

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Bc. Jitka Kopecká

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Synchronizace buněčného cyklu kostravy luční
(*Festuca pratensis* Huds.)

Diplomová práce

Bc. Jitka Kopecká

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením školitele RNDr. Davida Kopeckého, Ph.D.

V Olomouci dne

Souhrn

Zástupci rodu kostřava (*Festuca* sp.) tvoří významnou součást travních směsí využívaných v pícninářství, používají se rovněž v travníkových směsích na osev hřišť, sportovišť a parků. Kostřavy jsou charakteristické rozsáhlým kořenovým systémem, zamezujícím erozi půdy. Dobře snášejí sucho a mráz a jsou odolné vůči většině houbových a plísňových chorob.

Genom trav není, na rozdíl od hospodářsky významnějších druhů, jako je pšenice a ječmen, příliš prostudován. Mezi metody umožňující získat dostatečné množství materiálu pro studium genomu (jader a chromozomů), patří synchronizace buněčného cyklu. Jako výchozí materiál pro tuto metodiku jsou vhodné meristematické buňky z kořenových špiček, které lze poměrně snadno získat z naklíčených semen.

V předkládané práci jsem zoptimalizovala metodiku synchronizace buněčného cyklu u kořenových meristémů kostřavy luční (*Festuca pratensis* Huds.). Při synchronizaci buněčného cyklu jsou buňky vystaveny podmínkám, které jim zabrání v plynulém průchodu cyklem. Dojde tak k nahromadění buněk v určité fázi buněčného cyklu. Po odstranění inhibičního činidla procházejí buňky cyklem synchronně a je možné určit optimální ozdravný čas (RT, recovery time), kdy je nejvyšší mitotická aktivita buněk. Po akumulaci metafázi jsou kořenové meristémy zafixovány pomocí formaldehydu. Následnou mechanickou homogenizací dojde k uvolnění buněk do lyzačního purfu. Takto vznikne suspenze, vhodná pro třídění jednotlivých chromozomů průtokovou cytometrií. Získáme tak velké množství metafázních chromozomů, které mají nepřeberné využití v rostlinné cytogenetice a genomice.

Summary

Fescue species belong to the grasses used for forage and turf purposes. They also play fundamental role in environment protection. Fescues are characterized by great ability to survive under biotic and abiotic stress (such as summer drought, winter freezing and fungal diseases). Genomes of the grasses are not widely studied unlike other economically important plants like wheat barley and rice. Cell cycle synchronization is one of the methods feasible to obtain sufficient quantities of nuclei and chromosomes for genomic and cytogenetic studies. The starting material for this method is meristematic tissue of root tips which can be obtained from germinated seeds.

In this work I optimized the method of cell cycle synchronization in root tip meristems of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). Synchronization of the cell cycle was reached by the accumulation of the cells in a certain phase of cell cycle followed by removal of a block agent and synchronous restart of cell cycle. Removal of the inhibitory agent enabled synchronous restart of mitosis in the cells. It was possible to determine recovery time (RT) optimal to reach the highest mitotic activity of the cells. The cells are thereafter fixed with formaldehyde mechanically homogenized and removed into the lysis buffer. Such suspension is suitable for sorting of individual chromosome(s) by flow cytometry. These sorted metaphase chromosomes can be used in many applications of grass genomics and cytogenetics.

Děkuji svému školiteli RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D. a RNDr. Jarmile Číhalíkové za odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Zdeňce Dubské, Mgr. Janu Vránovi Ph.D., Ing. Petru Navrátilovi a ostatním pracovníkům Laboratoře molekulární cytogenetiky a cytometrie na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci.

Obsah

1. Úvod	9
2. Charakteristika rodu <i>Festuca</i> a taxonomie	10
2.1. Kostřava luční.....	11
2.2. Hospodářské využití	12
2.3. Metody analýzy genomu kostřavy luční	13
3. Buněčný cyklus	16
3.1. Fáze buněčného cyklu.....	16
3.2. Mitotické dělení	16
3.3. Kontrolní body buněčného cyklu.....	17
3.4. Regulace buněčného cyklu	18
4. Synchronizace buněčného cyklu	19
4.1. Materiál používaný pro synchronizaci	19
4.2. Metody synchronizace	20
4.3. Používané agens.....	21
4.4. Průběh synchronizace	21
4.5. Akumulace metafází	22
4.6. Vlastnosti uměle synchronizované populace	23
4.7. Využití průtokové cytometrie	23
5. Cíle práce	25
6. Materiál a metodika	26
6.1. Rostlinný materiál.....	26
6.1.2. Příprava rostlinného materiálu	26
6.2. Metody a postup práce.....	27
6.2.1. Synchronizace buněčného cyklu	27
6.2.2. Akumulace metafází	28
6.2.3. Izolace chromozomů do suspenze.....	28
6.2.4. Flow cytometrická analýza	29
6.3. Souhrn postupů při optimalizaci buněčného cyklu	31
6.4. Média, pufry a roztoky.....	32
6.5. Přístroje.....	35
7. Výsledky	36
7.1. Příprava rostlinného materiálu.....	36
7.2. Synchronizace buněčného cyklu.....	36
7.3. Akumulace metafází	37
7.4. Izolace chromozomů do suspenze	39
7.5. Třídění chromozomů průtokovou cytometrií.....	40
7.6. Optimalizovaný protokol synchronizace buněčného cyklu, akumulace metafází a izolace chromozomů u kostřavy luční	43
8. Diskuze	46

9. Závěr	48
10. Literatura	49
11. Seznam použitých zkratek a symbolů.....	55
Přílohy	

1. Úvod

Rozšíření travních porostů nebylo v minulosti tak rozsáhlé, jak je tomu v současnosti. Dřívější ráz krajiny tvořily lesy a lesostepi. Trávy osidlovaly jen suché stepi v nejvýchodnější oblasti Evropy. Louky a pastviny byly vytvořeny uměle s rozvojem obhospodařování půdy, kdy původní lesní porosty byly vykáceny a nahrazeny zemědělskou půdou. Výše položené oblasti se začaly využívat jako pastviny. V současné době nalezneme trávy ve všech částech světa v řadě biotopů, dokonce i ve sladkých vodách. Většinou jsou to byliny s úzkou a dutou kolénkatou lodyhou (stéblem).

Trávy jsou přirozenou součástí nejen pastvin a luk, ale díky šlechtění okrasných odrůd je najdeme jako nedílnou součást parků, dětských hřišť, sportovišť a technických ploch na sídlištích, či podél pozemních komunikací. Velmi odolné druhy, mezi něž patří kostřava luční (*F. pratensis* Huds.), se využívají především v píceinářství jako krmiva. Kostřava luční je značně odolná vůči mechanickému poškození, především pak sešlapu. Vyniká rychlou regenerační schopností, což se projeví stálou zeleností oseté plochy, kdy ani v extrémních podmínkách sucha a mrazu nevznikají nevzhledné hnědé plochy.

Rozvoj molekulárních a cytogenetických metod vedl k hlubšímu poznání buňky, jádra a genomu. V mnoha případech se zavedení molekulárně-biologických metod projevilo v zefektivnění a zkrácení délky šlechtění u řady rostlinných a živočišných druhů. Cytogenetické metody poskytují cenné informace pro charakterizaci jednotlivých chromozomů a další studie jaderného genomu. Dostatečné množství materiálu pro cytogenetické studie poskytují buňky, nacházející se ve stejné fázi buněčného cyklu, které lze získat chemicky či fyzikálně navozenou synchronizací buněčného cyklu.

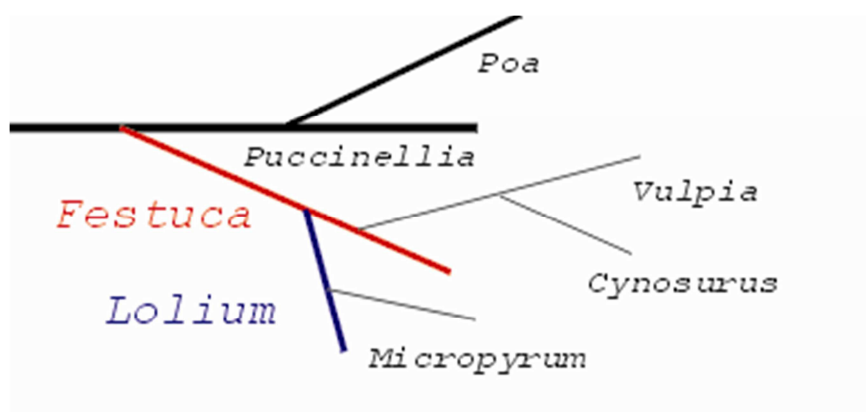
V této práci je vypracována metodika synchronizace buněčného cyklu u kostřavy luční. Optimalizací buněčného cyklu bylo získáno dostatečné množství buněk, vhodných pro třídění pomocí průtokové cytometrie a následné cytogenetické a genomové studie genomu kostřavy luční.

2. Charakteristika rodu *Festuca* a taxonomie

Kostřavy jsou hojně rozšířeným rodem trav zahrnujícím přes 550 druhů. Rostou na všech kontinentech mimo Antarktidu většinou v oblasti mírného pásu. Vyskytují se též v tropech a v horských oblastech (Clayton *et al.*, 2002).

Kostřavy patří do řádu lipnicotvaré *Poales* (starším názvem *Gramineae*), čeleď lipnicovité *Poaceae* (Catalán *et al.*, 2004). Od základní evoluční větve kostřav (Obr. 1) se odvozují menší rody jako mrvka (*Vulpia* sp.), jílek (*Lolium* sp.) či pohánka (*Cynosurus* sp.).

Rod kostřava je též evolučně blízce příbuzný s modelovým druhem *Brachypodium distachyon* ($2n = 10$).

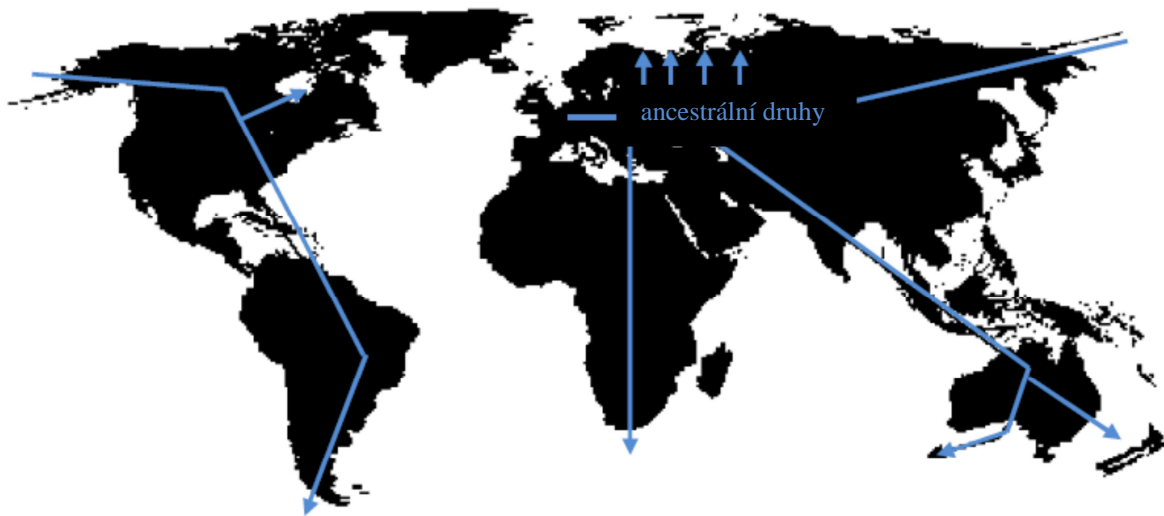


Obr. 1. Evoluční vztahy kostřav a blízkých příbuzných rodů. Z hlavní evoluční větve kostřav se vyvinul rod jílek (*Lolium* sp.). Mezi blízké příbuzné rody rodu kostřava patří rody mrvka (*Vulpia* sp.) a pohánka (*Cynosurus* sp., upraveno podle Clayton *et al.*, 1986).

Kostřavy se rozdělují na úzkolisté a širokolisté. Mezi širokolisté kostřavy patří kostřava luční (*F.pratensis* Huds.) a kostřava rákosovitá (*F.arundinacea* Schreb.). Kvetou od jara do léta rozvětvenými latami nebo hrozny, které mají dva i více klásků. Při určování jednotlivých druhů kostřav se vychází z tvaru tzv. jazýčku, který se nachází na rozhraní spodní části listu, který objímá lodyhu jako tzv. pochva. Kostřavy jsou trsnaté trávy s mohutným kořenovým systémem, které dobře rostou v propustné půdě. Jsou velmi odolné a vytrvalé, snášejí sucho a mráz. Ve volné přírodě je nejčastěji najdeme na loukách a pastvinách. Používají se rovněž ve směsích pro kvalitní píci a silážování (Könemann *et al.*, 2007).

Diploidní předci kostřavy luční byli hojně rozšířeni v oblasti střední Evropy a Eurasie, odkud se šířili do východní Evropy a do dalších částí světa (Obr. 2). Na pomezí výskytu dvou různých rostlinných druhů často docházelo a dochází k jejich křížení, které může vést až ke

vzniku nových druhů. Příkladem může být kostřava rákosovitá, která vznikla mezidruhovou hybridizací kostřavy luční a *F. glaucescens* (Malik *et al.*, 1967; Lewis, 1977).



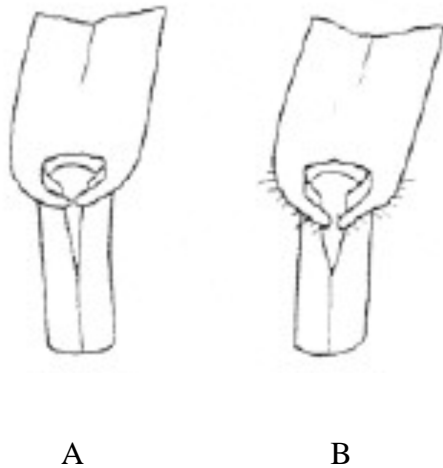
Obr. 2. Předpokládané hlavní migrační cesty spojené s evolucí kostřav (upraveno podle Inda *et al.* 2005). Původní (ancestrální) druhy kostřav se rozšířily z mírného pásu východní Evropy do celé Eurasie a do dalších světadílů.

