jaderná membrána, která se postupně rozpadá na malé části. Zbytky se stanou součástí endoplasmatického retikula. Spiralizované chromozomy se uvolňují do cytoplazmy a na konci fáze se chromozomy pomocí motorových proteinů začínají pohybovat směrem do ekvatoriální roviny buňky. V této fázi můžeme pozorovat maximální spiralizaci chromozomů.

3.3.2.3 Metafáze

Po prometafázi dochází v následné metafázi k seskupování chromozomů v ekvatoriální rovině, které vytvářejí metafázní destičku. Centromery jsou v jedné rovině a raménka jsou orientovaná směrem k pólům buňky. V této fázi jsou chromozomy nejvíce kondenzované a nejlépe pozorovatelné pod mikroskopem, čehož se využívá v cytogenetických technikách. Na konci dochází rozdělení centromer, které spojovaly chromatidy jednotlivých chromozomů (Snustad et Simmnons, 2016).

3.3.2.4 Anafáze

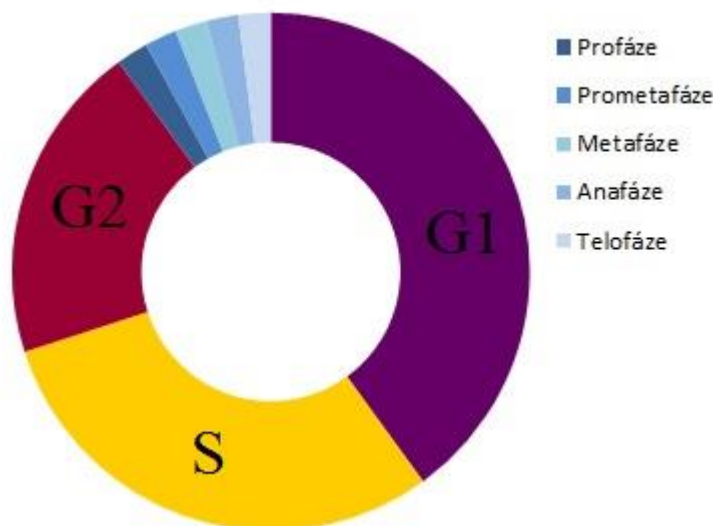
Anafáze představuje nejkratší část buněčného cyklu. Oddělují se od sebe sesterské chromatidy, ty jsou dále taženy mikrotubulárními vlákny k pólům buňky. Z každého chromozomu je jedna chromatida tažena k jednomu pólu a druhá chromatida k opačnému. Výsledkem segregace chromozomů je stejný počet jednochromatidových chromozomů na obou pólech buňky (Nečas, 2000).

3.3.2.5 Telofáze

V této fázi se obnovuje se jaderná membrána z fragmentů a částí endoplasmatického retikula. Objevuje se jádérko a chromatinová vlákna se despiralizují (Snustad *et* Simmnons, 2016).

3.3.2.6 Cytokineze

Poslední krok v mitotické fázi představuje samotné rozdělení mateřské buňky, které probíhá ve stejném čase jako telofáze. Dochází k rozdělení cytoplazmy a organel. Vznikají dvě dceřiné buňky, které mají stejný počet chromozomů jako buňka mateřská (Johnson *et* Walker, 1999).



Obrázek 7: Schématické zobrazení buněčného cyklu

3.3.3 Rozdíly mezi rostlinným a živočišným buněčným dělením

Buněčný cyklus se u eukaryot příliš neliší, ale můžeme najít drobné rozdíly mezi buňkou rostlin a živočichů. Tyto buňky se liší ve stavbě buňky samotné, což je základ rozdílného dělení při cytokinezi.

V mitotické fázi cyklu rostlinná i živočišná buňka zahrnuje profázi, prometafázi, metafázi, anafázi, telofázi a cytokinezi. Na začátku profáze rostlinné buňky mizí preprofázový prstenec, který vznikl v G1 fázi, vzniká dělicí vřetenko a rostlinné buňky na rozdíl od živočišných nemají centrioly. Šířka pólu je větší u rostlinných buněk, protože se tam tvoří tzv. pólové čepičky, které jsou základem vřetenka. Dělení probíhá dále obdobně, v metafázi dojde k seřazení v ekvatoriální rovině a maximální spiralizaci, v anafázi dochází k rozchodu chromozomů k opačným pólům buňky. Další větší rozdíly mezi buňkami jsou až v cytokinezi, kdy u vyšších rostlin vzniká buněčná destička (fragmoplast), která je tvořena zbytky polárních mikrotubulů a cytokineze začíná probíhat od středu k obvodu buňky (centrifugálně). Střed fragmoplastu je tam, kde se nacházel preprofázový prstenec. U živočichů se zaškrucuje membrána od obvodu směrem dovnitř buňky (centripetálně). Po skončení rostlinného dělení jsou výsledné buňky menší, mají méně plastidů a mitochondrií než buňka mateřská a jádra obsahují stejný počet chromozomů (Dewitte *et* Murray, 2003).

3.4 Charakteristika zkoumaných rostlin

3.4.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.)

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) patří mezi nejvýznamnější kulturní plodiny z čeledi lipnicovité (*Poaceae*), kmenu *Triticeae*. Tato obilovina má velké využití v mnoha odvětvích, např. jako krmivo pro zvířata, sladovnictví nebo při výrobě dalších nápojů. Ve světové produkci obilovin zaujímá čtvrté místo a v rámci České republiky místo druhé (Zohary *et* Hopf, 2000, Dreiseitl, 2003). Ječmen se vyskytuje ve dvou variantách, v zimní, který má vyšší výtěžnost asi o 20 % než varianta jarní (Špunar *et al.*, 2002). Tato jednoděložná rostlina má stéblo, které se skládá z několika článků (internodie), které jsou odděleny kolénky (nody). Květenství je lichoklas (složený nerozvětvený klas), jednotlivé kvítky jsou chráněny pluchou, a plodem je obilka. Kořeny jsou svazčité a listy pravotočivé ve dvou řadách (Zimolka, 2006).

Kulturní ječmen byl domestikován z planě rostoucího druhu *Hordeum. vulgare* ssp. *spontaneum* v okolí Turecka v oblasti zvané jako „úrodný půlměsíc“ a následně byl rozšířen do celého světa (Harlan, 1966). Zařazení do systematiky druhů není možné, protože existuje mnoho forem (plané i kulturní) a všechny obsahují stejný počet chromozomů ($2n=14$) Špaldon *et al.*, 1982). Ječmen můžeme rozdělit podobně jako pšenici na diploidní, tetraploidní a hexaploidní a v rámci druhu se můžou vyskytovat jedinci s různým ploidním stupněm. U většiny druhů ječmene můžeme najít čtyři páry metacentrických chromozomů, jeden pár submetacentrických chromozomů a dva páry chromozomů obsahující satelity (Bothmer *et al.*, 1991).

Do sekvenačního projektu ječmene byl zapojen mezinárodní tým z celého světa. Cílem mezinárodního projektu International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC) bylo nashromáždit informace o DNA markerech, sekvencích, genech a následně sestavit fyzické a genetické mapy pro samostatnou sekvenaci (Beier *et al.*, 2017). Genom ječmene je dvakrát tak velký jako lidský genom. Haploidní jádro obsahuje 5,55 pg DNA, tato hodnota odpovídá $5,3 \cdot 10^9$ pb (Bennett *et* Smith, 1976). Genom obsahuje 80 % repetitivních sekvencí, z čehož 10-20 % je tandemově uspořádáno a zbylých 60 % je rozptýlených (Rimpau *et al.*, 1980; Shirasu *et al.*, 2000).

