

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2019**

**Bc. Lucie Horáková**

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



**Studium stability genomového složení  
u vybraných kříženců kostřav a jílků  
xFestulolium**

**Diplomová práce**

**Bc. Lucie Horáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: RNDr. David Kopecký, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Davida Kopeckého, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

## Souhrn

Předkládaná diplomová práce je zaměřená na studium stability genomového složení mezirodových kříženců *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium*) kombinující agronomicky výhodné vlastnosti obou rodičů: zástupců rodů kostřava (*Festuca* L.) a jílek (*Lolium* L.). Tyto jednoděložné trávy patří do ekonomicky významné čeledi lipnicovité (*Poaceae*) a představují hlavní složku luk a pastvin. Slouží převážně jako krmivo pro hospodářská zvířata, ale využívají se také při zakládání užitkových či okrasných trávníků. Značným problémem při šlechtění hybridních trav je nestabilita jejich genomu v následujících generacích způsobená párováním homeologních chromozomů a cizosprašným typem rozmnožování.

V teoretické části je charakterizována čeleď lipnicovité a zvláštní pozornost je věnována hospodářsky významným druhům rodu kostřava a jílek. Dále se v teoretické části zabývám mezirodovou hybridizací, genomovým složením odrůd *Festulolium*, stabilitou jejich genomu a v neposlední řadě také metodami vhodnými k identifikaci a charakterizaci hybridů. Cílem experimentální části této práce bylo pomocí genomové *in situ* hybridizace studovat genetickou variabilitu a stabilitu genomového složení v následující generaci u vybraných introgresních odrůd *Festulolium* (Spring Green, FuRs0142, Lofa a FLM).

Výsledky cytogenetické analýzy ukázaly nevyvážené zastoupení rodičovských genomů, neboť v genomech všech analyzovaných rostlin dominoval genom jílku nad genomem kostřavy. V následující generaci bylo u většiny rostlin pozorováno zvýšení podílu jílkového genomu a postupná eliminace genomu kostřavového. Pouze v případě sprášení rostlin s kostřavovým, i bez kostřavového chromatinu a následné selekce pouze rostlin s kostřavovým chromatinem, byl u odrůd Lofa i FLM pozorován z generace na generaci mírný nárůst kostřavového chromatinu. Nicméně stále bylo zastoupení rodičovských genomů značně nerovnoměrné.

Na základě získaných výsledků lze usoudit, že genom introgresních odrůd není příliš stabilní a v následujících generacích dochází k dalšímu posunu genomového složení ve prospěch jílkového genomu. Pokud nebudou rostliny předem selektovány, může v dalších generacích dojít až k úplné eliminaci kostřavového chromatinu a návratu k čistě jílkové formě.

## Summary

This diploma thesis is focused on the genomic composition and its stability in intergeneric hybrids *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium*) which may combine superior agronomic characteristics of fescue (*Festuca* L.) and ryegrass species (*Lolium* L.). These monocot grasses are members of the economically important *Poaceae* family and are the main component of permanent meadows and pastures. Grasses provide high quality fodder for livestock and they are also used for turf and ornamental purposes. However, hybrid grasses possess troubles with the enormous genetic variability and instability in the successive generations due to a pairing of homoelogenous chromosomes and outcrossing type of reproduction.

In theoretical part of this thesis, *Poaceae* family is characterized with the special attention given to the genera *Festuca* and *Lolium*. Other part focuses on the intergeneric hybridization, genomic composition of *Festulolium*, stability of hybrid genomes and on the main cytogenetic and molecular methods used for the identification and characterization of the hybrids and their genomes. The main aim of this work was to study genetic variability and stability of the genomic composition in the successive generations of four *Festulolium* cultivars (Spring Green, FuRs0142, Lofa a FLM) using genomic *in situ* hybridization.

The cytogenetic analysis detected unbalanced representation of parental genomes. In the genomes of all analysed plants the *Lolium* genome dominated over the *Festuca* genome. The analysis detected increasing predominance of *Lolium* genome in the successive generation of the majority of analysed plants. Slight increase of *Festuca* chromatin was observed in two cultivars: Lofa and FLM when plants with and without *Festuca* chromatin were intercrossed and only plants with *Festuca* chromatin were used for seed collection. However, genomic constitution in these cultivars remained unbalanced.

To conclude, the results of this thesis indicates instability of the hybrid genome of introgression *Festulolium* cultivars. It seems evident, that without proper selection of the plants for mating, the introgression(s) from *Festuca* genome will be eliminated in subsequent generations and hybrid cultivars will revert to the pure *Lolium* form.

Velké poděkování patří mému vedoucímu diplomové práce RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a věnovaný čas v průběhu zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za ochotu a pomoc všem zaměstnancům Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. v Olomouci.

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>3</b>
3.1	Čeď lipnicovité ( <i>Poaceae</i> ).....	3
3.1.1	Stuktura genomu .....	3
3.1.2	Travní rody .....	4
3.1.3	Rod kostřava ( <i>Festuca L.</i> ).....	5
3.1.3.1	Kostřava luční.....	6
3.1.3.2	Kostřava rákosovitá .....	6
3.1.3.3	Komplex kostřavy ovčí a kostřavy červené.....	7
3.1.3.4	Genom kostřav.....	7
3.1.4	Rod jílek ( <i>Lolium L.</i> ) .....	8
3.1.4.1	Jílek mnohokvětý.....	9
3.1.4.2	Jílek vytrvalý .....	9
3.1.4.3	Genom jílků .....	10
3.2	Polyploidie a vzdálená hybridizace .....	11
3.2.1	Mezirodová a mezidruhová hybridizace ve šlechtění.....	13
3.2.2	Mezirodový hybrid <i>Festulolium (Festuca x Lolium)</i> .....	13
3.2.3	Křížení pomocí amfiploidie .....	14
3.2.4	Introgresní křížení.....	15
3.3	Genomové složení a stabilita hybridního genomu .....	17
3.4	Metody používané k identifikaci hybridů.....	19
3.4.1	Molekulární metody.....	19
3.4.2	Molekulárně cytogenetické metody.....	21
3.4.2.1	<i>In situ</i> hybridizace (ISH) .....	21
3.4.2.2	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	22
3.4.2.3	Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH) .....	23
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>26</b>
4.1	Biologický materiál .....	26
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	26
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	28
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	29
4.4.1	Setí rostlin, hydroponie, odběr a fixace kořínků.....	29
4.4.2	Příprava roztlakových preparátů .....	29

4.4.3	Příprava značené sondy .....	30
4.4.4	Izolace genomové DNA a příprava blokovací DNA .....	30
4.4.5	Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH) .....	30
4.5	Analýza dat .....	31
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>33</b>
5.1	Cytogenetická analýza .....	33
5.1.1	Aneuploidie .....	36
5.1.2	Genomové složení .....	37
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>61</b>



## Seznam zkratek

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
BAC	umělý bakteriální chromozom ( <i>Bacterial artificial chromosome</i> )
DAPI	4',6-diamidin-2-fenyindol
DArT	Diversity Arrays Technology
DIG	digoxigenin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EST-SSRs	Expressed sequence tag-simple sequence repeats
F <sub>x</sub>	filiální generace (x určuje číslo generace)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
Fp	kostřava luční ( <i>Festuca pratensis</i> )
Fg	<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>glaucescens</i> Boiss.
Gb	miliarda párů bází ( <i>giga base pairs</i> )
GBS	genotypování sekvenováním ( <i>Genotyping by sequencing</i> )
gDNA	celogenomová DNA ( <i>genomic DNA</i> )
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
IGER	Institute of Grassland and Environmental Research
ISH	<i>in situ</i> hybridizace
ITS	vnitřní transkribovaný mezerník ( <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
kb	tisíc párů bází ( <i>kilo base pairs</i> )
Lm	jílek mnohokvětý ( <i>Lolium multiflorum</i> )
MAS	markerem zprostředkovaná selekce ( <i>Marker assisted selection</i> )
Mb	milion párů bází ( <i>mega base pairs</i> )
NGS	sekvenování nové generace ( <i>Next generation sequencing</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase chain reaction</i> )

RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
SNP	jednonukleotidový polymorfismus ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SSC	citronan sodný ( <i>saline-sodium citrate</i> )
SSR	jednoduché opakující se sekvence ( <i>Simple Sequence Repeat</i> )
subg.	podrod ( <i>subgenus</i> )
subsp.	poddruh ( <i>subspecies</i> )
TAS	Telomeric repeat associated sequences
<i>trnL-F</i>	vnitřní mezerník ( <i>intergenic spacer</i> )
var.	varieta ( <i>variety</i> )
WGD	celogenomová duplikace ( <i>Whole-genome duplication</i> )

## Seznam obrázků

Obr. 1: Cytogenetická analýza jedné rostliny *Festulolium* odrůdy Lofa

Obr. 2: Průběh genomové *in situ* hybridizace

Obr. 3: Příklady cytogenetické analýzy dvou po sobě jdoucích generací čtyř odrůd *Festulolium*

Obr. 4: Schématické znázornění průběhu experimentu u odrůhy Spring Green

Obr. 5: Schématické znázornění průběhu experimentu u odrůhy FuRs0142

Obr. 6: Schématické znázornění průběhu experimentu u odrůhy Lofa

Obr. 7: Schématické znázornění průběhu experimentu u odrůhy FLM

## Seznam tabulek

Tab. 1: Přehled významných druhů kostřav podrodu *Schedonorus* a jílků, jejich ploidie a počet chromozomů

Tab. 2: Příprava hybridizační směsi

Tab. 3: Počet analyzovaných či sprášených rostlin jednotlivých odrůd *Festulolium* využitých v experimentu

Tab. 4: Počet chromozomů u dvou generací čtyř studovaných odrůd *Festulolium*

Tab. 5: Analýza genomového složení u dvou po sobě jdoucích generacích odrůd Spring Green a FuRs0142

Tab. 6: Analýza genomového složení u dvou po sobě jdoucích generacích odrůd Lofa

Tab. 7: Analýza genomového složení u dvou po sobě jdoucích generacích odrůd FLM

# 1 Úvod

Čeleď lipnicovité (*Poaceae*) zahrnuje nejvýznamnější travní rody, jako jsou jílky (*Lolium* L.) a kostřavy (*Festuca* L.), využívané zejména ke krmným účelům. Ty se rovněž uplatňují při zakládání trávníků či k okrasným účelům a hrají zásadní roli v ochraně životního prostředí (Kopecký *et* Studer, 2014). Jílky jsou ceněné pro svůj vysoký výnos dobře stravitelné píce s vysokým nutričním obsahem, zatímco kostřavy se vyznačují odolností vůči abiotickému a biotickému stresu (Thomas *et* Humphreys, 1991). Vzhledem k měnícím se klimatickým podmínkám, se šlechtitelé, často ve spolupráci s genetiky a molekulárními biology, snaží získat odrůdy odolné vůči abiotickému a biotickému stresu se zachováním či zvýšením výnosu, kvality píce a vytrvalostí. Cenným nástrojem při šlechtění se stala mezirodová či mezidruhá hybridizace. Tento postup se využívá i při šlechtění trav a mezirodovým křížením kostřav s jílkou vznikají hybridy *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium*) kombinující agronomicky vhodné vlastnosti obou rodů. V současné době existuje mnoho komerčních odrůd mezirodových hybridů *Festulolium* využívaných v pícninářství či trávníkářství (Kopecký *et al.*, 2008).

Na rozdíl od valné většiny mezidruhových kříženců se v křížencích *Festulolium* chromozomy pocházející z kostřav párují se svými partnery původem z jílky. To umožňuje homeologní rekombinace a výsledkem je značná variabilita v potomstvu. U odrůd *Festulolium* bylo zjištěno nerovnoměrné zastoupení rodičovských genomů, kdy převládá jílkový genom nad kostřavovým. Otazník tak zůstává nad stabilitou hybridního genomu v následujících generacích komerčních odrůd. Proto je tato diplomová práce zaměřená na studium genomového složení a jeho stabilitu v další generaci u vybraných introgresních odrůd *Festulolium*. Získané poznatky mohou být velice důležité při šlechtění a registraci nových odrůd.

## **2 Cíle práce**

1. Vypracování literární rešerše.
2. Cytogenetická charakterizace vybraných kříženců x*Festulolium* se zaměřením na introgresní odrůdy.
3. Studium stability genomového složení v další generaci vybraných kříženců.
4. Zhodnocení experimentálních dat a vypracování experimentální části diplomové práce.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Čeleď lipnicovité (*Poaceae*)

Čeleď lipnicovité je jedna z hospodářsky nejdůležitějších čeledí rostlin zahrnující obiloviny, jednoděložné trávy, ale i další užitkové rostliny (např. bambus nebo cukrovou třtinu). Lipnicovité jsou rozsáhlou čeledí dále členěnou na 12 podčeledí. Celkem je známo přibližně 770 rodů s více než 12 000 druhy (Soreng *et al.*, 2015). Do podčeledi *Pooideae* Bentham (1861), největší podčeledi lipnicovitých, patří kromě významných obilovin, jako je pšenice, ječmen či žito (Seberg *et Petersen*, 2007), také rody pícních a travníkových trav, např. rod jílek (*Lolium* L.) či kostřava (*Festuca* L., Clayton *et Renvoize*, 1986; Tzvelev, 1982).

V současnosti se ukazuje, že zvyšování výnosů hospodářsky významných rostlin klasickým šlechtěním není dostatečné při zvyšujícím se počtu světové populace. Zdá se, že jedinou cestou, která by zabezpečila potravinovou bezpečnost lidstva, představuje využití biotechnologií v moderním šlechtění. K tomu je však nezbytná znalost struktury, organizace a funkce genomů těchto plodin. Genomové analýzy jsou ale značně ztíženy častým polyploidním charakterem (např. hexaploidní pšenice setá či hexaploidní kostřava rákosovitá), velikostí genomu a vysokým zastoupením repetitivních sekvencí.

#### 3.1.1 Struktura genomu

Velikost genomu je v rámci rostlinné říše velice různorodá, pohybuje se v rozmezí od 63 Mb do 149 Gb. Počet a velikost (sekvenční délka) genů jsou u jednotlivých druhů přibližně stejné, rozdíl způsobují nekódující sekvence, především repetice (opakující se sekvence). Prvním typem repetitivních sekvencí jsou tandemové repetice (mikrosatelity, minisatelity a satelitní DNA) tvořící telomery, centromery nebo ribozomální DNA. Druhým typem jsou transponovatelné elementy (retrotranspozóny, DNA transpozóny) mající schopnost se v rámci genomu přemísťovat (Heslop-Harrison *et Schwarzacher*, 2011).

Přes velikost a komplexitu rostlinných genomů významných kulturních druhů čeledi *Poaceae* se díky rozvoji metod celogenomového sekvenování umožnilo získat úplné sekvence genomů některých druhů. V dnešní době jsou dostupné celogenomové sekvence rýže seté (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), kukuřice seté (Schnable *et al.*, 2009), čiroku dvoubarevného (Paterson *et al.*, 2009), ječmene setého (International Barley Genome Sequencing Consortium, 2017) či pšenice seté (International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2018). V rámci

pícních a trávnickových trav byl osekvenován genom jílku vytrvalého (Byrne *et al.*, 2015) či chromozom 4F kostřavy luční (Kopecký *et al.*, 2013).

### 3.1.2 Travní rody

Jednoděložné trávy představují významnou složku luk a pastvin, sloužící převážně jako vysoce kvalitní krmivo pro hospodářská zvířata (Regal *et Šindelářová*, 1970; Wang *et Ge*, 2006). Odhaduje se, že louky a pastviny představují dvakrát větší plochu než orná půda (Jauhar, 1993) a v České republice je to skoro 40 % zemědělských ploch (Černocho *et al.*, 2003). Jsou rovněž součástí trávnicků a uplatňují se např. při zakládání fotbalových a golfových hřišť, zatravnění letištních či jiných užitkových prostor. Zabraňují sesuvům či erozi půdy a hrají tak zásadní roli v ochraně životního prostředí. Taktéž jsou vysévány v parcích a zahradách za okrasným účelem (Kopecký *et Studer*, 2014).

Mezi naše nejvýznamnější travní rody patří jílky (*Lolium L.*) a kostřavy (*Festuca L.*). S menším zastoupením se vyskytují rovněž lipnice luční (*Poa pratensis L.*), bojínek luční (*Phleum pratense L.*) a srha laločnatá (*Dactylis glomerata L.*; Kopecký *et Studer*, 2014). Rod *Lolium L.* zahrnuje pouze devět čistě diploidních druhů (Byrne, 2015), přičemž zde najdeme samosprašné i cizosprašné druhy, které jsou buď vytrvalé, nebo jedno- či dvouleté. Rod *Festuca L.* je jedním z nejpočetnějších rodů čeledi *Poaceae*, v současnosti je uváděno přibližně 600 druhů a je pro ně charakteristický častý výskyt polyploidie (Catalán *et al.*, 2004).

Fylogenetickými analýzami byla zjištěná blízká příbuznost rodu *Lolium* s podrodem *Schedonorus* širokolistých kostřav (Torrecilla *et Catalán*, 2002), přičemž jílky se zřejmě vyvinuly z předchůdce kostřavy luční v Mediteránu v době před cca 2,1 milióny let (Inda *et al.*, 2008). V tab. 1 jsou uvedeny významné druhy rodů kostřav a jílků, jejich ploidie a počet chromozomů.



**Tab. 1:** Přehled významných druhů kostřav podrodu *Schedonorus* a jílků, jejich ploidy a počet chromozomů

	Počet chromozomů
<b>Rod kostřava (<i>Festuca</i> L.)</b>	
Kostřava luční ( <i>Festuca pratensis</i> Huds.)	$2n = 2x = 14$
Kostřava luční italská ( <i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i> )	$2n = 4x = 28$
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>glaucescens</i> Boiss.	$2n = 4x = 28$
Kostřava rákosovitá ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	$2n = 6x = 42$
<b>Rod jílek (<i>Lolium</i> L.)</b>	
Jílek vytrvalý ( <i>Lolium perenne</i> L.)	$2n = 2x = 14$
Jílek mnohokvětý ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.)	$2n = 2x = 14$

(Humphreys *et al.*, 2010; Rognli *et al.*, 2010)

### 3.1.3 Rod kostřava (*Festuca* L.)

Rod *Festuca* L. je se šesti sty druhy velice početný a široce rozšířený rod vyskytující se v mírném podnebném pásu především severní polokoule (Jenkin, 1959). Uplatňuje se při zakládání trvalých travních porostů, jako jsou pastviny a louky (Regal *et* Šindelářová, 1970).

Taxonomická klasifikace rodu *Festuca* L. je dosti složitá a existuje několik členění. Dle Hackela (1882) je rod kostřav členěn do 6 sekcí: *Ovinae*, *Bovinae*, *Sub-bulbosae*, *Variae*, *Scariosae* a *Monatanae* a podle Clayton *et* Renvoize (1986) na 9 podrodů: *Hesperochloa*, *Xanthochloa*, *Drymanthele*, *Schedonorus*, *Subulatae*, *Subuliflorae*, *Obtusae*, *Festuca* a *Helleria*. Na základě molekulárních analýz sekvencí ribozomálního mezerníkového regionu ITS (Internal Transcribed Spacer) byl rod *Festuca* L. rozdělen do dvou základních skupin: širokolisté (subg. *Schedonorus*) a úzkolisté (subg. *Festuca*) kostřavy (Charmet *et al.*, 1997; Torrecilla *et* Catalán, 2002). Do skupiny širokolistých kostřav jsou řazeny dva hospodářsky významné druhy: kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) a kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.). Druhá skupina je reprezentována ekonomicky významnými komplexy kostřavy ovčí (*Festuca ovina*) a kostřavy červené (*Festuca rubra*).

V následujících podkapitolách budou popsáni vybraní zástupci rodu *Festuca* L.

### 3.1.3.1 Kostřava luční

Kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) patří mezi nejhodnotnější pícní traviny (Regal *et* Šindelářová, 1970), ceněné pro relativně vysokou kvalitu dobře stravitelné píce. Díky tomu se využívá převážně jako krmivo pro hospodářská zvířata, ale rovněž je vhodná na uskladnění v podobě sena či siláže (Kölliker *et al.*, 1998). Je součástí alpských pastvin, a kromě Evropy se hojně vyskytuje v západní Asii, Severní Americe, Japonsku, Austrálii a na Novém Zélandu (Rognli *et al.*, 2010). Její přizpůsobivost k různým přírodním podmínkám, odolnost vůči sešlapu, chladnému podnebí a mrazu jí umožňují růst i ve Skandinávských zemích (Jauhar, 1993; Regal *et* Šindelářová, 1970). Většinou bývá vysazována společně s dalšími druhy trav, méně často jsou zakládány monokultury (Rognli *et al.*, 2010). Její nevýhodou je poměrně malá kompetitivnost ve směsích a nižší výtěžek semene v porovnání s druhy jílků.

Kostřava luční italská (*F. pratensis* subsp. *apennina* (De Not.) Hegi), je pravděpodobně alotetraploidní ( $2n = 4x = 28$ ) poddruh kostřavy luční, vzniklý zřejmě hybridizací diploidní kostřavy luční s dosud neznámým (zřejmě vyhynulým) druhem (Kopecký *et al.*, 2016; Lewis, 1977). Roste v oblastech s nadmořskou výškou 1100–2200 m. n. m. především v oblastech Alp, Karpat a Apenin. Upřednostňuje vlhká místa s půdou bohatou na živiny, čímž se liší od kostřavy luční, která je přizpůsobena širším ekologickým podmínkám (Borrill *et al.*, 1976; Kopecký *et al.*, 2016; Lewis, 1977). Má také jiné nároky na teplotní podmínky nezbytné ke klíčení semen. Semena kostřavy luční italské vyžadují pro klíčení chladovou periodu, kdežto semena kostřavy luční klíčí bez chladového působení (Linnington *et al.*, 1979).