2.1. Kostřava luční

2.1.1. Morfologie

Kostřava luční pochází z mírného pásu střední a západní Evropy. V současné době je hojně zastoupena též v Asii a Americe. K jejímu rozšíření významně přispělo odrůdové šlechtění a pícninářství. Vyskytuje se převážně na mezofilních loukách. Od ostatních druhů kostřav se odlišuje tím, že má ouška na bázi čepele listů lysá, na konci špičatá (Obr. 3). Listy tvoří v nadzemní části dva typy výhonků: listové a fertilní. Listové výhonky jsou na horní straně čepele nezřetelně rýhované, téměř hladké. Po jarovizaci se tvoří fertilní (plodná) stébla. Kostřava luční patří mezi trávy ozimého charakteru. Kvete od jara do léta. Květenství je lata, plodem jsou obilky (Grulich *et al.*, 2002). Podobně jako většina trav se kostřava luční rozmnožuje také vegetativně pomocí podzemního výběžku zvaného drn. Bohatý kořenový systém, dorůstající až do hloubky 1,5 m, zajišťuje kostřavě luční značnou odolnost i při dlouhém období sucha. Kostřava luční také toleruje teploty až do -10°C (Chinery, 2002, Jeong *et al.*, 1990). Pouze zřídka je napadána škůdci, bakteriemi nebo plísněmi. Tyto vlastnosti se staly velmi žádané zemědělci a v současnosti se kostřava luční intenzivně používá pro mezidruhové křížení s druhem jílku – jílkem mnohokvětým (*Lolium multiflorum* Lam.) a jílkem vytrvalým (*L. perenne* L.). Tyto agronomicky velmi atraktivní druhy jsou totiž

velmi citlivé vůči abiotickým a biotickým stresům. Mezirodových kříženců kostřav a jílků (tzv. Festulolium) byla vyšlechtěna celá řada a některé se úspěšně prosazují v pícninářství i trávnickářství.



Obr. 3. Znárodnění báze čepele listů u kostřavy luční a kostřavy rákosovité. Báze čepele listů je u kostřavy luční (A) nanejvýš s krátkými oušky, neúplně objímající stéblo. Kostřava rákosovitá (B) má ouška na okraji brvitá, na konci zaokrouhlená. Převzato z Šmarda (2005).

Blízká příbuzná kostřavy luční je kostřava rákosovitá. Od kostřavy luční se odlišuje tím, že ouška jsou na okraji brvitá, na konci zaokrouhlená (Obr. 3.). Listy jsou na horní straně čepele zřetelně rýhované. Pluchy jsou často osinaté, osiny 0 - 3mm dlouhé. Vyskytuje se na vlhkých loukách, v příkopech na okrajích komunikací (Grulich *et al.*, 2002).

2.2. Hospodářské využití

Rozkvět zemědělství v devatenáctém století a s ním spojené rostoucí nároky na kvalitu osiva a krmných směsí vedly k rozvoji travního semenářství. Šlechtěná travní semena našla hojně využití v pícninářství a trávnickářství. U krmiv se zvýšila nutriční kvalita a stravitelnost, trávnickové směsi byly obohaceny o odolné a vzhledově atraktivní druhy trav. Mezi další přednosti šlechtěných trav patří značná odolnost vůči škůdcům a schopnost rychlé obnovy. Hustý drn trav brání půdu před erozí, dobře odolává technické námaze, především sešlapu a pastvě.

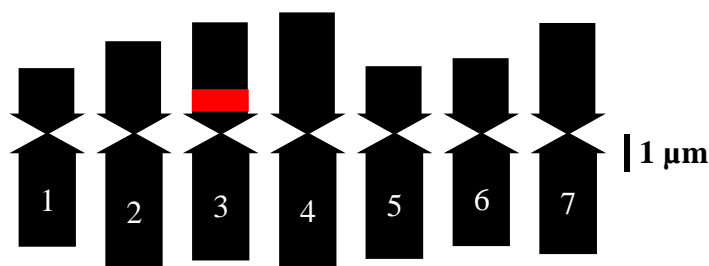
V přirozených i umělých porostech u nás roste 77 rodů s 238 druhy trav. Pro hospodářství má největší význam 30 druhů, mezi něž patří bojínka luční, jílek vytrvalý, srha říznáčka a kostřava luční. Kostřava luční se spolu s kostřavou rákosovitou uplatňuje především jako

součást pícninových směsí. Vzhledem k jejich toleranci vůči abiotickým a biotickým stresům jsou hojně využívány na osev technických ploch u silnic a dálnic, kde není možné pravidelné zavlažování (Chinery, 2002; Naučný slovník zemědělský 1987).

2.3. Metody analýzy genomu kostřavy luční

2.3.1. Karyotyp kostřavy luční

Kostřava luční je diploidní ($2n=2x=14$; Lundqvist, 1962), má 7 párů chromozomů, které se dělí na 3 metacentrické a 4 submetacentrické, z toho jeden pár metacentrických chromozomů (chromozom 3) má sekundární konstrikci (Obr. 4). Délka chromozomů se pohybuje v rozmezí 4,76 - 6,9 μm . Největší je chromozom 4, nejmenší chromozom 1 (Kopecký *et al.*, 2010).



Obr. 4. Idiogram kostřavy luční. Chromozom 3 nese sekundární konstrikci. Převzato z Kopecký *et al.*, 2010.

2.3.2. Cytogenetické metody analýzy genomu kostřavy luční

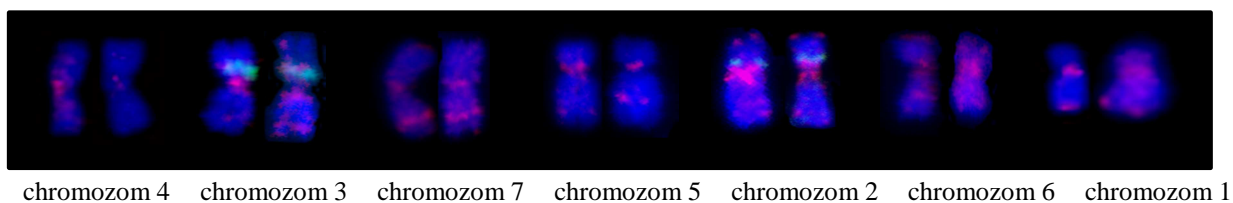
Na rozlišení jednotlivých chromozomů se nejčastěji používá FISH (fluorescent *in situ* hybridization). *In situ* hybridizace (Gall *et al.*, 1969; John *et al.*, 1969) je založena na detekci určité sekvence DNA přímo na chromozomech, fixovaných na podložním skle. První sondy byly značené radioaktivně. V roce 1982 Langer-Schafer a kol. poprvé použili fluorescenčně značené sondy.

Na přípravu sondy pro FISH lze použít jedno-kopiovou sekvenci DNA, repetitivní sekvence či genomovou DNA (GISH). FISH u rostlin se provádí na metafázních chromozomech (Jiang *et al.*, 1995), pachytenních chromozomech (de Jong *et al.*, 1999) a prometafázních chromozomech (Cheng *et al.*, 2001). Použít lze rovněž jednotlivá natažená vlákna DNA (fiber - FISH, Francz *et al.*, 1996, Jackson *et al.*, 1998).

Pro identifikaci jednotlivých chromozomů u vybraných druhů kostřav byla použita FISH se sondami pro dvě ribozomální DNA (5S rDNA a 45S rDNA). Na základě porovnání lokalizace těchto sond lze předpokládat, že kostřava luční je předkem kostřavy rákosovité

(Thomas *et al.*, 1997). Pomocí této dvojice sond bylo možno identifikovat dva páry (ze sedmi) chromozomů kostřavy luční. Průlomem se stalo použití několika BAC (bacterial artificial chromosome) klonů, vybraných z parciální BAC knihovny kostřavy luční (Kopecký *et al.*, 2008, 2010). Tímto způsobem bylo možné identifikovat všech sedm párů chromozomů (Obr. 5).

Variantou FISH je genomová *in situ* hybridizace (GISH, genome *in situ* hybridization), u níž je jako sonda použita fluorescenčně značená genomová DNA. GISH byla využita pro cytogenetickou analýzu u kříženců jílku a kostřav a umožnila identifikovat rodičovské chromozomy či úseky chromozomů jílku a kostřavy (Bailey *et al.*, 1993; Humphreys *et al.*, 1998; Zwierzykowski *et al.*, 1998; 1999, Leśniewska *et al.*, 2001; Pašakinskiene *et al.*, 2005).



Obr. 5. Identifikace metafázních chromozomů kostřavy luční pomocí FISH s vybranými sondami (5S rDNA – chromozom 2; 45S rDNA – chromozom 3; BAC klon 1G18 – specifický pattern u všech chromozomů). Převzato z Kopecký *et al.*, 2008.

2.3.3. Molekulárně-biologické metody analýzy genomu kostřavy luční

Pro studium genomu se kromě cytogenetických metod využívá i celá škála dalších molekulárně-biologických technik. Detailnější pohled na strukturu a evoluci genomu nám poskytuje mapování genomu, tj. ukotvování známých či neznámých sekvencí. Kromě cytogenetického mapování využívajícího již zmíněné metody FISH se používá i mapování genetické a fyzické. Genetické mapování je závislé na frekvencích rekombinací podél jednotlivých chromozomů a geneticky zamapované sekvence (markery) nemusí odpovídat jejich fyzické vzdálenosti na chromozomu. Pro kostřavu luční byla doposud vytvořena jediná genetická mapa obsahující 466 markerů typu RFLP, AFLP a isozymů (Alm *et al.*, 2003). Tato mapa byla dále obohacena o 148 DArT markerů (Bartoš *et al.*, 2011). Tato mapa byla využita ke komparativnímu mapování genomu kostřavy luční s ovsem, rýží a zástupci *Triticeae*. Pro fyzické mapování genomu je nutné mít zdroj dlouhých fragmentů DNA. Tímto zdrojem se stal umělý bakteriální chromozom-BAC. V současnosti existují dvě BAC knihovny kostřavy luční (King *et al.*, 2007, Kopecký *et al.*, 2008) s 2,5x a 1x pokrytím genomu.

Dalším prostředkem umožňujícím detailní pohled na strukturu genomu je jeho sekvenování a srovnávání získaných sekvencí s dostupnými databázemi dříve sekvenovaných

druhů. V dnešní době se pro sekvenování genomů využívá převážně sekvenování druhé generace (tzv. NG sekvenování – next generation sequencing). Jde například o systémy SOLiD firmy Applied Biosystems, Solexa firmy Illumina a 454 sekvenování firmy Roche. Sekvenování těmito přístupy je sice cenově náročné (ceny však stále klesají), ale ziskem je velké množství sekvenčních dat. Je proto s podivem, že genom kostřav a jílků nebyl dosud sekvenován. Výsledky získané v této práci by však mohly výrazně pomoci v sekvenování jednoho chromozomu kostřavy luční.

3. Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je sled metabolických a genetických pochodů vedoucích k rozdělení jádra, a posléze i celé buňky. Délka buněčného cyklu je značně proměnlivá. Jednobuněčné organismy se dělí během několika minut. U mnohobuněčných organismů může buněčný cyklus trvat několik hodin až týdnů. V průběhu buněčného cyklu dochází k přesné replikaci a rozdělení jaderné DNA do dvou dceřiných buněk. Rozděleny jsou též všechny orgány buňky. Fáze buněčného cyklu jsou: G_1 , S, G_2 a M (Barik *et al.*, 2010).

3.1. Fáze buněčného cyklu

V průběhu buněčného cyklu se u eukaryotického organismu střídají jednotlivé fáze vždy ve stejném pořadí. Nejvíce změn nastává při dělení jádra v procesu nazývaném mitóza a dále pak při dělení buňky na dvě během procesu zvaného cytokineze. Tyto dva procesy tvoří M-fázi buněčného cyklu. Doba mezi dvěma M-fázemi je označována jako interfáze. V interfázi dochází k zvětšování buňky, probíhají v ní tyto fáze buněčného cyklu: G_1 , S a G_2 -fáze buněčného cyklu.

G_1 -fáze je období mezi koncem mitotického dělení buňky a počátkem syntetické fáze (S-fáze). V buňce probíhá přepis genů, syntéza proteinů a zvětšuje se její velikost. Po ukončení G_1 -fáze jsou chromozomy tvořeny jednou chromatidou. Délka této fáze je proměnlivá, ale obecně platí, že se jedná o nejdelší fázi buněčného cyklu, která trvá 30 – 40 % jeho délky. Na přechodu mezi G_1 a S-fází se nachází první kontrolní bod buněčného cyklu.

V S-fázi je replikována jaderná DNA a všechny komponenty potřebné pro dělení buňky. Obsah genomové DNA se zdvojnásobí z 2C na 4C. Po ukončení S-fáze je tak každý chromozom tvořen dvěma chromatidami. S-fáze je druhou nejdelší fází buněčného cyklu, která trvá 30 % jeho délky. Z S-fáze přechází buňka do G_2 -fáze. V G_2 -fázi jsou syntetizovány proteiny a RNA. G_2 -fáze je velmi krátká, trvá pouze 10 – 20 % délky buněčného cyklu. Mezi G_2 a M-fází leží druhý kontrolní bod (Galindo *et al.*, 2005).

3.2. Mitotické dělení

Mitotické dělení zajišťuje rovnoměrné rozdělení genetického materiálu a vznik dvou identických buněk. Mitóza se dělí na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

3.2.1. Profáze a prometafáze

Chromozomy v profázi lze charakterizovat jako tenká vlákna, která jsou různě svinutá a zpřehýbaná. Chromozomy jsou replikované, každý se skládá ze dvou sesterských chromatid. V blízkém okolí jádra se začíná vytvářet mitotické vřetenko. Rostliny na rozdíl od živočichů neobsahují centrosomy, z nichž se tvoří mikrotubuly mitotického vřetenka. Mitotické vřetenko se u nich formuje v pólech buněk, kde je zvýšená koncentrace γ tubulinu. Profáze plynule přechází v prometafázi, kde dochází k rozpadu jaderného obalu.