3.4.2 Válečka mrvica (*Brachypodium distachyon* L.)

Brachypodium distachyon se řadí do čeledi lipnicovité (*Poaceae*) a podčeledi *Pooideae*, do této skupiny patří i pšenice, ječmen, žito a oves (International Brachypodium Initiative, 2010). Velikost genomu byla stanovena na 320 Mbp, což je nejmenší genom z čeledi lipnicovité, srovnatelný s genomem *Arabidopsis thaliana* (Draper *et al.* 2001). Pro svou malou velikost genomu se válečka začala používat jako modelový organismus pro obiloviny a trávy a také se využívá toho, že na základě příbuznosti můžeme pozorovat specifické procesy např. vývoj endospermu, kvetení a vývoj květenství. Navíc má všechny předpoklady pro modelový organismus jako je malý genom, malý vzrůst a rychlý životní cyklus (Garvin *et al.*, 2008). Počet chromozomů byl stanoven $2n = 10$. Jako téměř každý genom obsahuje i vysoce repetitivní sekvence, které zaujímají méně než 15 %, což je v porovnání s ječmenem zanedbatelné množství. Retrotraspozomy mají podíl v genomu 23 % a bylo zjištěno, že *Brachypodium* má nejmenší 5S rDNA mezi travinami (Ozdemir, 2008).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V praktické části bakalářské práce byla použita semena ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., $2n = 14$) kultivar MOREX, která byla získána ze Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži. Válečka mrvica (*Brachypodium distachyon* L., $2n=10$), kultivar BD21, byla zaslána z univerzity v Aberystwyth, semena poskytl profesor Alejandro Mur.

4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy

Použité chemikálie

- 2-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, kat. číslo: M6250)
- Formaldehyd 37% (Merck KGaA, kat. číslo: 103999)
- Chlorid draselný p.a. (Lach-Ner, kat. číslo: 30076-AP0)
- Chlorid sodný p.a. (Lach-Ner, kat. číslo: 30093-AP0)
- Na₂-EDTA (Sigma-Aldrich, kat. číslo: E5134)
- TRIS (citronan sodný dihydrát p.a., kat. číslo: 30009-AP0)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. číslo: X100)
- Spermin tetra hydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 85605)

Použité soupravy

- Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit (ThermoFisher Scientific, kat. číslo: C10632)
- EdU Flow Cytometry Kit 488 (Base Click, kat. číslo: BCK-FC488-50)

Použité roztoky a jejich příprava

- 10 × PBS pufr (pH 7,4): Smíchat 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ a 2,4 g KH₂PO₄. Doplnit do 800 ml vodou a upravit pH pomocí HCl na 7,4. Poté doplnit vodou do 1 l a nechat sterilizovat v autoklávu.
- TRIS pufr (pH 7,5): Smíchat 10 mmol·l⁻¹ TRIS 302,85 mg, 10 mmol·l⁻¹ Na₂-EDTA 930,6 mg, 100 mmol·l⁻¹ NaCl 1,461 g, doplnit do 250 ml a upravit pH 7,5 pomocí 1N NaOH.
- TRIS fixáž (pH 7,5): Smíchat 10 mmol·l⁻¹ TRIS 302,85 mg, 10 mmol·l⁻¹ Na₂-EDTA 930,6 mg, 100 mmol·l⁻¹ NaCl 1,461 g, 0,1% Triton-X

250 μl a doplnit do 200 ml destilovanou vodou a upravit pH 7,5 pomocí 1N NaOH. Na množství 250 ml dodat 13,5 ml formaldehydu.

- Lyzační pufr LB01: Smíchat 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS 363,4 mg, 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na₂-EDTA 148,9 mg, 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ spermine, (4HCl) 34,8 mg, 80 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl 1,193 g, 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl 233,8 mg, 0,1% TritonX-100 200 μl . Doplnit do 200 ml destilovanou vodou a poté upravit pH 9,0 pomocí 1N HCl. Filtrovat přes 0,2 μm filtr, poté přidat 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-merkптоethanol 220 μl , dobře rozmíchat a uchovávat ve tmě při - 20°C.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga – Fresco 17 (Thermo Scientific)
- Centrifuga Silverline Ministar (VWR Collection)
- Homogenizátor PT 1300 D (Kinematica AG, Littau, Switzerland)
- Inkubátor chlazený INCU-Line 150R (VWR Collection)
- Laboratorní digestoř M 1266 (Merci)
- Laboratorní váhy Entris 423-1S (Sartorius)
- Magnetická míchačka Poly 15 Variomag (Thermo Scientific)
- pHmetr 766 (Knick)
- Průtokový cytometr – sorter (BD FACSAria™ III)
- Třepačka – Reax Top (Heidolph)
- Vodní lázeň a cirkulátor – Polystat 13 (Cole-Parmer)
- Výrobník destilované vody typ 04 (Aqua Osmotic)
- Výrobník ledu GB (Brema)

4.4. Použité experimentální postupy

4.4.1 Příprava rostlinného materiálu

Postup naklíčení semen byl proveden dle používaného protokolu v místních podmínkách a to tak, že potřebné množství semen bylo naváženo a následně ponecháno přes noc v lednici. Poté byla semena vložena na 3 dny do termostatu.

4.4.2 Příprava suspenze jader

Naklíčená semena byla následně inkubována v termostatu v roztoku obsahujícím EdU při teplotě 25 °C po dobu 0,5 hodiny až 2,5 hodiny. Použitý pracovní roztok 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EdU byl připraven dle pokynu výrobce, a to rozpuštěním látky

ve 4 ml DMSO. Po inkubaci byl rostlinný materiál opláchnut pod tekoucí destilovanou vodou, aby byly odstraněny zbytky aktivní látky a poté byly odlomeny kořínky o délce asi 2 cm. Tyto kořínky byly fixovány 20 minut v Tris pufru s 2% formaldehydem při 4 °C. Po zafixování byly promyty třikrát po pěti minutách v Tris pufru při 4 °C a následně byly po celou dobu zpracovávání uchovávány na ledu. Meristémové špičky kořínků o délce asi 1 mm byly odříznuty a přemístěny do 0,5 ml LB01 lyzačního pufru (Doležel *et al.*, 1989). Suspenze jader byla získána mechanickou homogenizací pomocí homogenizátoru (Kinematica AG, Littau, Switzerland) Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes 50 µm nylonovou membránu, aby se odstranily zbytky tkání a buněk.

4.4.3 Fluorescenční značení

Přefiltrovaná suspenze jader byla centrifugována při 500 g a při 4 °C po dobu 10 minut. Následně byl odpipetován supernatant a k jádrům byla přidána reakční směs, která byla vždy připravena těsně před použitím a měla následující složení (viz tabulka č. 1). K přípravě 1 × reakčního pufru byl zředěn dodaný zásobní roztok v poměru 1:10 s deionizovanou vodou a dodané barvivo Alexa Fluor 488 bylo smícháno se 130 µl DMSO.