### 3.1.3.2 Kostřava rákosovitá

Široce rozšířená kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.) je oproti kostřavě luční statnějšího vzrůstu, často tvoří mohutné a husté trsy s drsnějšími listy. Díky svému hlubokému kořenovému systému je vysoce odolná vůči suchu. Cennou vlastností je její rychlý vývin, vysoký výtěžkový potenciál, nicméně drsná a tvrdá píce je obtížně stravitelná (Regal *et* Šindelářová, 1970). Představuje nedílnou složku trávníků, zemědělských ploch a pastvin v mírném podnebném pásu. Je také přizpůsobivá k chladnějšímu klimatu a roste i v zemích severní Evropy a v oblasti Alp (Yamada, 2011).

Existují tři ekotypy kostřavy rákosovité: kontinentální, středomořský a rhizomatický, které jsou morfologicky a fyziologicky odlišné a adaptované na jiné přírodní podmínky. Kontinentální ekotyp je rozšířený prakticky v celé kontinentální Eurasii, kdežto mediteránní

ekotyp se vyskytuje v oblastech okolo Středozevního moře včetně severní Afriky a oblasti středního východu. Tento ekotyp se adaptoval na vysoké teploty během letních měsíců letní dormancí, která u zbývajících dvou ekotypů nebyla pozorována. Rhizomatický ekotyp je dle fylogenetických analýz blízce příbuzný kontinentálnímu (Hand et al., 2010). Po tento ekotyp jsou charakteristické dlouhé rhizomy a je součástí flóry severního Portugalska a Španělska (Reed et al.; 2004; Robson, 1967). Kontinentální ekotyp byl z Evropy introdukovaný do Severní Ameriky a Austrálie, kde se stal velice oblíbeným pícním a trávnickým druhem (Rognli et al., 2010).

### 3.1.3.3 Komplex kostřavy ovčí a kostřavy červené

Tyto druhy jsou řazeny do skupiny úzkolistých kostřav (subg. *Festuca*) a jak už název skupiny napovídá, vyznačují se drobnými a úzkými listy, které minimalizují ztrátu vody způsobenou transpirací. Tyto nenáročné rostliny jsou suchomilné, přizpůsobené k růstu v málo úrodných půdách s nízkým pH. Snáší i stinná a chladná místa Evropy, Asie a Severní Ameriky. Své uplatnění tyto druhy našly zejména jako krmiva pro hospodářská zvířata (kostřava ovčí) a jsou součástí okrasných a parkových trávníků (kostřava červená; Rognli et al., 2010).

### 3.1.3.4 Genom kostřav

Jak již bylo zmíněno, u zástupců rodu kostřava je velmi častá polyploidie. V rámci celého rodu se ploidie pohybuje od diploidie po dodekaploidii (Loureiro et al., 2007). Podruh *Schedonorus* zahrnuje druhy diploidní (kostřava luční), tetraploidní (*F. arundinacea* subg. *glaucescens* či *F. mairei*), hexaploidní (kostřava rákosovitá či *F. gigantea*), oktoploidní (*F. arundinacea* subsp. *atlantigena*) a dekaploidní (*F. arundinacea* var. *letourneuxiana* St. Yves; Hand et al., 2010). Je nutno zmínit, že všechny dosud studované druhy mají základní chromozomové číslo 7.

Diploidní kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) má 7 párů chromozomů ( $2n = 2x = 14$ ) z nichž 3 páry jsou metacentrické a 4 páry submetacentrické. U chromozomu 3F je patrná sekundární konstrikce. Největší je chromozom 4F a nejmenší je chromozom 1F (Kopecký et al., 2010). Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena velikost monoploidního genomu na  $1Cx = 3\ 175$  Mb, to odpovídá 3,25 pg DNA (Kopecký et al., 2010). Alm et al. (2003) pomocí molekulárních (RFLP, AFLP, izoenzymů a SSR) markerů zkonstruovali

genetickou mapu kostřavy luční. Tato genetická mapa s 466 markery byla později doplněná o 149 DArT markerů (Bartoš *et al.*, 2011). Pro kostřavu luční byla také vytvořena BAC (Bacterial artificial chromosome) knihovna představující 5 ekvivalentů genomu (Donnison *et al.*, 2005) a je známá sekvence transkriptomu (Stočes *et al.*, 2016). Celogenomová sekvence tohoto druhu dosud není dostupná, osekvenovaný byl ale chromozom 4F. Tento chromozom je kolineární s chromozomem 4H ječmene, ale rovněž s částí dlouhého ramene chromozomu 5H (Kopecký *et al.*, 2013). Karyotyp tohoto druhu byl poprvé popsán v práci Malik *et Thomas* (1966). Pomocí sond připravených z BAC klonů, tandemových repetic a DNA klonů použitých pro fluorescenční *in situ* hybridizaci je možno jednoznačně odlišit jednotlivé chromozomy (Kopecký *et al.*, 2008; Křivánková *et al.*, 2017; Majka *et al.*, 2017).

Kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.) je alohexaploid ( $2n = 6x = 42$ ) se složením genomu PPG<sub>1</sub>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>G<sub>2</sub>, který vznikl mezidruhovým křížením tetraploidní *Festuca arundinacea* subsp. *glaucescens* Boiss ( $2n = 4x = 28$ , G<sub>1</sub>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>G<sub>2</sub>) s diploidní *Festuca pratensis* Huds. ( $2n = 2x = 14$ , PP) (Humphreys *et al.*, 1995). Velikost monoploidního genomu zjištěná pomocí průtokové cytometrie je  $1Cx = 2\ 845$  Mb, to odpovídá 2,91 pg DNA (Kopecký *et al.*, 2010). První genetickou mapu kostřavy rákosovité zkonstruovali Xu *et al.* (1995) s využitím AFLP markerů. AFLP markery společně s EST-SSRs (Expressed sequence tag-simple sequence repeats) markery použili i Saha *et al.* (2004). Tato genetická mapa byla dále zpřesněna pomocí DArT markerů (Dierking *et al.*, 2015).

### 3.1.4 Rod jílek (*Lolium* L.)

Mezi zemědělsky významné druhy rodu *Lolium* L. se řadí pícniny jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) a jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.). Tyto příbuzné druhy jsou rozšířené prakticky v celé Evropě vyjma severských oblastí a dále v severovýchodní Africe a Asii. Prvními osadníky byly také rozšířeny do Ameriky, Austrálie a na Nový Zéland (Humphreys *et al.*, 2010). Díky vysokému výnosu a kvalitní píce jsou hojně využívány ke krmným účelům. Rovněž se uplatňují při zakládání trvalých travnatých ploch a sportovních hřišť (Regal *et Šindelářová*, 1970). Vysazovány jsou jak v monokulturách, tak v travních směsích (Fojtík, 1994). V Evropě zabírají jílky téměř 23 % z 52 milionu hektarů travnatých ploch a jílek vytrvalý je abundantně zastoupeným druhem (Frame, 1991). Jílky se obecně vyznačují vysokým výnosem a nutričními charakteristikami. Na druhou stranu jsou poměrně málo odolné vůči biotickým a abiotickým stresům (Humphreys *et al.*, 2010).

Mezi další zástupce toho rodu patří jílek tuhý (*Lolium rigidum* Gaud.), významná pícnina pěstovaná převážně v Austrálii, jílek oddálený (*Lolium remotum* Shrank) či jílek mámivý (*Lolium temulentum* L.; Cai *et al.*, 2011). V následujících podkapitolách budou popsáni vybraní zástupci rodu *Lolium* L.

#### 3.1.4.1 Jílek mnohokvětý

Jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam. subsp. *italicum*) je jednoletá nebo dvouletá rostlina, která díky vysokému výnosu semene a zelené hmoty patří mezi nejvýznamnější pícní druhy. Píce je ceněná díky dobré stravitelnosti a vysokému nutričnímu obsahu. Jílek mnohokvětý se vyznačuje rychlým vývinem na jaře a nejvyšší výnos dává již v prvním roce zásevu. Na seno, siláž či hnojivo je pěstován pouze 1–2 roky. Má vyšší výnosové vlastnosti, ale nižší odolnost vůči abiotickým stresům než kostřavy i příbuzný druh jílek vytrvalý. Z důvodu mělkého kořenového systému je citlivý zejména na sucho a mrazivé podmínky (Humphreys *et al.*, 2010; Regal *et Šindelářová*, 1970).

Jednoletý poddruh jílku mnohokvětého se nazývá jílek westerwoldský (*Lolium multiflorum* Lam. subsp. *westerwoldicum*), který je vysoce stravitelný a chutný. Po jarním zasetí je v létě i v zimě využíván v podobě siláže. Častěji je ale zaséván již na podzim nebo během zimy, a tudíž lze poprvé sklízet už na jaře. Ve stejném roce sklizně hyne a tím se liší od jílku mnohokvětého, který přežívá i druhou zimu. Je významnou pícninou v Severní a Jižní Americe, jižní Austrálii, na Novém Zélandu, některých státech Asie a středozemní oblasti Evropy (Humphreys *et al.*, 2010).

#### 3.1.4.2 Jílek vytrvalý

Jednou z nejrozšířenějších trav tohoto rodu je jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.), který je součástí pastvin, luk či dočasných travních porostů. Tato vytrvalá travina je odolná vůči sešlapu a hojně využívána při zakládání okrasných travních ploch. Po zasetí se vyvíjí velmi rychle a je pro něj charakteristický vysoký výnos. Využíván je na siláž nebo je skladován ve formě sena. Bohužel, stejně jako jílek mnohokvětý je málo odolný vůči abiotickému (např. nízká teplota, sucho, znečištěná půda, vysoká koncentrace soli, hliníku, těžkých kovů aj.) a biotickému (škůdci a choroby) stresu (Humphreys *et al.*, 2010).

### 3.1.4.3 Genom jílků

Zástupci rodu *Lolium* L. jsou diploidní se sedmi páry chromozomů ( $2n = 2x = 14$ ). Diploidní jílek mnohokvětý má 3 páry metacentrických a 4 páry submetacentrických chromozomů. Chromozomy 2, 3 a 7 mají sekundární konstrikci (Kopecký *et al.*, 2010). Z jílků lze snadno polyploidizací vytvořit autotetraploidní rostliny s dvojnásobným počtem chromozomů ( $2n = 4x = 28$ ), které se často využívají ve šlechtění pícních odrůd (Pašakinskiene, 2000). Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena velikost genomu diploidních druhů *L. multiflorum* na 2567 Mb, tj. 2,62 pg DNA a *L. perenne* na 2623 Mb, tj. 2,68 pg DNA (Kopecký *et al.*, 2010).

Pro oba rody byly zkonstruovány genetické mapy. Inoue *et al.* (2004) sestavili genetickou mapu jílku mnohokvětého pomocí genetických markerů (RFLP, AFLP a TAS – Telomeric repeat associated sequences). SSR markery využili Jones *et al.* (2002) ke zkonstruování genetické mapy jílku vytrvalého. Pomocí DArT markerů byla sestavena genetická mapa jílku mnohokvětého obsahující 530 markerů (Bartoš *et al.*, 2011).

Velkým přínosem ke studiu funkce genů, regulací a identifikaci vhodných genetických markerů pro šlechtění rostlin bylo vytvoření BAC knihoven. Farrar *et al.* (2007) vytvořili dvě BAC knihovny jílku vytrvalého s 10x pokrytím genomu obsahující 98 304 a 101 376 BAC klonů. V roce 2014 byl *de novo* sekvenován traskriptom jílku vytrvalého (Farrell *et al.*, 2014), a získaná data byla následně využita při sekvenování genomu pomocí technik sekvenování nové generace (NGS, Next generation sequencing) Illumina HiSeq 2000 (Byrne *et al.*, 2015). Tak se stal jílek vytrvalý prvním osekvenovaným druhem z komplexu *Festuca-Lolium*. Rovněž byl sekvenován genom chloroplastů a znalost sekvence může být nápomocná např. při fylogenetických analýzách (Diekmann *et al.*, 2009). Osekvenován byl rovněž transkriptom jílku mnohokvětého (Stočes *et al.*, 2016).

### 3.2 Polyploidie a vzdálená hybridizace

Polyploidie (někdy popisovaná jako celogenomová duplikace, Whole-genome duplication, WGD) znamená přítomnost více než dvou chromozomových sad v jednom jedinci. Polyploidie je častá zejména v rostlinné říši (Soltis *et* Soltis, 1993). Odhaduje se, že v průběhu evoluce tento jev nastal u více než 70 % krytosemenných rostlin (Masterson, 1994), nejvíce byl zaznamenán u kaprad'orostů (až 95 %; Grant, 1981), méně často se vyskytuje u živočichů.

Kihara *et* Ono (1926) rozlišili dva základní typy polyploidie: autopolyploidii a alopolyploidii. Při autopolyploidii dochází ke znásobení počtu základních chromozomových sad daného druhu v karyotypu (např. autotriploid  $2n = 3x$ , AAA). Příkladem autopolyploidní rostliny je významná píceňka vojtěška setá (*Medicago sativa*; Stanford, 1951) nebo autotetraploidní srha říznačka (*Dactylis glomerata*; Lumeret *et al.*, 1989). Alopolyploidní jedinci mají rovněž více než dvě chromozomové sady, ale ty pocházejí ze dvou různých druhů (např. alotetraploid  $2n = 4x$ , AABB). Vznikli totiž vzdálenou (mezidruhovou či dokonce mezirodovou) hybridizací spojenou s polyploidii. Polyploidní rostliny jsou obvykle výsledkem fúze dvou neredukovaných gamet, které mají diploidní počet chromozomů ( $2n$ ) či splynutím neredukované gamety ( $2n$ ) s gametou redukovanou ( $n$ ) (Chen, 2007; Ramsey *et* Schemske, 1998). V některých případech mezidruhové hybridizace však nebylo zaznamenáno zvýšení počtu chromozomových sad, jelikož hybrid (homoploid) vznikl fúzí gamet s haploidním počtem chromozomů. Tímto způsobem vznikl druh *Helianthus deserticola* (Gross *et* Rieseberg, 2004; Rieseberg *et* Willis, 2007). I když tento jev vedl ke vzniku i několika jiných druhů, není tak častým jevem jako autopolyploidie a hlavně alopolyploidie.

Alopolyploidie hraje důležitou roli v diverzifikaci a adaptaci rostlin (Thompson *et* Merg, 2008) a je jedním z hlavních evolučních mechanismů rostlinné speciace (zejména sympatrické speciace; Otto *et* Whitton, 2000). Podílela se na vzniku mnoha významných kulturních plodin (Renny-Byfield *et* Wendel, 2014). Typickou alopolyploidní rostlinou je hexaploidní pšenice setá (*Triticum aestivum*,  $2n = 6x = 42$ ), jejíž genom je složen ze tří subgenomů (AABBDD; Petersen *et al.*, 2006). Alotetraploidní jsou rovněž někteří zástupci rodu *Brassica* (*B. juncea*, *B. napus* či *B. carinata*), jež jsou výsledkem mezidruhové hybridizace diploidních rodičovských druhů (*B. nigra*, *B. rapa*, *B. oleracea*; Allender *et* King, 2010; Nagaharu, 1935).

Jak už bylo uvedeno výše, vznik alopolyploidních druhů mezidruhovou hybridizací byl zaznamenán i u některých druhů rodu kostřava. Hybridizací vznikla zřejmě kostřava luční italská (*F. pratensis* subsp. *apennina*; Lewis, 1977) vyskytující se převážně v horských

oblastech. Ve Švýcarských či Rumunských horách byli nalezeni triploidní hybridní vzniklí mezidruhovou hybridizací diploidní *F. pratensis* a tetraploidní *F. pratensis* subsp. *apennina*. Jsou známí i pentaploidní hybridní, vzniklí křížením *F. pratensis* subsp. *apennina* s hexaploidní *F. arundinacea* Schreb. (Kopecký *et al.*, 2016). Rovněž alohexaploidní kostřava rákosovitá (*F. arundinacea* Schreb.) vznikla hybridizací a její genom se skládá z genomu *F. arundinacea* subsp. *glaucescens* Boiss. a *F. pratensis* Huds. (Humphreys *et al.*, 1995). K mezidruhové hybridizaci dochází i v rámci rodu jílek. Snadné křížení probíhá mezi jílkem vytrvalým a jílkem mnohokvětým, jehož výsledkem je fertillní a odolný hybridní jílek *L. x boucheanum* Kunth (*L. x hybridum* Hausskn.) s vysokou výnosností (Humphreys *et al.*, 2010).

Znásobení počtu chromozomových sad způsobuje morfologické a fyziologické změny daných organismů. Má zásadní vliv na velikost buněk a jednotlivých částí rostliny, na průběh meiózy a buněčného cyklu, organizaci genomu a jeho stabilitu, genovou expresi či na fertilitu jedinců. Větší změny genové exprese jsou způsobeny alopolyploidií, což zřejmě poukazuje na významnější vliv hybridizace na expresi genů než samotné genomové duplikace (Chen, 2007). Po polyploidizaci dochází k rozsáhlé reorganizaci genomu, kdy se rostlina musí vyrovnat s dvojnásobným počtem genů a probíhá jejich eliminace, umlčování a další epigenetické změny. Proto je pro polyploidy obecně charakteristická vyšší genetická variabilita, umožňující růst v odlišných klimatických podmínkách a odolnost vůči vnějším podnětům ve srovnání s jejich diploidními předky. Polyploidní rostliny mají obecně větší květy, kvetou později a polyplodie má také vliv na produkci sekundárních metabolitů rostlin, které mohou být preferovány jinými druhy opylovačů (Dhawan *et Lavana*, 1996; Stebbins, 1971; Wendel, 2000).

Ukazuje se, že polyplodie je zřejmě daleko častějším jevem, než se dříve předpokládalo. Některé rostliny byly považovány za diploidní, nicméně pomocí moderních molekulárních metod bylo zjištěno, že v průběhu evoluce u nich proběhla jedna nebo více polyploidizačních událostí. Po polyploidizaci následoval proces diploidizace (návrat do diploidního stavu) a takovéto rostliny jsou označovány jako paleopolyploidní (Levy *et Feldman*, 2002). Typickými příklady jsou huseníček rolní a další druhy z čeledi brukvovitých (Lysák, 2018), rýže, sója či kukuřice (Schmutz, 2010; Wolfe, 2001).



### 3.2.1 Mezirodová a mezidruhov<sup>á</sup> hybridizace ve šlechtění

Jak už bylo řečeno, vzdálená (mezidruhov<sup>á</sup> či mezirodová) hybridizace probíhá v přírodě samovolně a vede ke vzniku nových druhů. Oba přístupy se staly cennými nástroji při šlechtění hospodářsky významných rostlin. Vzdálená hybridizace umožňuje zkombinovat agronomicky významné vlastnosti obou druhů v jednom jedinci, obohatit „genepool“ daného druhu nebo vnést jeden či několik znaků z jednoho druhu do druhého (Wilkins, 1991).

Už před více než 140 lety byl vyšlechtěn první kříženec pšenice a žita (*Triticum x Secale*) dnes známého jako tritikále (syn. *Triticale*, *xTriticosecale*). Tento hybrid má vyšší obsah bílkovin a je tolerantnější k horším pěstitelským podmínkám (Mergoum *et al.*, 2009; Wilson, 1875). Vedle obilovin se šlechtitelé zaměřili i na křížení trav, jakožto významných producentů kvalitní píče a komponentů okrasných i užitkových trávníků. Populárními se stali zejména hybridní jílky (kříženci jílku vytrvalého a jílku mnohokvětého) a kříženci kostřav a jílků, tzv. *Festulolium* (*Festuca x Lolium*; Kopecký *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Mezirodový hybrid *Festulolium* (*Festuca x Lolium*)

Bylo zjištěno, že ve volné přírodě dochází ke křížení kostřav a jílků. Z Velké Británie jsou známi kříženci jílku vytrvalého a kostřavy luční, kteří rostou oproti svým rodičovským druhům v podmáčených půdách (Humphreys *et Harper*, 2008). Tito kříženci jsou však sterilní (Thomas *et al.*, 2003). Evidence mezirodového křížení kostřav a jílků v přírodě však otevřela nové možnosti pro šlechtitelé pícních a trávníkových trav.

První kříženec kostřavy luční a jílku vytrvalého byl uměle vytvořený již v roce 1933 (Jenkin, 1933), ale až s vývojem biotechnologických a molekulárních metod se začalo rozvíjet i komerční šlechtění odrůd *Festulolium*. Na počátku 70. let v Institute of Grassland and Environmental Research (IGER) byly vyvinuty první odrůdy *Festulolium* – Prior a Elmet, zkřížením jílku vytrvalého s kostřavou luční a jílku mnohokvětého s kostřavou luční (Lewis *et al.*, 1973). Krátce poté byla v USA vyšlechtěna odrůda Kenhy, která se stala velmi populární mezi farmáři. Tato odrůda vznikla zkřížením diploidního jílku mnohokvětého s hexaploidní kostřavou rákosovitou a hybridi byli zpětně kříženi s kostřavou rákosovitou. Odrůda Kenhy je lépe stravitelná a odolná vůči suchu a její genom je tvořen převážně genetickou informací kostřavy (Buckner *et al.*, 1977). V České republice se křížením kostřav a jílků a šlechtěním nových odrůd mezirodových hybridů *Festulolium* věnoval Ing. Antonín Fojtík ze šlechtitelské stanice v Hladkých Životicích, který položil základní kámen k produkci velkého množství

nových a komerčně velmi úspěšných odrůd (Houdek *et* Černoch, 2007).