3.2.2. Metafáze

V metafázi se chromozomy seřazují v rovníkové (ekvatoriální) rovině; nacházejí se v nejvyšším stupni kontrakce a spiralizace. Chromozomy leží těsně vedle sebe, jsou tlusté, krátké, a dobře viditelné ve světelném mikroskopu. Mnoho cytogenetických metod využívá právě metafázní chromozomy.

3.2.3. Anafáze

Po metafázi přechází buňky do anafáze, v níž dochází k smršťování vláken mitotického vřetenka, a tím k rozchodu sesterských chromatid k opačným pólům buňky. Na konci anafáze začíná prodlužování buňky, která přechází do telofáze.

3.2.4. Telofáze a cytokineze

V telofázi jsou obě sady chromozomů u pólů vřetenka. Vytváří se jaderný obal. Mitotické vřetenko zaniká a formují se dvě nová dceřiná jádra. Po rozdělení jádra začíná cytokineze, která je u rostlin zakončena tvorbou buněčné stěny mezi novými jádry. Stavba buněčné stěny je u rostlin řízena fragmoplastem, který je tvořený zbytky polárních mikrotubulů (Alberts *et al.*, 1998).

3.3. Kontrolní body buněčného cyklu

V průběhu buněčného cyklu se jednotlivé fáze střídají v přesně daném pořadí. Předchozí fáze cyklu musí být vždy ukončena dříve, než začne další fáze. Pokud předchozí fáze trvá déle, než je obvyklé, musí být zajištěno, že nedojde k spuštění následující fáze. Na chronologickém průběhu celého cyklu se podílí řada enzymů a proteinů, které zajišťují, aby na sebe jednotlivé fáze vždy navazovaly. První kontrolní bod je na přechodu G_1 a S-fáze, kdy

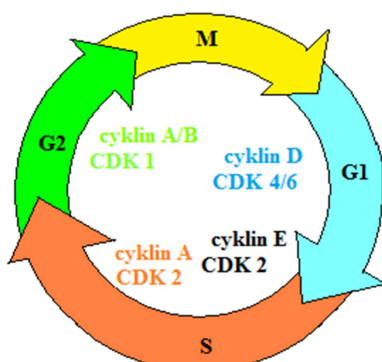
se kontroluje velikost buňky a případné poškození DNA. Druhý kontrolní bod, v němž buňka kontroluje velikost a správnou replikaci DNA, leží na přechodu mezi G_2 a M-fází. Regulace buněčného cyklu je řízena signály od ostatních buněk, které buňka přijímá z extracelulárního prostředí. Nejsou-li podmínky vhodné pro dělení, přejdou buňky do klidové fáze buněčného cyklu, označované jako G_0 -fáze buněčného cyklu. V této fázi buněčného cyklu může buňka setrvat různě dlouhou dobu (hodiny až měsíce). Buňky v G_0 -fázi buněčného cyklu si zachovávají metabolickou aktivitu, ale nedělí se. Pokud se změní podmínky, může buňka G_0 -fázi opustit (Galindo *et al.*, 2005).

3.4. Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus může být pozastaven nebo úplně zastaven fosforylací či defosforylací proteinů vyskytujících se v určitých fázích buněčného cyklu. Fosforylace a defosforylace jsou nejběžnějšími způsoby, kterými buňka mění aktivitu proteinu. Fosforylace je zprostředkována přes Ser/Thr proteinkinázy. Proteinkinázy lze v buňce detekovat během celého cyklu. Jejich aktivita je však přísně řízena. Koncentrace proteinkináz v průběhu buněčného cyklu vzrůstá a klesá cyklickým způsobem (Inzé, 2005).

Mezi nejvýznamnější složky regulačního systému patří cykliny a cyklin dependentní proteinkinázy (CDK). Cykliny se váží na kinázy a tím je aktivují (Inzé *et al.*, 2006, De Veylder *et al.*, 2007). Pro přechod mezi G_1/S a G_2/M jsou u rostlin významné CDK s motivem PSTAIRE (Hemerly *et al.*, 1995; Joubés *et al.*, 2004). Na přechodu z G_1 -fáze do S-fáze se podílí RBR/E2F dráha. Protein RBR (RB related protein) je v G_1 -fázi navázaný na transkripční faktor E2F a tím brání jeho transkripční aktivitě. Po fosforylaci RBR proteinu cyklinem D je E2F uvolněn z vazby a spouští transkripci genů, nezbytných pro přechod z G_1 do S-fáze (Inzé, 2005).

G_1 -fáze je řízena cyklinem D, jehož aktivitu regulují CDK 4/6. Přechod mezi G_1/S je řízen cyklinem D. Cykliny A, které reguluje CDK 2, jsou důležité pro kontrolu S-fáze. Cykliny A/B reguluje CDK 1. Cykliny B řídí přechod z G_2 do M-fáze (Obr. 6, Simillion *et al.*, 2002).



Obr. 6. Schématické zobrazení fází buněčného cyklu, zobrazující cykliny a cyklin dependentní kinázy (CDK), které regulují jednotlivé fáze buněčného cyklu.

4. Synchronizace buněčného cyklu

Pro studium buněčného cyklu se nejčastěji používá synchronní populace buněk, jejichž předností je, že buňky vstupují do mitózy jednotně. Přirozeně synchronizované pletiva se v přírodě vyskytují velmi vzácně. Proto byly vyvinuty systémy zajišťující synchronní vstup buněk do mitózy. Ze synchronizované buněčné populace je rovněž možné získat mnohem více intaktních chromozomů, než při použití asynchronní buněčné populace. Intaktní chromozomy izolované do suspenze lze třídit průtokovou cytometrií. Tříděné chromozomy se stále častěji uplatňují v řadě aplikací molekulární biologie, genomiky a cytogenetiky.

4.1. Materiál používaný pro synchronizaci

Na synchronizaci buněčného cyklu je vhodné použít populaci buněk, které se snadno izolují, odolávají mechanickému poškození při izolaci a vykazují genetickou stabilitu. Pestrost systémů používaných pro synchronizaci umožňuje vybrat ten nejvhodnější pro navržený experiment. Používají se buněčné kultury *in vitro*, protoplasty izolované z listového mezofylu, kořenové meristémy a kořenové kultury.

4.1.1. Buněčné kultury *in vitro*

Buňky v suspenzi lze vystavit různým synchronizačním podmínkám, proto je tento systém vhodný pro studium buněčného cyklu. Takto byl například studován buněčný cyklus linie tabáku BY - 2 (Nagata *et al.*, 1999). Nevýhodou tohoto systému je, že u něj často dochází chromozomové nestabilitě díky přestavbám chromozomů. U mnoha rostlinných druhů se navíc rychle rostoucí buněčné kultury pěstují velmi obtížně. Buněčné kultury se kromě tabáku používají i u rajčete (Arumuganathan *et al.*, 1990), vojtěšky (Meskiene *et al.*, 1995) či rýže (Lendvai *et al.*, 2002).

4.1.2. Protoplasty izolované z listového mezofylu

Protoplasty (buňky zbavené buněčné stěny) izolované z listového mezofylu se používají především u druhů, u nichž není možné získat kořenový meristém. Jsou vhodné především na studium regulace buněčného cyklu růstovými regulátory, což bylo použito u protoplastů *Petunia hybrida*, izolovaných z listového mezofylu. Protoplasty *Petunia hybrida* po několikahodinové inkubaci na médiu a po ovlivnění růstovými regulátory opakovaně

vstupovaly do mitózy (Bergounioux *et al.*, 1988). Nevýhodou tohoto systému je složitost izolace protoplastů a jejich pěstování.

4.1.3. Kořenové meristémy

Kořenové meristémy lze oproti buněčným kulturám snadno získat z klíčících semen. Je poměrně snadné je ovlivnit synchronizačními činidly, protože se na synchronizaci převážně používají roztoky, které kořenové meristémy snadno přijímají. V porovnání s ostatními částmi rostliny se buňky kořenového meristému značně dělí. Jsou hojně využívány pro analýzu chromozomů, studium buněčného cyklu a jeho regulaci (Doležel *et al.*, 1999). K synchronizaci buněčného cyklu byl kořenový meristém použit u bobu setého (*Vicia faba* L., Doležel *et al.*, 1992), pšenice (Lee *et al.*, 1997, Vrána *et al.*, 2000, Kubaláková *et al.*, 2005), ječmene (Lysák *et al.*, 1999b) či žita (Kubaláková *et al.*, 2003). Nevýhodou tohoto systému je obtížná manipulace s kořenovými špičkami některých druhů.

4.1.4. Kořenové kultury

Kořenové kultury se infikují *in vitro* transformační bakterií *Agrobacterium rhizogenes*. Takto ovlivněná kultura je specifická rychlým růstem a nedostatkem geotropismu. Může být pěstována neomezeně. Kořenové kultury vykazují genetickou stabilitu a poskytují dostatek kořenových špiček vhodných k synchronizaci. Používají se u druhů, které mají nedostatek semen, nebo je obtížné je získat. Nevýhodou tohoto systému jsou vysoké nároky na sterilní prostředí při práci s kultivačním médiem (Veuskens *et al.*, 1995; Neuman *et al.*, 1998).

4.2. Metody synchronizace

Při synchronizaci buněčného cyklu se buňky vystaví podmínkám, které buňkám brání v plynulém postupu buněčným cyklem. Dojde k nahromadění (akumulaci) buněk v určité fázi. Synchronizaci buněčného cyklu lze vyvolat fyzikálně či chemicky. Mezi fyzikální metody patří nízké teploty nebo vyhladovění buněk (Olszewska *et al.*, 1990; Sharma, 1999). U rostlin jsou nejčastěji používána chemická činidla, způsobující inhibici syntézy DNA, což vede k zastavení buněk v místě přechodu G1 a S-fáze buněčného cyklu (Doležel *et al.*, 1992). Po odstranění inhibitorů syntézy DNA vstoupí buňky synchronně do S-fáze (Doležel *et al.*, 1997a).

4.3. Používané agens

Na synchronizaci buněčného cyklu se nejčastěji používají sloučeniny, které blokují syntézu DNA: 5-aminouracil, aphidicolin a hydroxymočovina.

4.3.1. 5-aminouracil

5-aminouracil nezablokuje syntézu DNA kompletně. Zastavuje pozdní replikaci DNA. Jedná se o sloučeninu podobnou thyminu (Novák *et al.*, 1979).

4.3.2. Aphidicolin

Aphidicolin je toxin, který produkuje houba *Cephalosporium aphidicola*. Aphidicolin blokuje α DNA polymerázu.

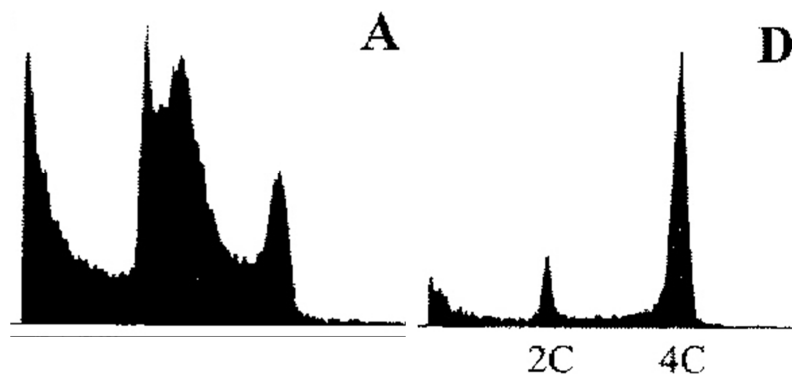
4.3.3. Hydroxymočovina

Hydroxymočovina (HU, hydroxyurea) zastavuje reverzibilně syntézu deoxyribonukleotidů. U savčích buněk je její použití ve většině případů letální. U živočichů ovlivňuje hydroxymočovina prodloužení řetězce DNA, což se projeví nahromaděním malých molekul DNA. U rostlinných buněk nebyl tento účinek prokázán (Doležel *et al.*, 1999). Při použití hydroxymočoviny je třeba správně stanovit koncentraci. Příliš vysoká koncentrace hydroxymočoviny zapříčiní pozdní uvolnění z bloku buněčného cyklu, což se projeví nízkým stupněm synchronizace buněk. Oproti tomu nízká koncentrace hydroxymočoviny buněčný cyklus dostatečně nezablokuje, což se projeví nástupem mitotické aktivity buněk již před odstraněním bloku buněčného cyklu. Ihned po odstranění bloku buněčného cyklu lze na preparátech, připravených z kořenového meristému, pozorovat mnoho mitoticky aktivních buněk, jejichž počet během ozdravné doby (RT) výrazně klesá. Ozdravná doba je čas po vymytí hydroxymočoviny a nahrazení Hoaglandovým roztokem, kdy dochází k odstranění bloku buněčného cyklu, což se projeví nástupem mitózy (Doležel *et al.*, 1999).

4.4. Průběh synchronizace

Po zablokování syntézy DNA (nejčastěji pomocí hydroxymočoviny) dojde k nahromadění buněk na přechodu G₁ a S-fáze. Vymytí hydroxymočoviny Hoaglandovým roztokem odstraní blok buněčného cyklu a je dokončena syntéza DNA. Buňky hromadně projdou S a G₂-fází (Obr. 7). Podle druhu rostliny se délka působení hydroxymočoviny pohybuje mezi 15 - 18 hodin. Obvykle se používá koncentrace hydroxymočoviny od 1,25 do 3,5mM. Osm hodin po

vymytí hydroxymočoviny zůstává v G₁ nebo S-fázi asi 10% buněk. Většina buněk je v G₂-fázi. Další buněčný cyklus začíná 12 hodin po průchodu synchronizovaných buněk mitózou. Poté synchronie v populaci výrazně klesá (Doležel *et al.*, 1999). Buňky kořenového meristému po vymytí hydroxymočoviny a nahrazení Hoaglandovým roztokem vstupují synchronně do mitózy. Nejvyšší mitotická aktivita buněk, kdy mitotický index dosahuje 50 – 70 %, byla například u pšenice a žita dosažena po 5 hodinách od odstranění bloku buněčného cyklu (Vrána *et al.*, 2000; Kubaláková *et al.*, 2003).