Tabulka 2: Jednotlivé složky pro přípravu reakční barvicí směsi

	Počet reakcí			
	1	2	5	10
1 × PBS pufr [µl]	438	875	2190	4380
CuSO₄ [µl]	10	20	50	100
Alexa Fluor 488 [µl]	2,5	5	12,5	25
Reakční pufr s aditivy [µl]	50	100	250	500
Celkový reakční objem [ml]	0,5	1	2,5	5

Suspenze jader s přidaným roztokem reakční směsi byla inkubována ve tmě při 25 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byla směs znovu centrifugována při 500 g při 4 °C po dobu 10 minut. Poté byl odpipetován supernatant a k finálnímu vzorku bylo přidáno 500 µl LB01 pufru, který obsahoval DAPI (finální koncentrace

roztoku byla 0,2 ug/ml). Před cytometrickou analýzou byla suspenze ještě přefiltrována přes jemnější nylonovou membránu ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

4.4.4 Průtoková cytometrická analýza

Experimenty byly vyhodnoceny na průtokovém cytometru (BD FACSAriaTM III) vybaveným 2 lasery (488 nm a 355 nm) s optickými detektory s odpovídajícími optickými filtry pro simultánní detekci obsahu DNA (DAPI fluorescence) a DNA obsahující inkorporované EdU (Alexa Fluor 488 fluorescence).

5 Výsledky

5.1 Optimalizace metody

Před samotnou analýzou buněčného cyklu bylo nutné zvolit postup přípravy vzorků pro následné cytometrické vyhodnocení. V úvahu přicházelo využití 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu (EdU) jakožto analogu thymidinu, anebo dříve hojně využívaný 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Při volbě metody se vycházelo z faktu, že při využití dobře fungující analýzy pomocí BrdU je proces přípravy vzorku poměrně náročný, jak časově, tak i metodicky, kdy je nutné vzorky denaturovat, enzymaticky štěpit a následně provést imunodetekci. Z tohoto důvodu byl zvolen druhý postup, který však vyžadoval nutnou optimalizaci. Postup optimalizací vycházel z dostupných materiálů, které byly součástí objednaných značících souprav od firmy Invitrogen a Base click a tyto manuály byly upraveny dle místních laboratorních podmínek pro obě studované rostliny.

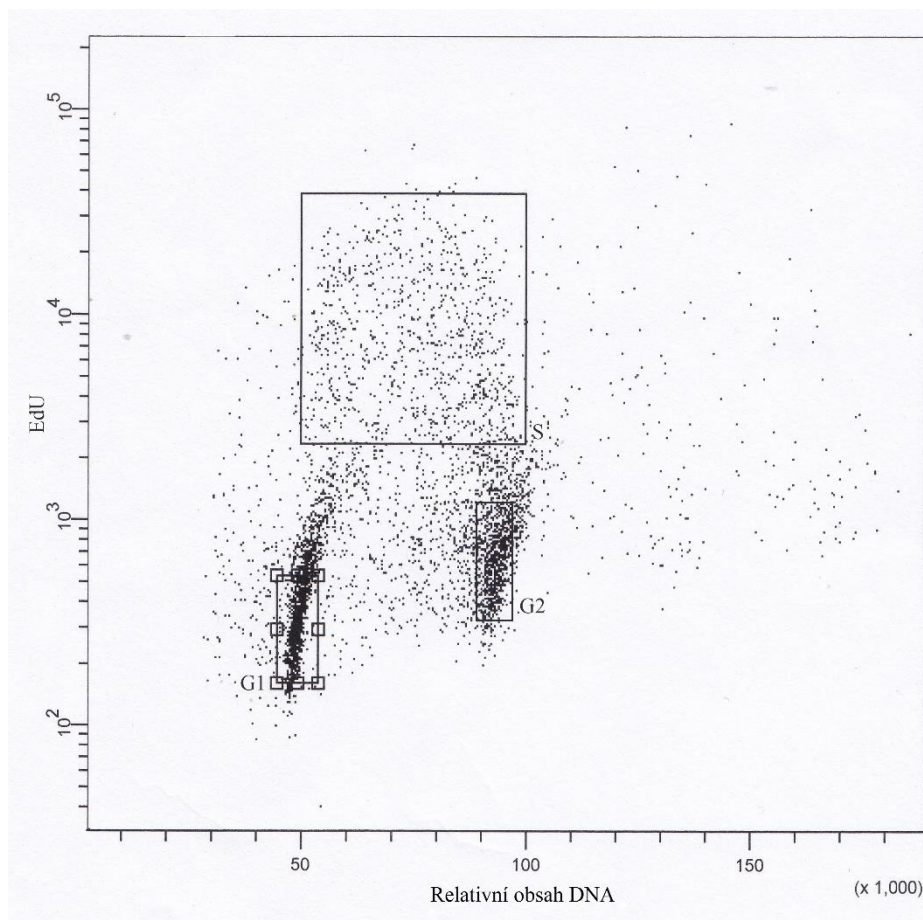
5.1.1 Optimalizace metody pro ječmen setý

V průběhu jednotlivých analýz bylo zjištěno, že pokud jsou naklíčená semena vložena přes noc do lednice a následně inkubována s roztokem obsahující EdU v termostatu při 25 °C, dochází k lepší inkorporaci analogu thymidinu, což znamená, že se značí větší počet jader než v případě, kdy nejsou naklíčená semena vložena do lednice.

Další parametr, ve kterém byly hledány optimální podmínky, byla homogenizace kořínků, protože při použití uváděných otáček 15 000 za sekundu byly tyto otáčky příliš vysoké a docházelo k nechtěnému roztržení jader. Po mnoha opakováních bylo zjištěno, že optimální doba homogenizace je 13 s a při otáčkách 14 300 za sekundu. Byla také upravena koncentrace pracovního roztoku obsahující EdU. Pro naše účely byla dostačující 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace oproti manuálem doporučené 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci EdU. Vysoká koncentrace této látky může mít dokonce cytotoxické účinky a z toho důvodu byla hledána nejnižší koncentrace roztoku, která však bude spolehlivě fungovat pro analýzy, což se podařilo.

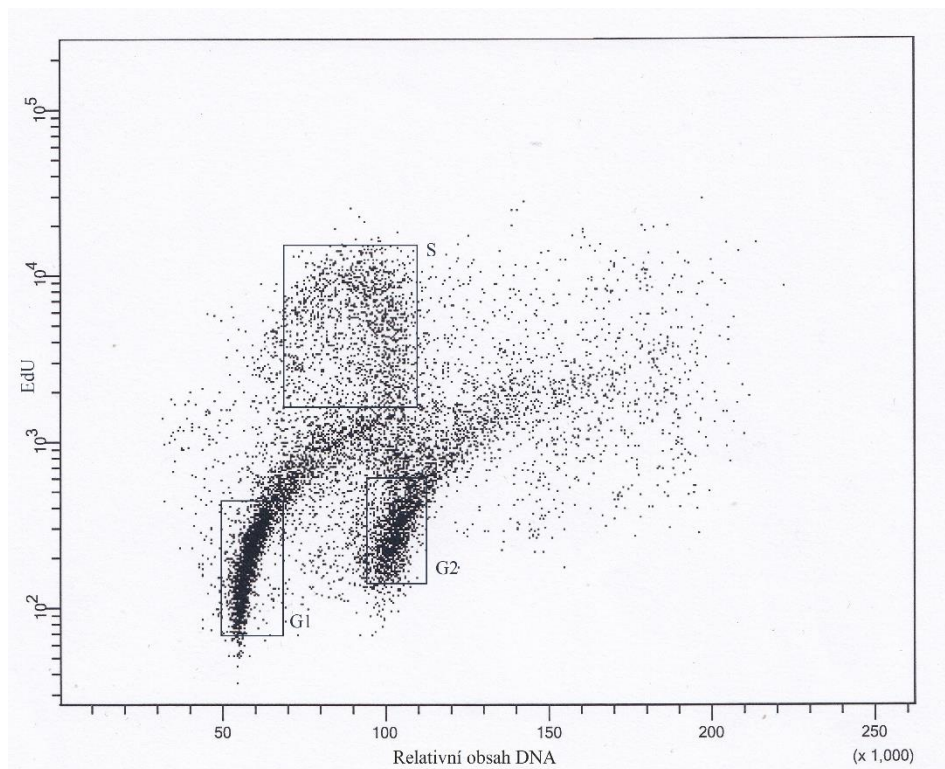
Výsledky optimalizací pro ječmen setý jsou znázorněny na následujících obrázcích 8, 9 a 10. Na obrázku č. 8 je vidět výsledek prvního použití zvolené metodiky bez jakýchkoliv optimalizací. Z výsledného histogramu je patrné, že ačkoliv probíhá inkorporace EdU do DNA, tak je značeno malé množství buněk a dochází také k nadměrnému roztržení jader. Výsledný histogram vznikl při přípravě vzorku za použití

25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace roztoku EdU spolu s použitím 15 000 otáček za sekundu po dobu 13 s.