Odrůdy *Festulolium* kombinují odolnost vůči abiotickému a biotickému stresu, přizpůsobivost různým ekologickým podmínkám a vytrvalost kostřav a vysoké výnosové a nutriční charakteristiky jílků. Současně se šlechtitelé při tvorbě nových travníkových odrůd zaměřují na zlepšení příjmu dusíku a vsakování vody (Ghesquière *et al.*, 2010; Thomas *et* Humphreys, 1991). Vyšlechtěné odrůdy *Festulolium* jsou díky kvalitní píce používány ke krmným účelům a jsou vysazovány v monokulturách, v travních směsích či ve směsích s jetelem nebo vojtěškou (Fojtík, 1994). Podle rozšířené definice Evropské komise (2004/55/EC) mohou hybridy *Festulolium* vzniknout křížením různých druhů rodů kostřav a jílků, nehledě na ploidii rodičů a na záměrné zpětné křížení hybridů s jedním z rodičovského druhu (Ghesquière *et al.*, 2010).

Existují dvě strategie, jak lze odvozovat mezirodové hybridy *Festulolium* za kontrolovaných podmínek, a to introgresním křížením a pomocí amfiploidie. Obě zmíněné metody, budou popsány v následujících dvou podkapitolách.

### 3.2.3 Křížení pomocí amfiploidie

Prvním postupem, jak lze získat mezidruhovité hybridy *Festulolium* je pomocí amfiploidie (neboli alopolyploidie), při které dochází ke zkombinování celých rodičovských genomů. Po zkřížení dvou druhů jsou získaní F<sub>1</sub> hybridy dále sprášené. Křížení diploidních rodičovských druhů vede ke vzniku sterilních hybridů a fertilita může být zajištěna znásobením počtu chromozomových sad (polyploidizací, Thomas *et al.*, 2003). Pro tyto účely se většinou používá alkaloid kolchicin, který depolymerizuje mikrotubuly dělicího vřetenka a tím narušuje správný rozchod chromozomů do buněk během buněčného dělení (Morgan, 1976; Shahinul Islam, 2010). Fertilní hybridy jsou získáni i křížením autotetraploidních forem rodičovských druhů (Zwierzykowski *et* Rybczyjski, 1981).

Křížením jílku mnohokvětého s kostřavou luční bylo vyšlechtěno velké množství komerčně dostupných amfiploidních odrůd např. Achilles, Perun, Hostýn a Perseus v České republice (Fojtík, 1994), Felopa, Sulino, Agula a Rakopan v Polsku (Zwierzykowski *et al.*, 1998, 2004), Elmet ve Walesu (Lewis *et al.*, 1973), Lueur a Lusillium ve Francii (Ghesquière *et al.*, 1996), Punia v Lotyšsku, Paulita v Německu a Spring Green v USA (shrnuto v Kopecký *et al.*, 2008). Syntetická odrůda Spring Green byla vyšlechtěna křížením a přemnožením čtyř komerčních odrůd Kemal, Tandem, Elmet a Prior (Casler *et al.*, 2001). Tetraploidní odrůda

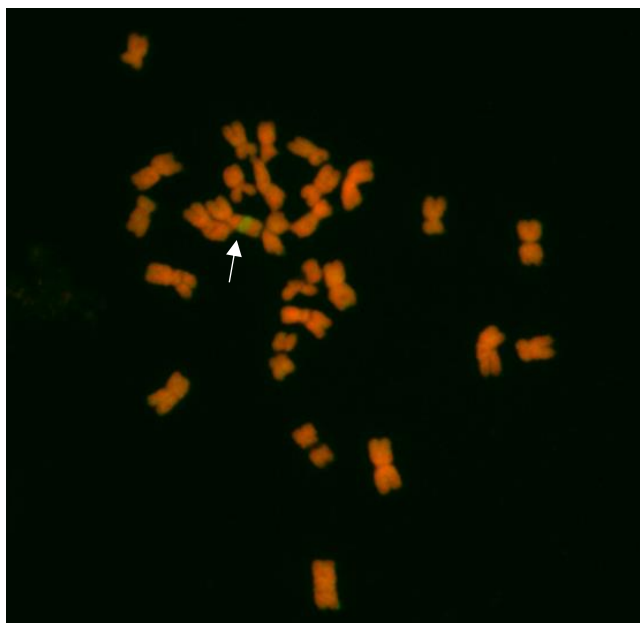
Prior vznikla křížením jílku vytrvalého s kostřavou luční (Lewis *et al.*, 1973).

### 3.2.4 Introgresní křížení

Druhou metodou, jak lze vytvořit mezidruhové hybridy, je introgresní křížení. Při tomto typu šlechtění se většinou používají rostliny dvou druhů s nestejnou ploidií. Získaný  $F_1$  hybrid je poté jednou či vícekrát zpětně křížen s jedním z rodičovských druhů. Genom hybridů vzniklý introgresním křížením je charakteristický nerovnoměrným zastoupením rodičovských genomů, kdy dochází ke značné převaze genomu jednoho druhu a jen malá část genomu pochází od druhého rodiče. V následujících generacích může dojít až k úplné eliminaci těchto introgresí. Úspěšná introgrese chromozomových segmentů je zajištěna párováním homeologních chromozomů kostřav a jílků a rekombinacemi mezi nimi (Ghesquière *et al.*, 2010).

Introgresní křížení využíval k tvorbě nových odrůd Ing. Antonín Fojtík ve šlechtitelské stanici v Hladkých Životících. Jeho zásluhou byly vyšlechtěny tetraploidní odrůdy Lofa a Bečva, které vznikly křížením diploidního jílku mnohokvětého ( $2n = 2x = 14$ ; LmLm) s hexaploidní kostřavou rákosovitou ( $2n = 6x = 42$ ; FpFpFgFgFg'Fg') a následným zpětným křížením tetraploidních  $F_1$  hybridů ( $2n = 4x = 28$ ; LmFpFgFg') s tetraploidním jílkem mnohokvětým ( $2n = 4x = 28$ ; LmLmLmLm). V genomech těchto dvou odrůd značně převažuje genom jílku mnohokvětého a pouze malý podíl pochází od kostřavy rákosovité (viz obr. 1). Lofa a Bečva jsou používány zejména na siláž, ale také na dočasných loukách a pastvinách nejčastěji ve směsi s jinými travními druhy. Byla u nich pozorována vyšší vytrvalost, vysoký výnos nutričně bohaté a dobře stravitelné píče než u obou rodičovských druhů (Fojtík, 1994, 1998).

Zpětným křížením tetraploidních  $F_1$  hybridů s hexaploidní kostřavou rákosovitou byly ve Spojených státech amerických vyšlechtěny odrůdy Kenhy a Johnstone (Buckner *et al.*, 1977, 1983) a v České republice hexaploidní odrůdy Korina, Lesana, Hykor, Felina a Fojtan (Fojtík, 1994, 1998). Velký podíl genomu těchto odrůd pochází od kostřavy rákosovité, které jsou i morfologicky podobné (Kopecký *et al.*, 2006). Tyto odrůdy mají vysoký výnos, a kromě hospodářského významu a skladování ve formě sena se uplatňují i při zakládání trávníků. Introgresním křížením byly vyšlechtěny i další odrůdy např. Duo, Matrix, Barfest, Evergreen, Kemal, Tandem či Puga (Ghesquière *et al.*, 2010).



**Obr. 1:** Cytogenetická analýza jedné rostliny *Festulolium* odrůdy Lofa (Foto: L. Horáková)

Roztlak metafázních chromozomů byl analyzován po genomové *in situ* hybridizaci, kde jako sonda byla použita genomová DNA kostřavy luční značená digoxigeninem (zelená barva) a jako blokovácí DNA byla použita celogenomová DNA z jílku mnohokvětého. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI (červená pseudobarva).

Zatímco jílky strádají v klimaticky nepříznivých podmínkách, kostřavy jsou známé svojí odolností vůči abiotickému a biotickému stresu. Kostřava luční je odolná k mrazu a kostřava rákosovitá nese geny zajišťující odolnost vůči suchu (Jauhar, 1993). Introgresním křížením tak lze obohatit genom jílku určitými geny pocházejících z kostřav. Kosmala *et al.* (2006) použili introgresní křížení k přenosu částí chromozomů nesoucí geny zajišťující lepší odolnost vůči mrazu z kostřavy luční do genomu jílku mnohokvětého. Po křížení diploidní kostřavy ( $2n = 2x = 14$ ) a tetraploidního jílku ( $2n = 4x = 28$ ) byli triploidní  $F_1$  hybridi zpětně kříženi s diploidním jílkem. Pomocí genomové a fluorescenční *in situ* hybridizace bylo prokázáno, že vybrané kostřavové geny ležící na chromozomech 2F a 4F kostřavy byly přeneseny do *L. multiflorum*. Stejně tak byly geny zodpovědné za odolnost k suchu z kostřavy rákosovité vneseny do genomu jílku mnohokvětého (Humphreys *et Thomas*, 1993; Humphreys *et Pašakinskiene*, 1996). Kromě genů podmiňujících výše zmíněné znaky byly, do genomů jílku přeneseny jiné geny, např. gen pro opožděnou senescenci (Thomas *et al.*, 1994, 1997) či geny pro rezistenci ke rzi korunkaté (*Puccinia coronata*, Roderick *et al.*, 2003).

### 3.3 Genomové složení a stabilita hybridního genomu

Pro šlechtitele je samozřejmě důležitá znalost genomového složení jednotlivých odrůd *Festulolium* a stejně tak i informace o jejich stabilitě v následujících generacích. Jak už bylo výše uvedeno, vyšlechtěné odrůdy mezirodových hybridů *Festulolium* jsou alopolyploidní a v jejich genomech jsou přítomny sady chromozomů pocházející od obou rodičovských druhů, tedy sady homologních a homeologních chromozomů. Obecně vzato vede nedostatečná podobnost sekvencí DNA či přítomnost regulačního mechanismu u alopolyploidů ke striktnímu párování homologních chromozomů a tvorbě bivalentů v meióze (Gillies, 1989). Jedním z nejznámějších regulačních mechanismů je *Ph1* (Pairing homoeologous) lokus u hexaploidní a tetraploidní pšenice (Riley *et al.*, 1958; Sears *et al.*, 1958), nacházející se na dlouhém raménku chromozomu 5B (Griffith *et al.*, 2006). Dalším důležitým genem je *Ph2* na krátkém raménku chromozomu 3D (Mello-Sampayo, 1971). U alotetraploidní brukve řepky (*Brassica napus*) je striktní párování homologních chromozomů v meióze pod kontrolou *PrBn* genu (Pairing regulator in *Brassica napus*; Jenczewski *et al.*, 2003). Podobný genetický kontrolní mechanismus se nachází i u hexaploidního ovsa setého (*Avena sativa*; Thomas *et al.*, 1967).

Přestože drtivá většina alopolyploidních druhů vykazuje striktní párování homologních chromozomů, existují i příklady kříženců s homeologním párováním. Bylo zjištěno, že u kříženců cibulí *Allium cepa* x *Allium roylei* a *Allium cepa* x *Allium fistulosum* dochází k párování homeologních chromozomů (Khrustaleva *et al.*, 1998; Khrustaleva *et al.*, 2019). Toho bylo využito k introgresi chromozomového segmentu *A. roylei* nesoucí rezistenci k plísni cibulové (*Peronospora destructor*) do odrůd cibule seté (*A. cepa*). Podobné je to i u komplexu *Festuca-Lolium*, kde bylo zjištěno, že chromozomy jílku se s chromozomy kostřavy spolu párují a rekombinují (Jauhar, 1975; Kopecký *et al.*, 2009b, 2010; Zwierzykowski *et al.*, 1998, 1999). To je způsobeno nepřítomností regulačního mechanismu jako je *Ph1* u rodičovských přirozeně diploidních druhů kostřavy luční a obou jílků. U některých polyploidních kostřav, např. u hojně rozšířené kostřavy rákosovité, *F. arundinacea* subsp. *glaucescens*, *F. pratensis* subsp. *apennina* či *F. mairei*, byl objeven genetický kontrolní systém, který zabraňuje párování homeologních chromozomů. I přesto u kříženců jílků s těmito kostřavami dochází k párování homeologních chromozomů (Clarke *et al.*, 1976; Jauhar, 1975; Kopecký *et al.*, 2009b). To je způsobeno tím, že regulační systém kostřav je na rozdíl od *Ph1* nefunkční v haploidní či hemizogotní konstituci (Jauhar, 1975).

Párování homeologních chromozomů a časná rekombinace mezi chromozomy kostřav

a jílků spolu s cizosprašným způsobem rozmnožování má za následek vznik vysoce variabilního potomstva. V rámci jedné odrůdy je tak každá rostlina geneticky jedinečná a u rostlin se může lišit zastoupení rodičovských genomů. To může způsobovat genetickou nestabilitu odrůd a rovněž otevírat prostor ke genomové dominanci jednoho rodiče (Jauhar, 1975; Thomas *et al.*, 1991; Zwierzykowski *et al.*, 2008). Pomocí genomové *in situ* hybridizace (GISH) bylo zjištěno, že všechny dosud zkoumané amfiploidní odrůdy *Festulolium* vykazovaly vyšší počet chromozomů původem z jílku oproti chromozomům z kostřavy (Kopecký *et al.*, 2005, 2006; Zwierzykowski *et al.*, 1998). Vychází tak otázka, zda se proporce rodičovských genomů v následujících generacích kříženců stabilizuje nebo může dojít k úplné eliminaci kostřavového genomu. Zwierzykowski *et al.* (2006, 2011, 2012) studovali stabilitu genomového složení u šesti generací tetraploidních hybridů *F. pratensis* x *L. perenne* ( $2n = 4x = 28$ ). V genomech těchto hybridů pozorovali změnu v poměru rodičovských genomů ve prospěch jílkového z 14L + 14F (kde L značí počet chromozomů původem z jílku a F počet chromozomů původem z kostřavy) v F<sub>1</sub> generaci, přes 14,4L + 13,6F v F<sub>2</sub> až na 16,3L + 11,6 F v F<sub>6</sub> generaci. Mechanismus tohoto úkazu je dosud neznámý. Z praktického hlediska to však představuje závažný problém. Jak stabilní jsou komerčně využívané odrůdy *Festulolium*? Stabilitou genomového složení u třech generací amfiploidních odrůd (Hostýn, Perun a Perseus) se zabývali Kopecký *et al.* (2017) a zjistili, že poměr rodičovských genomů hybridů se více lišil mezi rostlinami jedné odrůdy než mezi odrůdami a v genomu všech analyzovaných odrůd převažoval jílkový genom nad kostřavovým. Nicméně poměr byl v následujících generacích relativně stabilizován a nedocházelo k dalšímu výraznému nahrazování kostřavového genomu jílkovým. Bylo zjištěno, že při poměru cca 2:1 jílkového ku kostřavovému genomu dochází ke genetické stabilizaci hybridů. Stabilita genomového složení introgresních odrůd *Festulolium* dosud studována nebyla.

Z toho důvodu bylo v rámci této diplomové práce charakterizováno genomové složení vybraných introgresních odrůd *Festulolium* a následně studována stabilita genomového složení v další generaci při různých přístupech výběru rostlin.

### 3.4 Metody používané k identifikaci hybridů

Cílem šlechtitelů je získat nové odrůdy s vyšším výnosem a odolných vůči abiotickému a biotickému stresu (suchu, mrazu, chorobám, škůdcům aj.), které se dokáží adaptovat na měnící se klimatické podmínky. Zpočátku byly rostliny nesoucí žádané vlastnosti vybírány pouze na základě rozdílného fenotypu (výška rostliny, velikost a tvar semen aj.). Tyto klasické metody šlechtění jsou značně zdlouhavé, vyžadují velké populace, nejsou příliš přesné a začínají se stávat pro moderní šlechtění nedostačující. Šlechtitelé se proto ve spolupráci s genetiky a molekulárními biology snaží vyvinout nové postupy, které by celý proces šlechtění zjednodušily, zefektivnily a hlavně urychlily. V současnosti se uplatňují zejména metody molekulární biologie a cytogenetiky. Vybrané metody budou popsány v následujících podkapitolách.

#### 3.4.1 Molekulární metody

Jednou z možností, jak lze identifikovat a charakterizovat hybridní rostliny, jsou molekulární metody za pomoci genetických markerů. Genetické markery mohou představovat fenotypový znak, protein, gen či známou sekvenci DNA a jsou děleny do tří skupin: fenotypové (morfologické), biochemické a molekulární (DNA) markery. První skupinou markerů jsou rostliny hodnoceny na základě fenotypu (např. velikost rostliny, semen, barva květů aj.). Mezi molekulárně-biochemické markery jsou řazeny izoenzymy (též izozymy), alelické varianty enzymů, katalyzující stejnou reakci, ale lišící se svou strukturou (Winter *et* Kahl, 1995). Tento typ markerů použili u trav Eizenga *et* Buckner (1986) k identifikaci mezirodových hybridů *Festulolium*. Značnou nevýhodou izoenzymů, stejně jako morfologických znaků, je jejich ovlivnění prostředím, ale také vývojovou fází rostliny. Navíc existuje pouze omezený počet takovýchto markerů (Winter *et* Kahl, 1995).

Izoenzymy byly vystřídány univerzálnějšími, variabilnějšími a spolehlivějšími molekulárními DNA markery, které poskytují informace o variabilitě organismů na úrovni molekuly DNA. DNA markery lze rozdělit do tří skupin:

- (1) založené na hybridizaci – např. RFLP markery (délkový polymorfismus restričních fragmentů, Restriction Fragment Length Polymorphism) a DArT markery (Diversity Arrays Technology),
- (2) založené na PCR reakci – např. AFLP markery (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů, Amplified Fragment Length Polymorphism) nebo SSR

markery (jednoduché opakující se sekvence, Simple Sequence Repeat),

(3) založené na sekvenování – např. SNP markery (jednonukleotidové polymorfismy, Single Nucleotide Polymorphism).

Široké spektrum molekulárních markerů se v současnosti používá k celé řadě aplikací: ke studiu genetické variability, k tvorbě genetických map, k identifikaci a charakterizaci hybridních rostlin či ke šlechtění pomocí markerů (MAS, Marker Assisted Selection). Využití SSR markerů pro identifikaci mezirodových kříženců a k charakterizaci jednotlivých odrůd jílků a košťav předvedli Pašakinskiene *et al.* (2000) a Momotaz *et al.* (2004). Postupem času se při studiu genomu začaly uplatňovat vysokokapacitní markerové systémy jako je třeba Diversity Arrays Technology (DArT markery). Tato metoda je založená na hybridizaci fragmentů DNA na microarray a umožňuje detekovat variabilitu v tisícovkách lokusů genomu současně a oproti jiným systémům není potřeba znát sekvenci DNA (Jaccoud *et al.*, 2001). Navíc je tato metoda rychlá, relativně levná a získané výsledky jsou dobře reprodukovatelné. Kopecký *et al.* (2009a) vyvinuli DArTFest array obsahující 7680 sond pro pět travních druhů (*F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. glaucescens*, *L. perenne* a *L. multiflorum*). Tento čip lze využít k analýze genetické variability, genetickému a fyzickému mapování (Bartoš *et al.*, 2011; Dierking *et al.*, 2015; Tomaszewski *et al.*, 2012), ale také k analýze genomového složení kříženců *Festulolium* (Kopecký *et al.*, 2011). S rozvojem sekvenování nové generace (NGS) se dostávají do popředí genotypovací metody jako je metoda GBS (genotypování sekvenováním, Genotyping by sequencing; Elshire *et al.*, 2011).

Pomocí molekulárních markerů byly zkonstruovány genetické mapy pro jílek mnohokvětý (Inoue *et al.*, 2004), jílek vytrvalý (Jones *et al.*, 2002), košťavu luční (Alm *et al.*, 2003) a košťavu rákosovitou (Xu *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 2005). Díky tomu přibývají poznatky o poloze a funkci hospodářsky významných genů zodpovědných např. za dobu kvetení, odolnost vůči mrazu či resistenci k patogenům. Dostatečné množství informací umožňuje použití molekulárních markerů v těsné vazbě na daný znak, tzv. markerem zprostředkovanou selekci (MAS) s cílem vybrat nejvhodnější kombinaci rodičů a tím i snížit celkový počet křížení a použitých linií (Ribaut *et Hoisington*, 1998). Molekulární markery lze rovněž využít k fylogenetickým a evolučním studiím. Catalán *et al.* (2004) použili ribozomální mezerníkový region ITS a chloroplastovou sekvenci *trnL-F* k fylogenetické analýze celé čeledi lipnicovité.



### 3.4.2 Molekulárně cytogenetické metody

Další skupinou metod vhodných k identifikaci hybridů jsou molekulárně cytogenetické metody. Klasické cytogenetické metody, jako je proužkování chromozomů (G-, R-, C- či NOR-banding; Kannan *et Zilfalil*, 2009), využívané až do konce 70. let 20. století, byly primárně zaměřené na studium morfologie chromozomů. Pomocí těchto metod byl zjišťován počet chromozomů, numerické abnormality, studována velikost chromozomových ramen, pozice centromery a sekundární konstriktory (Silva *et Souza*, 2013). K přesné identifikaci a charakterizaci hybridů však nejsou tyto metody dostatečné. Zásadním milníkem v cytogenetice byl konec šedesátých let minulého století, kdy byla vyvinuta a poprvé použita metoda *in situ* hybridizace (Gall *et Pardue*, 1969; John *et al.*, 1969). Od té doby došlo k rozvoji a optimalizaci metod molekulární cytogenetiky a nyní patří fluorescenční a genomová *in situ* hybridizace mezi hlavní metody sloužící k identifikaci hybridů.