Obr. 7. Histogramy jaderného genomu DNA žita setého, které byly získány synchronizací kořenových meristémů. Histogram (A) zobrazuje buňky akumulované na přechodu G₁/S, ihned po odstranění bloku buněčného cyklu. Histogram (D) zobrazuje synchronní přechod většiny buněk do G₂-fáze po 5 hodinách (RT). Převzato z Doležel *et al.*, 1999.

4.5. Akumulace metafází

Synchronizovanou populaci buněk je nutné pro řadu aplikací (např. třídění intaktních chromozomů) zastavit v metafázi. Na akumulaci metafází se používají inhibitory dělicího vřeténka. Nejčastěji používaným inhibitorem je kolchicin, který má vliv na skládání tubulinů, čímž znemožní tvorbu mitotického vřeténka. Nevýhodou kolchicinu je nízká aktivita k rostlinnému tubulinu, v porovnání s látkami herbicidní povahy. Při aplikaci kolchicinu je nutné použít příliš vysoké koncentrace (0,25 - 12,5 mM). Kolchicin je nevhodný pro karyologické studie také proto, že zvyšuje lepivost chromozomů, což vede k tvorbě shluků chromozomů. To znemožňuje jejich další použití, především pak třídění chromozomů průtokovou cytometrií. Dalšími inhibitory mitózy jsou například p-dichlorbenzen, chloralhydrát, oxychinolin a ledová voda.

Do skupiny antimikrotubulárních drog patří též látky herbicidní povahy: oryzalin, amiprofosmethyl (APM) a trifluralin. Jejich značnou výhodou je fakt, že v porovnání s kolchicinem vykazují antimikrotubulární aktivitu již při μM koncentracích. Optimální koncentrace se stanovuje na základě hodnocení metafázního indexu z preparátů barvených Feulgenovou reakcí (Feulgen *et al.*, 1924). Nízká koncentrace akumulárních činidel se projevuje přechodem buněk do anafáze. Vysoká koncentrace způsobuje shlukování chromozomů (Doležel *et al.*, 1999). Za použití APM bylo v kořenovém meristému obilovin dosaženo metafázního indexu přes 50 % (Doležel *et al.*, 1999).

4.6. Vlastnosti uměle synchronizované populace

Po řízené synchronizaci byl pozorován vliv tohoto zásahu na chování buněk. Každá buňka zůstává v bloku různě dlouhou dobu, což může u některých druhů vést ke zkrácení buněčného cyklu u uměle ovlivněných buněk oproti nesynchronním buňkám. Bylo též pozorováno, že po zablokování reduktasy pomocí hydroxymočoviny mohou na chromozomech vznikat zlomy (Doležel *et al.*, 1999).

4.7. Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry) byla vyvinuta v padesátých letech minulého století. U rostlin byla poprvé použita v roce 1980 a stala se významnou technikou pro stanovení obsahu DNA, určení ploidie a analýzu buněčného cyklu (Galbraith, 2004, Shapiro, 2004, Bennet *et al.*, 2005). Mezi přednosti průtokové cytometrie patří rychlost detekce částic ($10^2 - 10^3$ částic za sekundu), což umožňuje analýzu velkého množství vzorků. Mikroskopické částice jsou unášeny a usměrňovány proudem kapaliny, který je veden přes průtokovou komůrku, ústící do vzduchu (jet in air). Přes průtokovou komůrku je vzorek unášen proudem kapaliny. Vzniká slabě nabitý roztok, který pomocí podtlaku usměrňuje proud částic ve vzorku. Koncentrace částic ve vzorku je stanovena tak, aby průtokovou komůrkou procházela vždy jen jedna částice. Následuje krátké ozáření částic. K excitaci částic se používá vysokotlaková rtuťová výbojka nebo laser. U laseru lze intenzitu záření nastavit dle použitého fluorescenčního barviva. Vyzářená fluorescence částice prochází přes filtry na fotonásobič, kde je zesílena a převedena do počítače. Počítačovým výstupem zpracovaných dat je histogram. Histogram zachycuje množství jader v dané fázi buněčného cyklu. Nejzřetelnější píky poskytuje G_1 a G_2 -fáze, kde dochází k nárůstu obsahu DNA z 2C na 4C (Obr. 7).

Průtoková cytometrie umožňuje měřit relativní množství DNA částic uvolněných ve vhodném lyzačním pufru. Před vložením do průtokového cytometru je vzorek barven fluorochromem. Nejčastěji se používá 4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), ethidium bromid, propidium jodid či fenylnindol (Doležel *et al.*, 2005).

Průtoková cytometrie nachází hojně využití v zoologii, mikrobiologii, imunologii, genetice, molekulární biologii a botanice. Průtoková cytometrie se používá na analýzu protoplastů, izolovaných jader a izolovaných chromozomů. Dále ji lze využít na stanovení obsahu jaderné DNA.

V předkládané práci je vypracována metodika synchronizace buněčného cyklu u kořenových meristémů kostřavy luční. Optimalizace buněčného cyklu umožňuje získat materiál vhodný k třídění jednotlivých chromozomů pomocí průtokové cytometrie.

5. Cíle práce

Optimalizace metodiky pro izolaci chromozomů u košťavy luční

- techniky klíčení semen
- synchronizace buněčného cyklu
- akumulace metafází
- izolace chromozomů do suspenze

6. Materiál a metodika

6.1. Rostlinný materiál

V této práci byly použity meristémy kořenových špiček kostřavy luční (*Festuca pratensis* Huds.) odrůdy Fure.

6.1.2. Příprava rostlinného materiálu

6.1.2.1. Klíčení semen v plastových nosičích

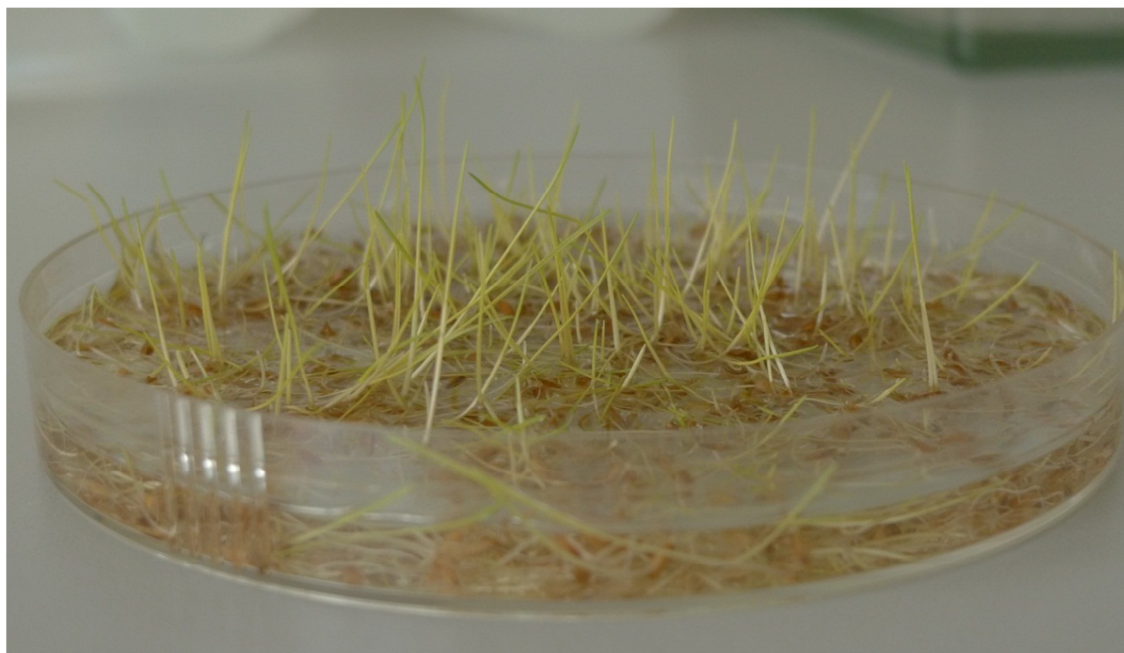
Do tří plastových nosičů bylo vyseto cca 300 semen kostřavy luční (*Festuca pratensis* Huds.), odrůda Fure. Semena v nosičích byla ponořena do 50 ml destilované vody a pěstována v zakryté Petriho misce v termostatu při teplotě 25°C. Po šesti dnech naklíčila semena v rostlinky (Obr. 8), které měly kořínky o délce 2 - 4 cm se zřetelnými kořenovými špičkami.



Obr. 8. Semena kostřavy luční pěstována šest dní v plastových nosičích na Petriho misce při teplotě 25°C.

6.1.2.2. Klíčení semen v Petriho misce

Byl vyzkoušen též druhý způsob klíčení semen, kdy byla semena umístěna přímo na plastové Petriho misce. Semena klíčila tři dny v termostatu při teplotě 25°C. Poté byla umístěna na dva dny na třepačku a následně na jeden den do termostatu (Obr. 9).



Obr. 9. Semena pěstovaná šest dní na plastové Petriho misce. Tři dny byla semena umístěna v termostatu při teplotě 25°C, poté byla vložena na dva dny na třepáčku a následně na jeden den do termostatu (25°C).

6.2. Metody a postup práce

6.2.1. Synchronizace buněčného cyklu

Při optimalizaci synchronizace buněčného cyklu u kostřavy luční jsem vycházela z metodiky pro synchronizaci buněčného cyklu obilovin (Doležel *et al.*, 1999). Naklíčená semena kostřavy luční jsem ponořila do roztoku hydroxymočoviny a umístila do termostatu (25°C). Synchronizace probíhala na nezakryté Petriho misce 18 hodin. Pro Petriho misku o průměru 17 cm jsem použila 60 ml roztoku hydroxymočoviny. Testovala jsem roztok hydroxymočoviny o koncentracích 1mM, 1,5mM a 2mM. Po ukončení synchronizace byl roztok hydroxymočoviny vymyt a nahrazen Hoaglandovým roztokem. Uvolnění buněk z bloku G₁/S do mitózy jsem pozorovala na roztlakových preparátech, které byly připraveny z kořenových špiček, odebraných do Carnoyovy fixáže I. Kořínky jsem odebírala ve dvouhodinových intervalech po vymytí hydroxymočoviny (tzv. recovery time, RT).

Pomocí mitotického indexu jsem zjistila optimum pro koncentraci hydroxymočoviny. Mitotický index (počet dělicích se buněk/počet všech buněk ×100%) jsem vypočítala z roztlakových preparátů kořenových špiček, barvených Feulgenovou reakcí z pozorování 300 a více jader pro každý odběr.

6.2.2. Akumulace metafází

Po optimalizaci synchronizace buněčného cyklu byla hledána nejvhodnější látka pro akumulaci metafází. Byly testovány dvě látky, které blokují mikrotubulární vřeténko, čímž zastavují buňky v metafázi. Obě látky se řadí mezi herbicidy a byly vyzkoušeny v různých koncentracích i dobách působení.

1. amiprofosmethyl (APM) o koncentraci 2,5 μM .
2. oryzalin o koncentracích 5 μM a 10 μM

Pro tyto dvě činidla byly vyzkoušeny různé časy po vymytí hydroxymočoviny: 3,5 h., 4 h., 4,5 h. a 5 h. Doba působení činidla byla vždy 2 hodiny.

Třetí testovanou substancí, která blokuje mikrotubulární vřeténko, byl rajský plyn (N_2O) o tlaku 5B, který byl indukován ve stejných časech a době působení jako předchozí dvě látky. Po působení danou látkou byly buňky kořenového meristému odebírány do Carnoyovy fixáže I a barveny Feulgenovou reakcí. U více než 300 jader pro každou variantu byl spočítán metafázní index ($\text{MeI} = \text{počet buněk v metafázi} / \text{celkový počet buněk}$). Zároveň byla vyhodnocena kvalita metafázních chromozomů.

6.2.3. Izolace chromozomů do suspenze

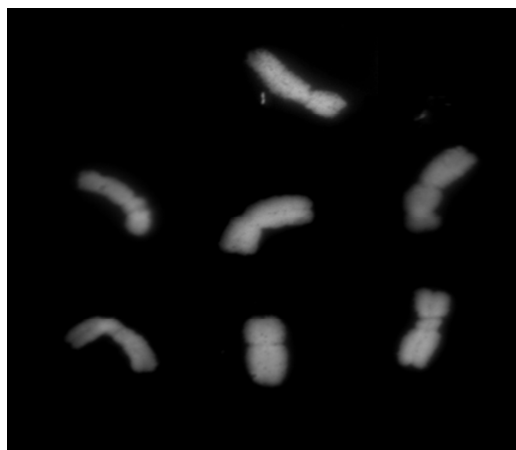
Vzhledem k tomu, že předkládaná práce směřuje k třídění a sekvenování jednotlivých chromozomů kostřavy luční a příbuzných druhů, dalším nezbytným krokem byla optimalizace izolace chromozomů do suspenze. Princip spočívá v přímé izolaci chromozomů, z formaldehydem fixovaných kořenových špiček, za použití mechanické homogenizace. Fixované chromozomy jsou stabilní a mají velmi dobře zachovanou morfologii. Je třeba stanovit optimální koncentraci formaldehydu a čas fixáže. V tomto případě byla fixována celá naklíčená semena (viz Obr. 19).

Pro 2% formaldehydovou Tris fixáž byly vyzkoušeny časy 15 min., 20 min., 25 min. a 30 min. ve třech různých variantách (časech RT od vymytí 1,5mM hydroxymočoviny, Tab. 1). Formaldehyd byl následně vymyt Tris pufrem (2x 5 minut). Poté bylo do 750 ml izolačního pufu LB01 nakrájeno 100 kořenových špiček o délce asi 2 mm a mechanicky homogenizováno homogenizátorem (Polytron Kinematica AG, PT 13 000D). Bylo nutné optimalizovat počet otáček a čas homogenizace. Pro tento typ velmi malých kořenových špiček byly vyzkoušeny otáčky 13000ot./s; 15000ot./s; 18000ot./s; 20000ot./s; 22000ot./s. a časy 15 – 18 sekund. Všechny testované varianty jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tab. 1. Testované varianty pro optimalizaci délky fixáže a homogenizace vzorků.