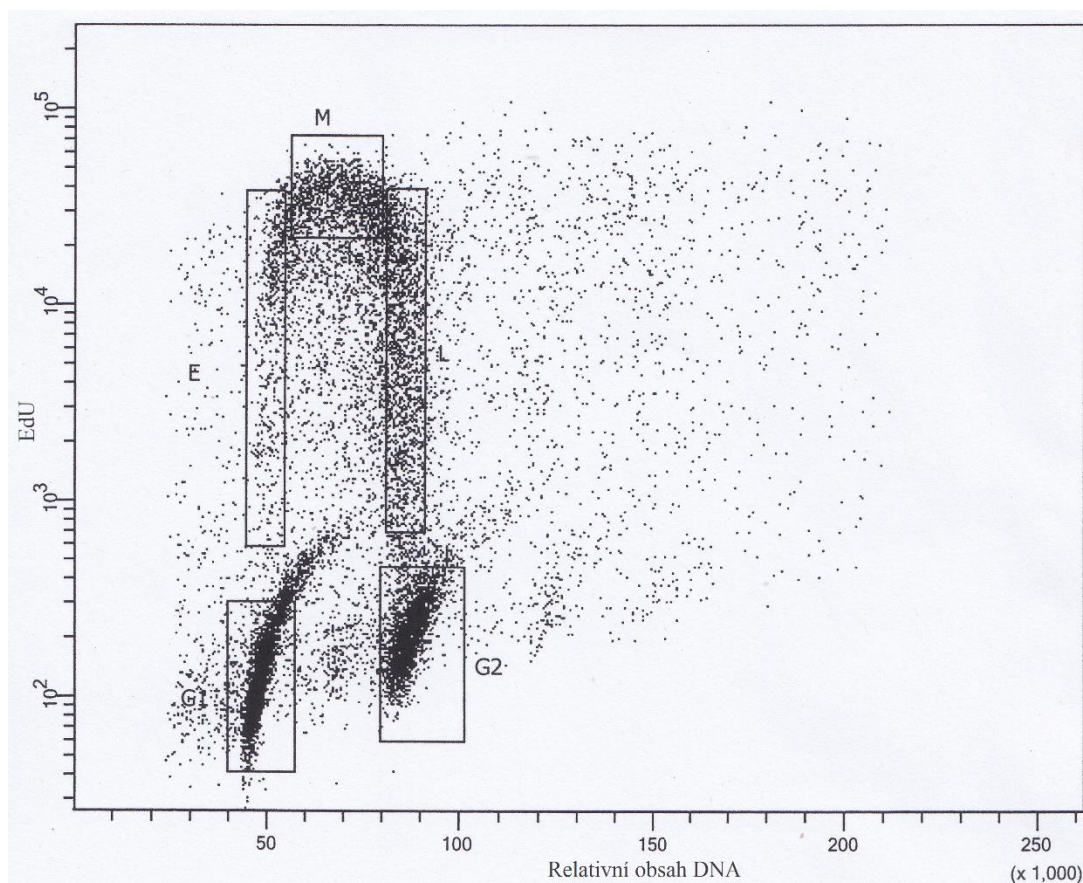
Obrázek 8: Výstup cytometrické analýzy jader ječmene setého před optimalizací

Následným upravováním podmínek došlo k vylepšení metody značení a tyto výsledky jsou znázorněny na histogramu č. 9. Výsledky optimalizace znázorněné na histogramu na obrázku č. 9 ukazují menší roztržitost jader, z důvodu upravení otáček při homogenizaci a to z 15 000 otáček za sekundu na 14 300 otáček za sekundu.



Obrázek 9: Výstup z cytometrické analýzy pro ječmen setý po optimalizaci otáček u homogenizace

Výsledná optimalizace celého protokolu je vidět na obrázku č. 10, při které byla použita $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace roztoku obsahující EdU při 14 300 otáčkách po dobu 13 sekund. Výsledný histogram jasně a zřetelně ukazuje jednotlivé fáze buněčného cyklu označené jako G1, S, G2. S fáze má tvar podkovy a po celkové optimalizaci je dokonce možné analyzovat buňky, které se nacházejí v brzké fázi S fáze (označené v histogramu jako E - early), kde začíná proces replikace, dále je možné rozlišit střední fázi označenou jako M a dále pozdní fázi označenou jako L, kde buňka dokončuje proces replikace a následně vstupuje do G2 fáze. Bylo také zjištěno, že objednané kity od firmy Invitrogen a Base click se při dodržení stejných postupů nijak neliší a z tohoto důvodu je možné používat levnější z nich.



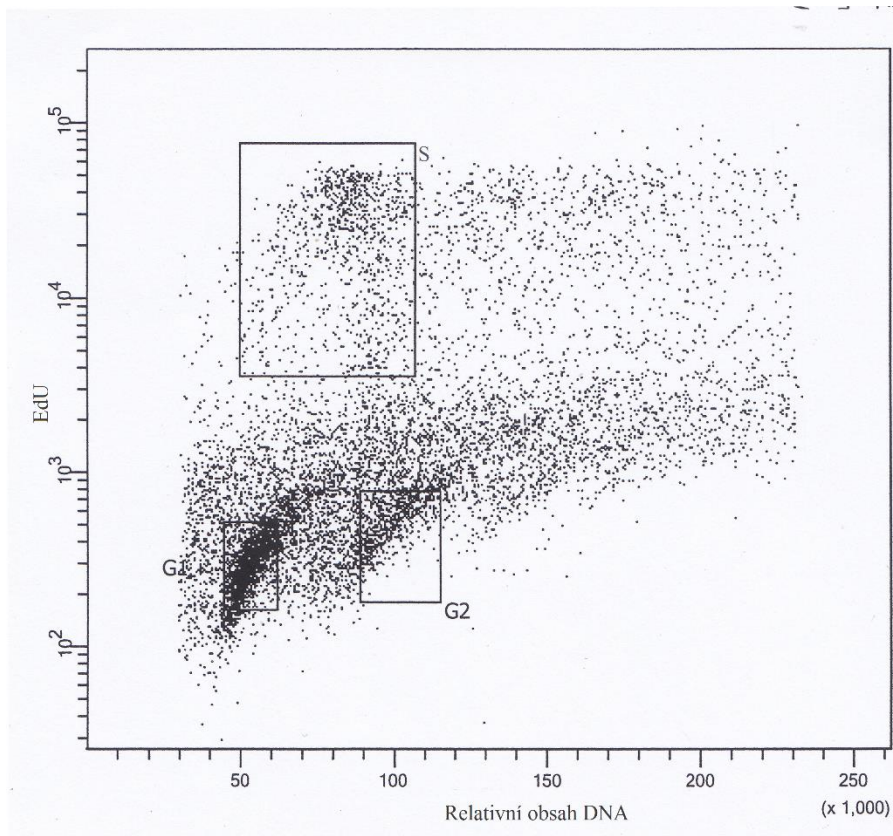
Obrázek 10: Výstup cytometrické analýzy pro ječmen setý po optimalizaci