#### 3.4.2.1 *In situ* hybridizace (ISH)

Na konci 60. let minulého století došlo k vývoji cytogenetické metody *in situ* hybridizace (dále jen ISH) založené na vzájemném párování značené DNA sondy s komplementární denaturovanou sekvencí nukleové kyseliny fixované na mikroskopickém skle nejčastěji ve formě metafázních chromozomů (Gall *et Pardue*, 1969; John *et al.*, 1969). Jako sondy se využívají sekvence DNA klonované do vektoru nebo amplifikované pomocí PCR, syntetické oligonukleotidy či celogenomová DNA (viz GISH; Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000). Zpočátku se připravovaly radioaktivně značené sondy, nicméně práce s takovými sondami vyžaduje zvýšené bezpečnostní opatření a dlouhou dobu expozice. Proto byly později nahrazeny sondami značenými fluorescenčními barvivy (viz FISH; Langer-Safer *et al.*, 1982) a krátce na to byla poprvé provedena ISH s neradioaktivně značenými sondami na prvním zástupci rostlinné říše (konkrétně na pšenici; Rayburn *et Gill*, 1985).

Metoda ISH se stala v průběhu 90. let minulého století základní metodou cytogenetiky a své uplatnění našla při studiu genomu rostlin a živočichů, v medicíně i při šlechtění. Pomocí ISH lze identifikovat chromozomy či jejich části, lokalizovat sekvence na chromozomech, detekovat chromozomové či genomové přestavby vzniklé v průběhu evoluce, vývoje organismu, ale také vlivem nemoci. ISH umožňuje studovat strukturu, funkci, organizaci, ale také evoluci genů či celých genomů. Rovněž použití RNA jako sondy pro tzv. RNA *in situ* hybridizaci, našlo své využití a poskytuje cenné informace o expresi genů a množství RNA

v pletivech a tkáních (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000).

### 3.4.2.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (dále jen FISH) je molekulární cytogenetická metoda, která se uplatňuje od konce 70. let 20. století v nejrůznějších vědních oborech. FISH je založená na hybridizaci fluorescenčně značené DNA sondy s komplementární sekvencí DNA a vzniklý signál je detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jako sondy se využívají specifické sekvence DNA (jednokopiové geny) nebo repetitivní sekvence např. telomerická DNA, 45S nebo 5S ribozomální geny. FISH umožňuje detekovat DNA sekvence v interfázních jádrech, mitotických nebo meiotických chromozomech a DNA vláknech (Schwarzacher, 2003; Stace *et* Bailey, 1999).

Sondy mohou být značené přímo. To znamená, že na jednotlivé nukleotidy jsou navázané fluorochromy a vzniklý signál lze vizualizovat ihned po hybridizaci. Druhou možností je nepřímé značení sond, kdy je na nukleotidy nejdříve navázán haptén. Nejčastěji je používána molekula biotinu (vitamínu H) nebo digoxigeninu (steroid z rostliny *Digitalis purpurea*) a přidáním konjugátu protilátka-fluorochrom (avidin-, strepavidin-, anti-digoxigenin-fluorochrom) po hybridizaci vzniká detekovatelný signál. Použití sond s různými značkami umožňuje v jednom preparátu detekovat více cílových sekvencí najednou (Schwarzacher, 2003; Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). Nejběžněji používané fluorochromy jsou fluorescein isothiokyanát (FITC), rhodamin či Texas red (Trask, 1991). Výhodou přímého značení je jeho rychlé provedení, ale ve srovnání s nepřímým značením je méně citlivé (Schwarzacher, 2003). U nepřímého značení může zase vznikat vysoké pozadí způsobené nespecifickým navázáním protilátek (Tsuchiya, 2011). Ke značení sond se nejčastěji využívají metody jako je nick translace, PCR amplifikace se značenými nukleotidy či random priming (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000).

FISH umožňuje identifikovat jednotlivé chromozomy, strukturální abnormality (translokace, delece aj.), změny v počtu jednotlivých chromozomů či lokalizovat specifické sekvence na chromozomech. Stala se tak cenným nástrojem k analýze karyotypu a ke konstrukci cytogenetických a fyzických map (Leitch *et al.*, 1994). Pomocí specifických sond (nejčastěji používané jsou sondy pro 45S či 5S rDNA) byla provedena řada fylogenetických analýz. Thomas *et al.* (1997) na základě počtu a pozice 45S a 5S rDNA lokusů potvrdili, že kostřava rákosovitá vznikla mezidruhovou hybridizací kostřavy luční a *F. glaucescens*. FISH lze využít

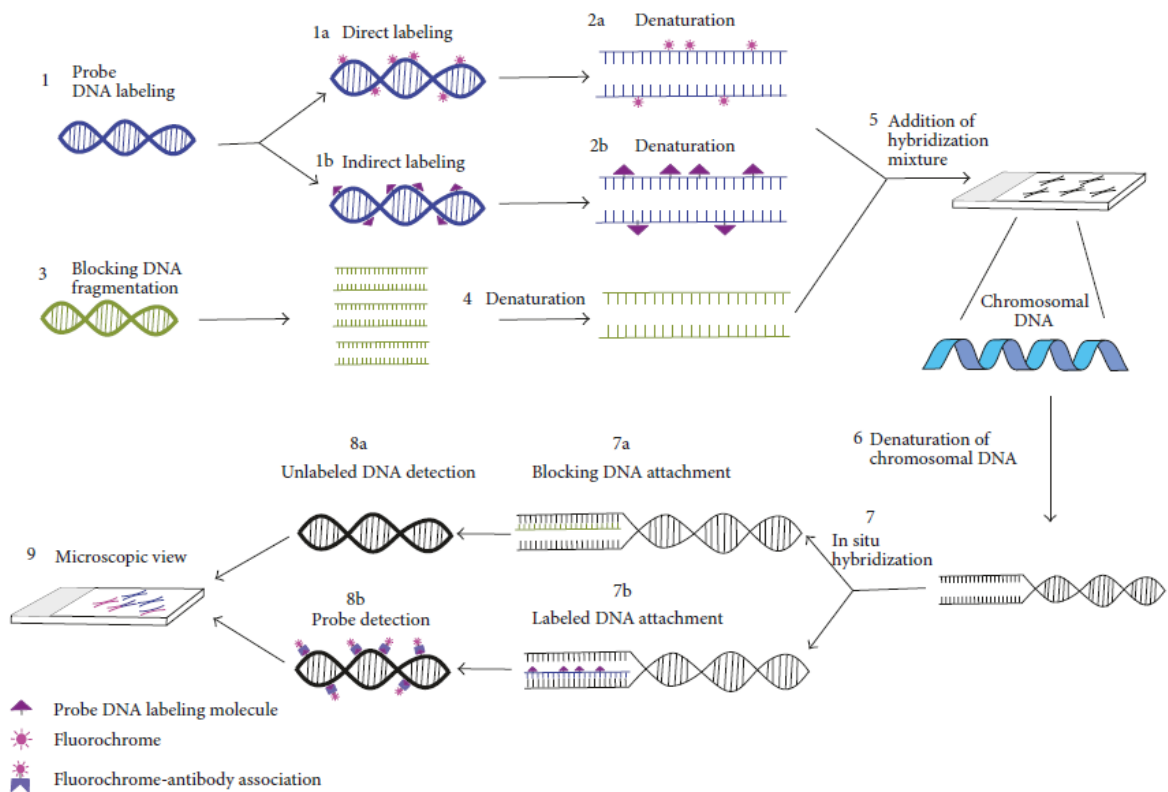
i k identifikaci mezirodových hybridů. Książczyk *et al.* (2010) použili sondy pro 45S a 5S rDNA k identifikaci triploidních a tetraploidních kříženců *F. pratensis* x *L. perenne*. Kopecký *et al.* (2016) pomocí FISH se sondami specifickými pro vybrané tandemové repetice potvrdili hybriditu triploidních rostlin vzniklých křížením diploidní kostřavy luční s tetraploidní *Festuca pratensis* subsp. *apennina*.

### 3.4.2.3 Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

Genomová *in situ* hybridizace (dále jen GISH) je široce rozšířená cytogenetická metoda založená na použití fluorescenčně značené celogenomové DNA jednoho z rodičovských druhů jako sondy, a tudíž ve srovnání s FISH umožňuje značení celých genomů v alopolyploidech a mezidruhových křížencích (Schwarzacher *et al.*, 1989). Celogenomová DNA pocházející z druhého rodičovského druhu je buď naznačená jiným fluorochromem či není fluorescenčně značená a slouží jako blokovácí DNA. Pro správný průběh GISH je nutné zajistit vhodnou koncentraci sondy a blokovácí DNA v hybridizační směsi. Neznačená blokovácí DNA se do směsi přidává ve vyšší koncentraci, cca 1:20 – 1:200 (Ananthawat-Jónsson *et Heslop-Harrison*, 1996; Silva *et Souza*, 2013). Ke značení sond je obvykle využívána nick translace, kdy dochází k inkorporaci značených nukleotidů do nukleové kyseliny po celé délce řetězce (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).

Aby se v průběhu GISH párovaly fragmenty DNA pouze s určitou homologií a výsledné hybridní molekuly byly stabilní, musí hybridizace probíhat za přísných podmínek. Nejčastěji se volí hodnota stringence 70–90 %, která udává, že budou hybridizovat všechny fragmenty DNA, které mají alespoň 70–90% homologii. Kombinací vysokých stringentních podmínek a vyšší koncentrace blokovácí DNA lze rozlišit genomy, které mají až 90–95% homologii (Parokonny *et al.*, 1997).

Výhodou této metody je rychlost, přesnost a poskytnutí velkého množství informací pro další cytogenetickou analýzu a šlechtění rostlin (Schwarzacher *et al.*, 1992). U hybridních trav se GISH rychle stala nápomocnou metodou při zjišťování genomového složení, struktury a evoluce genomů. Nevýhodou GISH je omezené rozlišení, které se udává v řádech – 5 kb (Kosmala *et al.*, 2003) až několik Mb (Lukaszewski *et al.*, 2005), tudíž nelze detekovat některé malé chromozomové introgrese, delece či translokace (Kopecký *et al.*, 2011). Schématické znázornění průběhu GISH je na obr. 2.



**Obr. 2:** Průběh genomové *in situ* hybridizace (převzato Ramzan *et al.*, 2017)

U rostlin poprvé provedli GISH Schwarzacher *et al.* (1989), kteří identifikovali rodičovské genomy mezirodových hybridů *Secale africanum* a *Hordeum chilense* a Le *et al.* (1989), kterým se podařilo touto metodou prokázat přítomnost žitného chromatinu v pokročilých generacích mezirodového křížence *Triticum aestivum* x *Secale cereale*. Ke studiu hybridů *Festulolium* byla tato metoda využita poprvé Thomasem *et al.* (1994), kteří charakterizovali triploidní hybridy *L. multiflorum* x *F. pratensis* a detekovali úsek chromozomu nesoucí gen pro opožděnou senescenci (*sid*) přenesený z genomu kostřavy luční do genomu jílku mnohokvětého. Metoda GISH a FISH jsou vhodné k detekci přenesených genů zajišťující odolnost vůči různým abiotickým a biotickým stresům z donorové rostliny do rostliny recipientní a také k fyzickému mapování daných genů (Kopecký *et al.*, 2008). GISH umožnila studium genomového složení hybridů *Festulolium* a identifikaci jednotlivých rodičovských chromozomů (Kopecký *et al.*, 2005, 2006; Zwierzykowski *et al.*, 1998) a odhalila značnou variabilitu v genomovém složení a nevyváženost rodičovských genomů.

Jak už bylo zmíněno výše, pro mezirodové křížence *Festulolium* je charakteristické párování homeologních chromozomů a vznik homeologních rekombinací. Průběh meiózy, párování jednotlivých chromozomů, vznik rekombinací a pozice a počet translokací mezi nimi

je rovněž možné sledovat právě pomocí metody GISH (Kopecký *et al.*, 2009b, 2010; Zwierzykowski *et al.*, 1998, 2008). Pomocí *in situ* hybridizace lze rovněž studovat fylogenetické vztahy mezi druhy. Humphreys *et al.* (1995) za pomoci této metody potvrdili původ alohexaploidní kostřavy rákosovité jakožto křížence kostřavy luční s druhem *F. glaucescens*.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Experimentální práce této diplomové práce byla zaměřená na studium genomového složení a jeho stabilitu v následující generaci u čtyř vybraných odrůd mezirodových hybridů *Festulolium*: Spring Green, FuRs0142, Lofa a FLM. Semena odrůd byla poskytnuta šlechtitelskou stanicí DFL Seeds, s.r.o. Hladké Životice (Česká republika).

Odrůdy FuRs0142 a Spring Green jsou původně amfiploidní odrůdy, u kterých ale došlo k výrazné dominanci jílkového genomu nad kostřavovým. U odrůdy FuRs0142 je to způsobeno jedním zpětným křížením  $F_1$  hybridů *L. perenne* x *F. pratensis* s jílkem vytrvalým. Odrůda Spring Green byla získána ze čtyř komerčních odrůd Kemal, Tandem, Elmet (*L. multiflorum* x *F. pratensis*) a Prior (*L. perenne* x *F. pratensis*). U odrůdy Kamel ale nebyl zjištěn žádný chromatin kostřavy (Kopecký *et al.*, 2006) a tudíž i odrůda Spring Green vykazuje nižší podíl kostřavového chromatinu oproti klasickým amfiploidním odrůdám. Lofa je introgresní odrůda získaná hybridizací *L. multiflorum* ( $2n = 2x = 14$ ) x *F. arundinacea* ( $2n = 6x = 42$ ) a následným zpětným zkřížením s *L. multiflorum* ( $2n = 4x = 28$ ). Odrůda FLM vznikla zkřížením *L. multiflorum* ( $2n = 2x = 14$ ) x *F. pratensis* ( $2n = 4x = 28$ ) a následně zpětným zkřížením s *L. multiflorum* ( $2n = 4x = 28$ ).

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

- 1M kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Neratovice, Česká republika; kat. č. 61018-001)
- 100% Formamid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. 295876)
- 99,8% Etanol (Lach-ner, Neratovice, Česká republika; kat. č. 20025-A96)
- 99,8% Kyselina octová (Lach-ner, Neratovice, Česká republika; kat. č. 10047-A9B)
- Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments 200 µg/ml (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Německo; kat. č. 11207741910)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velká Británie; kat. č. NIP552)
- Dextran sulfát sodná sůl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. D8906)
- DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science, Penzberg, Německo; kat. č. 11207741910)

11745816910)

- Dihydrát citronanu sodného (Lach-ner, Neratovice, Česká republika; kat. č. 30009-AP0)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. E5134)
- Hydroponex (Hu-Ben, Čerčany, Česká republika)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Lach-ner, Neratovice, Česká republika; kat. č. 10006-AP2)
- Imerzní olej Olympus (Tokio, Japonsko)
- Karmín (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. C1022)
- Octan sodný (CH<sub>3</sub>COONa) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. 71183)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. P2287)
- Tris-base (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; kat. č. T1503)
- Vectashield obsahující DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA; kat. č. H-1200)

### Použité soupravy

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

### Použité roztoky, pufrы a jejich příprava

- **Fixační roztok etanol:kyselina octová (3:1):** K přípravě 10 ml smíchat 7,5 ml 99,8% ethanolu a 2,5 ml 99,8% kyseliny octové, vždy připravovat čerstvou fixáž.
- **0,5 mol/l EDTA (pH 8,0):** 18,61 g EDTA rozpustit v 100 ml redestilované vody, upravit pH na hodnotu 8,0 (0,1 mol/l NaOH), autoklávovat a uchovávat při laboratorní teplotě.
- **1 mol/l Tris-HCl (pH 8,0):** 12,11 g Tris-base rozpustit v 80 ml redestilované vody, pH upravit koncentrovanou HCl na 8,0.
- **1% acetokarmín:** 10 g karmínu rozpustit v 1 l 45% kyseliny octové, roztok uchovat v laboratorní teplotě.
- **1% blokovací pufr:** 0,5 g Blocking reagent rozpustit v 50 ml 4x SSC/Tween 20 při 70 °C po dobu 1 hod, vyautoklávovaný pufr uchovávat při -20 °C.
- **2x SSC:** 100 ml 20x SCC doplnit redestilovanou vodou do 1 l, upravit pH na hodnotu 7,0 (0,1 mol/l HCl nebo 0,1 mol/l NaOH), roztok autoklávovat a uchovávat

při laboratorní teplotě.

- **4x SSC (4x SSC/Tween 20):** 200 ml 20x SSC doplnit redestilovanou vodou do objemu 1 l. Přidat 2 ml Tween 20, upravit pH na 7,0, vyautoklávovat a uchovat při laboratorní teplotě.
- **3 mol/l octan sodný (pH 5,2):** 40,82 g octanu sodného rozpustit ve 100 ml redestilované vody, upravit pH na hodnotu 5,2 (koncentrovanou kyselinou octovou) a uchovat při 4 °C.
- **20x SSC:** 175,3 g chloridu sodného a 88,2 g dihydrátu citronanu sodného doplnit redestilovanou vodou na do 1 l, upravit pH na hodnotu 7,0. Roztok přefiltrovat, 25 min autoklávovat a uchovávat při laboratorní teplotě.
- **50% dextran sulfát:** 2,5 g dextranu sulfátu rozpustit v 5 ml redestilované vody při mírném zahřátí a uchovávat při -20 °C.
- **TE (Tris-EDTA) pufr (pH 8,0):** 1 ml 1mol/l Tris-HCl smíchat s 200 µ 0,5mol/l EDTA a doplnit na 100 ml redestilovanou vodou, upravit pH na hodnotu 8,0, autoklávovat a uchovávat při 4 °C.

#### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Jouan CR3i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Digestor Merci (Merci, s.r.o., Brno, Česká republika)
- Fluorescenční mikroskop Olympus AX70 (Tokio, Japonsko) s chlazenou SensiCam kamerou (PCO, CCD Imaging, Kelheim, Německo) a se systémem analýzy obrazu Olympus Micro Imaging Software (Tokio, Japonsko)
- Hybridizační pec SM30 (Grant-Boekel Scientific, Feasterville, Pennsylvania, USA)
- Lyofilizátor Heto Drywinner (Trigon Plus spol. s.r.o., Čestlice, Česká republika) a vakuová pumpa (Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Německo)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Světelný mikroskop primo Star (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)
- Termocyklér na mikroskopavky PTC-200 (MJ Research, Bio-Rad, Kalifornie, USA)
- Termocyklér pro FISH Mastercycler (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Termostat BT 120 (LABO-MS spol. s.r.o., Praha, Česká republika)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant Instruments, Cambridge, Velká Británie)



- Vortex Reax Top (Heidolph Instrumensts, Schwabach, Německo)
- Výrobek ledové tříště Scotsman MF26 Ice Flaker (Scotsman Ice Systems, Ipswich, Velká Británie)

#### **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

##### **4.4.1 Setí rostlin, hydroponie, odběr a fixace kořínků**

Semena vybraných odrůd *Festulolium* byla vyseta na Petriho misky vyložené navlhčenou buničinou a filtračním papírem. Semena klíčila při laboratorní teplotě a poté byla vyseta do hlíny a umístěna do fytotronu. Po šesti týdnech byly mladé rostlinky vloženy v květináčích s perlitem do hydroponické lázně. Hydroponický roztok obsahoval Hydroponex (Hu-Ben, Čerčany) o koncentraci 0,9 g/l rozpustěný v destilované vodě.

Odběr kořínků se prováděl po cca sedmi dnech vždy mezi 11.–13. hodinou, kdy je nejvyšší mitotický index. Pomocí pinzety byly odebrány mladé kořínky a vloženy do zkumavek obsahující redestilovanou vodu. Zkumavky chlazené ledem byly ponechány 28–30 hodin v chladové místnosti při 4 °C, aby proběhla synchronizace buněčného cyklu. Následující den byly kořínky přeneseny do mikrozkušavek s 1 ml fixačního roztoku, složeného z absolutního etanolu (čistota 99,8%) a ledové kyseliny octové (čistota 99,8%) v poměru 3:1. Kořínky byly po dobu jednoho týdne inkubovány ve 37 °C v termostatu.

##### **4.4.2 Příprava roztlakových preparátů**

Roztlakové preparáty metafázních chromozomů byly připraveny podle protokolu Masoudi-Nejad *et al.* (2002). Kořínky byly z fixáže přeneseny minimálně na 2 hodiny do 1% roztoku acetokarmínu. Poté byla skalpelem odříznuta tmavě zbarvená kořenová špička obsahující vysoce dělivé meristemické pletivo a přenesena do kapky 45% kyseliny octové na vyleštěném podložním skle. Podložní skla byla před přípravou preparátů umístěna několik dnů v 96% etanolu. Po překrytí krycím sklem byl pomocí párátko proveden roztlak. Sklo bylo ožehnuto nad lihovým kahanem a po vychladnutí byl preparát ještě roztlak prsty. Takto připravené roztlaky byly ponechány minimálně jednu hodinu na bloku suchého ledu krycím sklem dolů. Následně byla pomocí žiletky odstraněna krycí skla a preparáty byly přeneseny do 45% kyseliny octové při laboratorní teplotě. Poté proběhla třiminutová inkubace preparátů v 45% kyselině octové zahřáté na 50 °C. Pomocí světelného mikroskopu byly vybrány

roztlakové preparáty metafázních chromozomů vhodné k provedení genomové *in situ* hybridizaci. Obarvené kořínky lze dlouhodobě uchovávat ve fixačním roztoku při -20 °C.

#### 4.4.3 Příprava značené sondy

Pro přípravu sondy i blokovací DNA bylo nutné vyizolovat genomové DNA z kostřavy luční (*Festuca pratensis* Huds., Fp) a jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum*, Lm) komerčně dodávaným kitem NucleoSpin® Plant II. Izolace proběhla podle postupu dodávaným výrobcem kitu a koncentrace vyizolované gDNA byla změřená spektrofotometricky.