čas [h.] po vymytí 1,5mM HU	délka 2% formaldehydové Tris fixáže [min.]	homogenizace
3,5	20	20 000ot./15s.
4	20	20 000ot./15s.
4	25	20 000ot./15s.
4	20	13000ot./15s.
4	20	18 000ot./15s.
4,5	20	20 000ot./15s.
4,5	20	22 000ot./15s.
4,5	25	22 000ot./18s.
4,5	15	20 000ot./15s.
4,5	30	20 000ot./18s.

Homogenizací získaná suspenze byla přefiltrována přes nylonové sítko o průměru očka 42 µm a tak byla získána tzv. hrubá suspenze, která obsahuje pouze chromozomy a jádra. Ta byla nakapána na podložní sklo, obarvena ředěným fluorescenčním barvivem DAPI a hodnocena ve fluorescenčním mikroskopu (Obr. 10). Byla posuzována kvalita izolace, tj. množství a kvalita izolovaných chromozomů.



Obr. 10. Metafázní chromozomy kostřavy luční pozorované ve fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70 při zvětšení 400x. Preparát byl vytvořen nakápnutím kapky suspenze metafázních chromozomů na podložní sklo a obarven DAPI.

6.2.4. Flow cytometrická analýza

Homogenizací získaná suspenze byla podrobena flow cytometrické analýze. Suspenze byla vložena do cytometru BD FACSAria™ II SORP (Becton Dickinson). Výstupem této

analýzy byl histogram zobrazující rozložení jednotlivých chromozómů. Vzhledem k tomu, že flow-cytometrické analýzy nebyly součástí předkládané práce, není zde detailně popsána metodika těchto postupů.

6.3. Souhrn postupů při optimalizaci buněčného cyklu

Postup synchronizace buněčného cyklu a vyzkoušené varianty a úpravy jednotlivých kroků synchronizace shrnuje Tabulka 2.

Tab. 2. Souhrn jednotlivých kroků synchronizace buněčného cyklu u kostřavy luční a jejich úpravy, které byly vyzkoušeny při optimalizaci protokolu.

jednotlivé kroky synchronizace buněčného cyklu	délka působení použitých roztoků
synchronizace buněčného cyklu	18h./ 1mM, 1,5mM, 2mM roztok hydroxymočoviny
ozdravná doba, recovery time (RT)	3,5 h., 4 h., 4,5 h. a 5 h. Hoaglandův roztok
akumulace metafáze	plyn N ₂ O (2 h./5B), roztok APM (2 h./2,5μM), roztok oryzalinu (2 h./5μM) roztok oryzalinu (2 h./10μM)
2% formaldehydová Tris fixáž	15 minut, 20 minut, 25 minut, 30 minut
homogenizace počet otáček /délka	13-22000 ot. /15-18 sekund

6.4. Média, pufry a roztoky

APM (2,5 μ M/100 ml)

zásobní roztok APM 12,6 μ l

Zásobní roztok APM se rozpustí v 100 ml destilované vody. Kvůli smáčivosti je třeba špičku pipety 1x propláchnout v APM.

Carnoyova fixáž I (Farmerova fixáž)

absolutní etanol (99,8%) 3 jednotky

ledová kyselina octová (99%) 1 jednotka

Vždy připravovat čerstvou.

DAPI zásobní roztok (0,1mg/ml)

DAPI 5 mg

Rozpustit v 50 ml destilované vodě. Míchat 60 minut, filtrovat přes 0,2 μ m filtr, skladovat při 20°C ve tmě.

FeEDTA (500ml)

Na₂EDTA 3,36 g

NeboNa₂EDTA · 2H₂O 3,725 g

FeSO₄ · 7H₂O 2,79 g

Každou látku rozpustit zvlášť v kádince v cca 50 ml destilované vody. Poté slít roztoky dohromady a zakrýt alobalem, zahřívat na 90°C a míchat do tmavě žluta, za studena doplnit 500 ml destilované vody, uchovávat v ledničce při 4°C.

Formaldehydová fixáž (2%)

na 100 ml fixáže:

10 mM Tris 121,14 mg

10 mM Na₂EDTA 372,24 mg

100 mM NaCl 584 mg

0,1% Triton X - 100 100 μ l

Rozpustit v destilované vodě, doplnit na 60 ml, upravit na pH 7,5 (1 M NaOH). Před použitím přidat 37% formaldehyd (5,4 ml) a doplnit destilovanou vodou do 100 ml. Fixáž připravovat vždy čerstvou.

Hydroxymočovina(1,5 mM/60 ml)

hydroxymočovina	6,9 mg
Hoaglandův roztok	600 μ l
FeEDTA	50 μ l

Hydroxymočovinu rozpustit zvlášť v cca 5 ml objemu destilované vody. Hoaglandův roztok s FeEDTA rozpustit v 60 ml dH₂O, poté přimíchat roztok hydroxymočoviny.

Hoaglandův roztok

roztok A (500 ml)

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	4,7 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,6 g
KNO ₃	3,3 g
NH ₄ · H ₂ PO ₄	0,6 g

roztok B (navážka na 100 ml)

H ₃ BO ₃	280 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	340 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22 mg

roztok C (navážka na 100 ml)

H ₂ SO ₄	0,5 ml
--------------------------------	--------

Soli A se rozpustí každá zvlášť v cca 50 ml destilované vody, přidá se 5 ml roztoku B a 0,5 ml roztoku C a doplní se do 500 ml.

LB01 lyzační pufr

na 100 ml:

15 mM Tris	183,2 mg
2 mM Na ₂ EDTA	74,45 mg
0,5 m spermine · 4HCl	17,4 mg
80 mM KCl	596,4 mg
20 mM NaCl	116,9 mg
0,1% Triton X - 100	100 μ l

Rozpustit v destilované vodě, doplnit do 100 ml, upravit na pH 9 (1NHCl). Přefiltrovat přes 0,2 μ m filtr. Po filtraci se do roztoku přidá 110 μ l merkptoetanolu. Pufr se uchovává při teplotě - 4°C.

Oryzalin (5 μ M/100 ml)

zásobní roztok oryzalinu	50 μ l
destilovaná voda	100 ml

Do destilované vody za stálého míchání, přidat 50 μ l oryzalinu. Kvůli smáčivosti je třeba špičku pipety 1x propláchnout v oryzalinu.

Schiffovo činidlo

1M HCl	30 ml
Parafuchsin C.I. 42500	2 g
K ₂ S ₂ O ₅	3,8 g

Rozmíchat v 170 ml dH₂O, míchat 2 hodiny v uzavřené láhvi a nechat stát přes noc. Přidat 2 g aktivního uhlí, míchat 1 minutu a filtrovat přes filtrační papír navlhčený 1M HCl. Opakovat dokud není roztok bezbarvý. Skladovat v pevně uzavřené láhvi ve tmě při 4°C.

Tris pufr (250ml)

10 mM Tris	302,85 mg
10 mM Na ₂ EDTA	935,5 mg
100 mM NaCl	1,461 g

Rozpustit v destilované vodě a doplnit do 250 ml, upravit na pH 7,5 (1M NaOH), uchovávat v ledničce v 250 ml odměrné baňce s krystalem Thymolu.

6.5. Přístroje

biologický termostat

digestoř

digitální váhy

elektromagnetická míchačka

fluorescenční mikroskop Olympus AX70 s kamerou SensiCam 12 Bit Cooled Imaging

homogenizátor Polytron Kinematica AG, Mixing technology, PT 13 000D

světelný mikroskop Zeiss Primo Star

třepačka

vodní lázeň

7. Výsledky

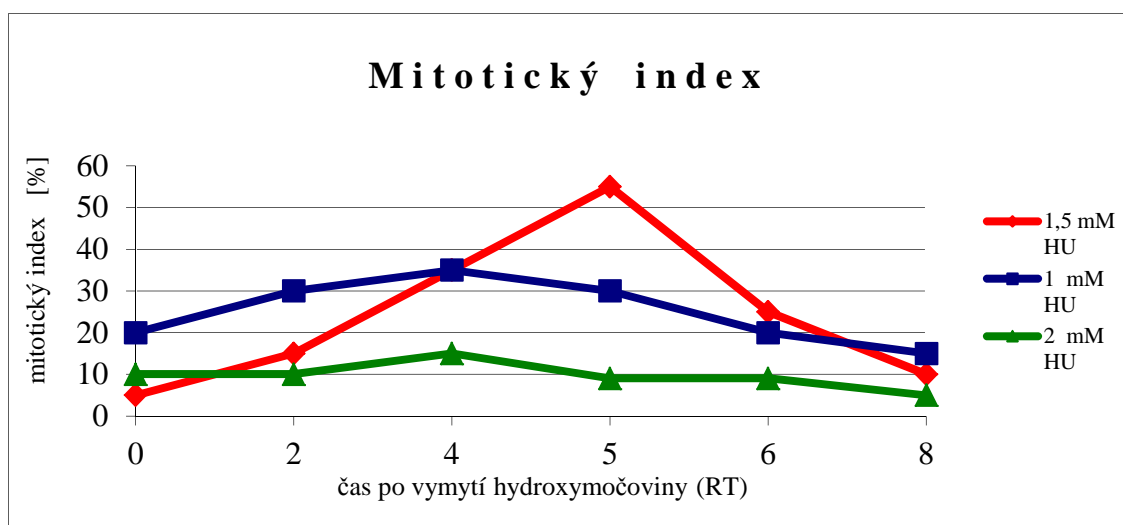
7.1. Příprava rostlinného materiálu

Kořenový meristém jsem získala z 300 naklíčených semen kostřavy luční. Byly vyzkoušeny dva postupy klíčení. Při prvním způsobu klíčení, kdy byla semena umístěna do plastových nosičů, byla zaznamenána klíčivost u 75 % semen. Při druhém způsobu klíčení, kdy byla semena volně umístěna na Petriho misku, bylo dosaženo o 20 % vyšší klíčivosti semen (95 %).

7.2. Synchronizace buněčného cyklu

Na synchronizaci buněčného cyklu jsem vyzkoušela tři koncentrace hydroxymočoviny: 1mM; 1,5mM a 2mM. Z mitotického indexu jsem určila míru synchronizace na základě vyhodnocení nejméně 300 buněk pro každý odběr (Obr. 11).

Obr. 11. Vývoj mitotického indexu pro tři koncentrace hydroxymočoviny (1mM; 1,5mM a 2mM).



Z Obr. 11. lze pozorovat, že u 1mM roztoku hydroxymočoviny nebylo buněčné dělení dostatečně zastaveno. Oproti tomu u 2mM roztoku hydroxymočoviny bylo dělení buněk výrazně pozastaveno i po osmi hodinách po odstranění bloku buněčného cyklu. Mitotická aktivita buněk byla příliš nízká, většina buněk se i po osmi hodinách stále nacházela v profázi. Při použití 1,5mM roztoku hydroxymočoviny byl mitotický index 50 – 60 % po 4,5 hodinách od odstranění bloku buněčného cyklu (Obr. 12). Mitotická aktivita buněk byla dostatečná pro další experimenty.



Obr. 12. Mitotická aktivita meristematických buněk kostřavy luční (zvětšeno 400x). Preparát kořenového meristému byl připraven z kořínků odebraných po 4,5 hodinách (RT) od vymytí 1,5mM hydroxymočoviny.

7.3. Akumulace metafází

Pro akumulaci metafází jsem použila tři substancí: APM, oryzalinu a rajského plynu (N_2O). Roztok APM (2 h./2,5 μ M, Tab. 3) poskytoval pouze 30-34 % buněk v mitóze a navíc způsoboval vysokou lepivost metafázních chromozomů, což vedlo k tvorbě shluků metafázních chromozomů. Pro další experimenty tak nebyl vhodný.

Tab. 3. Metafázní index vypočítaný z roztakových preparátů kořenových špiček barevných Feulgenovou reakcí. Synchronizované kořenové meristémy byly ovlivněny APM (2 h./2,5 μ M) po 5 hodinách RT.

opakování experimentu	čas po vymytí 1,5mM HU [h.]	počet buněk v metafázi	počet buněk v ostatních fázích B. C.	celkový počet buněk	metafázní index [%]
1.	5	78	182	260	30
2.	5	91	207	298	31
3.	5	105	213	318	33

Rajský plyn N_2O (2 h./5B), použitý 3,5 h. a 4 h. po odstranění bloku buněčného cyklu, rovněž nebyl vhodný pro další pokusy. Metafázní chromozomy byly nedostatečně kondenzované, metafázní index nedosáhl ani 50 % (Tab. 4). Vyšší metafázní index poskytl plyn (N_2O , 2 h./5B), použitý 4,5 hodiny po odstranění bloku buněčného cyklu. Bohužel, působení plynu (N_2O , 2 h./5B) a následná 2% formaldehydová Tris fixáž, způsobovaly

výrazné zasychání kořínků a velkou ztrátu metafázních chromozomů, proto byla akumulace pomocí plynu N₂O využita pouze na optimalizaci formaldehydové Tris fixáže.