5.1.2 Optimalizace metody pro válečku mrvici

V případě druhé analyzované rostliny – válečky byla situace obtížnější vzhledem k limitaci dostupného materiálu, ale na základě již zmíněné vypracované metodiky pro ječmen setý byly všechny tyto informace použity pro hledání optimálních podmínek. Bylo zjištěno, že při dodržení stejného postupu jako u ječmene, je nutné jen zoptimalizovat dobu a počet otáček v průběhu homogenizace. Vzhledem k malé velikosti jader byly otáčky sníženy z 16 000, přes 13 000 až na 10 000 otáček za sekundu opět po dobu 13 s.

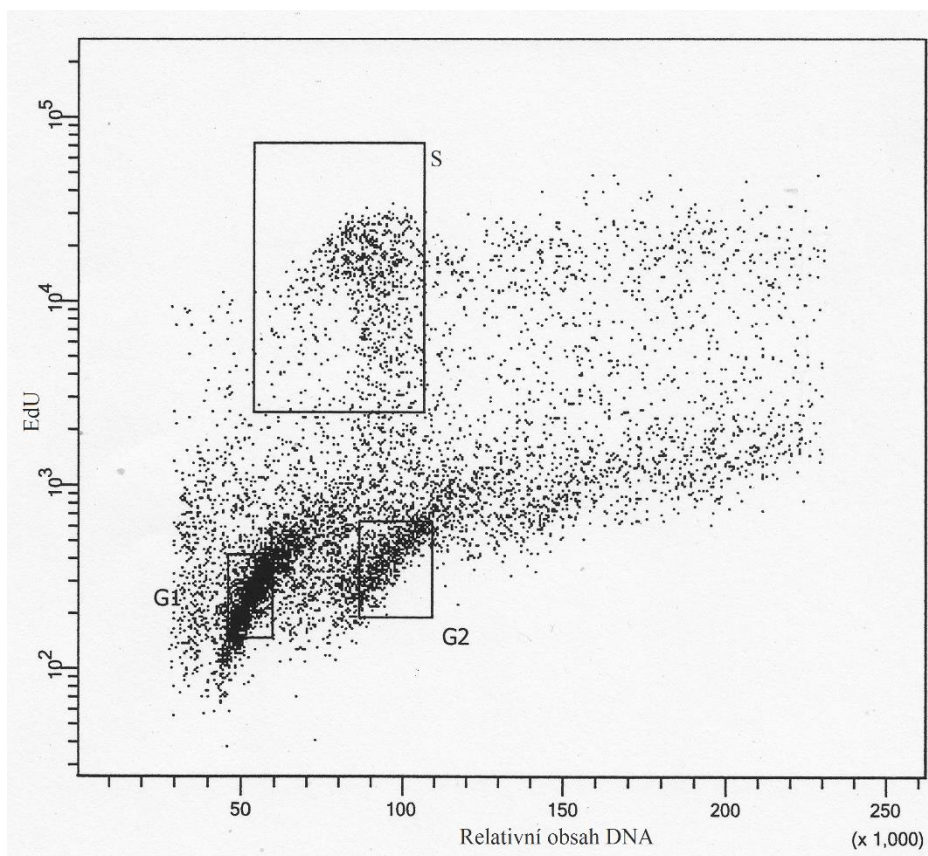
Výsledky optimalizací pro válečku jsou znázorněny na obrázcích č. 11 a 12 a 13.

Na obrázku č. 11 je zobrazen výsledný histogram po první optimalizaci, kdy byla naklíčená semena vložena do lednice a následně inkubována v roztoku obsahujícím EdU. Vzorek byl pak připravován 13 s homogenizací při otáčkách 16 000 otáček za sekundu. Z výsledku je patrné, že jádra jsou roztržena a jednotlivé fáze buněčného cyklu nelze snadno identifikovat a je potřeba další vylepšení postupu přípravy vzorku.



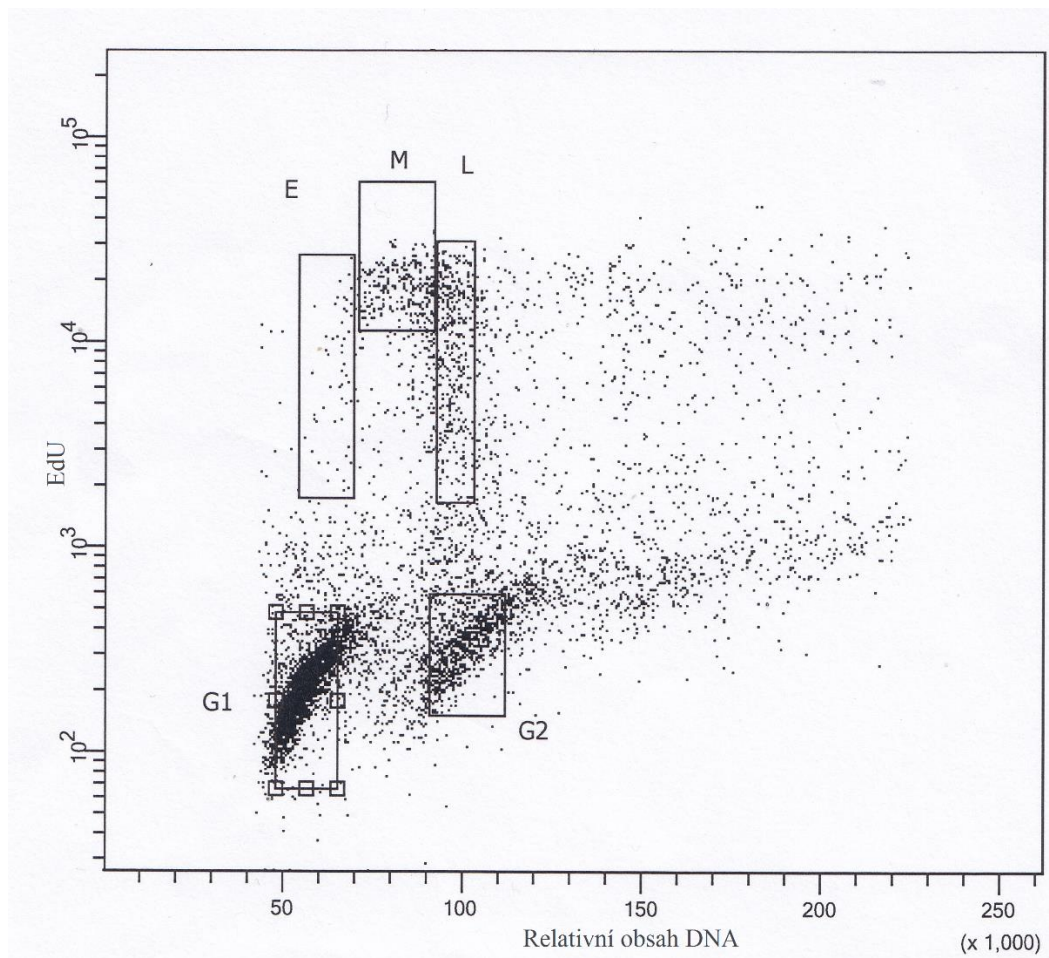
Obrázek 11. Histogram cytometrické analýzy válečky v průběhu optimalizace

Na obrázku č. 12 je zobrazen výsledný histogram po následných optimalizacích, při kterých byl vzorek připravován 13 sekundovou homogenizací při otáčkách 13 000 otáček za sekundu. Z výsledku je patrné, že jádra jsou méně roztržena a jednotlivé fáze buněčného cyklu lze již lépe identifikovat, ale je stále potřeba další optimalizace.