Sonda značená digoxigeninem k provedení GISH byla připravena z genomové DNA kostřavy luční pomocí nick translace. K 1 µg gDNA byly přidány 4 µl DIG-Nick Translation Mixu a doplněno na objem 20 µl redestilovanou vodou. Směs byla inkubována v termocykléru po dobu 1,5 hod při 15 °C. Po inkubaci byla zkumavka krátce zchlazena na ledu a reakce zastavena přidáním 1 µl 0,5 M EDTA a následnou inkubací po dobu 10 min při 65 °C.

#### 4.4.4 Izolace genomové DNA a příprava blokovací DNA

Na přípravu blokovací DNA bylo použito 400 µg gDNA, které bylo doplněno do objemu 384 µl redestilovanou vodou. Následně bylo připipetováno 16 µl 10M NaOH, který tak měl finální koncentraci 0,4 M a směs byla důkladně promíchána a vařena ve vroucí vodě 45 minut. Vaření způsobilo naštěpení gDNA na menší úseky cca 200-500 bp. Po krátkém zchlazení mikrozukmavky na ledu bylo přidáno 400 µl 3M octanu sodného (pH=5,2) a 800 µl 99,8% ethanolu. Směs byla pečlivě promíchána a uchována při -80 °C do dalšího dne. Následující den byla směs centrifugována při 14 000 rpm a 4 °C po dobu 30 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl několikrát opláchnut v 1 ml 70% vychlazeného ethanolu. Po vysušení byl pelet rozpuštěn ve 40 µl TE pufu.

Sondy, gDNA a blokovací DNA lze dlouhodobě uchovávat při -20 °C.

#### 4.4.5 Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

K provedení GISH byl použit protokol Masoudi-Nejad *et al.* (2002). Z reagensií podle tab. 2 bylo připraveno 20 µl hybridizační směsi. Celý objem byl nanesen na podložní sklo s preparátem a překryt krycím sklem. Následovala denaturace při 80 °C po dobu 2 minut

a 25 sekund. Preparáty s hybridizační směsí byly inkubovány do dalšího dne v hybridizační komůrce při 37 °C. Na základě koncentrace formamidu a SSC v použité hybridizační směsi byla stringence hybridizační reakce cca 77 %.

**Tab. 2:** Příprava hybridizační směsi

<b>Reagencie</b>	<b>Koncentrace zásobního roztoku</b>	<b>Výsledná koncentrace</b>	<b>Objem použitých reagensů [μl]</b>
Formamid	100%	50%	10
Dextran sulfát	50%	10%	4
SSC	20x	2x	2
Blokovací DNA (Lm)	-	-	1
Sonda (Fp)	-	-	1
Redestilovaná voda	-	-	2
<b>Celkový objem</b>			<b>20</b>

Druhý den bylo proudem destilované vody odstraněno krycí sklo a preparát byl inkubován v 2x SSC po dobu 10 min. Po inkubaci byl preparát opláchnut destilovanou vodou a lehce osušen. Sonda byla detekována pomocí protilátky Anti-digoxigenin, která je značená FITC (fluorescein isothiokyanát). Na preparát bylo napipetováno 35 μl 1% blokovacího pufru s protilátkou Anti-DIG-FITC (v poměru 1:200) a překryto krycím sklem. Preparáty byly inkubovány 1,5 hod v hybridizační komůrce při 37 °C. Po inkubaci bylo krycí sklo odstraněno proudem destilované vody. Na osušený preparát bylo aplikováno 12 μl Vectashield média s DAPI (1,5 μg/ml) a překryto krycím sklem. Preparáty byly vyhodnoceny na fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70 s chlazenou SensiCam B/W kamerou. Výsledné fotografie byly upraveny v programech ScionImage a Adobe Photoshop. Pro každou rostlinu byly nasnímány nejméně dvě metafáze.

#### 4.5 Analýza dat

Metodou GISH bylo analyzováno celkově 120 rostlin rodičovské generace čtyř odrůd mezirodových hybridů *Festulolium*: 20 rostlin odrůdy Spring Green, 22 rostlin odrůdy FuRs0142, 28 rostlin odrůdy Lofa a 50 rostlin odrůdy FLM. Tyto rostliny byly na základě přítomnosti chromatinu pocházejícího z kostravy rozděleny do skupin. Jako rozhodující kritérium pro přiřazení jednotlivých chromozomů k jednomu z rodičovských genomů byla

oblast centromery. Pokud byla oblast centromery značená sondou z celogenomové DNA kostřavy luční, chromozom byl určen jako kostřavového původu.

U každé rostliny byl analyzován:

- Celkový počet chromozomů
- Počet kompletních chromozomů původem z jílku
- Počet kompletních chromozomů původem z kostřavy
- Počet chromozomů původem z jílku nesoucí translokaci z kostřavy
- Počet chromozomů původem z kostřavy nesoucí translokaci z jílku

Po rozdělení rostlin do skupin, ve kterých byly sprášený, byl vypočítán:

- Průměr všech analyzovaných hodnot u všech rostlin první generace v dané skupině (pod označením samčí rostliny)
- Průměr všech analyzovaných hodnot pouze u vybraných 5 (4) mateřských rostlin první generace (pod označením samičí rostliny)
- Průměr průměrů všech analyzovaných hodnot samčích a samičích rostlin (pod označením teoretická hodnota)
- Průměr všech analyzovaných hodnot 25 (24) rostlin následující generace (pod označením reálná hodnota)

## 5 Výsledky

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

### 5.1 Cytogenetická analýza

Náplní první části experimentu bylo zjistit pomocí genomové *in situ* hybridizace genomové složení čtyř odrůd *Festulolium*: Spring Green, FuRs0142, Lofa a FLM. Na základě získaných dat byli kříženci rozděleni do skupin podle přítomnosti/nepřítomnosti chromatinu pocházejícího z kostřavy a volně křížení. V druhé části experimentu bylo analyzováno genomové složení následující generace (G2) pomocí genomové *in situ* hybridizace a zjištěn posun v genomovém složení ve srovnání s rodičovskou generací (G1).

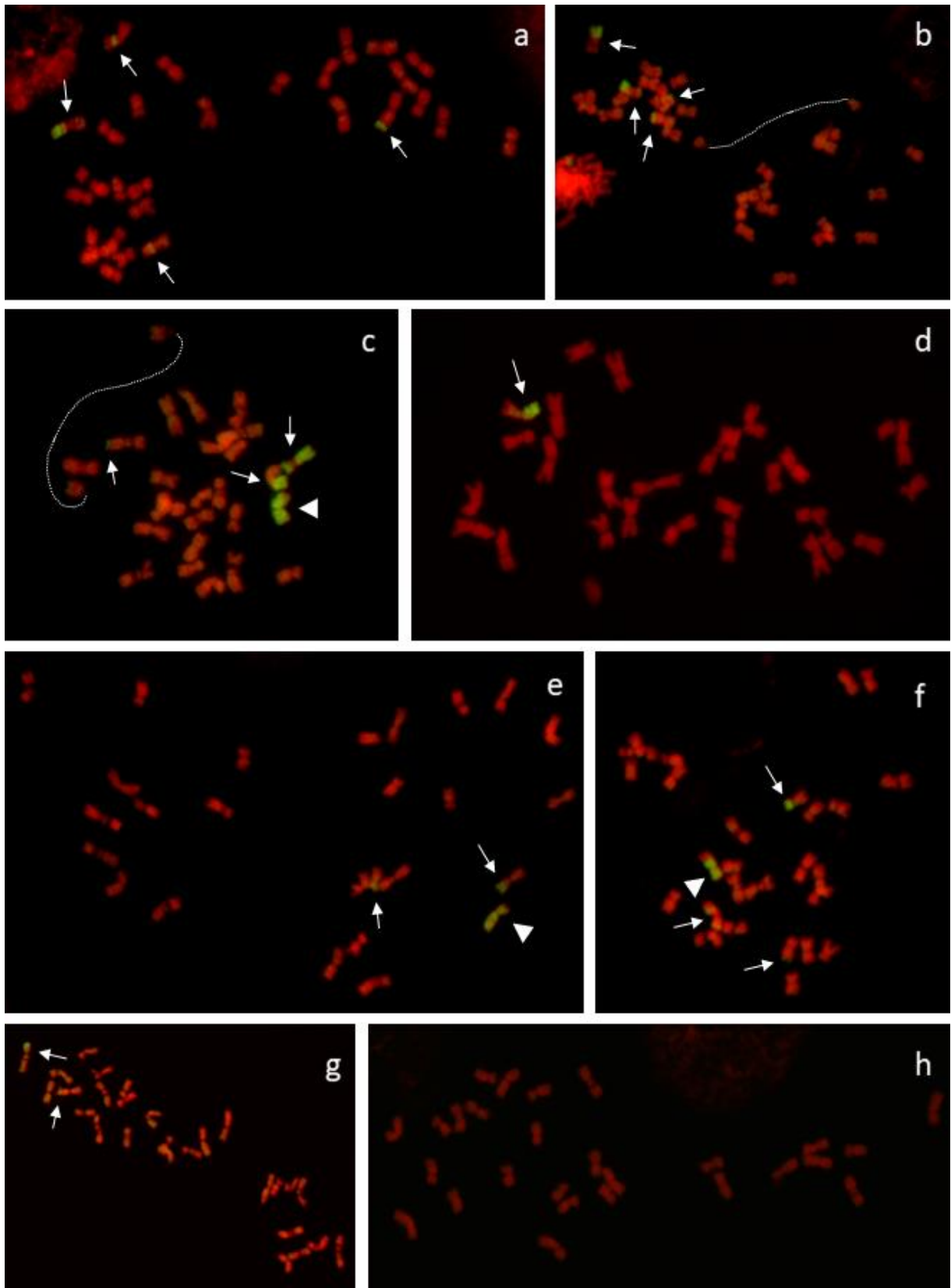
Celkově bylo analyzováno 120 rostlin generace G1 čtyř odrůd *Festulolium*: 20 rostlin odrůdy Spring Green, 22 rostlin odrůdy FuRs0142, 28 rostlin odrůdy Lofa a 50 rostlin odrůdy FLM. Pro jednoduchou orientaci v celém experimentu byla vypracována tab. 3 a schématická znázornění průběhu celého experimentu pro každou odrůdu jsou uvedena v příloze 1.

**Tab. 3:** Počet analyzovaných či sprášených rostlin jednotlivých odrůd *Festulolium* využitých v experimentu

Odrůda	Spring Green	FuRs 0142	Lofa			FLM		
Rostliny první generace (G1)	20	22	28			50		
Rostliny ke sprášení	20	22	S introgresí (I)	S i bez introgrese		S introgresí (I)	S i bez introgrese	
			7	21		9	41	
Náhodně vybrané rostliny	5	4	6	S introgresí (IIa)	S i bez introgrese (Iib)	5	S introgrese (IIa)	S i bez introgrese (Iib)
				5	5		5	5
Rostliny následující generace (G2)	25	24	25	24	25	25	25	25

U všech 20 rostlin odrůdy Spring Green byl přítomen chromatin z kostřavy a tyto rostliny byly navzájem volně sprášeny. Poté bylo náhodně vybráno 5 mateřských rostlin, z kterých byla sebrána zralá semena. Od každé z těchto pěti rostlin bylo zaseto 5 semen. Celkem bylo od odrůdy Spring Green analyzováno 25 rostlin z následující generace. Stejně tak u odrůdy FuRs0142 bylo mezi sebou volno sprášeno všech 22 rostlin mající malý podíl genomu z kostřavy. Z důvodu malého množství semen byly vybrány pouze 4 rostliny a analyzováno 24 rostlin z následující generace. Rostliny odrůdy Lofa a FLM byly rozděleny do dvou skupin. První skupina (I) zahrnovala pouze rostliny, u kterých byl vždy přítomen chromatin z kostřavy a tyto rostliny byly mezi sebou sprášeny. Náhodně bylo vybráno 5 (6) rostlin a od každé z nich bylo zaseto 5 (4) semen. U první skupiny bylo analyzováno pro každou odrůdu 25 rostlin z následující generace. Druhá skupina (II) zahrnovala jak rostliny s kostřavovým chromatinem, tak i rostliny čistě jílkového typu. Po sprášení bylo náhodně vybráno 5 rostlin s chromatinem z kostřavy (skupina IIa) a 5 rostlin bez introgrese (skupina IIb). Od každé z pěti rostlin bylo zaseto 5 (4) semen a celkově bylo od každé podskupiny analyzováno 25 (24) rostlin následující generace. Celkově bylo analyzováno 198 rostlin druhé generace: 24 rostlin odrůdy Spring Green, 25 rostlin odrůdy FuRs0142, 74 rostlin odrůdy Lofa a 75 rostlin odrůdy FLM.

Cílem celého experimentu bylo zjištění stability genomového složení v následující generaci. Příklady cytogenetické analýzy dvou po sobě jdoucích generací pro všechny čtyři odrůdy *Festulolium* jsou znázorněny na obr. 3.



**Obr. 3:** Příklady cytogenetické analýzy dvou po sobě jdoucích generací čtyř odrůd *Festulolium*  
 Legenda: a) první generace (G1) Spring Green, b) druhá generace (G2) Spring Green, c) G1 FuRS0142, d) G2 FuRS0142, e) G1 Lofa, f) G2 Lofa, g) G1 FLM, h) G2 FLM

Roztlaky metafázních chromozomů byly analyzovány po genomové *in situ* hybridizaci, kde jako sonda byla použita genomová DNA košťavy luční značená digoxigeninem (zelená barva) a jako blokovácí DNA byla použita celogenomová DNA z jílku mnohokvětého. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI (červená pseudobarva).

### 5.1.1 Aneuploidie

Při analýze genomového složení byla v rámci jednotlivých odrůd pozorovaná aneuploidie, tedy ztráta či nadbytek chromozomů. Teoretický počet chromozomů ( $2n = 28$ ) byl zjištěn pouze u 35 % rostlin. Počet chromozomů se pohyboval mezi 25 až 30. Nejčastěji měly rostliny 27 chromozomů ( $2n = 27$ ), tento stav byl pozorován celkově u 39 % rostlin. U následující generace nebyl pozorován nárůst aneuploidie, naopak u odrůdy FuRs0142 klesala aneuploidie z 77,3 % na 70,8 %, u odrůdy Lofa z 64,3 % na 56,8 % a u odrůdy FLM ze 70 % na 66,7 %. Odrůda Spring Green vykazovala v obou generacích stejnou frekvenci aneuploidie (60 %, viz tab. 4).

**Tab. 4:** Počet chromozomů u dvou generací čtyř studovaných odrůd *Festulolium*

Odrůda a generace	Počet rostlin	Počet chromozomů v diploidním stavu (2n)						Průměr
		25	26	27	28	29	30	
Spring Green G1	20	-	4	7	8	-	1	27,4
Spring Green G2	25		4	11	10	-	-	27,2
FuRs0142 G1	22	-	4	11	5	2	-	27,2
FuRs0142 G2	24	-	1	16	7	-	-	27,3
Lofa G1	28	-	4	11	10	2	1	27,5
Lofa G2	74	1	16	17	32	8	-	27,4
FLM G1	50		12	22	15	1	-	27,1
FLM G2	75	4	16	29	25	1	-	27,0
<b>Celkem</b>	318	5	61	124	112	14	2	

Legenda: G1 – první generace, G2 – druhá generace.



### 5.1.2 Genomové složení

Výsledky cytogenetické analýzy odhalily značnou variabilitu v genomovém složení v rámci jednotlivých odrůd i mezi odrůdami navzájem. Pro všechny studované odrůdy *Festulolium* bylo charakteristické nevyvážené zastoupení rodičovských genomů a v genomech všech odrůd převládal jílkový genom nad genomem kostřavy.

#### Odrůdy Spring Green s FuRs0142

U odrůd Spring Green a FuRs0142 byl pozorován vyšší počet chromozomů původem z kostřavy, než u odrůd Lofa a FLM. V generaci G1 byl u všech rostlin odrůd Spring Green a FuRs0142 přítomen kostřavový chromatin. V první sledované generaci odrůdy Spring Green bylo genomové složení  $22,50 L + 4,35 T (3,55 L^T + 0,80 F^T) + 0,50 F$  (L značí počet chromozomů původem z jílku, T počet rekombinovaných chromozomů, F počet chromozomů původem z kostřavy,  $L^T$  počet chromozomů původem z jílku nesoucí translokaci z kostřavy a  $F^T$  počet chromozomů původem z kostřavy nesoucí translokaci z jílku) a u odrůdy FuRs0142 bylo  $23,68 L + 3,14 T (2,32 L^T + 0,82 F^T) + 0,36 F$ . V následující generaci byl u obou odrůd pozorován posun v genomovém složení ve prospěch jílkového genomu. Genomové složení se změnilo na  $23,88 L + 3,20 T (2,52 L^T + 0,68 F^T) + 0,16 F$  u odrůdy Spring Green a na  $24,79 L + 2,42 T (1,88 L^T + 0,54 F^T) + 0,04 F$  u odrůdy FuRs0142. Z generace na generaci došlo k redukci 27 % kostřavového chromatinu v případě odrůdy Spring Green a 32 % u odrůdy FuRs0142 (viz tab. 5).

**Tab. 5:** Analýza genomového složení u dvou po sobě jdoucích generacích odrůd **Spring Green** a **FuRs0142**

Odrůda a generace	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z jílku	Průměrný počet chromozomů původem z jílku nesoucí translokaci z kostřavy	Průměrný počet chromozomů původem z kostřavy nesoucí translokaci z jílku	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z kostřavy
Spring Green G1 samčí rostliny	$22,50 \pm 2,97$	$3,55 \pm 2,33$	$0,80 \pm 0,98$	$0,50 \pm 0,87$
Spring Green G1 samičí rostliny	$22,80 \pm 2,14$	$3,20 \pm 1,17$	$0,80 \pm 1,17$	$0,40 \pm 0,80$
Spring Green G2 teoretická hodnota	$22,65 \pm 2,56$	$3,38 \pm 1,75$	$0,80 \pm 1,08$	$0,45 \pm 0,84$
Spring Green G2 reálná hodnota	$23,88 \pm 2,23$	$2,52 \pm 2,16$	$0,68 \pm 0,73$	$0,16 \pm 0,46$

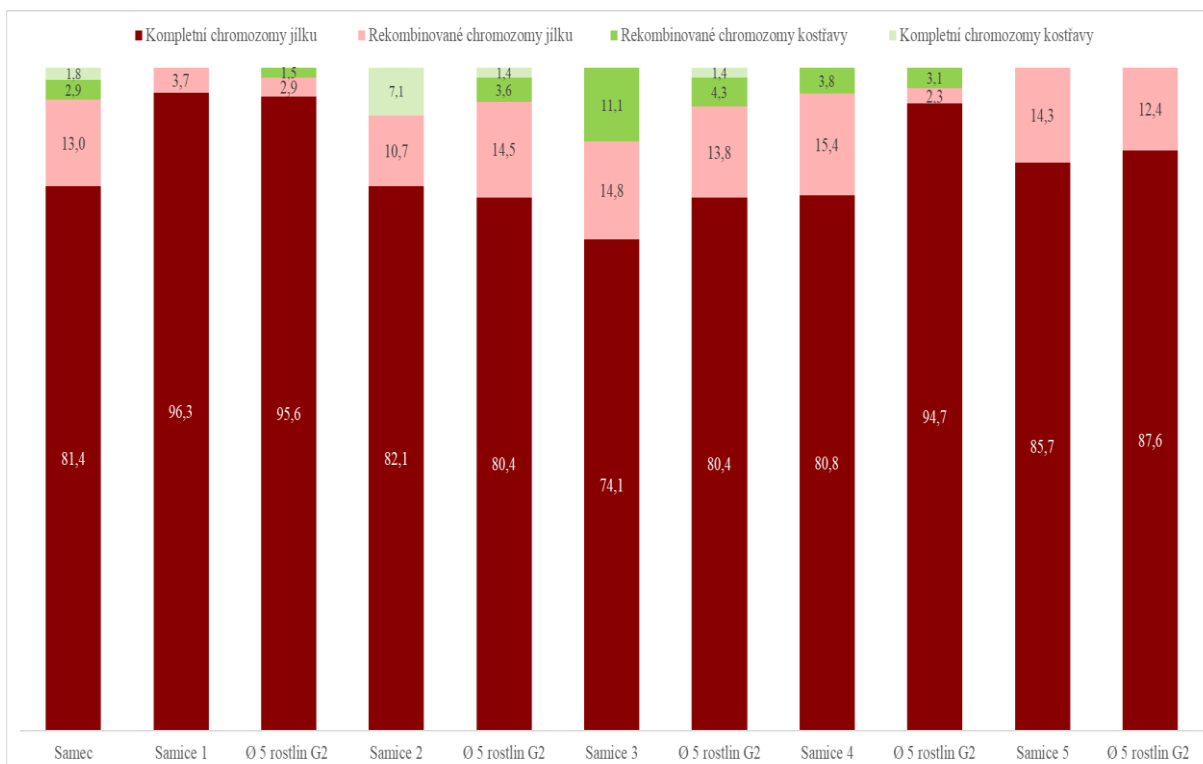
**Tab. 5:** Pokračování 1

Odrůda a generace	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z jílku	Průměrný počet chromozomů původem z jílku nesoucí translokaci z kostřavy	Průměrný počet chromozomů původem z kostřavy nesoucí translokaci z jílku	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z kostřavy
<b>FuRs0142 G1 samčí rostliny</b>	23,68 ± 1,61	2,32 ± 1,06	0,82 ± 0,98	0,36 ± 0,64
<b>FuRs0142 G1 samičí rostliny</b>	23,75 ± 1,79	2,25 ± 1,09	1,25 ± 1,64	0,25 ± 0,43
<b>FuRs0142 G2 teoretická hodnota</b>	23,72 ± 1,70	2,29 ± 1,08	1,04 ± 1,31	0,40 ± 0,54
<b>FuRs0142 G2 reálná hodnota</b>	24,79 ± 1,35	1,88 ± 1,45	0,54 ± 0,71	0,04 ± 0,20

Legenda: G1 – první generace, G2 – druhá generace.

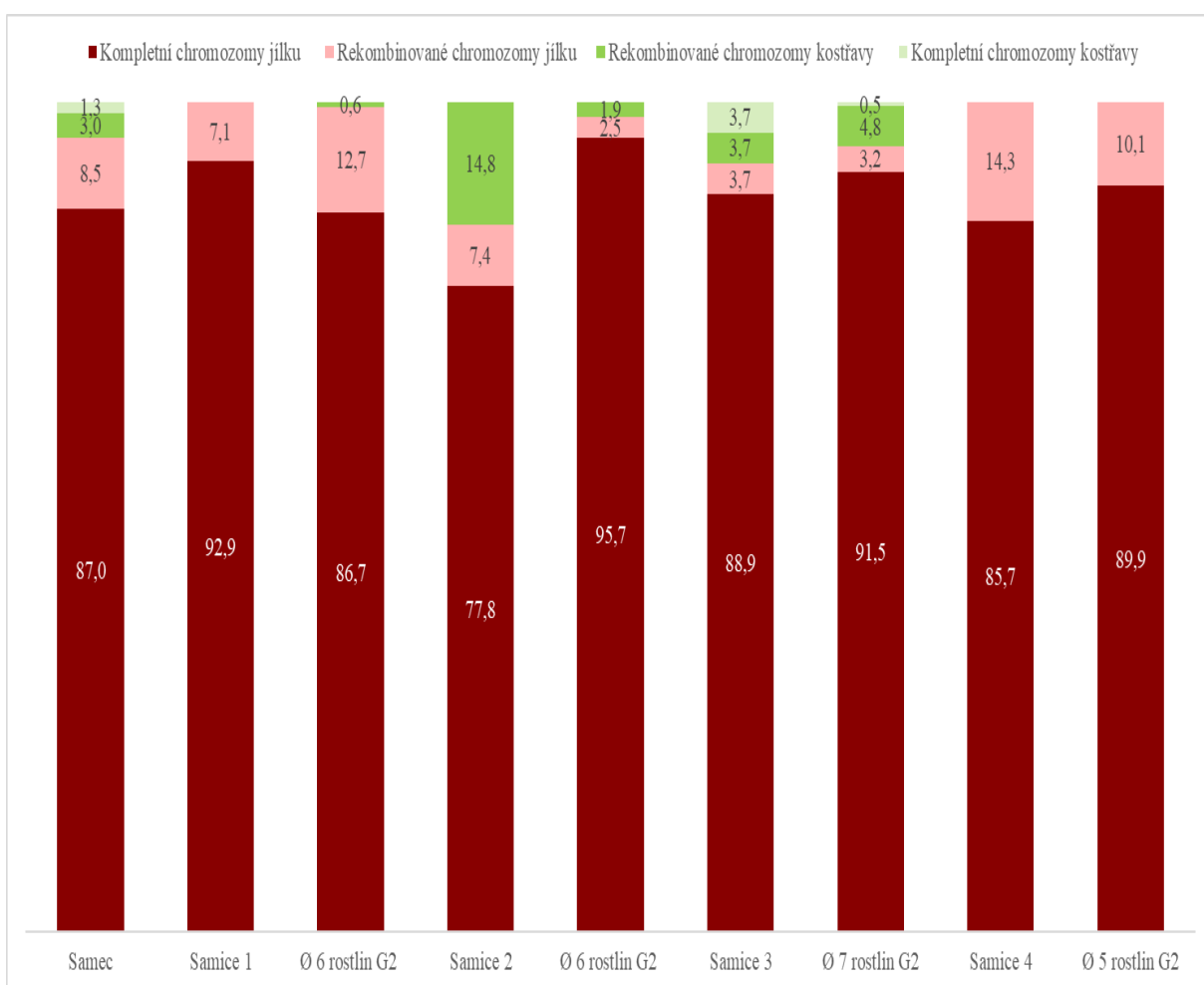
Grafické znázornění genomového složení rodičovské generace a pěti rostlin následující generace od každé z pěti náhodně vybraných rostlin odrůdy Spring Green je znázorněné v grafu 1. U dvou rostlin (samice 1, samice 2) nebylo v další generaci pozorováno zvýšení podílu jílkového genomu nad kostřavovým. Zbývající rostliny vykazovaly v další generaci posun směrem ke genomu jílku.

**Graf 1:** Genomové složení rodičovské generace (G1) a průměru rostlin z generace následující (G2) u odrůdy **Spring Green**. Absolutní hodnoty (vzhledem k častému výskytu aneuploidie) byly pro snadnější vizualizaci nahrazeny relativními hodnotami (%).



Grafické znázornění genomového složení rodičovské generace a 5–7 rostlin následující generace od každé ze čtyř náhodně vybraných rostlin odrůdy FuRs0142 je znázorněné v grafu 2. Kromě samice 1 a její následující generace, kde byl pozorován mírný nárůst kostřavového genomu, byl u všech rostlin zjištěn posun v genomovém složení z generace na generaci ve prospěch jílku.

**Graf 2:** Genomové složení rodičovské generace (G1) a vybraných rostlin z generace následující (G2) u odrůdy **FuRs0142**. Absolutní hodnoty (vzhledem k častému výskytu aneuploidie) byly pro snadnější vizualizaci nahrazeny relativními hodnotami (%).



## Odrůdy Lofa a FLM

Největší rozdíl v zastoupení rodičovských genomů byl zjištěn u odrůd Lofa a FLM. V genomech těchto dvou odrůd převažoval chromatin z jílku a u žádné rostliny nebyl přítomen žádný kompletní kostřavový chromozom, pouze jeden či více segmentů kostřavového chromatinu.

V první generaci byl chromatin kostřavy zjištěn u 13 z 28 rostlin odrůdy Lofa. Ve skupině I byly spolu sprášeny jen rostliny, u kterých se vždy nacházel alespoň jeden chromozomový segment původem z kostřavy. Genomové složení se u odrůdy Lofa změnilo z  $25,00 L + 2,72 T (2,43 L^T + 0,29 F^T) + 0,00 F$  na  $25,36 L + 2,04 T (1,72 L^T + 0,32 F^T) + 0,00 F$ . Přestože byl u všech mateřských rostlin detekován kostřavový chromatin, v následující generaci se nacházel pouze u 21 rostlin z 25 rostlin. Oproti očekávané (teoretické) hodnotě byl zaznamenán mírný pokles kostřavového chromatinu, který se projevoval zvýšeným výskytem chromozomů jílku bez introgrese a sníženým výskytem jílkových chromozomů s introgresí z kostřavy. Ve druhé skupině bylo volně sprášeno všech 21 rostlin: 6 rostlin s kostřavovým chromatinem (skupina IIa) a 15 rostlin čistě jílkového typu bez viditelné introgrese (skupina IIb). U skupiny IIa se genomového složení změnilo z  $26,86 L + 0,53 T (0,43 L^T + 0,10 F^T) + 0,00 F$  na  $25,58 L + 1,54 T (1,21 L^T + 0,33 F^T) + 0,00 F$  a došlo tak k nárůstu podílu kostřavového chromatinu (oproti teoretické hodnotě). Ve skupině IIb byly všechny mateřské rostliny bez viditelné introgrese, ale 6 potenciálních samčích rostlin (opylovačů) mělo chromatin původem z kostřavy. V následující generaci byl kostřavový chromatin pozorován pouze u jediné rostliny a genomové složení se změnilo z  $26,86 L + 0,53 T (0,43 L^T + 0,10 F^T) + 0,00 F$  na  $27,64 L + 0,04 T (0,04 L^T) + 0,00 F$  a došlo tak k velmi výrazné eliminaci kostřavového chromatinu (viz tab. 6).

**Tab. 6:** Analýza genomového složení u dvou po sobě jdoucích generacích odrůd **Lofa**

Odrůda a generace	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z jílku	Průměrný počet chromozomů původem z jílku nesoucí translokaci z kostřavy	Průměrný počet chromozomů původem z kostřavy nesoucí translokaci z jílku	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z kostřavy
<b>Lofa G1</b>	26,39 ± 1,95	0,93 ± 1,49	0,14 ± 0,44	0,00 ± 0,00
<b>Lofa I G1 samčí rostliny</b>	25,00 ± 2,39	2,43 ± 1,99	0,29 ± 0,70	0,00 ± 0,00
<b>Lofa I G1 samičí rostliny</b>	24,67 ± 2,43	2,67 ± 2,05	0,33 ± 0,75	0,00 ± 0,00
<b>Lofa I G2 teoretická hodnota</b>	24,84 ± 2,41	2,55 ± 2,02	0,31 ± 0,73	0,00 ± 0,00
<b>Lofa I G2 reálná hodnota</b>	25,36 ± 1,44	1,72 ± 1,11	0,32 ± 0,61	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIa G1 samčí rostliny</b>	26,86 ± 1,52	0,43 ± 0,79	0,10 ± 0,29	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIa G1 samičí rostliny</b>	25,60 ± 1,74	1,60 ± 0,80	0,40 ± 0,49	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIa G2 teoretická hodnota</b>	26,23 ± 1,63	1,02 ± 0,80	0,25 ± 0,39	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIa G2 reálná hodnota</b>	25,58 ± 2,18	1,21 ± 1,12	0,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIb G1 samčí rostliny</b>	26,86 ± 1,52	0,43 ± 0,79	0,10 ± 0,29	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIb G1 samičí rostliny</b>	28,40 ± 1,36	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIb G2 teoretická hodnota</b>	27,63 ± 1,44	0,22 ± 0,40	0,05 ± 0,15	0,00 ± 0,00
<b>Lofa IIb G2 reálná hodnota</b>	27,64 ± 1,16	0,04 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Legenda: G1 – první generace, G2 – druhá generace.

V první generaci byl kostřavový chromatin zjištěn u 29 z 50 rostlin odrůdy FLM. V případě sprášení pouze rostlin (skupina I), u kterých se nacházel kostřavový chromatin, se složení rodičovských genomů změnilo ve prospěch jílkového genomu z 25,78 L + 1,22 T (1,11 L<sup>T</sup> + 0,11 F<sup>T</sup>) + 0,00 F na 26,36 L + 0,64 T (0,44 L<sup>T</sup> + 0,20 F<sup>T</sup>) + 0,00 F a kostřavový chromatin byl v druhé generaci detekován pouze u 12 rostlin. Zbývajících 13 rostlin bylo jílkového typu bez viditelné introgrese. Ve druhé skupině bylo sprášeno 20 rostlin s introgrésí a 21 bez introgrese. V případě skupiny IIa se genomové složení změnilo z 26,46 L + 0,63 T (0,61 L<sup>T</sup> + 0,02 F<sup>T</sup>) + 0,00 F na 25,96 L + 1,36 T (1,36 L<sup>T</sup>) + 0,00 F. Stejně jako u odrůdy Lofa došlo k mírnému nárůstu podílu kostřavového chromatinu, který byl přítomen u 19 z 25 rostlin. U skupiny IIb byly všechny mateřské rostliny bez viditelné introgrese, ale 20 potenciálních samčích rostlin (opylovačů) mělo kostřavový chromatin. V následující generaci se proporce rodičovských genomů změnila z 26,46 L + 0,63 T (0,61 L<sup>T</sup> + 0,02 F<sup>T</sup>) + 0,00 F na 26,72 L

+ 0,08 T (0,08 L<sup>T</sup>) + 0,00 F. Kostřavový chromatin se vyskytoval pouze u dvou rostlin z celkového počtu 25 rostlin. Ostatní rostliny byly čistě jilkového typu a stejně jako u odrůdy Lofa došlo k výrazné eliminaci kostřavového chromatinu (viz tab. 7).

Tab. 7: Analýza genomového složení u dvou po sobě jdoucích generacích odrůd **FLM**

Odrůda a generace	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z jílku	Průměrný počet chromozomů původem z jílku nesoucí translokaci z kostřavy	Průměrný počet chromozomů původem z kostřavy nesoucí translokaci z jílku	Průměrný počet kompletních chromozomů původem z kostřavy
<b>FLM G1</b>	26,34 ± 0,97	0,70 ± 0,70	0,04 ± 0,20	0,00 ± 0,00
<b>FLM I G1 samčí rostliny</b>	25,78 ± 0,92	1,11 ± 0,74	0,11 ± 0,31	0,00 ± 0,00
<b>FLM I G1 samičí rostliny</b>	26,40 ± 0,49	0,80 ± 0,40	0,20 ± 0,40	0,00 ± 0,00
<b>FLM I G2 teoretická hodnota</b>	26,09 ± 0,71	0,96 ± 0,57	0,16 ± 0,36	0,00 ± 0,00
<b>FLM I G2 reálná hodnota</b>	26,36 ± 1,20	0,44 ± 0,75	0,20 ± 0,40	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIa G1 samčí rostliny</b>	26,46 ± 0,94	0,61 ± 0,66	0,02 ± 0,15	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIa G1 samičí rostliny</b>	26,20 ± 0,40	1,20 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIa G2 teoretická hodnota</b>	26,33 ± 0,67	0,91 ± 0,53	0,01 ± 0,08	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIa G2 reálná hodnota</b>	25,96 ± 1,04	1,36 ± 0,97	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIb G1 samčí rostliny</b>	26,46 ± 0,94	0,61 ± 0,66	0,02 ± 0,15	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIb G1 samičí rostliny</b>	27,00 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIb G2 teoretická hodnota</b>	26,73 ± 0,79	0,31 ± 0,33	0,01 ± 0,08	0,00 ± 0,00
<b>FLM IIb G2 reálná hodnota</b>	26,72 ± 104	0,08 ± 0,27	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Legenda: Legenda: G1 – první generace, G2 – druhá generace.

## 6 Diskuze

Zástupci rodu kostřava (*Festuca* L.) a jílek (*Lolium* L.) mají značný potenciál ve šlechtitelství k vytváření nových mezirodových hybridů *Festulolium*, kteří by mohli být schopní se adaptovat na měnící se klimatické podmínky a rovněž mít vysoký výnos nutričně kvalitní píče. Přes první komerční úspěchy registrovaných odrůd se však šlechtitelé stále potýkají s nerovnoměrným zastoupením rodičovských genomů v jednotlivých odrůdách a také s nestabilitou hybridního genomu v následujících generacích. Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat genomové složení vybraných odrůd *Festulolium* (Spring Green, FuRs0142, Lofa a FLM) a následně studovat stabilitu genomového složení v další generaci.

V rámci experimentu bylo celkem analyzováno genomové složení dvou generací čtyř odrůd *Festulolium* pomocí metody genomové *in situ* hybridizace. Analýza genomového složení odhalila variabilitu v počtu chromozomů u jednotlivých rostlin. Teoretický počet chromozomů ( $2n = 28$ ) byl zjištěn pouze u 35 % rostlin. Nejnižší hodnota aneuploidie byla pozorována u odrůd Spring Green a Lofa (60 % resp. 64,3 %), zatímco u odrůdy FuRs0142 a FLM byla vyšší (77,3 % resp. 70 %). V následující generaci nebyla pozorována zvýšená frekvence aneuploidie, naopak u odrůd FuRs0142, Lofa a FLM aneuploidie klesala a u odrůdy Spring Green byla frekvence aneuploidie v obou generacích stejná. Podobně vysokou frekvenci aneuploidie u různých odrůd *Festulolium* zaznamenali i Kopecký *et al.* (2006).

U všech analyzovaných rostlin byl pozorován značný rozdíl v zastoupení rodičovských genomů. Chromatin jílku naprosto dominoval, zatímco chromatin kostřavy se vyskytoval pouze ve formě jednoho či několika málo introgresovaných segmentů, velmi vzácně ve formě celých chromozomů původem z kostřavy. U některých rostlin došlo k úplné eliminaci kostřavového chromatinu. Takovéto genomové složení bylo očekávané a je způsobené zpětným křížením do jílku, které bylo v průběhu odvození všech čtyř odrůd použito. Kopecký *et al.* (2005, 2006) charakterizovali genomové složení u cca 26 komerčních odrůd *Festulolium* pomocí genomové *in situ* hybridizace. U odrůd Spring Green, Lofa i FuRs0142 (Kopecký *et al.*, 2018) byla pozorována převaha jílkového chromatinu nad kostřavovým či úplná eliminace chromatinu kostřavy, stejně tomu bylo i v experimentu této diplomové práce. Odrůdy Spring Green a FuRs0142 mají v genomech více kostřavového chromatinu než rostliny odrůdy Lofa, u kterých se vyskytoval pouze jeden či několik málo segmentů kostřavového chromatinu. U žádné rostliny odrůdy Lofa v rámci experimentu této diplomové práce a analýzy provedené Kopeckým *et al.* (2005) nebyl přítomen kompletní kostřavový chromozom. U rostlin této odrůdy zjistili značnou dominanci jílkového genomu a jeden či více segmentů chromatinu

košťavy byly pozorovány pouze u 6 z 29 rostlin. V rámci této diplomové práce byl košťavový chromatin zjištěn u 13 z 28 rostlin první generace, což je téměř dvojnásobný počet rostlin, než zjistili Kopecký *et al.* (2005). U odrůdy Spring Green cytogenetická analýza provedená Kopeckým *et al.* (2006) odhalila nižší počet kompletních chromozomů původem z košťavy (pouze 0,2), než bylo zjištěno v rámci tohoto experimentu, kdy rostliny měly průměrně 0,5 kompletních košťavových chromozomů. Počet rekombinovaných chromozomů byl v obou analýzách přibližně stejný (4,6 resp. 4,4) a rostliny měly průměrně cca 22 chromozomů původem z jílku. Rozdíly ve výsledcích analýz mohou být způsobené např. rozdílnou generací (zde nemůžeme říci, které generace byly použity v rámci jejich a této diplomové práce) analyzovaných rostlin či malým počtem analyzovaných rostlin.

S nerovnoměrným zastoupením rodičovských genomů souvisí problematika stability hybridního genomu a posunu v genomovém složení v následujících generacích. U většiny analyzovaných rostlin byl pozorován posun v genomovém složení ve prospěch jílkového genomu. U odrůd Spring Green a FuRs0142 došlo v průběhu jedné generace k redukci 27 % resp. 32 % košťavového chromatinu. Při stejné úrovni posunu v genomovém složení tak lze očekávat úplnou eliminaci košťavového chromatinu už po cca čtyřech generacích. U odrůd Lofa i FLM byl ve skupině I, kdy spolu byly sprášeny pouze rostliny s košťavovým chromatinem, pozorován mírný pokles košťavového chromatinu a posun v genomovém složení z generace na generaci ve prospěch jílku. Eliminace chromatinu košťavy byla pozorována i v případě skupin IIb obou odrůd. Pokud spolu byly sprášeny rostliny s i bez košťavového chromatinu a následně provedená selekce rostlin s košťavovým chromatinem, byl u obou odrůd zjištěn mírný nárůst košťavového chromatinu.

Introgresní typ odrůd *Festulolium* se tak zdá pro praktické šlechtění jako nevhodný. Z experimentů této diplomové práce je zjevné, že bez selekce rostlin dojde dříve či později k úplné eliminaci košťavového chromatinu a návratu k čistě jílkové formě. Na rozdíl od introgresních odrůd se jeví použití amfiploidie jako vhodnější. Stabilitou jejich genomů se zabývali Kopecký *et al.* (2017). Přestože v genomech tří generací amfiploidních odrůd (Perun, Perseus a Hostýn) vzniklých hybridizací *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* dominoval jílkový genom, v dalších generacích nedocházelo k jeho výraznému zvýšení a podíl rodičovských genomů byl relativně stabilizován. Stabilitu genomového složení u generací F<sub>2</sub>–F<sub>8</sub> hybridů *Festuca pratensis* Huds. (2n = 4x = 28) x *Lolium perenne* (2n = 4x = 28) studovali Zwierzykowski *et al.* (2006, 2011). Pomocí genomové *in situ* hybridizace zjistili, že v následujících generacích docházelo ke zvyšování podílu jílkového chromatinu v hybridním genomu. Z výsledků analýzy však bylo zjištěno, že podíl rodičovských genomů se mezi



generacemi F<sub>7</sub>–F<sub>8</sub> zřejmě stabilizuje. Nicméně ke křížení byly přednostně vybírány rostliny nesoucí výhodné agronomické vlastnosti jílku, což mohlo ovlivnit výsledky této studie. Proto Zwierzykowski *et al.* (2012) provedli analýzu znovu u generací F<sub>2</sub>–F<sub>4</sub> s náhodným výběrem rostlin. Výsledky analýzy se shodovaly s výsledky první studie, pouze posun ve prospěch jílkového genomu probíhal pomaleji.

Mechanismus, který je příčinou dominance genomu jednoho z rodičovských druhů nad druhým, není dosud znám, avšak byly navrženy různé teorie, např. konkurence gamet, účinek opylení, či centromerický posun (centromeric drive) v samičí meióze (Jones *et Pašakinskiene*, 2005). Pro šlechtitele představuje tento jev závažný problém. Jak stabilní jsou registrované odrůdy, které se komerčně využívají na trhu s osivou? Je nežádoucí, aby v dalších generacích křížení došlo k úplné eliminaci jednoho z rodičovských genomů. Jelikož je stabilita genomového složení značně ovlivněna párováním a rekombinováním homeologních chromozomů v průběhu meiózy, možným řešením, jak udržet hybridní genom stabilní, by bylo nalezení či vnesení regulačního mechanismu zabraňujícímu párování homeologních chromozomů. Takovéto genetické systémy se přirozeně vyskytují u pšenice seté (Riley *et Chapman*, 1958; Sears *et Okamoto*, 1958), brukve řepky (Jenczewski *et al.*, 2003), ale také u některých zástupců rodu kostřav (*Festuca arundinacea*, *Festuca arundinacea* subsp. *glaucescens*, *Festuca pratensis* subsp. *apennina* a *Festuca mairei*; Clarke *et al.*, 1976; Jauhar, 1975; Kopecký *et al.*, 2009b). U druhů, které se k mezirodové hybridizaci nejčastěji používají, tedy u diploidní kostřavy luční a obou jílků, se však regulační systém nevyskytuje (Kopecký *et al.*, 2009b). Pro další šlechtění tak plané příbuzné druhy, především *Festuca arundinacea* subsp. *glaucescens* a *Festuca mairei*, představují cenný zdroj nejen odolnosti k abiotickým stresům, která byla u obou druhů pozorována, ale i systému zabraňujícímu párování homeologních chromozomů. Tím by mohlo dojít k vytvoření nových mezirodových kříženců, které by mohly mít stabilní genom bez posunu v dalších generacích.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo provést cytogenetickou analýzu genomového složení a studovat jeho stabilitu v následující generaci u čtyř introgresních odrůd *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium*): Spring Green, FuRs0142, Lofa a FLM, které byly získány křížením jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum*) nebo jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) s kostřavou luční (*Festuca pratensis*) či kostřavou rákosovitou (*Festuca arundinacea*).

Pomocí genomové *in situ* hybridizace byla u všech studovaných rostlin zjištěna vysoká frekvence aneuploidie a nevyvážené zastoupení rodičovských genomů. V následující generaci byl u většiny analyzovaných rostlin zaznamenán posun v genomovém složení ve prospěch jílkového genomu, který značně převažoval nad genomem kostřavovým. Nicméně v případě sprášení rostlin s introgresí i bez introgrese a následné selekce rostlin s kostřavovým chromatinem byl u odrůd Lofa i FLM pozorován z generace na generaci mírný nárůst kostřavového chromatinu.

Z výsledků cytogenetické analýzy vyplývá, že introgresní odrůdy *Festulolium* nejsou příliš vhodné pro praktické šlechtění z důvodu nestability hybridního genomu, který má za následek zvyšování podílu jílkového genomu v následujících generacích. Pokud nebudou rostliny předem selektovány, může časem dojít až k úplné eliminaci kostřavového chromatinu.

## 8 Literatura

**Allender C. J., King G. J. (2010):** Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC plant biology* 10(1): 54.

**Alm V., Fang C., Busso C. S., Devos K. M., Vollan K., Grieg Z. R. O. A., Rognli O. A. (2003):** A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other *Poaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics* 108(1): 25–40.

**Ananthawat-Jonsson K., Heslop-Harrison J. P. (1996):** Establishing relationships between closely related species using total genomic DNA as a probe. In: Clapp J. P. (eds.) *Species Diagnostics Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 50. Humana Press. pp. 209–225.

**Bartoš J., Sandve S. R., Kölliker R., Kopecký D., Christelová P., Stočes Š., Østrem L., Larsen A., Kilian A., Rognli O. A., Doležel J. (2011):** Genetic mapping of DArT markers in the *Festuca–Lolium* complex and their use in freezing tolerance association analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 122(6): 1133–1147.

**Borrill M., Tyler B. F., Morgan W. G. (1976):** Studies in *Festuca* 7. Chromosome atlas (Part 2), an appraisal of chromosome race distribution and ecology, including *Festuca pratensis* var. *apennina* (DeNot) Hack. - tetraploid. *Cytologia* 41: 219–236.

**Buckner R. C., Boling J. A., Burrus II P. B., Bush L. P., Hemken R. A. (1983):** Registration of Johnstone tall fescue. *Crop Science* 23: 399–400.

**Buckner R. C., Burrus P. B., Bush L. P. (1977):** Registration of Kenhy tall fescue. *Crop Science* 17: 672–673.

**Byrne S. L., Nagy I., Pfeifer M., Armstead I., Swain S., Studer B., Mayer K., Campbell J. D., Czaban A., Hentrup S., Panitz F., Bendixen C., Hedegaard J., Caccamo M., Asp T. (2015):** A synteny-based draft genome sequence of the forage grass *Lolium perenne*. *The plant journal* 84(4): 816–826.

**Cai H., Stewart A., Inoue M., Yuyma N., Hirata M. (2011):** *Lolium*. In: Kole C. (eds.) *Wild Crop Relatives. Genomic and Breeding Resources Millets and Grasses*. Springer, Verlag Berlin, Heidelberg. pp.153–164.

**Casler M. D., Pitts P. G., Rose-Fricke C., Bilkey P. C., Wipff J. K. (2001):** Registration of Spring Green *Festulolium*. *Crop Science* 41(4): 1365–1365.

**Catalán P., Torrecilla P., Rodriguez J. A. L., Olmstead R. G. (2004):** Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (*Poeae*, *Pooideae*) inferred from ITS and *trnL-F* sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* 31(2): 517–541.

**Clarke J., Chandrasekharan P., Thomas H. (1976):** Studies in *Festuca* 9. Cytological studies of *Festuca pratensis* var. *apennina* (De Not.) Hack. (2n = 28). *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 77: 205–214.

**Clayton W. D., Renvoize S. A. (1986):** Genera graminum: Grasses of the World. Kew Bull, Addit. Ser 13: 1–389.

**Černoč V., Našinec I., Šrámek P. (2003):** Share of grasslands on landscape forming in the Czech Republic. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 39: 158–162.

**Dhawan O. P., Lavania U. C. (1996):** Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica 87(2): 81–89.

**Diekmann K., Hodkinson T. R., Wolfe K. H., van den Bekerom R., Dix P. J., Barth S. (2009):** Complete chloroplast genome sequence of a major allogamous forage species, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). DNA research 16(3): 165–176.

**Dierking R., Azhaguvel P., Kallenbach R., Saha M., Bouton J., Chekhovskiy K., Kopecký D., Hopkins A. (2015):** Linkage maps of a mediterranean x continental tall fescue population and their comparative analysis with other *Poaceae* species. The Plant Genome 8(1).

**Donnison I. S., O'Sullivan D. M., Thomas A., Canter P., Moore B., Armstead I., Thomas H., Edwards K., King I. P. (2005):** Construction of a *Festuca pratensis* BAC library for map-based cloning in *Festulolium* substitution lines. Theoretical and Applied Genetics 110(5): 846–851.

**Eizenga G. C., Buckner R. C. (1986):** Cytological and isozyme evaluation of tall fescue x Italian ryegrass hybrids. Plant breeding 97(4): 340–344.

**Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. (2011):** A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PloS one 6(5): e19379.

**Farrar K., Asp T., Lübberstedt T., Xu M., Thomas A. M., Christiansen C., Humphreys M. O., Donnison I. S. (2007):** Construction of two *Lolium perenne* BAC libraries and identification of BACs containing candidate genes for disease resistance and forage quality. Molecular Breeding 19(1): 15–23.

**Farrell J. D., Byrne S., Paina C., Asp T. (2014):** *De novo* assembly of the perennial ryegrass transcriptome using an RNA-Seq strategy. PloS one 9(8): e103567.

**Fojtík A. (1994):** Methods of grass improvement used at the Plant Breeding Station Hladke Zivotice. Genetica Polonica 35A: 25–31.

**Fojtík A. (1998):** Šlechtění a využití *Festulolium* v České Republice. Proc National Conference *Festulolium* – Achievements and Perspectives, Poznań, Poland, November 1998, pp 27–32.

**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.

**Gall J. G., Pardue M. L. (1969):** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences 63(2): 378–383.

**Ghesquière M., Emile J. C., Jadas-Hécart J., Mousset C., Traineau R., Poisson C. (1996):** First *in vivo* assessment of feeding value of *Festulolium* hybrids derived from *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* and selection for palatability. *Plant breeding* 115(4): 238–244.

**Ghesquière M., Humphreys M. W., Zwierzykowski Z. (2010):** *Festulolium*. In: Boller B, Posselt U. K., Veronesi F. (eds.): *Fodder crops and amenity grasses*. Book series: *Handbook of plant breeding* 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 293–316.

**Gillies C. B. (1989):** Chromosome pairing and fertility in polyploids. In: Gillies C. B., (Ed) *Fertility and Chromosome Pairing: Recent Studies in Plants and Animals*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp. 137–176.

**Goff S. A., Ricke D., Lan T. H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B. M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W. L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T. C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R. M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. (2002):** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296(5565): 92–100.

**Grant V. (1981):** *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York.

**Griffiths S., Sharp R., Foote T. N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moore G. (2006):** Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439(7077): 749–752.

**Gross B. L., Rieseberg L. H. (2004):** The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of heredity* 96(3): 241–252.

**Hackel E. (1882):** *Monographia Festucarum Europearum*. Theodor Fischer, Kassel et Berlin.

**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(1): 303.

**Heslop-Harrison J. S., Schwarzacher T. (2011):** Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* 66(1): 18–33.

**Houdek I., Černoč V. (2017):** 70 let od vzniku šlechtitelské stanice v Hladkých Životicích, 60 let šlechtění trav a jetelů. *Úroda* (12). online: [https://c.vuvt.cz/files/aktualni\\_poznatky/2017\\_vedecka\\_priloha\\_uroda\\_12.pdf](https://c.vuvt.cz/files/aktualni_poznatky/2017_vedecka_priloha_uroda_12.pdf)

**Humphreys M. W., Harper J. A. (2008):** *Festulolium loliaceum*, an understudied natural UK grass hybrid species that may provide benefits to UK grasslands withstanding the onsets of climate change. *Crop Wild Relative* 6: 7–9.

- Humphreys M. W., Pašakinskiene, I. (1996):** Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. *Heredity* 77(5): 530–534.
- Humphreys M. W., Thomas H. (1993):** Improved drought resistance in introgression lines derived from *Lolium multiflorum* x *Festuca arundinacea* hybrids. *Plant breeding* 111(2): 155–161.
- 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.
- Humphreys M., Feuerstein U., Vandewalle M., Baert J. (2010):** Ryegrasses. In: Boller B. Posselt U. K., Veronesi F. (eds.): *Fodder crops and amenity grasses*. book series: *Handbook of plant breeding* 5, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 211–260.
- Charmet G., Ravel C., Balfourier F. (1997):** Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theoretical and Applied Genetics* 94(8): 1038–1046.
- Chen Z. J. (2007):** Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58: 377–406.
- 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(3): 932–957.
- Inoue M., Gao Z., Hirata M., Fujimori M., Cai H. (2004):** Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers. *Genome* 47(1): 57–65.
- International Barley Genome Sequencing Consortium (IBGSC) (2017):** A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544: 427–433.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2018):** Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361 (6403): eaar7191.
- Jaccoud D., Peng K., Feinsein D., Kilian A. (2001):** Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29: e25.
- Jauhar P. P. (1975):** Genetic control of diploid-like meiosis in hexaploid tall fescue. *Nature* 254: 595–597.
- Jauhar P. P. (1993):** Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. *Relevance to Breeding*. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* Vol. 18. Springer-Verlag, Berlin.

- Jenczewski E., Eber F., Grimaud A., Huet S., Lucas M. O., Monod H., Chevre A. M. (2003):** PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (*Brassica napus*) haploids. *Genetics* 164(2): 645–653.
- Jenkin T. J. (1933):** Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses. Initial crosses. *Journal of genetics* 28(2): 205–264.
- Jenkin T. J. (1959):** Fescue species (*Festuca* L.). In *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, 2. auflage, Band IV. Paul Parey un Berlin und Hamburg, pp. 418–434.
- John H. A., Birnstiel M. L., Jones K. W. (1969):** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223(5206): 582.
- Jones E., Dupal M., Dumsday J., Hughes L., Forster J. (2002):** An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105(4): 577–584.
- Jones N., Pašakinskiene I. (2005):** Genome conflict in the gramineae. *New Phytologist* 165(2): 391–410.
- Kannan T. P., Zilfalil B. A. (2009):** Cytogenetics: past, present and future. *The Malaysian journal of medical sciences* 16(2), 4–9.
- Khrustaleva L. I., Kik C. (1998):** Cytogenetical studies in the bridge cross *Allium cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*). *Theoretical and Applied Genetics* 96(1): 8–14.
- Khrustaleva L., Mardini M., Kudryavtseva N., Alizhanova R., Romanov D., Sokolov P., Monakhos G. (2019):** The Power of Genomic *in situ* Hybridization (GISH) in Interspecific Breeding of Bulb Onion (*Allium cepa* L.) Resistant to Downy Mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.). *Plants*, 8(2): 36.
- Kihara H., Ono T. (1926):** Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 4: 475–481.
- Kölliker R., Stadelmann F. J., Reidy B., Nösberger J. (1999):** Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomerata* L. *Euphytica* 106(3): 261–270.
- Kopecký D., Studer B. (2014):** Emerging technologies advancing forage and turf grass genomics. *Biotechnology advances* 32(1): 190–199.
- Kopecký D., Baert J., Barth S., Bartoš J., Černoč V., Doležel J., Grogan D., Harper J., Humphreys M., Książczyk T., Østrem L., Paszkowski E., Sokolovič D., Zwierzykowski Z., Ghesquiére M. (2018):** Genotyping of *Festulolium* Cultivars Involved in EUCARPIA Multi-site Trial Using DArT Markers and GISH. In: Brazauskas G., Statkeviciute G., Jonaviciene K. (eds.): *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*. Springer International Publishing. pp. 155-159.

**Kopecký D., Bartoš J., Christelová P., Černoch V., Kilian A., Doležel J. (2011):** Genomic constitution of *Festuca* x *Lolium* hybrids revealed by the DArTFest array. *Theoretical and applied genetics* 122(2): 355–363.

**Kopecký D., Bartoš J., Lukaszewski A. J., Baird J. H., Černoch V., Kölliker R., Rogli O. A., Blois H., Caig V., Lübberstedt T., Studer B., Shaw P., Doležel J., Kilian A. (2009a):** Development and mapping of DArT markers within the *Festuca-Lolium* complex. *BMC Genomics* 10(1): 473.

**Kopecký D., Bartoš J., Zwierzykowski Z., Doležel J. (2009b):** Chromosome pairing of individual genomes in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), its progenitors, and hybrids with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Cytogenetic and genome research* 124(2): 170–178.

**Kopecký D., Harper J., Bartoš J., Gasior D., Vrána J., Hřibová E., Boller B., Ardenghi N. M. G., Šimoníková D., Doležel J., Humphreys M. W. (2016):** An increasing need for productive and stress resilient *Festulolium* amphiploids: what can be learnt from the stable genomic composition of *Festuca pratensis* subsp. *apennina* (De Not.) Hegi? *Frontiers in Environmental Science* 4: 66.

**Kopecký D., Havráňková 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): 162–172.

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

**Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J. (2005):** Genomic constitution of *Festulolium* cultivars released in the Czech Republic. *Plant breeding* 124(5): 454–458.

**Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J. (2008):** Cytogenetics of *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium* hybrids). *Cytogenetic and genome research* 120(3–4): 370–383.

**Kopecký D., Martis M., Číhalíková J., Hřibová E., Vrána J., Bartoš J., Kopecká J., Cattonaro F., Stočes Š., Novák P., Neumann P., Macas J., Šimková H., Studer B., Asp T., Baird J. H., Navrátil P., Karafiátová M., Kubaláková M., Šafář J., Mayer K., Doležel J. (2013):** Flow sorting and sequencing meadow fescue chromosome 4F. *Plant physiology* 163(3): 1323–1337.

**Kopecký D., Šimoníková D., Ghesquière M., Doležel J. (2017):** Stability of Genome Composition and Recombination between Homoeologous Chromosomes in *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium*) Cultivars. *Cytogenetic and genome research* 151(2): 106–114.



- Kosmala A., Skibinska M., Zwierzykowski Z., Humphreys M. W., Rapacz M., Joks W. (2003):** Introgression of genes for abiotic stress resistance from *Festuca pratensis* and *F. arundinacea* into *Lolium multiflorum* germplasm. *Vortr Pflanzenzuchtg* 59: 225–231.
- Kosmala A., Zwierzykowski Z., Gašior D., Rapacz M., Zwierzykowska E., Humphreys M. W. (2006):** GISH/FISH mapping of genes for freezing tolerance transferred from *Festuca pratensis* to *Lolium multiflorum*. *Heredity* 96(3): 243–251.
- Křivánková A., Kopecký D., Stočes Š., Doležel J., Hřibová E. (2017):** Repetitive DNA: A Versatile Tool for Karyotyping in *Festuca pratensis* Huds. *Cytogenetic and genome research* 151(2): 96–105.
- Książczyk T., Taciak M., Zwierzykowski Z. (2010):** Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. *Journal of Applied Genetics* 51(4): 449–460.
- Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C. (1982):** Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79(14): 4381–4385.
- Le H. T., Armstrong K. C., Miki B. (1989):** Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Molecular Biology Reporter* 7(2):150–158.
- Leitch A. R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I. J. (1994):** *In situ* hybridization: a practical guide. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Levy A. A., Feldman M. (2002):** The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant physiology* 130(4): 1587–1593.
- Lewis E. J. (1977):** Studies in *Festuca* IV. A phyletic study of *Festuca pratensis* var. *apennina* (De Not.) Hack., hybridization with synthetic tetraploid *F. pratensis* Huds. *Genetica* 47(1): 59–64.
- Lewis E. J., Tyler B. F., Chorlton K. H. (1973):** Development of *Lolium-Festuca* hybrids. *Annual Report of the Welsh Plant Breeding Station 1972*: pp. 34–37.
- Linnington S., Bean E. W., Tyler B. F. (1979):** The effects of temperature upon seed germination in *Festuca pratensis* var. *apennina*. *Journal of applied ecology*: 933–938.
- 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.
- Lukaszewski A. J., Lapinski B., Rybka K. (2005):** Limitations of in situ hybridization with total genomic DNA in routine screening for alien introgression in wheat. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 373–377.

- Lumaret R., Bowman C. M., Dyer T. A. (1989):** Autopolyploidy in *Dactylis glomerata* L.: further evidence from studies of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics* 78(3): 393–399.
- Lysak M. A. (2018):** *Brassicales*: an update on chromosomal evolution and ancient polyploidy. *Plant Systematics and Evolution* 304(6): 757–762.
- Majka J., Majka M., Kwiatek M., Wiśniewska H. (2017):** Similarities and differences in the nuclear genome organization within *Pooideae* species revealed by comparative genomic *in situ* hybridization (GISH). *Journal of Applied Genetics* 58: 151–161.
- Malik C. P., Thomas P. T. (1966):** Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species. *Caryologia* 19: 167–196.
- Masoudi-Nejad A., Nasuda S., McIntosh R. A., Endo T. R. (2002):** Transfer of rye chromosome segments to wheat by a gametocidal system. *Chromosome Research* 10(5): 349–357.
- Masterson J. (1994):** Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264(5157): 421–424.
- Mello-Sampayo T. (1971):** Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nature: New Biology* 230: 23–24.
- Mergoum M., Singh P. K., Pena R. J., Lozano-del Río A. J., Cooper K. V., Salmon D. F., Macpherson, H. G. (2009):** Triticale: a “new” crop with old challenges. In: Cereana M. (eds.) *Cereals. Handbook of Plant Breeding*, vol 3. Springer, New York. (pp. 267–287).
- Momotaz A., Forster J. W., Yamada T. (2004):** Identification of cultivars and accessions of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium* hybrids through the detection of simple sequence repeat polymorphism. *Plant Breeding* 123(4): 370–376.
- Morgan W. G. (1976):** A technique for the production of polyploids in grasses. *Euphytica* 25(1): 443–446.
- Nagaharu U. (1935):** Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* 7(7): 389–452.
- Otto S. P., Whitton J. (2000):** Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics* 34(1): 401–437.
- Pašakinskiene I. (2000):** Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perenne* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. *Plant breeding* 119(2): 185–187.
- Pašakinskiene I., Griffiths C. M., Bettany A. J. E., Paplauskiene V., Humphreys M. W. (2000):** Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species-specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. *Theoretical and Applied Genetics* 100(3–4): 384–390.

- Parokony A. S., Marshall J. A., Bennett M. D., Cocking E. C., Davey M. R., Power J. B. (1997):** Homoeologous pairing and recombination in backcross derivatives of tomato somatic hybrids [*Lycopersicon esculentum* (+) *L. peruvianum*]. Theoretical and applied genetics 94 (6–7): 713–723.
- Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A. K., Chapman J., Feltus F. A., Gowik U., Grigoriev I. V., Lyons E., Maher C. A., Martis M., Narechania A., Ollillar R. P., Penning B. W., Salamov A. A., Wang Y., Zhang L., Carpita N. C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C. T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M. C., Ming R., Peterson D. G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K. F., Messing J., Rokhsar D. S. (2009):** The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. Nature 457(7229): 551.
- Petersen G., Seberg O., Yde M., Berthelsen K. (2006):** Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). Molecular phylogenetics and evolution 39(1): 70–82.
- Ramsey J., Schemske D.W. (2002):** Neopolyploidy in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics 33: 589–639.
- Ramzan F., Younis A., Lim K. B. (2017):** Application of genomic *in situ* hybridization in horticultural science. International journal of genomics 2017: 1–12.
- Rayburn A. L., Gill B. S. (1985):** Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. Journal of Heredity 76(2): 78–81.
- Reed K. F. M., Clement S. L., Feely W. F., Clark B. (2004):** Improving tall fescue (*Festuca arundinacea*) for cool-season vigour. Australian Journal of Experimental Agriculture 44(9): 873–881.
- Regal V., Šindelářová J. (1970):** Atlas nejdůležitějších trav. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- Renny-Byfield S., Wendel J. F. (2014):** Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. American journal of botany 101(10): 1711–1725.
- Ribaut J. M., Hoisington D. (1998):** Marker-assisted selection: new tools and strategies. Trends in Plant Science 3(6): 236–239.
- Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007):** Plant speciation. Science 317: 910–914.
- Riley R., Chapman V. (1958):** Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature 182: 713–715.
- Robson M. J. (1967):** A comparison of British and North African varieties of tall fescue (*Festuca arundinacea*). I. Leaf growth during winter and the effects on it of temperature and day length. Journal of Applied Ecology 4: 475–484.

**Roderick H. W., Morgan W. G., Harper J. A., Thomas H. M. (2003):** Introgression of crown rust (*Puccinia coronata*) resistance from meadow fescue (*Festuca pratensis*) into Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and physical mapping of the locus. *Heredity* 91: 396–400.

**Rognli O. A., Saha M. C., Bhamidimarri S., van der Heijden S. (2010):** Fescues. In: Boller B., Posselt U. K., Veronesi F. (eds.): Fodder crops and amenity grasses. Book series: Handbook of plant breeding 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 261–292.

**Saha M. C., Mian R., Zwonitzer J. C., Chekhovskiy K., Hopkins A. A. (2005):** An SSR-and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theoretical and Applied Genetics* 110(2): 323–336.

**Sears E. R., Okamoto M. (1958):** Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proc. 10th Int. Congr. Genet., Montreal* 2: 258–259.

**Seberg O., Petersen G. (2007):** Phylogeny of Triticeae (*Poaceae*) based on three organelle genes, two single-copy nuclear genes, and morphology. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 23(1): 362–371.

**Shahinul Islam S. M. (2010):** The Effect of Colchicine Pretreatment on Isolated Microspore Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science* 4(9): 660.

**Schmutz J., Cannon S. B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D. L., Song Q., Thelen J. J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G. D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M. K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X. C., Shinozaki K., Nguyen H. T., Wing R. A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R. C., Jackson S. A. (2010):** Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463(7278):178–183.

**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., Jeddelloh 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(5956): 1112–1115.

**Schwarzacher T. (2003):** DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome* 46(6): 953–962.

**Schwarzacher T., Heslop-Harrison P. (2000):** Practical *in situ* Hybridization. Bios Scientific Publishers Ltd. New York.

**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.

**Silva G. S., Souza M. M. (2013):** Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research* 12(3): 2953–2965.

**Soltis D. E., Soltis P. S. (1993):** Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical reviews in plant sciences* 12(3): 243–273.

**Soreng R. J., Peterson P. M., Romaschenko K., Davidse G., Zuloaga F. O., Judziewicz E. J., Filgueiras T. S., Davis J. I., Morrone O. (2015):** A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*). *Journal of Systematics and Evolution* 53(2): 117–137.

**Stace C. A., Bailey J. P. (1999):** The Value of Genomic *in situ* Hybridization (GISH) in Plant Taxonomic and Evolutionary Studies. In: Hollingsworth P. M., Bateman R. M., Gornall R. J., (eds.): *Molecular Systematics and Plant Evolution*. CRC Press, London. pp.199-210.

**Stanford E. H. (1951):** Tetrasomic inheritance in alfalfa. *Agronomy Journal* 43: 222–225.

**Stebbins G. L. (1971):** Chromosomal Evolution in Higher Plants. London: Edward Arnold. 216 pp.

**Stoček Š., Ruttink T., Bartoš J., Studer B., Yates S., Zwierzykowski Z., Abrouk M., Roldán-Ruiz I., Książczyk T., Rey E., Doležel J., Kopecký D. (2016):** Orthology guided transcriptome assembly of Italian ryegrass and meadow fescue for single-nucleotide polymorphism discovery. *The Plant Genome* 9(3).

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

- Thomas H. M., Morgan W. G., Meredith M. R., Humphreys M. W., Leggett J. M. (1994):** Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* by genomic *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 88(8): 909–913.
- Thomas H., Evans C., Thomas H. M., Humphreys M. W., Morgan G., Hauck B., Donnison I. (1997):** Introgression, tagging and expression of a leaf senescence gene in *Festulolium*. *New Phytologist* 137(1): 29–34.
- Thomas H., Humphreys M. O. (1991):** Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *Journal of Agricultural Science* 117: 1–8.
- Thomas H., Rajhathy T. (1967):** Chromosome relationships between *Avena sativa* (6x) and *Avena pilosa* (2x). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 9(1): 154–162.
- Thompson J. N., Merg K. F. (2008):** Evolution of polyploidy and the diversification of plant–pollinator interactions. *Ecology* 89(8): 2197–2206.
- Torrecilla P., Catalán P. (2002):** Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (*Poaceae*) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany*: 241–251.
- Tomaszewski C., Byrne S. L., Foito A., Kildea S., Kopecký D., Doležel J., Heslop-Harrison J. S., Stewart D., Barth S. (2012):** Genetic linkage mapping in an F2 perennial ryegrass population using DArT markers. *Plant breeding* 131(2): 345–349.
- Trask B. J. (1991):** Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* 7(5): 149–154.
- Tsuchiya K. D. (2011):** Fluorescence *in situ* hybridization. *Clinics in laboratory medicine* 31(4): 525–542.
- Tzvelev N.N. (1982):** Poryadok zlaki (*Poales*). *Zhizn'Rastenii* 6: 341–378.
- Wang Z. Y., Ge Y. (2006):** Recent advances in genetic transformation of forage and turf grasses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42(1): 1–18.
- Wendel J. F. (2000):** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225–249.
- Wilkins P. W. (1991):** Breeding perennial ryegrass for agriculture. *Euphytica* 52(3): 201–214.
- Wilson A. S. (1875):** Wheat and rye hybrids. In: *Transactions and Proceedings of the Botanical Society, Edinburgh* 12: 286–288.
- Winter P., Kahl G. (1995):** Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4): 438–448.
- Wolfe K. H. (2001):** Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics* 2(5): 333.

**Xu W. W., Sleper D. A., Chao, S. (1995):** Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91 (6–7): 947–955.

**Yamada T. (2011):** *Festuca*. In: Kole C. (eds.): *Wild Crop Relatives, Genomic and Breeding Resources Millets and Grasses*. Springer, Verlag Berlin, Heidelberg, pp: 153–164.

**Yu J., Hu S., Wang J., Wong G. K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H. (2002):** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296(5565): 79–92.

**Zwierzykowski Z. (2004):** Amphiploid and introgression breeding within the *Lolium-Festuca* complex—achievements and perspectives. In: Yamada T., Takamizo T. (eds): *Development of a novel grass with environmental stress and high forage quality through intergeneric hybridization between Lolium and Festuca*. NARO, Tsukuba, pp 17–29.

**Zwierzykowski Z., Lukaszewski A. J., Naganowska B., Lesniewska A. (1999):** The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. *Genome* 42(4): 720–726.

**Zwierzykowski Z., Kosmala A., Zwierzykowska E., Jones N., Jokś W., Bocianowski J. (2006):** Genome balance in six successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* x *Lolium perenne*. *Theoretical and applied genetics* 113(3): 539–547.

**Zwierzykowski Z., Książczyk T., Taciak M., Zwierzykowska E., Jones N., Kosmala A. (2012):** Genome constitution in selected and unselected plants of F2-F4 generations derived from an allotetraploid *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* Hybrid. In: Barth S., Milbourne D., (eds.): *Breeding Strategies for Sustainable Forage and Turf Grass Improvement*, Edition: Part II, pp. 75–79, Springer, Amsterdam.

**Zwierzykowski Z., Rybczyjski J. J. (1981):** Studies on tetraploid hybrids of *Lolium multiflorum* Lam. (2n = 28) x *Festuca pratensis* Huds. (2n = 28): morphological characterization, fertility and chromosome number of hybrids in F1–F4 generations. *Genetica Polonica* 22: 295–303.

**Zwierzykowski Z., Tayyar R., Brunell M., Lukaszewski A. J. (1998):** Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *Journal of Heredity* 89(4): 324–328.

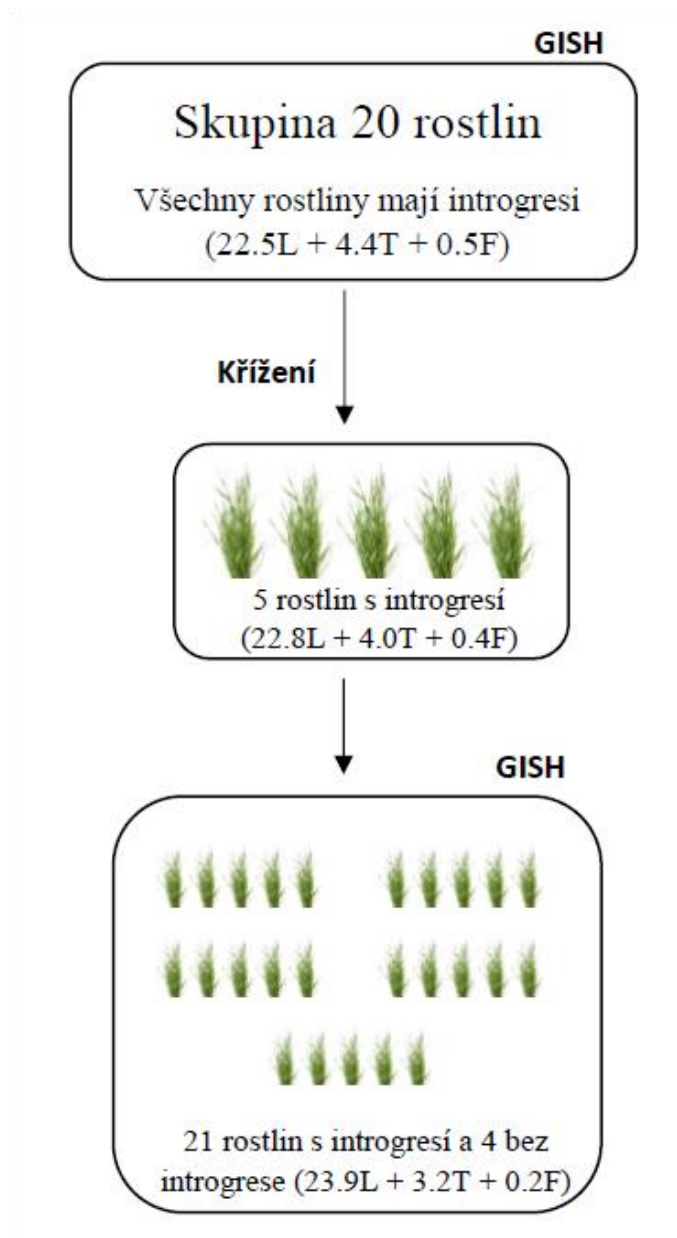
**Zwierzykowski Z., Zwierzykowska E., Taciak M., Jones N., Kosmala A., Krajewski P. (2008):** Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Research* 16(4): 575–585.

**Zwierzykowski Z., Zwierzykowska E., Taciak M., Kosmala A., Neil Jones R., Zwierzykowski W., Książczyk T., Krajewski, P. (2011):** Genomic structure and fertility in advanced breeding populations derived from an allotetraploid *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* cross. *Plant breeding* 130(4): 476–480.



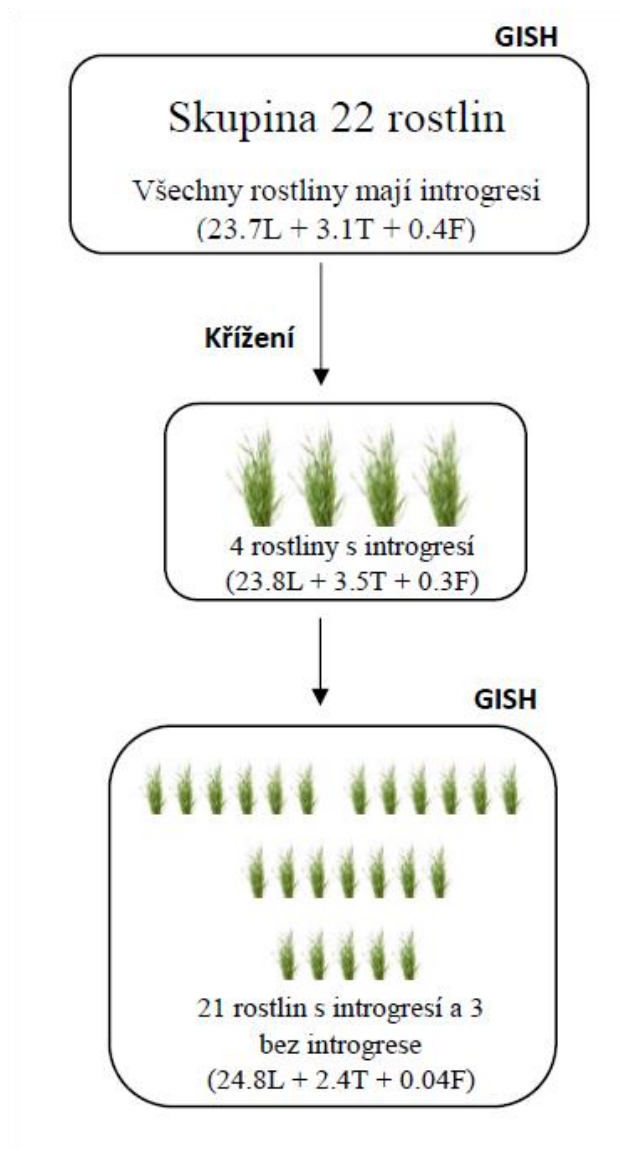
## 9 Přílohy

Příloha č.1: Schématická znázornění průběhu experimentu pro jednotlivé odrůdy *Festulolium*



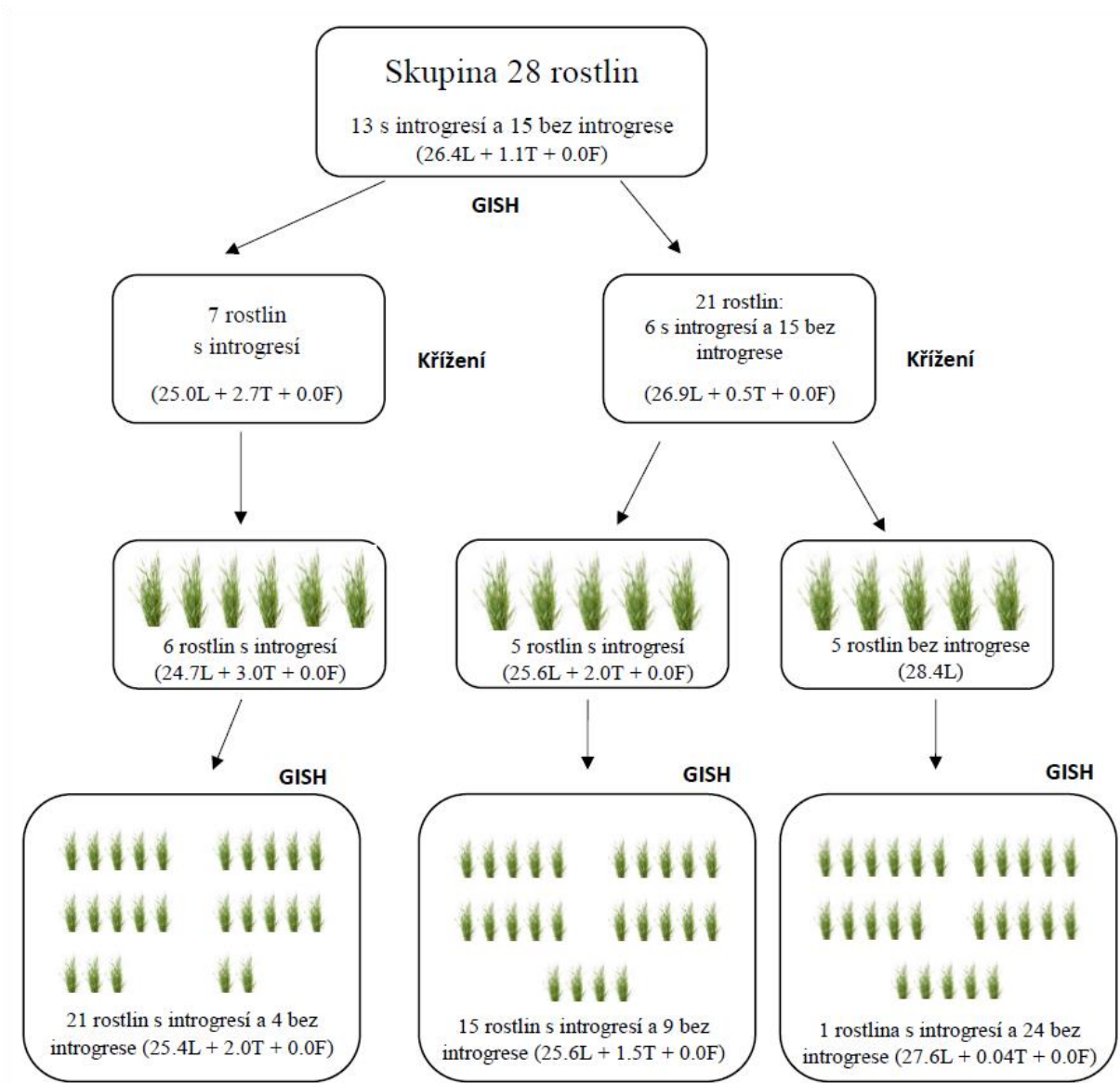
Obr. 4: Schématické znázornění průběhu experimentu u odruhy **Spring Green**

**Legenda:** L – průměrný počet chromozomů původem z jílku, T – průměrný počet chromozomů s translokací, F – průměrný počet chromozomů původem z kostřavy.



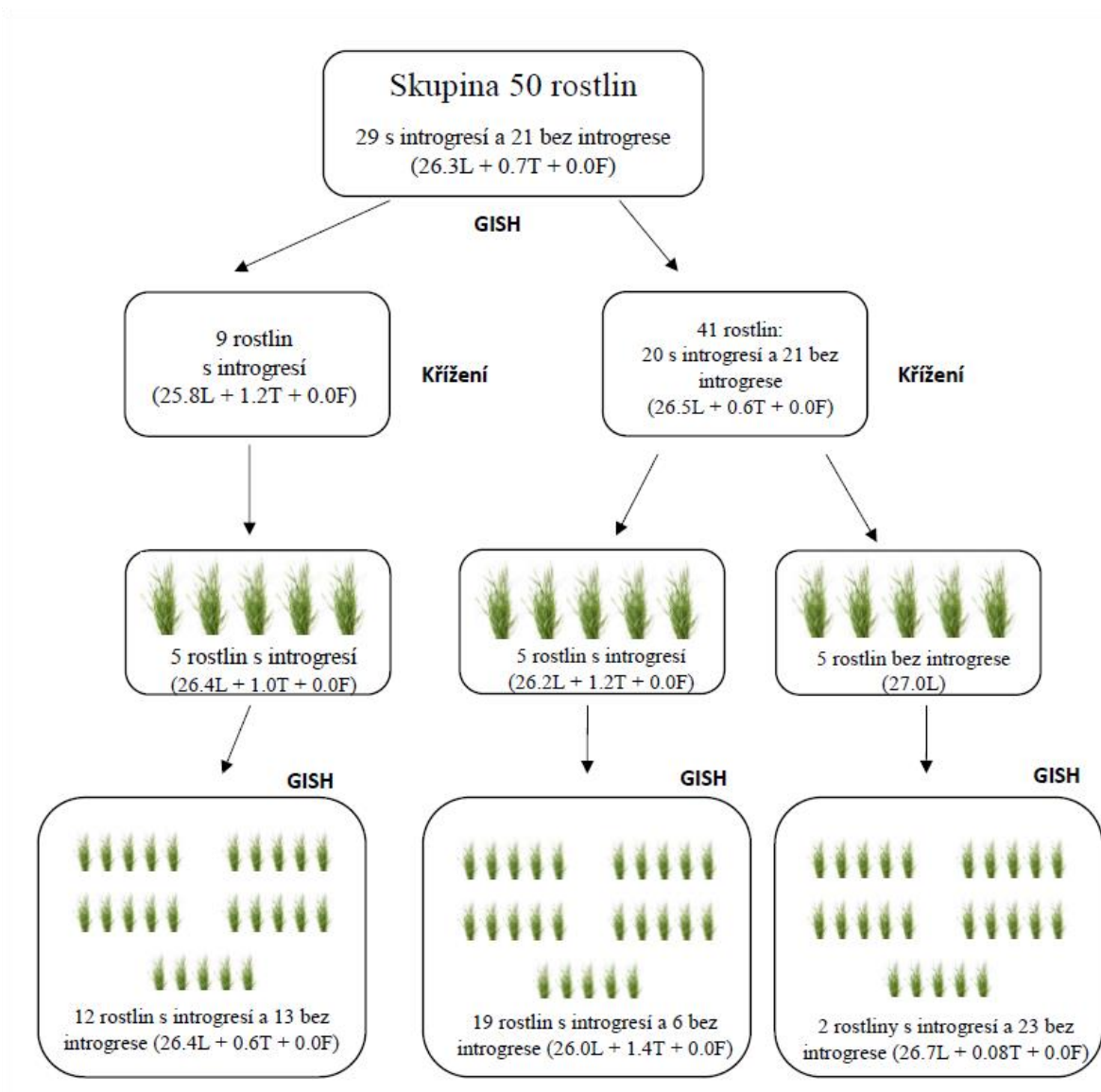
Obr. 5: Schématické znázornění průběhu experimentu u odruhy **FuRs0142**

**Legenda:** L – průměrný počet chromozomů původem z jílku, T – průměrný počet chromozomů s translokací, F – průměrný počet chromozomů původem z kostřavy.



Obr. 6: Schématické znázornění průběhu experimentu u odruhy **Lofa**

**Legenda:** L – průměrný počet chromozomů původem z jílku, T – průměrný počet chromozomů s translokací, F – průměrný počet chromozomů původem z kostřavy.



Obr. 7: Schématické znázornění průběhu experimentu u odruhy **FLM**

**Legenda:** L – průměrný počet chromozomů původem z jílku, T – průměrný počet chromozomů s translokací, F – průměrný počet chromozomů původem z kostřavy.