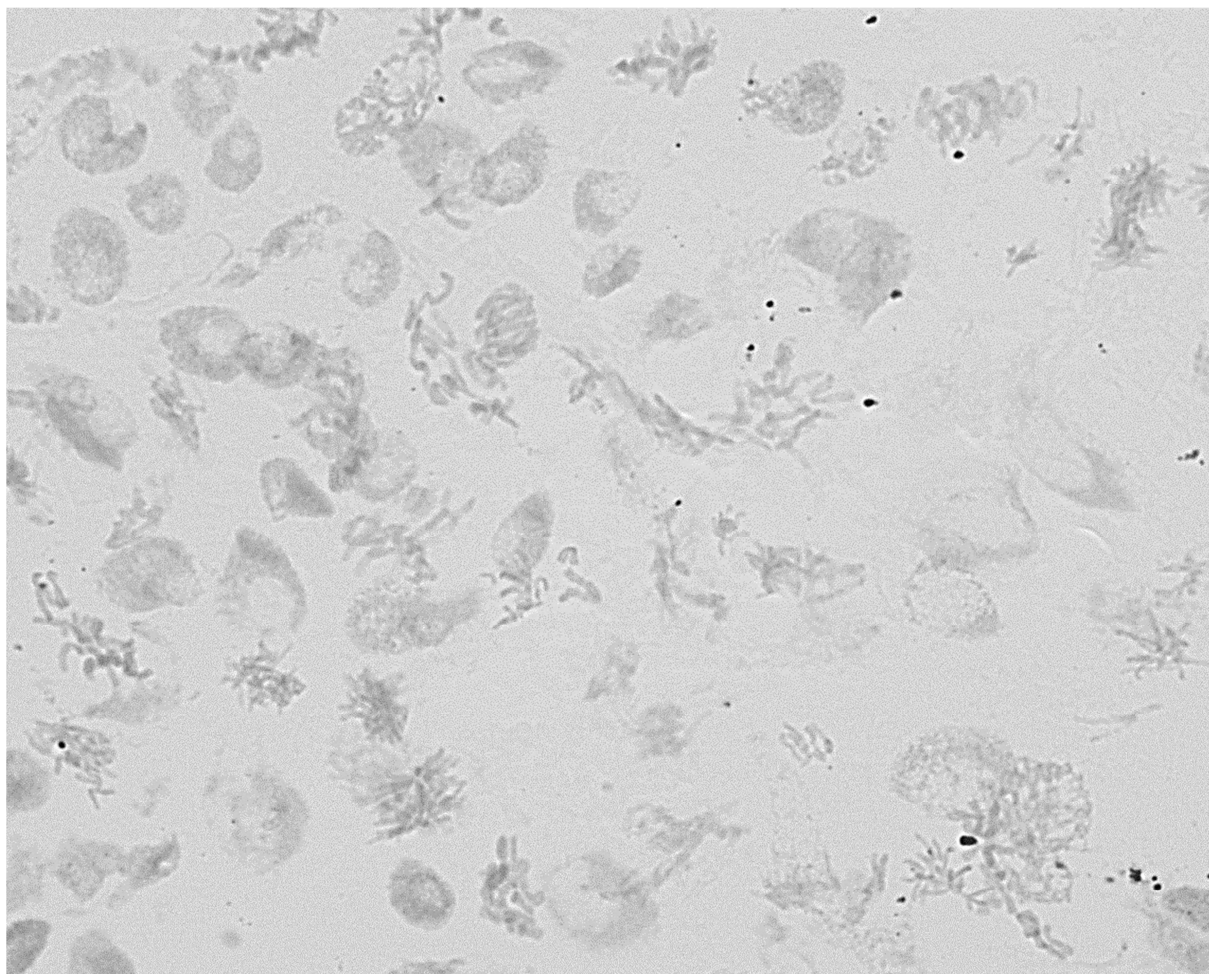
Tab 4. Metafázní index vypočítaný z roztlakových preparátů kořenových meristémů kostřavy luční, barvených Feulgenovou reakcí. Synchronizované kořenové meristémy byly ovlivněny plynem N₂O (2 h./5B) ve třech časech RT.

čas po vymytí 1,5mM HU [h.]	délka působení plynu N₂O [h.]	průměrný počet buněk v metafázi	průměrný počet buněk v ostatních fázích B. C.	celkový počet buněk	metafázní index [%]
3,5	2	105	175	280	38
4	2	137	180	317	43
4,5	2	153	132	285	54

Nejvyšší metafázní index poskytlo použití oryzalinu (2 h./5μM). Roztok oryzalinu byl aplikován 4,5 hodiny po odstranění bloku buněčného cyklu (Tab. 5, Obr. 13).

Tab. 5. Metafázní index vypočítaný z roztlakových preparátů kořenových meristémů kostřavy luční, barvených Feulgenovou reakcí. Na synchronizované kořenové meristémy byl ve třech časech RT aplikován oryzalin (2 h./5μM).

čas po vymytí 1,5mM HU [h.]	délka působení 5μM oryzalinu [h.]	průměrný počet buněk v metafázi	průměrný počet buněk v ostatních fázích B. C.	celkový počet buněk	metafázní index [%]
4	2	109	137	246	44
4,5	2	178	76	254	70
5	2	147	163	310	48



Obr. 13. Metafázní chromozomy košťavy luční, které byly po 4,5 hodinách RT, ovlivněny roztokem oryzalinu (2 h./5 μ M), zvětšení 600x.

7.4. Izolace chromozomů do suspenze

Z testovaných variant (Tab. 6) byla vybrána 2% formaldehydová Tris fixáž o délce 20 minut po 4,5 hodinách od vymytí 1,5mM hydroxymočoviny a použití plynu N₂O (2 h./5B) k akumulaci metafází. Tato varianta byla nejvhodnější, protože poskytovala dostatečné množství metafázních chromozomů, vhodných pro třídění průtokovou cytometrií. Poté byly kořenové špičky košťavy luční nakrájeny a umístěny do 750 ml LB01 lyzačního pufru.

Tab. 6. Testované časy 2% formaldehydové Tris fixáže ve třech různých časech po vymytí 1,5mM hydroxymočoviny Hoaglandovým roztokem. Na akumulaci metafází byl použit plyn N₂O (2 h./5B).

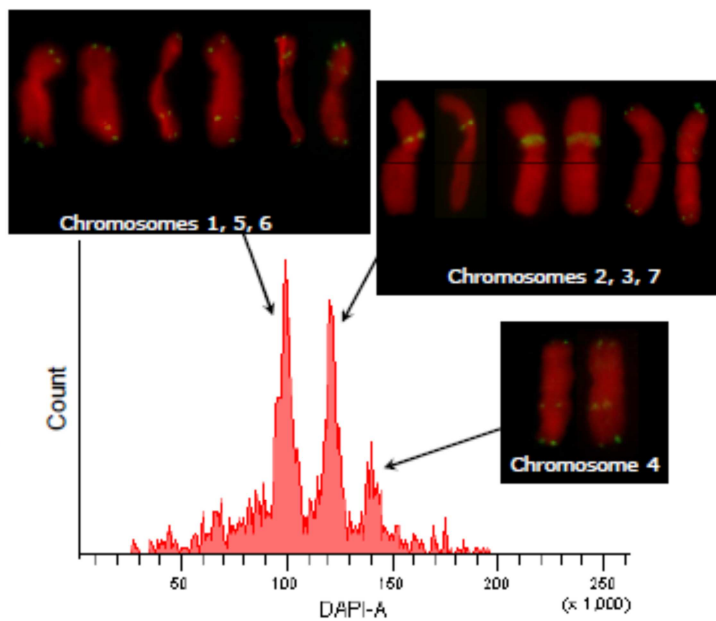
čas [h.] po vymytí 1,5mM HU Hoaglandovým roztokem	délka 2% formaldehydové Tris fixáže [min.]
3,5	20
4	20
4	25
4,5	15
4,5	20
4,5	25
4,5	30

7.4.2. Optimalizace homogenizace

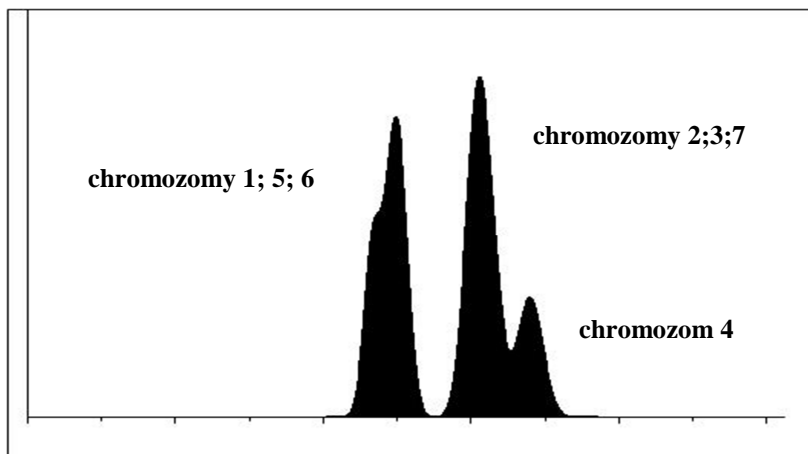
Při homogenizaci 13 000ot./18 000ot./ 15 sekund byly ve fluorescenčním mikroskopu pozorovány rozmotané a poškozené metafázní chromozomy, což nebylo vhodné pro třídění průtokovou cytometrií. Porovnáváním kvality morfologie izolovaných chromozomů z preparátů různých variant (Tab. 6), pozorovaných ve fluorescenčním mikroskopu, byla určena optimální délka 2% formaldehydové Tris fixáže 20 minut, s homogenizací 20 000ot./15s.

7.5. Třídění chromozomů průtokovou cytometrií

Po izolaci chromozomů byla suspenze obarvena pomocí DAPI a vložena do průtokového cytometru. Byl získán reálný histogram rozložení jednotlivých chromozomů kostřavy luční (Obr. 14). Rozložení histogramu odpovídalo teoretickému rozložení chromozomů (Obr. 15). To bylo určeno na základě délky jednotlivých chromozomů kostřavy luční (Kopecký *et al.*, 2010). V reálném i teoretickém (počítačově zpracovaném) histogramu byly chromozomy rozděleny dle své délky do tří píků. První pík byl tvořen chromozomy 1; 5 a 6. Druhý pík byl tvořen chromozomy 2; 3 a 7. Třetí pík tvoří nejdelší chromozom 4, který tak lze jako jediný samostatný třídít pomocí průtokové cytometrie.

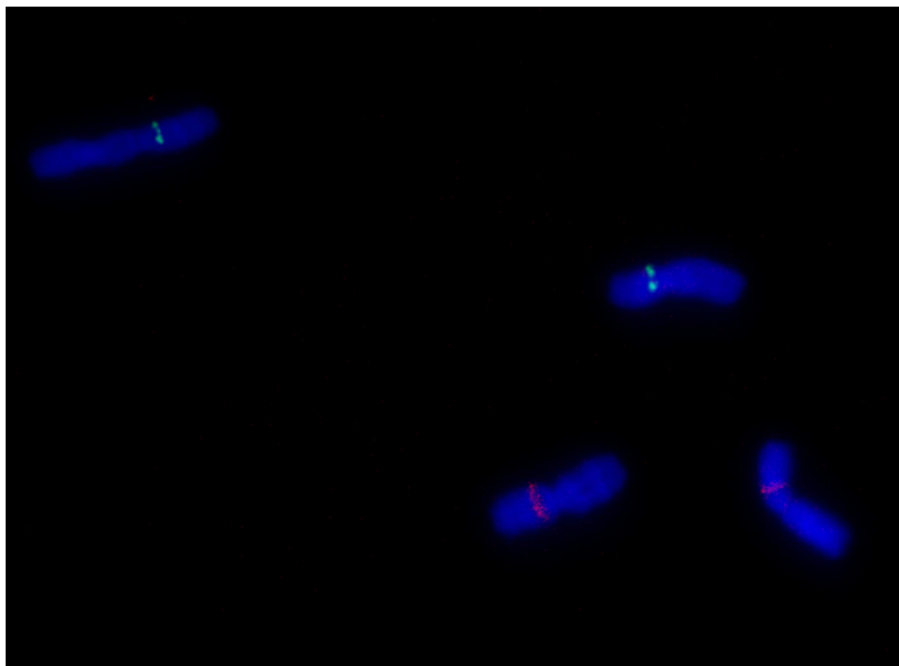


Obr. 14. Histogram, určující rozložení chromozómů do jednotlivých píků, získaný z flow-cytometrické analýzy (histogram laskavě poskytl Dr. Jan Vrána).



Obr. 15. Teoretický histogram zobrazující rozložení chromozómů do jednotlivých píků, počítačově zpracovaný na základě délky jednotlivých chromozómů kostřavy luční při $CV = 2,5\%$ (histogram poskytl Dr. David Kopecký).

Na charakterizaci tříděných chromozomů 2 a 3, které se nacházejí ve druhém píku histogramu z flow-cytometrické analýzy, byla použita FISH (Obr. 16).



Obr. 16. Fluorescenční *in situ* hybridizace s tříděnými chromozómy druhého píku (zde chromozómy 2 a 3) se sondami s 5S rDNA (zelená) a 45S rDNA (červená). Chromozóm 3, je jediný chromozóm, který má lokus 45S rDNA a chromozóm 2 je jediný, který má lokus 5S rDNA (obrázek poskytnul Dr. David Kopecký).

7.6. Optimalizovaný protokol synchronizace buněčného cyklu, akumulace metafází a izolace chromozomů u kostřavy luční

V předkládané práci byl poprvé vypracován optimalizovaný protokol synchronizace buněčného cyklu, akumulace metafází a izolace chromozomů u trav. Souhrn jednotlivých kroků, vedoucích k třídění chromozomů průtokovou cytometrií shrnují body 1-6.

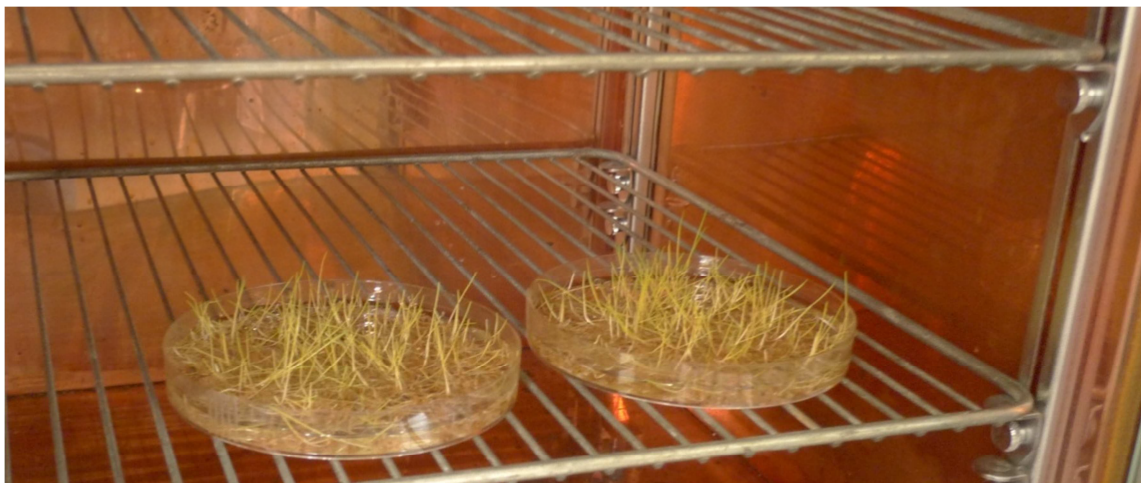
1. Klíčení semen kostřavy luční: 6 dní
2. Synchronizace buněčného cyklu: 1,5mM hydroxymočovina, 18 hodin
3. Ozdravná doba (RT): Hoaglandův roztok, 4, 5 hodin
4. Akumulace metafází: 5 μ M oryzalin, 2 hodiny
5. Fixáž: 2% formaldehydová Tris fixáž, 20 minut
6. Homogenizace 20 000ot. /15s.

7.6.1. Postup synchronizace buněčného cyklu

1. Bylo vyseto 300 semen kostřavy luční (Obr. 17). Po šesti dnech semena naklíčila kořínky o délce 2-4 cm.

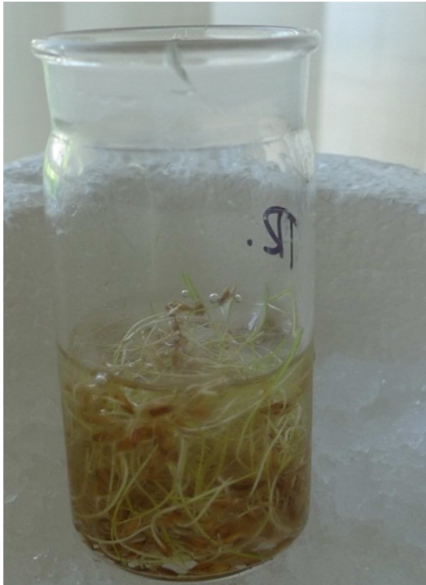


2. Na nezakryté Petriho misce (Obr. 18) umístěné v termostatu probíhala:
 - 18 hodinová synchronizace 1,5 mM hydroxymocovinou
 - 4,5 hodin RT Hoaglandovým roztokem
 - 2 hodinová akumulace metafází 5 μ M oryzalinem



Obr. 18. Naklíčená semena kostřavy luční umístěná v termostatu (25°C).

- Poté byly celé naklíčené rostlinky ponořeny na 20 minut do 2% formaldehydové Tris fixáže (Obr. 19).



Obr. 19. Naklíčené rostlinky ponořené do 2% formaldehydové Tris fixáže.

- Po fixáži byly kořenové špičky nakrájeny a přeneseny do LB01 lyzačního pufru, v němž byly mechanicky homogenizovány (Obr. 20).



Obr. 20. Petriho miska s nakrájenými kořenovými špičkami kostřavy luční (v levo). Špičky kostřavy luční umístěné v LB01 lyzačním pufru, před mechanickou homogenizací (v pravo).

- Vzniklá suspenze metafázních chromozomů byla po obarvení DAPI použita pro flow-cytometrické analýzy.

8. Diskuze

Při optimalizaci synchronizace buněčného cyklu u kostřavy luční jsem vycházela z protokolu synchronizace buněčného cyklu u obilovin. Doba působení hydroxymočoviny byla odvozena z protokolů synchronizace u pšenice, ječmene a žita, kde byla použita doba působení 18 h. Pro pšenici a ječmen byl použit 2mM roztok hydroxymočoviny, pro žito dokonce 2,5mM roztok (Doležel *et al.*, 1999). Na synchronizaci buněčného cyklu u kostřavy luční byla testována hydroxymočovina o koncentraci 1 mM, 1,5 mM a 2 mM. Optimální synchronizace buněčného cyklu kostřavy luční bylo dosaženo při použití 1,5mM roztoku hydroxymočoviny.

Po synchronizaci buněčného cyklu byla hydroxymočovina vymyta a nahrazena Hoaglandovým roztokem. Z roztakových preparátů kořenových špiček byla určena délka ozdravné doby (RT, recovery time) u kostřavy luční 4,5 hodin, což představovalo dvouhodinové zkrácení v porovnání s ječmenem, u něhož je ozdravná doba 7 hodin (Lysák *et al.*, 1999b).

Na akumulaci metafází byl u pšenice, ječmene i žita použit roztok APM, které působil 3 hodiny (Doležel *et al.*, 1999). U kostřavy luční jsem vyzkoušela tři akumulární činidla: rajský plyn (N_2O) a roztoky APM a oryzalinu. Akumulární činidla působila vždy 2 hodiny. Zkrácení akumulární doby nemělo zásadní vliv na množství metafázních chromozomů v suspenzi. Roztok APM způsoboval lepivost metafázních chromozomů a nebylo možné jej použít na další experimenty. Použitím rajského plynu bylo dosaženo metafázního indexu 54 %, ale nebylo možné jej použít na přípravu suspenze chromozomů pro třídění průtokovou cytometrií. Při aplikaci plynu N_2O totiž docházelo ke značným ztrátám metafázních chromozomů, které byly způsobeny zasycháním tenkých kořínek kostřavy. Plyn N_2O byl však s úspěchem použit na akumulaci metafází u kukuřice (Dr. J. Číhalíková, osobní sdělení). Kukuřice má ale oproti kostřavě mohutnější kořeny, u nichž nedochází k zasychání. Nejvyšší metafázní index 70 % poskytl roztok oryzalinu a byl navržen jako optimální pro další experimenty. Ledová voda byla s úspěchem použita na u pšenice (Vrána *et al.*, 2000), žita (Kubaláková *et al.*, 2003) a ječmene (Lysák *et al.*, 1999b). Ledová voda byla též s úspěchem využita u kostřavy luční, kdy došlo k vyšší spiralizaci metafázních chromozomů. Výhodou této techniky je možnost formaldehydové Tris fixáže až ráno.

Dvouprocentní formaldehydová Tris fixáž, která byla použita u kostřavy luční, byla použita též u pšenice (Vrána *et al.*, 2000), ječmene (Lysák *et al.*, 1999b) a žita (Kubaláková *et*

al., 2003). Délka 2% formaldehydové Tris fixáže 20 minut byla optimální nejen pro kostřavu luční, ale i pro ječmen a pšenici (Doležel *et al.*, 1999).

Synchronizace buněčného cyklu a následná izolace chromozomů do LB01 lyzačního pufu, byla využita na třídění chromozomů pomocí průtokové cytometrie. Takto získané chromozomy byly využity na konstrukci chromozomově specifických BAC knihoven a mapování genomu hospodářsky významných plodin, mezi něž patří pšenice setá a ječmen setý a žito seté. Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je allohexaploid ($2n=6x=42$) s komplexním genomem, složeným ze tří příbuzných genomů (AABBDD, Bennet *et al.*, 1991). Po optimalizaci buněčného cyklu u pšenice (Vrána *et al.*, 2000) byl získán histogram, zobrazující čtyři píky. Tři píky byly tvořeny třemi a více chromozomy, čtvrtý samostatný pík byl tvořen chromozomem 3B, který jediný lze třídit průtokovou cytometrií. Další pšeničné chromozomy bylo možné třídit pouze s využitím speciálních telosomických linií, které obsahovaly jednotlivá ramena pšeničných chromozomů. Ramena pšeničných chromozomů tvoří samostatné píky, které můžeme třídit pomocí průtokové cytometrie. U ječmene a žita lze pomocí průtokové cytometrie třídit rovněž jen jeden chromozom-1H u ječmene a 1R u žita (Lysák *et al.*, 1999, Kubaláková *et al.* 2003). U kostřavy luční lze samostatně třídit chromozom 4. Tohoto bude využito pro NG sekvenování tohoto chromozomu. Natříděné chromozomy budou rovněž použity na cytogenetické mapování pomocí FISH a fyzické mapování s použitím chromozomově specifických markerů pomocí PCR.

Dle synchronizačního protokolu pro kostřavu luční bude tato metoda rovněž optimalizována pro zástupce rodu jílek a využita pro mapování příbuzných travních druhů.

9. Závěr

V této práci byla vůbec poprvé vypracována metodika synchronizace buněčného cyklu u kořenových meristémů trav, konkrétně kostřavy luční (*F. pratensis* Huds.). Na rozdíl od předchozích protokolů synchronizace buněčného cyklu u pšenice (Vrána *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 1997, Kubaláková *et al.*, 2005), ječmene (Lysák *et al.*, 1999b) a žita (Kubaláková *et al.*, 2003) zde byla poprvé použita nová metodika klíčení semen. Při prvním i druhém způsobu klíčení byla semena umístěna v zakryté Petriho misce v termostatu při teplotě 25°C. Při prvním způsobu klíčení byla semena vyseta do plastových nosičů. V druhém postupu byla semena pěstována tři dny v termostatu. Poté byla na dva dny umístěna na třepačku. Po dvou dnech na třepačce byla naklíčená semena opět umístěna do termostatu. Takto bylo dosaženo vyšší klíčivosti semen. Oproti prvnímu postupu došlo k 20% nárůstu klíčivosti semen.

Při optimalizaci buněčného cyklu byl použit 1,5mM roztok hydroxymočoviny, který působil 18 hodin. Bylo dosaženo mitotického indexu 54 %, což je oproti asynchronní populaci pětinasobný nárůst. Byl vyzkoušen nový způsob ovlivňování kořenových meristémů roztoky. Vzhledem k velikosti semen kostřavy luční a křehkosti kořínků nebylo možné ovlivňovat pouze kořenové meristémy. Do roztoků byla ponořena celá semena. Bylo zjištěno, že ani přímé ponoření naklíčených semen kostřavy luční do všech použitých roztoků nemá negativní vliv na optimalizaci buněčného cyklu kořenových meristémů. Na rozdíl od předchozích protokolů roztoky nebyly během synchronizace buněčného cyklu a následné akumulace metafází provzdušňovány. Bylo zjištěno, že provzdušňování roztoků nemá zásadní vliv na jejich působení při synchronizaci buněčného cyklu u kostřavy luční.

Na akumulaci metafází byla vyzkoušena tři akumulční činidla: roztoky APM a oryzalinu a plyn N₂O. Dostatečné množství metafázních chromozomů, tedy metafázní index 54 %, poskytl plyn N₂O. Při dalších postupech však bylo zjištěno, že po akumulaci tímto plynem dochází k značné ztrátě metafázních chromozomů, která byla způsobena zasycháním kořínků. Přínosem tohoto postupu byla netoxicity plynu N₂O. Pro třídění chromozomů průtokovou cytometrií je však třeba získat co nejvyšší počet metafázních chromozomů. Ten poskytl roztok oryzalinu (metafázní index 70 %). Po akumulaci metafází byly chromozomy zafixovány 20 minut v 2% formaldehydové Tris fixáži.

10. Literatura

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): Základy buněčné biologie Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero Publishing.

Alm V., Fang C., Busso C.S., Devos K.M., Vollan K., Grieg Z., 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: 25-40.

Arumuganathan K., Slattery J.P., Tanksley S.D., Earle E.D. (1990): Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosomes of tomato. Theor. Appl. Genet. 82: 101-111.

Barik D., Baumann W.T., Paul M.R., Novak B., Tyson J.J. (2010): A model of yeast cell cycle regulation based on multisite phosphorylation. EMBO and Macmillan Publishers Limited. 405: 1-18.

Bailey J.P., Bennet S.T., Stace C.A. (1993): Genomic *in situ* hybridization identifies parental chromosomes in the wild grass hybrid x *Festulopia hubbardii*. Heredity. 71: 413-420.

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. Theor. Appl. Genet. 122: 1133-1147.

Bennett M.D., Leitch I. (2005): Genome size evolution in plants. In: Gregory T. ed. The evolution of the genome. London: Elsevier Academic Press. 89-162.

Bergounioux C., Perennes C., Brown S.C., Gadat P. (1988): Cytometric analysis of growth regulator dependent transcription and cell cycle progression in *P. hybrida* protoplast cultures. Planta. 175: 500-505.

Catalán P., Torrecilla P., López Rodríguez J. A., Olmstead R.G. (2004): Phylogeny of festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (*Poae*, *Poideae*) inferred from ITS and *trnL* - F sequences. Molec. Phylogenetics Evol. 31: 517 - 541.

Cheng Z., Presting G.G., Buell C.R., Wing R.A., Jiang J. (2001): High resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. Genetics. 157: 1749-1757.

Chinery M. (2002): Flóra a fauna Evropy, Slovart.

- Clayton W. D., Harman K. T., Williamson H.** (2002): World grass species: Descriptions, identification, and information retrieval.
- Clayton W. D., Renvoize S. A.** (1986): Genera graminum: Grasses of the world. Kew Bull. Addit. Ser. 13: 1 - 389.
- De Veylder L., Beckman T., Inzé D.** (2007): The ins and outs of the plant cell cycle. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8: 655–665.
- Doležel J., Bartoš J.** (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany. 95: 99-110.
- Doležel J., Číhalíková J., Weiserová J., Lucretti S.** (1999): Cell cycle synchronization in plant root meristems. Methods in Cell Science. 21: 95-107.
- Doležel J., Lysák M.A., Van den Houwe I., Doleželová M., Raux N.** (1997a): Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. Infomusa. 6: 6-9.
- Doležel J., Číhalíková J., Luceretti S.** (1992): A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L.. Planta. 188: 93-98.
- Draper J., Mur L.A.J, Jenkins G., Biswas G.C.G., Bablak P., Hasterok R., Routledge A.P.M.** (2001): *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. Plant Physiology. 127: 1539-1555.
- Feulgen R., Rossenbeck H.** (1924): Microscopisch Chemisches nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure. Zells. Physiol. Chemie. 135: 203-248.
- Franz P.F., Alonso-Blanco C., Liharska T.B., Peeters A.J.M., Zabel P., de Jong J.H.** (1996): High resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extend DNA fibers. The Plant Journal. 9 (3): 421-430.
- Galbraith D.W.** (2004): Cytometry and plant sciences: a personal retrospective. Cytometry. 58A: 37-44.
- Gall J.G., Pardue M.L.** (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63: 378-383.
- Galindo M., Pratap J., Young D.W., Hovhannisyán H., Im H.J., Choi J., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., Wijnen A.J.** (2005): The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. J. Biol. Chem. 280(21): 20274-20285.
- Grulich V., Krahulec F., Šmarda P., Kočí K.** (2002): *Festuca p.* 828 - 834. In: Kubát K. [ed.], Klíč ke květeně České republiky. Academia. Praha.