Obrázek 12: Histogram cytometrické analýzy válečky v průběhu optimalizace

Výsledná optimalizace celého protokolu je vidět na obrázku č. 13, při které byla použita $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace roztoku obsahující EdU při 10 000 otáčkách po dobu 13 sekund. Výsledný histogram opět jasně a zřetelně ukazuje jednotlivé fáze buněčného cyklu válečky označené jako G1, S, G2. S fáze má i zde tvar podkovy a po celkové optimalizaci je opět možné analyzovat buňky, které se nacházejí v brzké fázi S fáze (E), ve střední fázi (M) a v pozdní (L) fázi S fáze buněčného cyklu.



Obrázek 13: Finální histogram cytometrické analýzy válečky po optimalizaci.

5.2 Analýza buněčného cyklu

Po optimalizaci finálních protokolů byla provedena samotná analýza buněčného cyklu, ve které byly testovány různě dlouhé časové impulzy působení analogu thymidinu. Bylo zjištěno, že díky schopnosti inkorporace EdU do DNA je možné sledovat průběh a postup jednotlivých buněk v průběhu S fáze buněčného cyklu. Bylo pozorováno, jak buňky při různých časových pulzech s roztokem obsahujícím EdU postupně cyklují tak, že se dá pozorovat jejich posun z G1 fáze do S fáze, průběh brzkou, střední a pozdní fází S fáze a následný přechod do G2 fáze a návrat do G1 fáze. Bylo zjištěno, že při krátkém pulzu se jádra nachází především v brzké fázi S fáze, zatímco při dlouhém pulzu se buňky nacházejí v pozdní S fázi buněčného cyklu a dále přecházejí do G2 fáze. Z výsledků časových pulzů se dá vypořádat, že délka S fáze buněčného cyklu ječmene trvá 2 a půl hodiny. V případě válečky byla situace komplikovanější z důvodu nedostatečného počtu semen. Došlo ale k optimalizaci metody a následně probíhá přemnožování semen, která budou použita k dalším analýzám. Při vypracovávání metodiky značení pro tuto rostlinu bylo ale pozorováno, že celková délka buněčného cyklu

je kratší, než u ječmene Výsledky této práce jsou velmi přínosné, protože výsledná optimalizace je tak přesná, že bude použita k detailní analýze S fáze buněčného cyklu, kdy budou tříděna jádra z jednotlivých částí buněčného cyklu a získaná DNA bude použita pro sekvenování a následné bioinformatické vyhodnocení.

6 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo provést analýzu buněčného cyklu ječmene a válečky pomocí průtokové cytometrie. K tomu účelu byla zvolena metodika využívající 5-ethynyl-2'-deoxyuridine EdU, jakožto analog thymidinu, který se v průběhu S fáze buněčného cyklu inkorporuje do míst nově vznikajícího řetězce namísto daných dusíkatých bází a následné navázání azidu s fluorochromem pak umožňuje vyhodnocení pomocí průtokové cytometrie. Analog thymidinu byl použit v několika studiích, které se zabývaly studiem replikace u huseníčku rolního (Mikelson-Young *et al.*, 2016; Concia *et al.*, 2018), studiem DNA replikace u kukuřice (Bass *et al.*, 2014), studiem endoreduplikace u orchideí (Hříbová *et al.*, 2016) a dále pak studiem S fáze buněčného cyklu u pšenice, rýže a kukuřice (Mikelson-Young *et al.*, 2016).

Při vybírání vhodné metody se vycházelo z nejnovějších studií, které ve své práci využívají EdU, jakožto vhodný nástroj pro analýzu velkého počtu buněk bez nutnosti jejich předchozí synchronizace. Vyoptimalizovaná metoda může být použita pro široké spektrum rostlin a jejich detailní analýzu S fáze buněčného cyklu. Tyto poznatky potvrzují i Mikelson-Young *et al.*, 2016 ve své publikaci, ve které se zaměřují na detailní analýzu S fáze buněčného cyklu u vybraných rostlin (Mikelson-Young *et al.*, 2016). Velkou výhodou při použití této metody je její reprodukovatelnost, snadná vizualizace a rychlost, což potvrzují i autoři studie (Mikelson-Young *et al.*, 2016). Další velkou výhodou této metody je, že nedochází k degradaci jader či subnukleárních struktur jako v případě, kdy se využíval analog známý jako BrdU (Kotogany *et al.*, 2010). Zde použitá metodika využitá k analýze buněčného cyklu poskytuje možnost přímého měření nárůstu obsahu DNA, ke které dochází během replikace a může být použita i pro nesynchronizované buněčné populace, a před samotnou analýzou není potřeba přidání chemických inhibitorů či jiných látek nutných pro synchronizaci (Doležel *et al.*, 1999; Planchais *et al.*, 2000; Mikelson-Young *et al.*, 2016). Další velkou výhodou této metody je rychlost celé této analýzy ve srovnání s metodami, které vyžadují porovnání jednotlivých jader s využitím mikroskopických technik. Využití průtokové cytometrie se jeví jako velmi vhodný nástroj při hodnocení velkého množství buněk či jader z proliferujících populací.

V průběhu bakalářské práce byl optimalizován protokol pro obě rostliny. Z důvodu nedostatku semen válečky nemohl být zanalyzován její buněčný cyklus, který by byl následně porovnán s cyklem ječmene. Větší genom ječmene a větší obsah repetitivních oblastí napovídá, že i doba celého cyklu by mohla být delší v porovnání s válečkou.

To se v této studii ukazuje, ovšem nebylo to průkazně zjištěno a statisticky podloženo. Tyto analýzy budou předmětem dalšího výzkumu. Studie zabývající se analýzou buněčného cyklu a stanovení S fáze u kukuřice stanovily dobu replikace ve vzorcích připravených z kořenových špiček na 2,7 hodiny, přičemž velikost genomu kukuřice byla stanovena na 2,3 Gbp (Schnable *et al.*, 2009). U huseníčku rolního, který se stejně jako válečka používá díky své malé velikosti genomu (0,13 Gbp) jako modelový organismus, byla doba S fáze stanovena na 1,5 h. U rýže s velikostí genomu 0,64 Gbp (Matsumoto *et al.*, 2005) bylo zjištěno, že délka S fáze ve vzorcích připravených z kořenových špiček trvala 1,2 h. U pšenice kultivaru Chinese Spring s velikostí genomu 17 Gbp (Brenchley *et al.*, 2012) stanovili délku S fáze buněčného cyklu na 2,5 hodiny. Výsledky této studie potvrzují i výsledky získané v této v bakalářské práci. V tomto článku stanovili délku S fáze buněčného cyklu ječmene s velikostí genomu 5,1 Gbp (Mayer *et al.*, 2012) na 2,3 hodiny (Mickelson-Young *et al.*, 2016). Při porovnání těchto výsledků můžeme pozorovat, že rostliny s podobnou velikostí genomu ukazují pouze malé a zdánlivě náhodné podobnosti v délce S fáze buněčného cyklu a vzhledem k tomu, že k replikaci DNA probíhá v oddělených replikonech, z nichž se mohou mnohé replikovat současně, doba trvání S fáze nemusí být nutně závislá na velikost genomu (Bennett 1972, Francis *et al.*, 2008., Mickelson-Young *et al.*, 2016).

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat buněčný cyklus dvou vybraných rostlin pomocí průtokové cytometrie a s tím související precizní vypracování dobře fungujícího protokolu, jenž využívá novou metodu. Po zvolení vhodné metodiky využívající 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) byly optimalizovány 4 základních faktory značení DNA – samotný proces inkorporace EdU DNA po naklíčení semen, koncentrace roztoku obsahujícího EdU, doba homogenizace kořínků a otáčky homogenizace.

V práci se podařilo vyoptymalizovat výsledný protokol pro ječmen setý i pro válečku a dokonce se podařilo vypracovat tak precizní protokol, který bude následně použit k třídění jader z jednotlivých fází buněčného cyklu zahrnující G1, G2 fázi a také dobře rozlišitelnou brzkou, střední a pozdní S fázi buněčného cyklu. Následně vyizolovaná DNA bude použita pro sekvenování a bioinformatickou analýzu získaných dat.

Při analýze buněčného cyklu bylo na základě různě dlouhých časových impulzů zjištěno, že celková doba S fáze buněčného cyklu ječmene setého trvá přibližně 2,5 hodiny. Vzhledem k omezenému množství semen válečky, která jsou nyní přemnožována, nebyla provedena celková analýza buněčného cyklu, ovšem při vypracovávání metodiky bylo pozorováno, že cyklus je kratší než u ječmene.

8 Seznam použité literatury.

Baserga R., Morrione A. (1999): Differentiation and malignant transformation: two roads diverged in a wood 32-33: 68–75.

Bass H. W., Wear E.E., Lee T.J., Hoffman G.G., Gumber H.K., Allen G.C., Thompson W.F., Hanley-Bowdoin L. (2014): A maize root tip system to study DNA replication programmes in somatic and endocycling nuclei during plant development. *Journal of Experimental Botany* 65: 2747–2756.

Beier S., Himmelbach A., Colmsee C., Zhang X. Q., Barrero R. A., Zhang Q., Li L., Bayer M., Bolser D., Taudien S., Groth M., Felder M., Hastie A., Šimková H., Staňková H., Vrána J., Chan S., Muñoz-Amatriaín M., Ounit R., Wanamaker S., Schmutzer T., Aliyeva-Schnorr L., Grasso S., Tanskanen J., Sampath D., Heavens D., Cao S., Chapman B., Dai F., Han Y., Li H., Li X., Lin C., McCooke J. K., Tan C., Wang S., Yin S., Zhou G., Poland J. A., Bellgard M. I., Houben A., Doležel J., Ayling S., Lonardi S., Langridge P., Muehlbauer G. J., Kersey P., Clark M. D., Caccamo M., Schulman A. H., Platzer M., Close T. J., Hansson M., Zhang G., Braumann I., Li C., Waugh R., Scholz U., Stein N., Mascher M. (2017): Construction of a map-based reference genome sequence for barley, *Hordeum vulgare* L. *Scientific Data*, 4, 170044

Bennett M.D. (1972): Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 181: 109–135.

Bothmer R., Jacobsen N., Baden C., Jørgensen R.B., Linde-Laursen I. (1991): An Ecogeographical Study of the Genus *Hordeum*. *Systematic and Ecogeographic Studies of Crop Genepools*. 7. IBPGR.

Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M., Barker G. L., D'Amore R., Allen A. M., McKenzie N., Kramer M., Kerhornou A., Bolser D., Kay S., Waite D., Trick M., Bancroft I., Gu Y., Huo N., Luo M. C., Sehgal S., Gill B., Kianian S., Anderson O., Kersey P., Dvorak J., McCombie W. R., Hall A., Mayer K. F., Edwards K. J., Bevan M. W., Hall N. (2012): Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491: 705–710.

Buck S., Bradford J., Gee K., Agnew B., Clarke S.W., Salic A. (2008): Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click

chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* 44(7): 927–929.

Concia L., Brooks A. M., Wheeler E., Zynda G. J., Wear, E. E., LeBlanc, C., Song J., Lee, T. J., Pascuzzi, P. E., Martienssen, R. A., Vaughn, M. W., Thompson, W. F., Hanley-Bowdoin, L. (2018): Genome-Wide Analysis of the Arabidopsis Replication Timing Program. *Plant Physiol.* 176(3): 2166–2185.

Crosland-Taylor P. J. (1953): A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube *Nature* 171(4340): 37–38

Dewitte W., Murray, J. A. H. (2003): The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54(1): 235–264

Díaz M., Herrero M., García L. A., Quirós C. (2010): Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48: 385–407

Doležel J. (1991): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2(4): 143–154.

Doležel J. (2000): Využití průtokové cytometrie pro analýzu genomů rostlin (Habilitationální práce), Univerzita Palackého v Olomouci, Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR

Doležel J., Bartoš J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 95: 99 – 110

Doležel J., Bartoš H., Voglmayr J., Greilhuber J. (2003): Nuclear DNA content and genome size of trout and humane. *Cytometry* 51A (2): 127-128.

Doležel J. (1997): Analýza a třídění chromozomů rostlin pomocí průtokové cytometrie. *Biologické listy* 62(2): 131–160

Doležel J., Čihalíková J, Weiserova J, Lucretti S. (1999): Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Methods in Cell Science* 21: 95–107.

Doležel L., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L., Obermayer R. (1998): Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Annals of Botany* 82(1): 17–26

- Doležel J., Greihuber J., Suda J. (2007): Flow cytometry with plants cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA
- Draper J, Mur L. A., Jenkins G., Ghosh-Biswas G. C., Bablak P., Hasterok R., Routledge A. P. (2001): *Brachypodium distachyon*: A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.* 127(4):1539-55
- Dreiseitl A. (2003): Adaptation of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* to barley resistance genes in the Czech Republic in 1971 – 2000. *Plant Soil and Environment* 49: 231-248.
- Francis D., Barlow P. W. (1988): Temperature and the cell cycle. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 42: 181–201.
- Harlan J. R., Zohary D. (1966): Distribution of Wild Wheats and Barley. *Science*, 153(3740), 1074–1080
- Heller F. O. (1973). DNS – Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 86: 437-441
- Herzenberg L. A., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M. (2002): “The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford,” *Clin. Chem.*, vol. 48, no. 10, pp. 1819–1827
- Howard A, Pelc SR (1953): Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 6: 261–273.
- Hřibová E., Holušová K., Trávníček P., Petrovská B., Ponert J., Šimková H, Kubátová B., Jersáková J., Čurn V., Suda J., Doležel J., Vrána J. (2016): The Enigma of Progressively Partial Endoreplication: New Insights Provided by Flow Cytometry and Next-Generation Sequencing. *Genome Biology and Evolution* 8(6): 1996-2005
- Chehrehasa F., Meedeniya A. C. B., Dwyer P., Abrahamsen G., Mackay-Sim A. (2009): EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 177: 122–130
- Garvin D. F., Gu Y. Q., Hasterok R., Hazen S. P., Jenkins G., Mockler T. C., Mur L. A. J., Vogel J. P. (2008): Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science – The Plant Genome* 48: S69–S8