- Hemerly A., De Almeida Engler J., Bergounioux C., Van Montagu M., Engler G., Inzé D., Ferreira P.** (1995): Dominant negative mutants of the *Cdc2* kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* 14:3925-3936.
- Humphreys M.W., Pašakinskiene I., James A.R., Thomas H.** (1998): Physically mapping quantitative traits for stress-resistance in the forage grasses. *J. Exp. Bot.* 49: 1611-1618.
- Inda L. A., Segarra - Moragues J.G., Peterson M.A., Müller J., Catalán P.** (2005): Phylogenetic studies and the radiation of the New and Old World festucoids (*Loliinae*, *Pooideae*, *Poaceae*). poster presentation, XVII International Botanical Kongres.Vinna. Abstracts p. 433. IBC Organizing Committee.
- Inzé D., De Veylder L.** (2006): Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40: 77-105.
- Inzé D.** (2005): Green light for the cell cycle. *The EMBO Journal.* 24: 657-662.
- Jackson S.J., Wang M.L., Goodman H.M., Jiang J.** (1998): Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome.* 41: 566-572.
- Jeong B.R., Housley T.L.** (1990): Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. *Plant Physiol.* 93: 902 – 906.
- Jiang J., Gill B., Wang G.L., Ronald P.C., Ward D.C.** (1995): Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4487-4491.
- John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W.** (1969): RNA - DNA hybrids at the cytological level. *Nature.* 223: 582-587.
- de Jong J.H., Fransz P., Zabel P.** (1999): High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends Plant. Sci.* 4: 258-263.
- Joubés J., De Schutter K., Verkest A., Inzé D., De Veylder L.** (2004): Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *PlantJ.* 37: 889-896.
- King J., Armstead I.P., Donnison S.I., Roberts L.A., Harper J.A., Skot K., Elborough K., King I.P.** (2007): Comparative analyses between *Lolium /Festuca* introgression lines and rice reveal the major fraction of functionally annotated gene model is located in recombination poor/very recombination-poor regions of the genome. *Genetics.* 177: 597-606.
- Kopecký D., Havránková M., Loureiro J., Castro S., Lukaszewski A.J., Bartoš J., Kopecká J., Doležel J.** (2010): Physical distribution of homoeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. *Cytogenetic and Genome research.* 29 (1-3): 162-172.

- Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J.** (2008): Meiotic behaviour of individual chromosomes of *Festuca pratensis* in tetraploid *Lolium multiflorum*. *Chromosome Research*. 16: 987-998.
- Kopecký D.** (2005): Využití androgeneze *in vitro* pro tvorbu rostlinných hybridů a charakterizace hybridních rostlin. Univerzita Palackého. Olomouc.
- Könemann, Königswinter** (2007): Botanika, Ilustrovaný abecední atlas 10 000 druhů rostlin z celého světa s návodem jak je pěstovat. Slovart.
- Kubaláková M., Kovářová P., Suchánková P., Číhalíková J., Bartoš J., Lucretti S., Watanabe N., Kianian S.F., Doležel J.** (2005): Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics*. 170: 823-829.
- Kubaláková M., Valárik M., Bartoš J., Vrána J., Číhalíková J., Doležel J.** (2003): Analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. *Genome*. 46: 893-905.
- Langer-Safer P.R., Levine M., Ward D.C.** (1982): Immunocytological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 4381- 4395.
- 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: 59-64.
- Lee J.H., Arumuganathan K., Yen Y., Kaeppeler S., Baenziger P.S.** (1997): Root tip cell cycle synchronization and metaphase - chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*. 40: 633-638.
- Lendvai A., Nikovics K., Bakó L., Dudits D., Györgyey J.** (2002): Synchronization of *Orizasetiva* L. cv. Taipei - 309 cell suspension culture. *Acta Biologica Szegedlensis*. 46 (3-4): 39-41.
- Leśniewska A., Pontika A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Zwierzykowska E., Zwierzykowski Z., James A.R.** (2001): Androgenesis from *Festuca pratensis* x *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilise rare gene combinations for grass breeding. *Heredity*. 86: 167-176.
- Lysák M.A., Číhalíková J., Kubaláková M., Šimková H., Künzel G., Doležel J.** (1999b): Flow karyotyping and sorting of mitotic chromosomes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chromosome Research*. 7: 431-444.
- Lundquist A.** (1962): The nature of the two - loci incompatibility system in grasses. II Number of alleles at the incompatibility loci in *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas*. 48: 169-181.

- Malik C.P.** (1967): Hybridization of *Festuca* species. Canadian Journal of Botany. Volume. 45: 1025-1029.
- Meskiene I., Bogre L., Dahl M., Pirck M., Cam Ha D.T., Swoboda I., Heberle-Bors E., Ammerer G., Hirt H.** (1995): cycMs3, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0- to G1 transition of the cell cycle. Plant Cell. 7: 759-771.
- Nagata T., Kumagai F.** (1999): Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. Methods in Cell Science. 21: 123-127.
- Naučný slovník zemědělský** (1987): Ústav vědeckotechnologických informací pro zemědělství. Praha. printed in Czechoslovakia. 315-321.
- Neumann P., Lysák M., Doležel J., Macas J.** (1998): Isolation of chromosomes from *Pisivum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. Plant Science. 137: 205-215.
- Novák F.J., Schwammenhöferová K., Číhalíková J., Ondřej M.** (1979): Partial synchronization of cell division in root meristem induced by 5-aminouracil. Biologia Plantarum. 21: 51-56.
- Olszewska A.J., Marciniak K., Kuran H.** (1990): Analysis of mitotic synchrony induced by cold treatment in root meristems of *Vicia faba* L. Environ Exp. Bot. 30: 373-382.
- Pašakinskiene I., Jones N.** (2005): Challenging genome integrity. Biologia. 1: 3-9.
- Shapiro H.** (2004): Practical flow cytometry, 4th edn. New York: Wiley - Liss.
- Sharma A.K.** (1999): Synchronization in plant cell an introduction. Methods in Cell Science. 21: 73-78.
- Simillion C., Van de Lope K., Van Montagu M., Zabeau M., Van de Peer Y.** (2002): The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 13627-13632.
- Šmarda P.** (2005): Biosystematická studie středoevropských kostřav *Festuca* Ser. *Psammophilae* Pawlus. Masarykova univerzita. Brno.
- Thomas H.M., Harper J.A., Meredith M.R., Morgan W.G., King I.P.** (1997): Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by *in situ* hybridization. Genome. 40: 406-410.
- Veuskens J., Marie D., Brown S.C., Jacobs M., Negrutiu I.** (1995): Flow sorting of the Y sex-chromosome in the dioecious plant *Melandrium album*. Cytometry. 21: 363-373.
- Vrána J., Kubaláková M., Šimková H., Číhalíková J., Lysák M.A., Doležel J.** (2000): Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetics. 156: 2033-2041.

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

Zwierzykowski Z., Tayyar R., Brunell M. Lukaszewski A. J. (1998): Genome recombination in intrageneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *JHered* 89: 328-342.

11. Seznam použitých zkratek a symbolů

AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism, polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů
APM	amiprophosmethyl
BAC	bacterial artificial chromosome, umělý bakteriální chromozom
B. C.	buněčný cyklus
DAPI	4,6 – diamidino – 2- fenylyndol
DArT	Diversity Arrays Technology
EST	expressed sequence tags, místa s expresní adresou
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization, fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
G₁, G₂	gap fáze buněčného cyklu
GISH	genomic <i>in situ</i> hybridization, genomová <i>in situ</i> hybridizace
HU	hydroxyurea, hydroxymočovina
mM	milimolární
n	haploidní sada chromozomů
NOR	nucleolus organizer region, oblast organizátoru jadérka
NG	next generation sequencing
rDNA	ribosomal DNA, ribozomální DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism ,polymorfizmus délky restrikčních fragmentů
RT	recovery time, ozdravný čas
S	syntetická fáze buněčného cyklu
sp.	species, druh
μM	mikromolární
μm	mikrometr
μl	mikrolitr

Přílohy

Abstrakt, který bude prezentován formou posteru na konferenci The Plant Genomics European Meeting (Plant GEM), který se koná ve dnech 4. - 9. května 2011 v Istanbulu.

Chromosome Genomics: New Milestone in Genome Analysis of Forage and Turf Grasses

David Kopecký, Jarmila Číhalíková, Jan Vrána, Jitka Kopecká, Štěpán Stočes, Miroslava Havránková, Jan Bartoš, Jan Šafář, Hana Šimková, Jaroslav Doležel

Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Sokolovská 6, CZ-77200, Olomouc, Czech Republic, email: kopecky@ueb.cas.cz

Grasses are among the most important and widely cultivated plants. On arable land they are grown for grassland and silage production. Meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) is one of the predominant grass species especially in temperate and Northern regions because of its ability to survive under freezing conditions. Moreover, it has been used widely in intergeneric hybridization with various ryegrass species, and several superior *Festulolium* cultivars have been produced. Because of the large genome (1C=3175 Mbp) and high proportion of repetitive DNA, genomic studies are difficult. In this work, we describe a possibility to dissect meadow fescue genome to smaller parts – individual chromosomes and groups of chromosomes. Following the chromosome sorting strategy originally developed for legumes and cereals we have developed a procedure for grasses and currently we are able to sort *F. pratensis* chromosome 4 and two groups of chromosomes: chromosomes 2, 3 and 7 and chromosomes 1, 5 and 6. As the first step we will sequence chromosome 4 by Illumina with the expected 20x coverage and assemble low copy and genic regions. This will facilitate detailed comparative analysis using sequenced genomes of rice, *Brachypodium* and sorghum and provide the first insight into the genome composition of this species. The possibility to purify chromosome 4 opens the way for more efficient analysis of genomic loci on this chromosome underlying important traits such as freezing tolerance. This work has been supported by the Czech Science Foundation (grant award P501/11/0504) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the European Regional

Development Fund (Operational Programme Research and Development for Innovations No. CZ.1.05/2.1.00/01.0007).

Keywords: fescue, chromosome sorting, flow cytometry, grasses, sequencing

Poster na Plant GEM

CHROMOSOME GENOMICS: NEW MILESTONE IN GENOME ANALYSIS OF FORAGE AND TURF GRASSES

David Kopecký, Jarmila Čiháliková, Jan Vrána, Jitka Kopecká, Štěpán Stočes, Miroslava Havránková, Jan Bartoš, Jan Šafář, Hana Šimková and Jaroslav Doležel

Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Sokolovská 6, CZ-77200, Olomouc, Czech Republic, email: kopeccky@ueb.cas.cz



BACKGROUND

Grasses are among the most important and widely cultivated plants. On arable land they are grown for grassland and silage production. Meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) is one of the predominant grass species especially in temperate and Northern regions because of its ability to survive under freezing conditions. Moreover, it has been used widely in intergeneric hybridization with various ryegrass species, and several superior *Festulolium* cultivars have been produced. Because of the large genome (1G=3175 Mbp) and high proportion of repetitive DNA, genomic studies are difficult. In this work, we describe a possibility to dissect meadow fescue genome to smaller parts – individual chromosomes and groups of chromosomes. Following the chromosome sorting strategy originally developed for legumes and cereals we have developed a procedure for grasses and currently we are able to sort *F. pratensis* chromosome 4 and two groups of chromosomes: chromosomes 2, 3 and 7 and chromosomes 1, 5 and 6. As the first step we will sequence chromosome 4 by Illumina with the expected 20x coverage and assemble low copy and genic regions. This will facilitate detailed comparative analysis using sequenced genomes of rice, *Brachypodium* and sorghum and provide the first insight into the genome composition of this species. The possibility to purify chromosome 4 opens the way for more efficient analysis of genomic loci on this chromosome underlying important traits such as freezing tolerance.

AIMS OF THIS STUDY

- Identification of individual chromosomes of meadow fescue using FISH; developing molecular karyotype
- Test the possibility to sort individual chromosomes of meadow fescue
- Sequence individual chromosome (4) of meadow fescue by NGS

KARYOTYPING OF MEADOW FESCUE

Chromosome	1	2	3	4	5	6	7
Size (Mbp)	373	485	499	543	403	394	484
Cen							
Tel							
45SrDNA							
5SrDNA							
1F21							
1G18							
2N14							
2O16							
1K11							

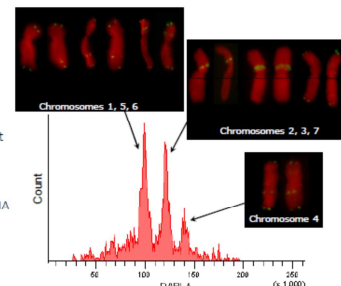
Karyotyping was realized using FISH with Centromeric probe of wheat (Cen), Telomeric probe of wheat (Tel), 45S rDNA, 5S rDNA, and selected BAC clones from BAC library of *F. pratensis* (<http://olomouc.ueb.cas.cz/dnalib/fp>).

CHROMOSOME SORTING

Procedure

- Synchronization of cell cycle in root meristem
- Accumulation of dividing cells in metaphase
- Preparation of suspension of intact chromosomes
- Stain of chromosomes by DNA fluorochrome
- Flow cytometrics analysis
- Chromosome sorting

Synchronization of cell cycle and chromosome sorting by flow cytometry was based on the methodology previously developed for legumes and cereals.



Flow karyotype of meadow fescue consists of two composite peaks representing specific groups of chromosomes and a peak of chromosome 4. This chromosome can be discriminated and sorted.

APPLICATIONS

Flow sorted chromosomes are superior material cytogenetic mapping by FISH and for physical mapping using PCR with specific primers. We will sequence chromosome 4 by Illumina with the expected 20x coverage and assemble low copy and genic regions (expected until end of June).

PERSPECTIVES

Similar approach can be used for more grass species. Preliminary experiments have been made with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and perennial ryegrass (*L. perenne* L.).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Czech Science Foundation (grant award P501/11/0504) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the European Regional Development Fund (Operational Programme Research and Development for Innovations No. CZ.1.05/2.1.00/01.0007).