- Gray J. W., Dolberare F., Pallavicini M. G. (1990): Quantitative cell cycle analysis. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA (eds), Flow cytometry and sorting, Second Edition. New York, Wiley-Liss, Inc
- Gucker F.T., Pickard H. B., O'Konski C. T. (1947): A photoelectric instrument for comparing the concentrations of very dilute aerosols, and measuring low light intensities. *J Am Chem Soc.* 69(2): 429–438
- Choi J. S., Berdis A. J. (2016): Vizualizing nucleic acid methabolism using non-natural nucleosides and nucleosides analogs. *Biochmica et Biophysica Acta – Proteins and proteomics* 1864(1): 165–176
- Johnson D. G., Walker C. L. (1999): Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 295–312.
- Kotogany E., Dudits D., Horvath G.V., Ayaydin F. (2010): A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods* 6: 5
- Maton A., Hopkins J. J., LaHart S., Quon Warner D., Wright M., Jill D. (1997): *Cells: Building Blocks of Life*. New Jersey: Prentice Hall. pp. 70–4
- Marinov, I. (2003): *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Triton. Praha. ISBN: 8072544152
- Matsumoto T., Wu J., Kanamori H., *et al.* (2005): The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436, 793–800.
- Mayer K. F., Waugh R., Brown J. W., Schulman A., Langridge P., Platzer M., Fincher G. B., Muehlbauer G. J., Sato K., Close T. J., Wise R. P., Stein N. (2012): A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711–716.
- Moldavan A. (1934): Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 80: 188–189
- Morgan D. O. (2007): *The cell cycle: principles of control*. London: New Science Press. Primers in biology. ISBN: 978-0-87893-508-6.
- Nečas O. (2000): *Obecná biologie pro lékařské fakulty, 3. přepracované vydání*, Jinočany H&H., ISBN 80-86022-46-3

- Ormerod M. G. (2008): Flow cytometry: A basic introduction. ISBN 978-0-9559812-0-3.
- Ozdemir B. S., Hernandez P., Filiz, E., Budak H. (2008): Brachypodium Genomics. *Int J Plant Genomics*. 536104
- Planchais S., Glab N., Inze D., Bergounioux C. (2000): Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters* 476: 78–83
- Rimpau J., Smith D. B., Flavell R. B. (1980) Sequence organization in barley and oats chromosomes revealed by interspecies DNA-DNA hybridization. *Heredity* 44: 131–149
- Roubalová L. (2012): Průtoková cytometrie. *FONS*. roč. 22, č. 2, s. 5-9. ISSN: 1211-7137
- Roux N. A., Toloza Z., Radecki F. J., Zapata-Arias, Doležel J. (2003): Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports* 21(5): 483–490
- Rowley T. (2012): “Flow Cytometry - A Survey and the Basics,” *Mater. Methods* 2: 125
- Salic A., Mitchison T. J. (2008): A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(7), 2415-2420
- Shapiro, H. M. (2003): *Practical Flow Cytometry*, 4th edition. Wiley-Liss, New York, NY, USA. ISBN: 0-471-41125-6
- Shirasu K., Schulman A. H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. (2000): A contiguous 66-kb barley sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Research* 10: 908–915
- Schnable P. S., Ware D., Fulton R. S., Stein J. C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T. A., Minx P., Reily A. D., Courtney L., Kruchowski S. S., Tomlinson C., Strong C., Delehaunty K., Fronick C., Courtney B., Rock S. M., Belter E., Du F., Kim K., Abbott R. M., Cotton M., Levy A., Marchetto P., Ochoa K., Jackson S. M., Gillam B., Chen W., Yan L., Higginbotham J., Cardenas M., Waligorski J., Applebaum E., Phelps L., Falcone J., Kanchi K., Thane T., Scimone A., Thane N., Henke J., Wang T., Ruppert J., Shah N., Rotter K., Hodges J., Ingenthron E., Cordes M., Kohlberg S., Sgro J., Delgado B., Mead K., Chinwalla A., Leonard S., Crouse K., Collura K., Kudrna D., Currie J., He R., Angelova A., Rajasekar S., Mueller T., Lomeli R., Scara G., Ko A., Delaney K., Wissotski M., Lopez G., Campos D., Braidotti M., Ashley E., Golser W., Kim H., Lee S., Lin J., Dujmic Z., Kim W., Talag J., Zuccolo

A., Fan C., Sebastian A., Kramer M., Spiegel L., Nascimento L., Zutavern T., Miller B., Ambroise C., Muller S., Spooner W., Narechania A., Ren L., Wei S., Kumari S., Faga B., Levy M. J., McMahan L., Van Buren P., Vaughn M. W., Ying K., Yeh C. T., Emrich S. J., Jia Y., Kalyanaraman A., Hsia A. P., Barbazuk W. B., Baucom R. S., Brutnell T. P., Carpita N. C., Chaparro C., Chia J. M., Deragon J. M., Estill J. C., Fu Y., Jeddloh J. A., Han Y., Lee H., Li P., Lisch D. R., Liu S., Liu Z., Nagel D. H., McCann M. C., SanMiguel P., Myers A. M., Nettleton D., Nguyen J., Penning B. W., Ponnala L., Schneider K. L., Schwartz D. C., Sharma A., Soderlund C., Springer N. M., Sun Q., Wang H., Waterman M., Westerman R., Wolfgruber T. K., Yang L., Yu Y., Zhang L., Zhou S., Zhu Q., Bennetzen J. L., Dawe R. K., Jiang J., Jiang N., Presting G. G., Wessler S. R., Aluru S., Martienssen R. A., Clifton S. W., McCombie W. R., Wing R. A., Wilson R. K. (2009): The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326, 1112–1115.

Snustad D. P., Simmons M. J. (2016): *Principles of genetics*. Seventh edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2016. ISBN 9781119142287.

Suda J. (2004): *An employment of flow cytometry into plant biosystematics* (Ph.D. Thesis). Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany

Suda J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa* 53/1: 46–48

Šinkorová Z., Zárýbnická L. (2008): Průtoková cytometrie jako analytická a selekční I. část. *Vojenské zdravotnické listy* 6

Špaldon E. (1982): *Rostlinná výroba*. Bratislava, Příroda

Špunar J., Vaculová K., Špunarová M., Nesvadba Z. (2002): Comparison of important parameters of spring and winter barley cultivated in sugar beet production area of Czech Republic. *Rostlinná Výroba* 48:237–242

Taylor J.H., Woods P. S., Hughes W. L. (1957): The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43, 122–128

The International Brachypodium Initiative (2010): Genome sequence analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*: insights into grass genome evolution. *Nature* 463: 763-768

Tuttle A. H., Rankin M. M., Teta M., Sartori D. J., Stein G. M., Kim G. J., Virgilio C., Granger A., Zhou D., Long S. H., Schiffman A. B., Kushner J.A. (2010): Immunofluorescent Detection of Two Thymidine Analogues (CldU and IdU) in Primary Tissue J Vis Exp. (46): 2166.

Vanderlaan M., Thomas C. B. (1985): Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. Cytometry 6: 501–505.

Vengrova S., Dalgaard J. (2015): DNA Replication, New York, NY: Springer New York, Methods in Molecular Biology.

Zimolka, J. (2006). Ječmen - formy a užitkové směry v České republice. Praha: Profi Press. ISBN 978-80-86726-18-2.

Zohary D., Hopf M. (2000): The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. In: Domestication of Plants in the Old World. 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK