

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Denisa Šimoníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium genetické variability u vybraných
druhů kostřav a jejich kříženců s rodem jílek**

Diplomová práce

Bc. Denisa Šimoníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Davida Kopeckého, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při realizaci této diplomové práce. Chtěla bych poděkovat i ostatním zaměstnancům Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. v Olomouci, kteří mi pomáhali při práci v laboratoři.

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá studiem genetické variability vybraných zástupců pícních trav rodu kostřava (*Festuca* L.) a jejich kříženců se zástupci rodu jílek (*Lolium* L.) zvaných *Festulolium* pomocí cytometrických a cytogenetických technik s cílem identifikovat vhodné genotypy pro novošlechtění mezirodovou hybridizací.

Z výsledků cytometrické analýzy vyplývá, že se úroveň ploidie u nově získaných genotypů *Festuca pratensis* subsp. *apennina* z vybraných lokalit Švýcarska a Itálie lišila, významnou roli sehrála nadmořská výška. Byly identifikovány diploidní, tetraploidní, a dokonce i triploidní cytotypy, na řadě lokalit se vyskytovaly dva či všechny tři cytotypy společně. Na většině vybraných lokalit překvapivě převažovaly triploidní cytotypy, v některých oblastech byli triploidii pouze jediným detekovaným cytotypem.

Pomocí genomové *in situ* hybridizace byla hodnocena genetická variabilita a stabilita genomového složení u vybraných komerčních odrůd *Festulolium* (Hostýn, Perseus, Perun). U všech odrůd byla z generace na generaci zjištěna zvyšující se převaha genomu *Lolium* nad genomem *Festuca*. V pozdějších generacích od počátečního křížení bylo ale pozorováno relativní ustálení genomového složení, i přesto zůstalo zastoupení rodičovských genomů u studovaných odrůd nevyvážené a byla zjištěna značná genetická variabilita v rámci každé odrůdy.

Na základě výsledků zjištěných cytometrickou a cytogenetickou analýzou byla z vybraných genotypů kostřav, jílků a jejich kříženců založena fenotypovací školka. Pilotní fenotypování ukázalo, že mezi jednotlivými druhy, ale i v rámci jednotlivých druhů byly detekovány velké rozdíly ve stupni mrazuvzdornosti. Vysokou míru přežití vykazovaly odrůdy kostřavy rákosovité a luční, dále pak vybrané plané tetraploidní genotypy *Festuca pratensis* subsp. *apennina* a překvapivě i triploidní cytotypy.

Tato diplomová práce poskytla nové informace o genomovém složení, genetické variabilitě a ekologii vybraných druhů rodu kostřava (*Festuca* L.) a kříženců kostřav a jílků. Je rovněž přínosem pro budoucí šlechtění nových odrůd pomocí mezidruhové hybridizace.

Summary

This MSc. thesis deals with the study on the genetic variability in selected fescue species (*Festuca* L.) and their hybrids with the ryegrasses (*Lolium* L.) using cytometric and cytogenetic techniques with aim to identify suitable genotypes for breeding new cultivars using intergeneric hybridization.

The results of flow cytometry analysis indicated large variation in ploidy level of the analysed genotypes of *Festuca pratensis* subsp. *apennina*, obtained from different locations (Switzerland and Italy) and at different altitude. The analysis revealed diploidy (diploid meadow fescue - *F. pratensis*), tetraploidy (tetraploid *F. pratensis* subsp. *apennina*), and even triploidy (hybrids of former two species). In many locations, two or even three cytotypes were grown sympatrically with frequent predominance of triploids. In some locations, triploids were the only cytotype detected.

Genetic diversity and variability in genomic constitution among individual plants in selected *Festulolium* cultivars (Hostýn, Perseus, Perun) was detected using genomic *in situ* hybridization. The analysis detected predominance of *Lolium* genome increasing since initial crosses in all cultivars. The relative stabilization of genomic composition was observed in the successive generations after initial crosses, but genomic constitution within these cultivars remained unbalanced.

According to the results obtained from flow cytometry and cytogenetic analysis in selected fescues and their hybrids with ryegrasses, selected genotypes were used for the establishment of phenotyping nursery. Pilot scoring indicated high variability in frost resistance among as well as within individual species used. High survival rate was scored in *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis* cultivars, as well as in selected tetraploid and triploid genotypes of *Festuca pratensis* subsp. *apennina*.

This thesis increased our knowledge on the genetic variability, genomic composition and ecology in selected fescue species (*Festuca* L.) and hybrids between fescues and ryegrasses (*Festulolium*). The results are also valuable for breeders due to the indication of new genotypes potentially used for forage grass breeding using interspecific hybridization.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Literární přehled.....	10
3.1	Charakteristika čeledi lipnicovité (<i>Poaceae</i>).....	10
3.1.1	Taxonomie.....	10
3.1.2	Význam vybraných druhů rodu kostřava (<i>Festuca L.</i>).....	11
3.1.2.1	Kostřava luční.....	12
3.1.2.2	Kostřava rákosovitá.....	12
3.1.2.3	Kostřavy nižšího vzrůstu s úzkými listy.....	13
3.1.3	Význam vybraných druhů rodu jílek (<i>Lolium L.</i>).....	13
3.1.3.1	Jílek vytrvalý	14
3.1.3.2	Jílek mnohokvětý.....	14
3.1.4	Mezidruhovú hybridizace u trav	15
3.1.4.1	Mezirodový hybrid <i>Festulolium</i>	15
3.2	Struktura genomu	17
3.2.1	Rod kostřava (<i>Festuca L.</i>).....	18
3.2.2	Rod jílek (<i>Lolium L.</i>).....	19
3.2.3	Mezidruhovú hybridizace u trav	20
3.2.3.1	Introgrese.....	21
3.2.3.2	Amfiploidie	22
3.3	Metody studia genomů rostlin.....	23
3.3.1	Molekulární charakterizace	23
3.3.2	Cytogenetická charakterizace	24
3.3.2.1	Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH)	26
3.3.2.2	Průtoková cytometrie.....	28
4	Materiál a metody	31
4.1	Rostlinný materiál	31
4.1.1	Cytometrická analýza	31
4.1.2	Cytogenetická analýza.....	33
4.2	Metodika.....	34
4.2.1	Analýza ploidie pomocí průtokové cytometrie	34
4.2.2	Příprava rostlinného materiálu pro odběr kořínků, fixace kořínků.....	34
4.2.3	Příprava roztlakových preparátů metafázních chromozomů	35
4.2.4	Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH) a mikroskopování	35
4.2.5	Analýza dat.....	37

4.2.6	Založení fenotypovací školky a pilotní fenotypování vybraných rostlin na mrazuvzdornost.....	37
4.3	Použité chemikálie	38
4.4	Použité roztoky a jejich příprava	39
4.5	Seznam laboratorních přístrojů.....	42
5	Výsledky.....	43
5.1	Cytometrická analýza	43
5.2	Cytogenetická analýza.....	45
5.2.1	Frekvence aneuploidie.....	49
5.2.2	Podíl rodičovského chromatinu	50
5.2.3	Homeologní rekombinace	51
5.3	Vytvoření fenotypovací školky	53
5.3.1	Pilotní fenotypování mrazuvzdornosti u jednotlivých genotypů z fenotypovací školky.....	55
6	Diskuze	56
7	Závěr	60
8	Seznam použitých zkratk.....	61
9	Použitá literatura	63
10	Přílohy	75

1 Úvod

Lipnicovité (*Poaceae*) představuje čeleď jednoděložných trav, které jsou rozšířeny převážně v mírném podnebném pásu všech kontinentů (Soreng *et al.*, 2015). Tyto trávy představují důležitý prvek řady ekosystémů. Zásadní je také jejich hospodářský význam pro člověka, neboť představují dominantní složku luk a pastvin. Okrasné druhy trav slouží ke zvelebování krajiny a k rekreačním a sportovním účelům, kdy jsou nedílnou součástí zahrad, městských zelení, trávníků a fotbalových či golfových hřišť.

Šlechtění trav je v současnosti vystaveno velké výzvě v podobě změny klimatu a s ní související potřebě těchto rostlinných druhů přizpůsobit se stresovým podmínkám (Kopecký *et al.*, 2017). Zvyšuje se rovněž poptávka po kvalitnějším krmivu pro hospodářská zvířata. Jelikož je genetická variabilita trav značně omezená, je žádoucí přinášet nové alely do souboru existujících odrůd. To může být dosaženo mezidruhovou hybridizací, kdy dochází ke křížení dvou různých druhů za vzniku mezidruhového či dokonce mezirodového hybrida. Takto vznikl i kříženec kostřav a jílků zvaný *Festulolium*, který kombinuje výhodné vlastnosti z obou rodičů, které pomáhají zajistit stabilně rostoucí výnos a současně odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům (Kopecký *et al.*, 2008).

Tato práce se zabývá studiem genomového složení mezidruhových kříženců trav a s tím související problematiky stability hybridního genomu po následující generace. Znalost struktury genomu rostlin je nezbytná pro rychlejší a efektivnější šlechtění druhů s požadovanými vlastnostmi. Experimentální část diplomové práce má tedy za cíl přispět k charakterizaci vybraných druhů trav a jejich kříženců pomocí zvolených cytometrických a cytogenetických metod.

2 Cíle práce

Cílem práce bylo vytvořit fenotypovací školku z vybraných zástupců kostřav, jílků a jejich kříženců pro studium odolnosti proti abiotickým stresům. Školka zahrnovala vybrané zástupce kostřavy luční, kostřavy luční italské, kostřavy atlaské, kostřavy rákosovité (včetně tetraploidního poddruhu *Festuca arundinacea* subsp. *glaucescens*), jílku mnohokvětého, jílku vytrvalého a mezirodových kříženců *Festulolium*. Dlouhodobým cílem tohoto projektu ve spolupráci se šlechtiteli je identifikace nových genotypů použitelných pro mezirodové křížení.

Jednotlivé dílčí cíle práce zahrnovaly:

1. Vypracovat literární rešerši o vybraných druzích trav s důrazem na agronomický potenciál mezidruhových hybridů. Zaměřit se zejména na genomové složení těchto kříženců a popsat používané metody studia genomu rostlin, především průtokovou cytometrii a genomovou *in situ* hybridizaci.
2. Charakterizovat vybrané zástupce rodu kostřava (*Festuca* L.) pomocí cytometrických technik.
3. Charakterizovat genomové složení kříženců kostřav a jílků (*Festulolium*) pomocí cytogenetických technik.
4. Založit fenotypovací školku z vybraných zástupců kostřav, jílků a jejich kříženců.
5. Provést pilotní fenotypování jednotlivých rostlin ve fenotypovací školce pro mrazuvzdornost.

3 Literární přehled

3.1 Charakteristika čeledi lipnicovité (*Poaceae*)

Úvodní kapitola je věnována nejvýznamnějším zástupcům trav čeledi *Poaceae*. Tyto trávy patří mezi nejdůležitější plodiny pěstované na Zemi, louky a pastviny pokrývají odhadem dvakrát větší plochu v porovnání s ornou půdou (Jauhar, 1993). Jsou často upřednostňovány na úkor dalších významných plodin, jako jsou např. obilniny, kukuřice, cukrová třtina a brambory. V České republice představují louky a pastviny téměř 40 % zemědělských ploch (Černoch *et al.*, 2003). Převládajícími travními rody jsou jílky (*Lolium* L.) a kostřavy (*Festuca* L.) (Kopecký *et al.*, 2008). V Evropě hrají prim dva druhy jílků, a to jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) a jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.) (Lübberstedt *et al.*, 2003).

3.1.1 Taxonomie

Z hlediska taxonomické klasifikace je čeleď lipnicovité (*Poaceae* Barnhart) řazena do říše rostliny (*Plantae*), oddělení krytosemenné (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložné (*Liliopsida*) a řádu lipnicotvaré (*Poales*). Čeleď se dále dělí do 12 podčeledí (Soreng *et al.*, 2015). Jednou z nich je významná podčeď *Pooideae* Bentham (1861), do které je řazeno téměř 200 rodů (Soreng *et al.*, 2015), včetně rodů kostřava (*Festuca* L.) a jílek (*Lolium* L.). Do podčeledí *Pooideae* patří mimo jiné i další druhy, které jsou nesmírně důležité ve světovém zemědělství, jako je pšenice, ječmen, oves a žito (Czaban *et al.*, 2015).

Do rodu *Lolium* L. je řazeno celkem devět druhů (Byrne *et al.*, 2015), oproti tomu výrazně početnější rod *Festuca* L. zahrnuje až 600 druhů trav (Czaban *et al.*, 2015).

Vybrané druhy rodu *Lolium* L. doplněné o charakteristický počet chromozomů:

Lolium multiflorum Lam. subsp. *italicum* - jílek mnohokvětý ($2n = 2x = 14$)

Lolium perenne L. - jílek vytrvalý ($2n = 2x = 14$)

Lolium rigidum Gaudin - jílek tuhý ($2n = 2x = 14$)

Vybrané druhy rodu *Festuca* L. doplněné o charakteristický počet chromozomů:

1. Druhy vyššího vzrůstu s širokými listy (podrod *Schedonorus*)

Festuca pratensis Huds. - kostřava luční ($2n = 2x = 14$)

Poddruh *Festuca pratensis* subsp. *apennina* (De Not.) Hegi - kostřava luční italská ($2n = 4x = 28$)

Festuca arundinacea Schreb. - kostřava rákosovitá ($2n = 6x = 42$)

Poddruh *Festuca arundinacea* subsp. *glaucescens* Boiss. ($2n = 4x = 28$)

Festuca mairei St.-Yves - kostřava atlasská ($2n = 4x = 28$)

2. Druhy nižšího vzrůstu s úzkými listy (s variabilním počtem chromozomů, jsou známy diploidní až dekaploidní druhy (Rognli *et al.*, 2010))

Festuca rubra L. - kostřava červená ($2n = 14, 21, 28, 42, 49, 56, 64, 70$; Aiken *et Darbyshire*, 1990; Sampoux *et Huyghe*, 2009)

Festuca ovina L. - kostřava ovčí ($2n = 14, 21, 28, 42, 49, 56, 70$; Church, 1929; Löve *et Löve*, 1948)

3.1.2 Význam vybraných druhů rodu kostřava (*Festuca* L.)

Tato početná skupina velmi rozmanitých druhů trav je nedílnou složkou luk, pastvin i udržovaných trávníků. Kromě hospodářského a estetického významu mají kostřavy i značný ekologický význam v ochraně krajiny (zadržování vody, protierozní ochrana půd apod.). Na základě morfologie je dělíme do dvou skupin. Do první skupiny kostřav vyššího vzrůstu s širokými listy patří kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) spolu s kostřavou rákosovitou (*Festuca arundinacea* Schreb.). Do druhé skupiny kostřav nižšího vzrůstu s úzkými listy je řazen komplex kostřavy červené (*Festuca rubra*) a komplex kostřavy ovčí (*Festuca ovina*). Rod *Festuca* L. se obecně vyskytuje především v mírném podnebném pásu severní polokoule (Jenkin, 1959; Rognli *et al.*, 2010).

3.1.2.1 Kostřava luční

Kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) je využívána především ke krmným účelům hospodářských zvířat, a to díky vysoké kvalitě a výnosovému potenciálu. Vyznačuje se vysokou odolností vůči nízkým teplotám a mrazu v zimním období. Je původem z Eurasie (Hultén *et* Fries, 1986). Díky své mrazuvzdornosti představuje významnou složku pastvin především v alpských oblastech, Skandinávii a ve východní Evropě. Introdukována byla rovněž do Severní Ameriky, Japonska, Austrálie a na Nový Zéland (Rognli *et al.*, 2010).

Kostřava luční je velmi rozšířená na zemědělských plochách, objevuje se ale i na březích řek a v mokřadech. Její populace byla značně zdecimována v předešlé době meziledové, kdy v krajině převažovaly husté lesy (Fjellheim *et al.*, 2006). Kostřava luční je jen zřídka vysazována jako monokultura, častěji se vyskytuje společně s dalšími druhy trav. Ve Skandinávii je využívána kombinace kostřavy luční spolu s bojínkem lučním (*Phleum pratense* L.) a jetelem lučním (*Trifolium pratense* L.) (Rognli *et al.*, 2010).

3.1.2.2 Kostřava rákosovitá

Další druh, kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.), je důležitou vytrvalou pícninou, která se na rozdíl od kostřavy luční vyznačuje statnějším vzrůstem. Vyskytuje se v oblastech mírného pásu celého světa, je dobře přizpůsobena chladnému podnebí. Dokáže se adaptovat na různorodé půdní typy i klimatické podmínky. Bohužel nemá takové výnosové charakteristiky jako jílky a má rovněž nižší stravitelnost hospodářskými zvířaty (Rognli *et al.*, 2010).

U kostřavy rákosovité rozeznáváme tři ekotypy - evropský, rhizomatický a středomořský (Hand *et al.*, 2010). Zatímco rhizomatický a evropský ekotyp se liší pouze přítomností rhizomů u prvního, středomořský ekotyp se od ostatních dvou odlišuje morfologicky, ekologicky i velikostí genomu (Reed *et al.*, 2004; Robson, 1967). Vyvinuly se pravděpodobně v odděleném evolučním procesu, neboť jsou adaptovány na rozdílné podmínky podnebí. Ekotypy ze severní Evropy byly dále zavlečeny do Severní Ameriky, kde patří mezi nejpopulárnější pícniny, zejména díky své odolnosti vůči suchu (na rozdíl od méně odolné kostřavy luční) (Rognli *et al.*, 2010).

Jako nedílná složka luk a pastvin je kostřava rákosovitá dostupná po většinu roku. Dobře snáší i stinná místa, je stálezelená po celý rok, a to i ve vlhkých oblastech chladného

podnebí. Obliba tohoto druhu mezi šlechtiteli i zemědělci stále vzrůstá a vzhledem k měnícím se klimatickým podmínkám, zvláště ke stále častějším nástupům střednědobých období sucha a horka během léta, se dá očekávat její zvyšující se podíl na evropském trhu s osivy. Bývá rovněž součástí travníkových porostů a je významná i pro ochranné účely krajiny (Sleper *et Buckner*, 1995). V některých oblastech bývá dokonce vysazována pouze jako monokultura (Rognli *et al.*, 2010).

3.1.2.3 Kostřavy nižšího vzrůstu s úzkými listy

Kostřavy nižšího vzrůstu s úzkými listy, představující druhou skupinu kostřav, jsou vytrvalé trávy dobře přizpůsobené chladnému podnebí Evropy, Asie a Severní Ameriky. Tyto druhy jsou důležitými pícninami, bývají ale hlavně nedílnou součástí travníků a okrasných ploch, především pro svoji nenáročnou údržbu a výborné travníkové vlastnosti. Jejich drobné a úzké listy minimalizují vodní ztráty způsobené transpirací a mají tak dobrou odolnost vůči suchu (Rognli *et al.*, 2010). Nevadí jim růst ve stinných oblastech, za sucha, nízkého pH (5,5 - 6,5) či na málo úrodných půdách (Beard 1973; Hanson *et al.*, 1969). Nevyžadují navíc žádné přídatné hnojení či zavlažování (Ruemmele *et al.*, 1995).

3.1.3 Význam vybraných druhů rodu jílek (*Lolium L.*)

Jílký představují hlavní pícniny střední a západní Evropy, mírného podnebného pásu Japonska, Austrálie, jižní Afriky a Severní Ameriky. Kromě hospodářského významu jsou rovněž hojně využívány pro okrasné účely a díky své odolnosti proti sešlapu také pro zatravnění sportovních ploch. Monokultury jílků zabírají 23 % z 52 milionů ha všech travnatých ploch Evropy, přičemž převládajícím druhem je jílek vytrvalý (Humphreys *et al.*, 2010). Jílký jsou ze všech druhů trav pro zvířata nejlépe stravitelnými (Frame, 1991), nevýhodou je ale jejich malá odolnost vůči abiotickým stresům (Yamada *et al.*, 2005).

Jílek vytrvalý spolu s jílkem mnohokvětým představují ekonomicky nejdůležitější jílký v Evropě. Oproti tomu jílek tuhý (*Lolium rigidum* Gaudin), ozimá jednoletá tráva, je využíván jako pícnina v Austrálii. V blízké budoucnosti by se ale kvůli měnícímu se klimatu mohl stát významným druhem pěstovaným i v sušších oblastech Evropy (Humphreys *et al.*, 2010).

Původním stanovištěm jílků je oblast Středomoří. Tyto druhy mají velmi podobnou strukturu genomu spolu s obilninami eurasijského původu, jako je pšenice a ječmen (Kellog, 2001). Domestikace těchto trav je spojena se vznikem primitivního zemědělství v oblasti úrodného púlměsíce Středního východu před cca 10 000 lety a s následnou expanzí do západní a severní Evropy (Balfourier, 2000). Jílky byly pravděpodobně šířeny spolu s obilninami jako plevele prostřednictvím migrujících zemědělců.

3.1.3.1 Jílek vytrvalý

Jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) je vytrvalá tráva s dlouhou vegetační dobou (v západní Evropě od března do listopadu). Vyznačuje se vysokými výnosy, je opakovaně během roku spásán hospodářskými zvířaty. V zimním období se skladuje v podobě sena. Je to základní druh využívaný pro účelové, rekreační či sportovní trávníky (Humphreys *et al.*, 2010). Jeho nevýhodou je poměrně malá odolnost vůči abiotickým stresům.

3.1.3.2 Jílek mnohokvětý

Jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam. subsp. *italicum*) je jedno až dvouletá rostlina s vysokou mírou stravitelnosti a má proto velký význam jako pícnina. Oproti jílku vytrvalému je tento druh ještě méně odolný vůči abiotickým stresům, má ale vyšší výnosový potenciál s rychlejším růstem. Má velmi mělké kořeny, kořenový systém tvoří hustou, vláknitou hmotu v hloubce pouhých 5 cm, což způsobuje jeho nízkou toleranci vůči suchu. Je pěstován v krátkých obdobích 1 až 2 let pro skladování sena, jako siláž nebo hnojivo. Využití nachází také pro zatrávňování volných ploch, je významným druhem bránícím půdní erozi a ztrátě půdních živin. Stejně jako jílek vytrvalý je možné jej množit vegetativně (Humphreys *et al.*, 2010).

Poddruh jílku mnohokvětého, *Lolium multiflorum westerwoldicum* (*Lolium multiflorum* Lam. subsp. *multiflorum*), je jednoletá tráva vyššího vzrůstu (oproti jílku mnohokvětému), má vysokou chutnost a stravitelnost. Po zasetí na jaře se v létě a opakovaně i v zimě využívá jako siláž, poté hyne. Oproti tomu *Lolium multiflorum* subsp. *italicum* přežívá i do druhé zimy. Vyskytuje se v oblasti Středomoří a v mírném podnebném pásu střední Evropy, je důležitou plodinou také v Severní i Jižní Americe, jižní Africe, jižní Austrálii, Japonsku, Číně, Indii a na Novém Zélandu. (Humphreys *et al.*, 2010).

3.1.4 Mezidruhová hybridizace u trav

Při šlechtění nových odrůd je u rostlin pro vnášení žádoucího znaku, který obvykle poskytne rostlině určitou výhodu (např. odolnost vůči patogenu, vyšší výnos apod.), čím dál více využívanou metodou cílená mezidruhová či mezirodová hybridizace (Silva *et* Souza, 2013). Potomci s novou kombinací znaků jsou označováni jako hybridy neboli kříženci. Takoví jedinci vznikají i samovolně v přírodě, mezidruhová hybridizace hraje velmi důležitou roli v evoluci, zejména při vzniku nových druhů.

Co se týče trav, tato metoda je mezi šlechtiteli, producenty osiv a zemědělci čím dál více populární. Velký význam mají hybridní jílky či kostřavy, zvláště pak ale mezirodové hybridy *Festulolium* vzniklé křížením těchto dvou rodů. V dnešní době je známo více než 50 komerčně dostupných odrůd *Festulolium* (Kopecký *et al.*, 2017).

3.1.4.1 Mezirodový hybrid *Festulolium*

Mezirodový kříženec *Festulolium* (*Festuca* × *Lolium*) je hojně využíván v pícních i travníkových směsích. Je vytvořen uměle zkřížením vybraných druhů rodu jílek (*Lolium* L.) a kostřava (*Festuca* L.), které jsou ideálními složkami zemědělských či travníkových systémů. Představuje energeticky bohaté krmivo se zároveň velmi dobrou odolností vůči abiotickým a biotickým stresům (Humphreys *et al.*, 2006, 2014).

Ačkoliv se kostřavy a jílky kříží volně v přírodě, jejich vzniklé kříženci jsou sterilní. Hybridy *Festulolium*, vzniklé křížením druhů *Festuca pratensis* × *Lolium perenne*, se často vyskytují kolem břehů řek a rostou i na silně podmáčených půdách, což není u rodičovských druhů běžné (Humphreys *et* Harper, 2008). Tyto formy byly už v přírodě zaznamenány dříve, taxonomové (např. Hubbard, 1992) je považovali za křížence *Festulolium* na základě kombinací vlastností charakteristických pro jejich rodičovské druhy, jako je např. tvar květenství (Ghesquiere *et al.*, 2010). První, hybridizací uměle vytvořený hybrid jílku vytrvalého a kostřavy luční, byl zaznamenán už v roce 1933 (Jenkin, 1933). Komerční křížení odrůd *Festulolium* se ale začalo rozvíjet až později.

V roce 2004 (2004/55/EC) evropská komise rozšířila definici kříženců *Festulolium*. Tito hybridy mohou vzniknout křížením jakékoli kombinace druhů rodu *Festuca* × *Lolium* bez ohledu na počet chromozomů obou rodičů. Nezáleží ani na tom, zda byli hybridy záměrně zpětně kříženi s jedním z rodičů (Ghesquiere *et al.*, 2010). Dříve byli totiž hybridy

Festulolium, kteří byli zpětně kříženi s kostřavou rákosovitou, považováni za odrůdy této kostřavy.

Obecně taxonomie komplexu *Festuca-Lolium*, do kterého je řazen podrod *Schedonorus* (*Festuca pratensis* a *Festuca arundinacea*) spolu s rodem *Lolium* (Catalán *et al.*, 2004), zůstává nejednoznačná a někteří autoři naznačují, že by širokolisté kostřavy z podrodu *Schedonorus* měly být součástí rodu *Lolium* (Banfi *et al.*, 2017).

Jak již bylo řečeno, vznikem kříženců *Festulolium* dochází ke zkombinování genomů vybraných druhů z rodu *Lolium* a *Festuca* (Thomas *et* Humphreys, 1991). Jílky jsou významnou součástí luk a pastvin využívaných pro zemědělské účely, neboť poskytují vysoké výnosy a představují nutričně bohaté krmivo. Nicméně jsou málo odolné vůči abiotickému stresu vyvolanému změnou klimatických podmínek. Z tohoto důvodu byly geny odpovědné za větší odolnost vůči stresu vyhledávány u odolnějších zástupců vyššího vzrůstu patřících do rodu kostřava (Yamada *et al.*, 2005). Požadovanými vlastnostmi při šlechtění odrůd vhodných pro trávnickové systémy je zejména zlepšení příjmu dusíku a vsakování vody (Ghesquiere *et al.*, 2010).

Většina doposud známých odrůd *Festulolium* je alopolyploidních, neboť vznikly křížením kostřavy luční s jílkem mnohokvětým či jílkem vytrvalým s následným křížením F1 generace a vzniku dalších generací (Ghesquiere *et al.*, 2010). Zkřížením kostřavy luční spolu s jílkem mnohokvětým máme k dispozici mnoho komerčně dostupných odrůd jako je Perun, Achilles, Perseus a Hostýn (Kopecký *et al.*, 2006).

Mezidruhové křížení je u druhů kostřav z podrodu *Schedonorus* běžné, většina zástupců tohoto podrodu je totiž alopolyploidních. Hybridizace bývá často doprovázená právě polyploidizací, kdy nově vzniklé polyploidní druhy získají výhodné kombinace genomu, které zlepšují jejich adaptaci na měnící se podmínky, která je nedostačující u rodičovských genomů, a zároveň mají zachovány fertilitu (Kopecký *et al.*, 2016).

Hybridizací vznikla např. široce rozšířená alohexaploidní kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb., $2n = 6x = 42$), a to zkřížením diploidní kostřavy luční ze severní a střední Evropy (*Festuca pratensis* Huds., $2n = 2x = 14$) spolu se středozemním tetraploidním poddruhem kostřavy rákosovité *Festuca arundinacea* subsp. *glaucescens* Boiss. ($2n = 4x = 28$). Tento kříženec je hojně součástí luk a pastvin zejména v oblastech, kde méně adaptované druhy rodu *Lolium* špatně odolávají silnému abiotickému stresu (Humphreys *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1991).

Podobně bylo zjištěno, že tetraploidní druh *Festuca pratensis* subsp. *apennina* je pravděpodobně rovněž alopolyloidním druhem obsahujícím genom dvou druhů, kdy jeden z nich představuje genom diploidní kostřavy luční (*Festuca pratensis*; Lewis, 1977). Hybridizací vznikli i sterilní triploidní mezidruhová hybridní kostřavy, a to zkřížením diploidní *Festuca pratensis* a tetraploidní *Festuca pratensis* subsp. *apennina*, kteří jsou převládajícími druhy na mnoha místech švýcarských Alp, kde koexistují společně s jejich rodičovskými druhy (Kopecký *et al.*, 2016).

Také druhy jílek vytrvalý a jílek mnohokvětý se mohou mezi sebou křížit velmi snadno. Výsledný kříženec, hybridní jílek *Lolium boucheanum* Kunth. (*L. × hybridum* Hausskn.) je fertilitní a kombinuje vlastnosti obou druhů, a to jak vysokou odolnost, tak i výnosnost (Humphreys *et al.*, 2010).

3.2 Struktura genomu

Pro charakterizaci a klasifikaci druhů je důležitá velikost jejich jaderného genomu. S tímto parametrem souvisí tzv. C hodnota, která byla zavedena v roce 1950 (Swift, 1950). Představuje obsah DNA v nereplikované haploidní sadě chromozomů (*n*), jádro v G1 fázi buněčného cyklu má tedy množství 2C DNA. Bylo zjištěno, že neexistuje vztah mezi C hodnotou a složitostí organismu, morfologicky podobné organismy tak mohou mít odlišnou velikost genomu (Mirsky *et al.*, 1951). Tento jev byl poté nazván jako „Paradox C-hodnoty“ (Thomas, 1971).

Velikost genomů rostlin je velmi variabilní, pohybuje se v rozmezí od 0,063 Gb do 148,8 Gb, rozdíl mezi jednotlivými rostlinnými druhy je tedy mnohdy až 2400krát větší (Dodsworth *et al.*, 2015). Genomy zástupců *Pooideae*, největší podčeledi lipnicovitých, jsou charakteristické svou značnou velikostí a složitostí (např. genom pšenice se skládá ze tří nezávislých genomů o celkové velikosti 17 Gb; Heslop-Harrison, 1991).

Jelikož je počet genů u jednotlivých druhů podobný, velikost rostlinných genomů ovlivňují zejména repetitivní sekvence DNA, které představují jeho podstatnou část (např. v genomu kukuřice se jedná o více než 80 %) (Flavell, 1985). Mezi repetitivní sekvence patří tandemově uspořádané repeticity a transponovatelné elementy (tzv. transpozony). Transpozony, které jsou rozptýlené po celém genomu, tvoří u rostlin více než polovinu veškeré genetické informace (Heslop-Harrison *et al.*, 2011).

Rozdíly ve velikosti genomů jednotlivých rostlinných druhů, včetně trav, jsou způsobeny i tzv. celogenomovou duplikací (WGD, whole-genome duplication), známou jako polyploidie (Soltis *et al.*, 2015). Při studiu genomů trav je tak dalším důležitým parametrem i znalost úrovně ploidie.

3.2.1 Rod kostřava (*Festuca L.*)

Zatímco v případě rodu jílek jsou všechny druhy diploidní, polyploidie je předním znakem právě rodu kostřava (zejména u podrodu *Schedonorus*), kde jsou známy diploidní až dekaploidní druhy (např. dekaploidní poddruh kostřavy rákosovité, *Festuca arundinacea* subsp. *letourneuxiana* St.-Yves; Hand *et al.*, 2010). Základní počet chromozomů v haploidním stavu je u tohoto rodu 7 ($n = 7$). Kopecký *et al.* (2010) stanovili pomocí průtokové cytometrie velikost genomu u diploidní *Festuca pratensis*, který odpovídá $1Cx = 3\,175$ Mb (tj. 3,25 pg DNA). U hexaploidní *Festuca arundinacea* se jednalo o 2 845 Mb (tj. 2,91 pg DNA).

Kvůli polyploidii a vysokému podílu repetitivní DNA je analýza velkých rostlinných genomů velmi obtížná, což platí i pro kostřavy. Kopecký *et al.* (2013) i přesto ve své rozsáhlé studii za využití průtokové cytometrie a sekvenování nové generace (NGS, next generation sequencing) zanalyzovali u kostřavy luční (*Festuca pratensis*) sekvenci chromozomu 4F. Složitý genom nejprve rozdělili na jednotlivé chromozomy či skupiny chromozomů. Pomocí průtokové cytometrie z genomu cíleně vytrídili chromozom 4F a provedli sekvenování s využitím platformy Illumina. Na základě získané sekvence byli následně schopni určit pořadí genů na tomto chromozomu, a to porovnáním s již osekvenovanými genomy příbuzných druhů, jako je *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor* či *Hordeum vulgare*. Touto komparativní studií bylo potvrzeno, že geny na chromozomu 4F mají obdobné uspořádání jako geny na 4H a 5H (na dlouhém rameni) chromozomů u ječmene (tzv. kolinearita). Dále pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace identifikovali několik tandemových repetit, které je možno použít jako cytogenetické markery pro detailnější analýzu karyotypů kostřav, jílek či jejich kříženců.

U kostřavy luční byla rovněž sestavena genetická mapa (Alm *et al.*, 2003), vytvořena BAC (bacterial artificial chromosome) knihovna (Donnison *et al.*, 2005) a osekvenován transkriptom (Stočes *et al.*, 2016). U kostřavy rákosovité byla sestavena genetická mapa (Dierking *et al.*, 2015). Pro oba druhy byl vytvořen čip typu DArT (Kopecký *et al.*, 2009a).

3.2.2 Rod jílek (*Lolium L.*)

Pro zástupce rodu jílek, který představuje součást polyploidního komplexu *Festuca-Lolium*, je charakteristický diploidní genom se 7 páry chromozomů ($2n = 2x = 14$) (Humphreys *et al.*, 2010). Jílky mají relativně velký genom, jehož velikost byla publikována již v roce 1979 ($1Cx = 2\ 000$ Mb; Hutchinson *et al.*, 1979). V roce 2010 byla zjištěna měřením na průtokovém cytometru novější data, velikost genomu diploidního *Lolium multiflorum* odpovídala $1Cx = 2\ 567$ Mb (tj. 2,62 pg DNA), u diploidního *Lolium perenne* se jednalo o 2 623 Mb (tj. 2,68 pg DNA) (Kopecký *et al.*, 2010).

V roce 2007 byly pro druh *Lolium perenne* zkonstruovány dvě BAC knihovny, které reprezentuje soubor 98 304, resp. 101 376 BAC klonů. Odhadovaná průměrná velikost inzertů u obou knihoven činila přibližně 100 kb. Tyto knihovny představují téměř deset ekvivalentů genomu (tzn. pokrytí 10krát), je tedy u nich velká pravděpodobnost přítomnosti specifické sekvence, tj. kandidátních genů pro požadovanou vlastnost. Díky těmto knihovnám je umožněno detailnější studium funkce genů či identifikace genetických markerů vhodných pro šlechtění rostlin odolných vůči chorobě či pro zvýšení kvality (Farrar *et al.*, 2007).

Jílek vytrvalý (*Lolium perenne*) je prvním druhem v rámci komplexu *Festuca-Lolium*, jehož genom byl osekvenován (Byrne *et al.*, 2015). Vedle celogenomového sekvenování byl sekvenován i transkriptom obou jílků (Farrell *et al.*, 2014; Ruttink *et al.*, 2013; Stočes *et al.*, 2016). Takto získaná data umožnila identifikaci 28 455 genů kódujících 40 068 proteinů (Byrne *et al.*, 2015). Díky vysokému stupni kolinearity mezi genomy jílku vytrvalého a ječmene (Pfeifer *et al.*, 2013) a značné synténii v rámci genomů lipnicovitých (tj. výskytu konzervovaných oblastí genů u těchto příbuzných druhů) bylo zjištěno pořadí genů napříč celým genomem jílku. Pro oba druhy jílků existuje i celá řada genetických map (např. Bartoš *et al.*, 2011; Studer *et al.*, 2012).

Ačkoliv, jak už bylo řečeno, jílky jsou přirozeně diploidní, snadno z nich mohou být uměle vytvořeni i jedinci s tetraploidní sadou chromozomů. Během posledních 50 let počet tetraploidních odrůd jílků stále narůstá, zvyšující se počet byl zaznamenán v Nizozemsku, Německu, Francii a Velké Británii. Tito tetraploidi s dvojnásobným počtem chromozomů jsou vzhledem k diploidům většího vzrůstu, mají vyšší výnosy s dobrým obsahem cukru a jsou odolné zejména proti plísni sněžné. Jsou dobře spásáni hospodářskými zvířaty a zajišťují tak vysoký příjem živin. Běžně jsou vyséváni ve směsi spolu s diploidy, kde přispívají ke zvýšení

hustoty travních porostů a vyšší odolnosti proti mechanickému poškození (Humphreys *et al.*, 2010).

3.2.3 Mezidruhov^á hybridizace u trav

Mezidruhov^á hybridizace, často doprovázená polyploidizací, je jedním ze základních procesů, které přispívají k evoluci rostlinných genomů a speciaci (Soltis *et Soltis*, 1993). Obecně je velmi častá u rostlin (asi u 40 % všech druhů), u živočichů zřídka. Odhadem více než 70 % druhů krytosemenných rostlin je polyploidních (Soltis *et Soltis*, 2000; Wendel, 2000). Mezidruhov^á hybridizace může nastat i bez zvýšení ploidie, a to po splynutí gamet s haploidním počtem chromozomů. Vzniklí homoploidní hybridi, kteří byli zaznamenáni u některých rostlinných druhů, mohou vést rovněž ke vzniku nových druhů (Schumer *et al.*, 2014). Častější jsou však u rostlin případy, kdy dochází ke spojení neredukovaných gamet (tj. gamet s diploidním počtem chromozomů), což vede k polyploidizaci (Mason *et Pires*, 2015). Polyploidie je tedy obecně charakteristická přítomností více než dvou základních sad chromozomů (x) v karyotypu. Existují dva základní typy polyploidie: autopolyploidie a alopolyploidie.

Autopolyploidie se vyznačuje přítomností více než dvou shodných (homologických) základních sad chromozomů v karyotypu, naopak alopolyploidie představuje znásobení počtu chromozomových sad (x), které pocházejí ze dvou či více biologicky odlišných druhů. Alopolyploidie je přitom častějším typem. Vzniklé alopolyploidní druhy představují konkurenční výhodu oproti svým diploidním předkům (Comai, 2005), tyto rostliny mají vyšší stupeň genetické variability, což představuje selekční výhodu v evoluci (Soltis *et Soltis*, 2000). V takovém alopolyploidním genomu se neprojeví např. některé škodlivé recesivní alely, což vede ke značnému omezení projevu mutací (Madlung, 2013). Mezidruhov^á hybridizace a s ní spojená polyploidizace přispěly ke vzniku mnoha zemědělských plodin, včetně pšenice, banánovníku a bavlníku (Renny-Byfield *et Wendel*, 2014).

V alopolyploidech se chromozomy pocházející z různých rodičovských druhů spolu většinou nepárují a dochází k párování homologních chromozomů. To je způsobeno díky velkým rozdílům v DNA sekvenci nebo prostřednictvím speciálního regulačního mechanismu, který zajišťuje striktní párování homologních chromozomů, jako je např. systém Ph1 u pšenice (Sears *et Okamoto*, 1958). Toto ovšem není pravidlem v případě kříženců *Festulolium*, kde se chromozomy kostřav a jílků volně párují a dochází mezi nimi

k rekombinacím. Přestože u kříženců *Festulolium* ($2n = 4x = 28$; FpFpLpLp) dochází k preferenčnímu párování mezi chromozomy stejného původu (Fp/Fp a Lp/Lp), homeologní párování bylo zaznamenáno v 33 % případů (Zwierzykowski *et al.*, 2008). Vzniká tak vysoce variabilní potomstvo, kdy se jednotlivé rostliny v rámci jedné odrůdy od sebe odlišují svým unikátním chromozomovým složením. Pro šlechtění je však nestabilita genomového složení kříženců *Festulolium* velkým problémem (Kopecký *et al.*, 2017).

3.2.3.1 Introgrese

První možností vzniku mezidruhových hybridů je tzv. introgresní křížení. U introgresních odrůd dochází ke křížení dvou druhů s následným zpětným křížením F1 hybridu s jedním z původních rodičů. Takto dochází k přenosu genů pro vybranou vlastnost z donora do recipienta. Poprvé byly u trav tímto způsobem přeneseny vybrané geny z jílku vytrvalého do hexaploidní kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea* Schreb.) (Buckner *et al.*, 1977, 1983). V současnosti se provádí introgresní šlechtění s cílem obohatit genový fond jílku některými geny vybraných zástupců kostřav (Ghesquiere *et al.*, 2010).

Tato metoda mezidruhové hybridizace má za následek vznik hybridů s velmi nevyváženým podílem rodičovských genomů, což bylo zjištěno u řady odrůd tohoto typu (např. Bečva a Lofa). Genomy těchto odrůd jsou téměř celé tvořeny genomem jílku, pouze jeho malá část je původem z kostřavy rákosovité. Problémem introgresních odrůd je fakt, že během dalšího přemnožování může dojít k úplné eliminaci introgrese v odrůdě (Kopecký *et al.*, 2005).

Pomocí metody genomové *in situ* hybridizace (GISH) je možno v genomu recipienta lokalizovat konkrétní chromozom, do kterého byly přeneseny vybrané geny. V roce 1996 byla provedena studie, kdy byli analyzováni F1 hybridy vzniklé křížením druhů *Lolium multiflorum* a *Festuca arundinacea* a následně i linie vzniklé zpětným křížením těchto hybridů. Pomocí GISH bylo možné prokázat, že po zpětném křížení generace F1 hybridů získal druh *Lolium multiflorum* chromozomový segment z druhu *Festuca arundinacea* (konkrétně z krátkého ramene chromozomu 2), který je zodpovědný za lepší odolnost hybridu vůči suchu (Humphreys *et Pasakinskiene*, 1996).

3.2.3.2 Amfiploidie

Druhým typem kříženců kostřav a jílků jsou amfiploidi (či alopolyploidi). Při tomto způsobu šlechtění se získaní F1 kříženci dále spráší a je tak většinou zachován původní poměr rodičovských genomů v křížencích. Při této technice dochází ke zkombinování celých genomů obou druhů. U kříženců kostřav a jílků je tohoto docíleno buď použitím autotetraploidních rodičů (Lewis *et al.*, 1973), další možností je polyploidizovat získané diploidní F1 křížence, kteří jsou sterilní.

Pomocí amfiploidie se vyšlechtila celá řada odrůd *Festulolium* v České republice (např. Perun, Achilles, Perseus a Hostýn), Polsku (odrůdy Rakopan, Sulino, Agula a Felopa), Německu (Paulina, Pauleta), Walesu (Prior, Elmet, Aberniche), Litvě (Punia) či Francii (Lueur, Lusillium) (Ghesquiere *et al.*, 2010). Výhodou amfiploidie je obecně vyšší fertilita a stabilita genomového složení vzniklých odrůd hybridů po další generace (Ghesquiere *et al.*, 2010).

Jak již bylo řečeno, párování homeologních chromozomů je u kříženců kostřav a jílků běžné. Tím dochází k tvorbě obrovské genetické variability mezi potomstvem a může se rovněž měnit poměr v zastoupení rodičovských genomů, což ovlivňuje celkovou hodnotu a také fertilitu dané odrůdy (Canter *et al.*, 1999; Kopecký *et al.*, 2006; Zwierzykowski *et al.*, 1998, 2006). Poměrně značná variabilita v genomovém složení byla zjištěna pomocí genomové *in situ* hybridizace (GISH; Kopecký *et al.* 2006) u 19 amfiploidních odrůd *Festulolium*. Překvapivě byla daleko větší variabilita zjištěna mezi rostlinami jedné odrůdy než mezi odrůdami. U všech odrůd byla zjištěna větší či menší převaha genomu jílku nad genomem kostřavy.

Posun v genomovém složení, vysoká frekvence homeologního párování a rekombinací vybízí k otázce, do jaké míry jsou genomy odrůd *Festulolium* stabilní i po následující generace. Problém by mohl nastat, kdyby se podíl genomu rodu *Lolium* neustále zvyšoval, až by byl genom kostřavy zcela vyloučen. Je tedy proto důležité zjistit, zda a jaké jsou u těchto odrůd vzniklých amfiploidii či introgresí možnosti stabilizovat hybridní genom.

3.3 Metody studia genomů rostlin

V dnešní době se hledají stále novější přístupy, jak zefektivnit a urychlit šlechtění rostlin. Klasické metody šlechtění založené na pozorování fenotypu s následnou selekcí vhodných jedinců jsou velmi pracné a zdlouhavé. Pro získání co nejlepších výsledků jsou potřeba velké populace a několikaleté fenotypovací hodnocení. Do popředí se proto dostává aplikace vybraných technik molekulární biologie, které jsou založeny na selekci vhodných jedinců pomocí molekulárních markerů s těsnou vazbou na požadovaný znak (tzv. MAS, marker assisted selection) či jiným typem charakterizace genetické informace (Kopecký *et al.*, 2009a). Dochází tak k selekci nejvhodnějších rodičovských kombinací a potomků již v raném stádiu, čímž se sníží počet sledovaných linií. Celý proces je tak výrazně urychlen a jsou sníženy rovněž náklady na šlechtění.

Adekvátně zvolené metody studia genomů rostlin nám pomáhají lépe pochopit jejich strukturu, genetickou variabilitu, biodiverzitu, původ, evoluční a fylogenetické vztahy i taxonomii.

3.3.1 Molekulární charakterizace

Molekulární studie jsou prováděny pomocí tzv. genetických markerů, které dělíme do tří skupin na markery fenotypové, biochemické a molekulární. Pomocí fenotypových markerů pozorujeme vybrané morfologické a fyziologické znaky (např. výška rostliny, odolnost vůči patogenu apod.). Dalšími markery jsou markery biochemické, mezi které patří tzv. izoenzymy. Nejdůležitější skupinou jsou DNA markery spočívající v polymorfismu nukleotidových sekvencí. Tyto markery jsou nejčastěji založeny na hybridizaci (např. RFLP markery (Restriction Fragment Length Polymorphism)), na PCR (např. SSR (Simple Sequence Repeat) a AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)) či sekvenaci (např. SNP markery (Single Nucleotide Polymorphism)).

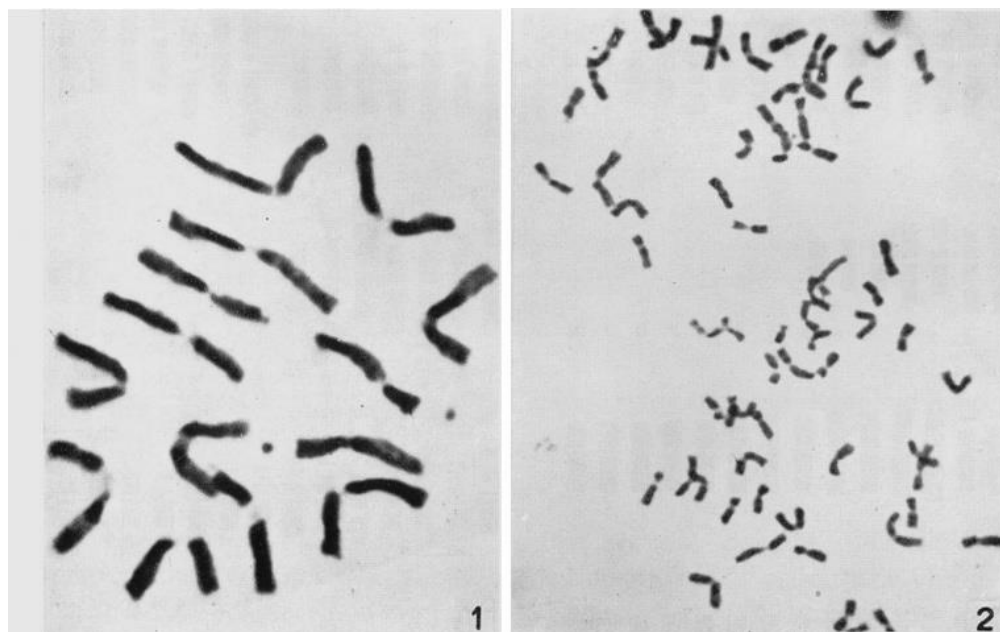
Do popředí se v dnešní době dostávají vysokokapacitní markerové systémy, které umožňují celý proces analýzy zautomatizovat. Využití nachází vysokokapacitní genotypovací platformy, které zajišťují efektivní šlechtění díky analýze velkého počtu znaků najednou. Tyto systémy jsou založené na mikročipech nebo masivním paralelním sekvenování. Pro kostřavy a jílky byl vyvinut čip obsahující DArT markery (Diversity Arrays Technology), který umožňuje použitím cca 8 000 sond studovat genetickou diverzitu či konstruovat genetické

mapy (Kopecký *et al.*, 2009a). V dnešní době stále častěji využívané sekvenování nové generace (NGS) šlechtitelům nabízí genotypovat populace rostlin pomocí sekvenování, tzv. GBS (genotyping by sequencing) či GWAS (genome wide association study).

3.3.2 Cytogenetická charakterizace

Výše zmíněné pokročilé metody molekulární biologie a genomiky jsou pro šlechtitele stále značně finančně náročné. I proto se dosud využívá poměrně levných a rychlých metod cytogenetiky, které rovněž umožňují studovat rostlinné genomy. Cytogenetika je podoborem genetiky, který se zabývá organizací a strukturou genetického materiálu v buňce a umožňuje nám tak studovat genetickou informaci organismů na chromozomální úrovni.

Až do 70. let minulého století bylo možné analyzovat chromozomy pouze klasickými metodami cytogenetiky založenými především na studiu jejich morfologie, včetně velikosti chromozomových ramen, polohy centromer, umístění sekundární konstriktce či zjištění počtu chromozomů (Silva *et Souza*, 2013). Bylo možno vizualizovat chromozomy pomocí klasických barvicích technik (viz Obrázek 1) či pomocí tzv. proužkování chromozomů.



Obrázek 1: Studium morfologie chromozomů klasickými barvicími technikami u diploidního (*Festuca spadicea*; vlevo) a dekaploidního (*Festuca arundinacea*; vpravo) zástupce rodu kostřava (převzato z: Malik *et Thomas*, 1966)

S rozvojem molekulární cytogenetiky na konci 60. let minulého století byla vyvinuta technika *in situ* hybridizace, která umožnila lokalizaci DNA-DNA hybridních molekul přímo na mikroskopickém skle (Pardue *et* Gall, 1969). Pomocí *in situ* hybridizace lze identifikovat oblasti chromozomů, které nemohou být analyzovány konvenčními cytogenetickými metodami. Molekulární cytogenetika vedla k velkým pokrokům v pochopení evoluce, genetiky a karyotypických změn u rostlin (Brammer *et al.*, 2007). Umožňuje identifikaci DNA sekvencí u mitotických i meiotických chromozomů, interfázních jader či natažených DNA vláken (Brasileiro-Vidal *et* Guerra, 2002). S tímto novým přístupem tak bylo v posledních letech získáno velké množství důležitých poznatků.

V průběhu 90. let minulého století se *in situ* hybridizace (ISH) stala zásadní cytogenetickou metodou v buněčné a molekulární biologii. ISH nám umožňuje lépe pochopit strukturu, funkci, organizaci a evoluci genů i celých genomů či objasnit prostorovou distribuci DNA. ISH se využívá zejména k identifikaci a charakterizaci chromozomů nebo jejich částí, lze pomocí ní detekovat genomové či chromozomální přestavby a změny v sekvencích v průběhu evoluce, vývoje organismu či při chorobě (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). Je proto velmi významnou metodou využívanou rovněž v medicíně či ve šlechtitelství.

ISH představuje hybridizaci značené DNA sondy k cílové DNA chromozómů navázaných na podložní sklíčko (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). Nejprve dochází k denaturaci sondy spolu s cílovou DNA a poté k nasednutí sondy na základě komplementarity DNA bází. Sonda, která je nejčastěji značena fluorescenčním barvivem, představuje specifický úsek DNA (oligo- nebo polynukleotidový řetězec), nejčastěji klonovaný do vektoru nebo amplifikovaný pomocí PCR. Lze ji připravit i z celogenomové DNA (Silva *et* Souza, 2013).

Podmínky hybridizace musí být dostatečně přísné (tzv. stringentní), aby byly stabilní jen přesně spárované hybridní molekuly. Výsledný signál je detekován fluorescenčním mikroskopem vybaveným CCD kamerou a napojeným na PC s vhodným programem na úpravu fotografií. Výhodou metody je rychlá detekce hybridizačního signálu (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000).

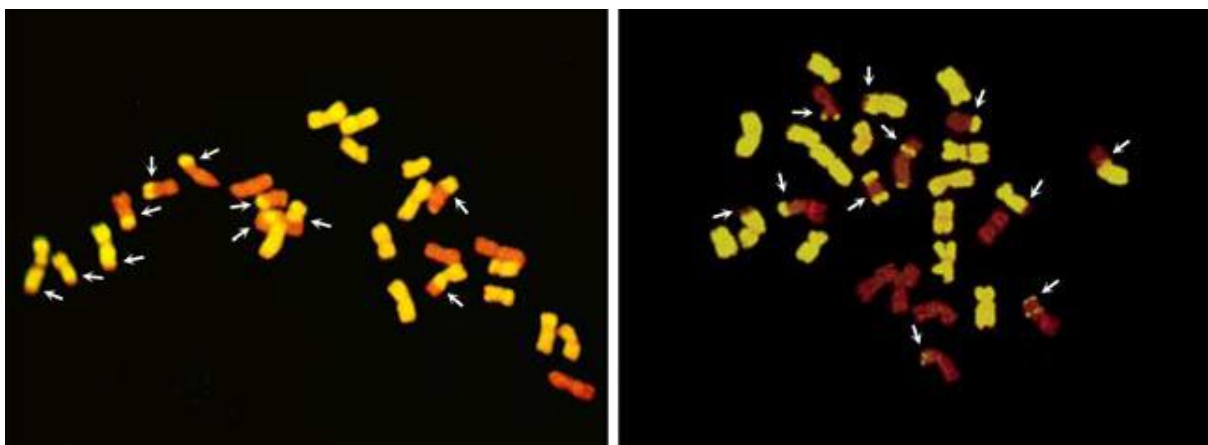
3.3.2.1 Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

Hlavními cytogenetickými metodami jsou v dnešní době fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a genomová *in situ* hybridizace (dále GISH), které pro vizualizaci sekvence DNA využívají fluorescenčně značené sondy. Dříve byly populární kolorimetrické metody *in situ* hybridizace a ke značení sond se využívaly zejména radioaktivní izotopy. Dnes jsou však radioaktivně značené sondy využívány jen zřídka, vyžadují totiž dlouhou dobu expozice a zvýšenou bezpečnost při práci (Guerra, 2004). Radioaktivní značení bylo v 90. letech minulého století nahrazeno značením fluorescenčními barvivy. Fluorescenční barviva mohou být navázána přímo na sondu, nebo mohou být sondy značeny nepřímo pomocí antigenů. Nejčastěji využívanými jsou biotin a digoxigenin, které jsou následně detekovány pomocí konjugátu protilátka-fluorochrom. Se zavedením fluorochromů se tedy tato technika stala známou jako fluorescenční *in situ* hybridizace (dále FISH) (Guerra, 2004).

FISH se využívá k lokalizaci značených komplementárních DNA (sond) na cílovou DNA *in situ* (na chromozómu nebo v jádře). Zatímco FISH využívá specifické DNA sekvence jako sondy (45S či 5S ribozomální geny, jednokopiové geny, telomerické či jiné repetitivní DNA), GISH využívá celogenomovou DNA. Výhodou oproti FISH je tedy značení celých genomů. GISH je hojně využívána při identifikaci rodičovských genomů v přirozených i člověkem vytvořených mezidruhových či mezirodových křížencích, při zjištění původu či evoluci aloploidních druhů či při šlechtění hybridních rostlin (Stace *et al.*, 1999). Analýza hybridů touto metodou je tak poměrně snadná a velmi spolehlivá (Wang *et al.*, 2009).

GISH nám mimo jiné umožňuje sledovat, zda v průběhu meiozy probíhá párování pouze mezi homologními chromozomy nebo i mezi homeologními chromozomy a indikovat tak fylogenetické vztahy mezi rodičovskými druhy a rovněž využitelnost daného křížence ve šlechtění (Silva *et al.*, 2013). Celogenomová DNA jednoho z rodičovských druhů slouží obvykle jako sonda, přičemž neznačená celogenomová DNA druhého rodičovského druhu je použita pro přípravu blokovací DNA (viz Obrázek 2). Blokovací DNA musí být naštípána na menší fragmenty, používá se oproti sondě ve vyšší koncentraci. Značení sondy může být provedeno řadou postupů jako je random priming, PCR amplifikace se značenými nukleotidy nebo nick translací (Guerra, 2004). Při *in situ* hybridizaci je důležité zvolit adekvátní poměr použité sondy a blokovací DNA pro každý biologický druh, aby proběhlo současně značení chromozomů pocházejících z obou druhů (Brammer *et al.*, 2009). Použití blokovací DNA je tak nezbytné při studiu hybridů u blízce příbuzných druhů, a to kvůli jejich

vysokému stupni homologie DNA sekvencí. V opačném případě by mohlo dojít ke značení sondou obou genomů rodičovských druhů. Blokovací DNA nám tak zajišťuje vyšší specifitu při značení (Silva *et Souza*, 2013). Jestliže adekvátně zvýšíme stringenci spolu s použitím blokovací DNA, je možno rozlišit genomy druhů, které vykazují až 90 - 95% homologii (Parokony *et al.*, 1997).



Obrázek 2: Genomová *in situ* hybridizace (GISH) mitotických chromozomů z kořenových špiček hybridů *Festulolium* (*Festuca pratensis* × *Lolium perenne*), $2n = 4x = 28$

Celogenomová DNA *Lolium perenne* (Lp) byla použita pro přípravu sondy značené digoxigeninem, která byla detekována antidigoxigeninem konjugovaným s fluoresceinem (žlutá). Jako blokovací DNA posloužila genomová DNA *Festuca pratensis* (Fp). Na závěr byly chromozomy vizualizovány pomocí propidium jodidu (červená). Rekombinantní chromozomy jsou označeny šipkou.

Obrázek 2 vlevo: rostlina F4 generace [17 chromozomů z Lp (z toho 5 rekombinovaných) + 10 chromozomů z Fp (z toho 6 rekombinovaných)]

Obrázek 2 vpravo: rostlina F5 generace [17 chromozomů z Lp (z toho 4 rekombinované) + 11 chromozomů z Fp (z toho 7 rekombinovaných)] (převzato z: Zwierzykowski *et al.*, 2006).

GISH byla poprvé provedena Schwarzacher *et al.* (1989) k identifikaci rodičovských genomů mezirodových hybridů mezi *Hordeum chilense* ($2n = 2x = 14$) a *Secale africanum* ($2n = 2x = 14$). Bylo zjištěno, že chromozomy těchto dvou rodů jsou lokalizovány v odlišných doménách interfázního jádra. Tento jev, kdy dochází k tvorbě domén, tak může ovlivnit genovou expresi (Leitch *et al.*, 1991).

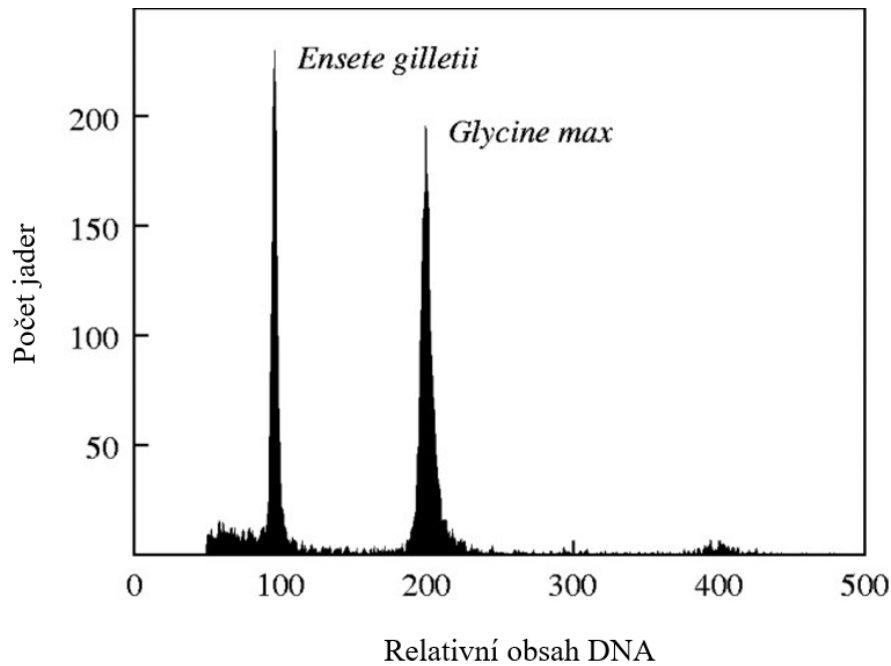
Charakterizace genomu pomocí GISH hraje důležitou roli při výběru hybridů s potenciálně užitečnými vlastnostmi či vhodným genomovým složením během počátečního stádia křížení, stejně tak při charakterizaci nových odrůd. V případě hybridů *Festulolium*, u kterých je běžná vysoká frekvence mezirodových rekombinací, lze pomocí GISH snadno identifikovat interchromozomální přestavby, což činí metodu GISH velmi užitečnou pro detekci introgrese a pro fyzické mapování vybraných genů (Kopecký *et al.*, 2008).

3.3.2.2 Průtoková cytometrie

Kromě výše popsaných cytogenetických metod patří k metodám studia chromozomů i tzv. cytometrické techniky. Pomocí těchto technik můžeme stanovit množství buněčných komponent a jejich interakce či změny v prostoru a čase. Rozlišujeme statickou a průtokovou cytometrii.

Zejména aplikace průtokové cytometrie se stala u rostlin velmi populární metodou, pomocí které můžeme stanovit relativní obsah DNA (neboli ploidii) či zjistit absolutní množství jaderné DNA. Průtoková cytometrie nachází využití i při analýze buněčného cyklu (např. při studiu kinetiky buněčného cyklu či apoptózy), stanovení obsahu jednotlivých DNA bází, analýze genové exprese, je možno také třídít chromozomy či jádra. U chromozomů můžeme dále identifikovat strukturní změny či změny v jejich počtu (aneuploidie) (Doležel *et Bartoš*, 2005).

Principem této metody je analýza optických parametrů mikroskopických částic (chromozomů, jader, celých buněk) za pohybu v úzkém vodním paprsku. Díky hydrodynamické fokusaci je zajištěno, že částice putují jedna za druhou v průtokové komůrce pomocí unášející kapaliny. DNA analyzovaných částic je barvena specifickým fluorochromem. Vzorek interaguje se světelným paprskem laseru o vhodné vlnové délce vzhledem k použitému fluorochromu. Dochází k excitaci fluorochromu a rozptylu světla, paprsky jsou následně sesbírány příslušnou optickou soustavou a detekovány pomocí specifických detektorů. Světelné pulzy jsou přeměněny na elektrické, které jsou analyzovány v PC s vhodným softwarem a množství světla emitované každým jádrem je tak kvantifikováno. Výsledkem měření je nejčastěji histogram relativní intenzity fluorescence analyzovaných částic představující relativní obsah DNA (viz Obrázek 3).



Obrázek 3: Histogram stanovení relativního obsahu jaderné DNA

Buněčná jádra druhů *Ensete gillettii* a *Glycine max* byla barvena propidium jodidem. Druh *Glycine max* sloužil jako standard o známé velikosti genomu (převzato z: Doležel *et* Bartoš, 2005).

Příprava vzorku i následná analýza je jednoduchý a rychlý proces, je však potřeba počítat s možnými nepřesnostmi způsobenými ať už samotnou přípravou vzorku, či měřením. K analýze nejsou potřeba dělicí se buňky, což je velkou výhodou. Můžeme tak analyzovat obsáhlé populace buněk ve velmi krátkém čase (Doležel *et* Bartoš, 2005).

Obsah jaderné DNA se začal u rostlin měřit pomocí průtokové cytometrie v 70. letech minulého století (Heller, 1973) použitím suspenze intaktních jader lýzí protoplastů (získaných enzymatickou digescí kořínků) a následnou vizualizací DNA ethidium bromidem. O deset let později nastal průlom, když byla tato suspenze připravena nasekáním malého množství čerstvého rostlinného pletiva ve vhodném pufru (Galbraith *et al.*, 1983), což bylo velmi jednoduché a rychlé.

Ke stanovení velikosti jaderného genomu pomocí průtokového cytometru, tj. zjištění 2C hodnoty DNA, která představuje obsah nereplikovaných sad chromozomů, využíváme referenční standard o známém obsahu DNA (Doležel *et* Bartoš, 2005). Izolace a barvení jader je provedeno současně u zkoumaného vzorku a standardu v pufru s DNA barvivem (pro měření obsahu DNA se využívá zejména ethidium bromid či propidium jodid, pro stanovení ploidie zase DAPI), následuje odstranění zbytků rostlinného pletiva filtrací

přes membránu. Podle polohy píků v G1 fázi buněčného cyklu lze vypočítat obsah DNA (v pg) ve vzorku vzhledem ke standardu.

Stanovení ploidie pomocí průtokového cytometru je velmi rychlý, nedestruktivní proces (pro analýzu stačí malé množství rostlinného pletiva). Pro měření potřebujeme rovněž interní standard o známé velikosti genomu. Na základě poměru píků standardu a vzorku pak stanovíme ploidii neznámého vzorku.

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

4.1.1 Cytometrická analýza

Pro první část experimentů této diplomové práce byly použity genotypy kostřavy luční italské (*Festuca pratensis* subsp. *apennina*) pocházející ze sběrové expedice na vybraných lokalitách Švýcarska a Itálie (viz Tabulka 1). Tento tetraploidní druh je morfologicky velmi těžko odlišitelný od diploidní kostřavy luční (především ve vegetativním stádiu, kdy sběry probíhaly) a na řadě lokalit se nacházely oba dva druhy. Bylo proto nutné identifikovat tetraploidní rostliny příslušející k žádoucímu druhu kostřavy luční italské.

Celé rostliny byly odebírány ve vybraných oblastech Švýcarska a Itálie (Alpy a Apeniny), včetně pro tento druh typické lokality Santo Stefano d' Aveto (Ardenghi *et* Foggi 2015). Tato italská oblast se vyznačuje stinnými lesními mýtinami a vodou nasáklými půdami, naopak ve Švýcarsku byly rostliny získány z horských luk a pastvin.

Po počáteční analýze ploidie byl proveden další sběr (tentokrát pouze listů) na třech švýcarských lokalitách. Sběr probíhal dvojím způsobem: první sada vzorků zahrnovala listy náhodně vybraných rostlin, zatímco druhá sada obsahovala listy rostlin, které byly na základě morfologie indikovány jako tetraploidní *F. pratensis* subsp. *apennina* (trávy se širokými listy a hnědo-červeným zbarvením báze listů). Odebrané listy byly před analýzou průtokovým cytometrem uchovány v navlhčených papírových utěrkách po dobu 10 dní.

Tabulka 1: Analyzované genotypy druhů *Festuca pratensis* a *Festuca pratensis* subsp. *apennina* nově získané z vybraných lokalit Švýcarska a Itálie

Lokalita	Nadmořská výška (m n. m.)	Celkový počet rostlin
Mörlialp, Švýcarsko	1355	11
Glaubenbielen, Švýcarsko	1568	15
Fontanen, Švýcarsko	1703	7
Küblisbiehlschwand, Švýcarsko	1250	16
Stoos, Švýcarsko	1651	1
	1717	1
	1783	4
	1865	2
Moleson, Švýcarsko	1401	5
	1416	1
	1516	2
	1533	1
	1634	2
	1810	2
	1743	3
Gsteig, Švýcarsko	1515	2
	1737	5
	1703	5
La Para, Švýcarsko	1541	5
	2006	5
	1907	6
	1895	5
Crissolo, Itálie	1710	3
	1415	5
	1603	5
Santo Stefano d' Aveto, Itálie	1497	4
	1596	8
	1583	5

4.1.2 Cytogenetická analýza

Druhá část experimentální práce zahrnovala studium genomového složení tří vybraných odrůd křížence *Festulolium*, a to 'Hostýn' 'Perseus' a 'Perun', se kterými se počítalo pro založení do fenotypovací školky. Cílem této diplomové práce bylo zjistit stabilitu genomového složení u registrovaných odrůd. Semena poskytla šlechtitelská a semenářská stanice DFL, s.r.o. (Hladké Životice, Česká republika). Tyto odrůdy byly získány mezirodovou hybridizací mezi rody *Lolium multiflorum* ($2n = 4x = 28$) a *Festuca pratensis* ($2n = 4x = 28$) doprovázenou několika následnými kříženími.

Každá odrůda byla zastoupena třemi generacemi - SE1, SE2 a C1 (oficiální značení pro množení rostlin ze semen v České republice). Po první registrované generaci SE1 následovala generace SE2 a C1 byla druhou generací po SE2. Po počáteční mezirodové hybridizaci odpovídala SE1 generaci F6-F7, SE2 generaci F7-F8 a C1 generaci F9-F10. U každé generace jednotlivé odrůdy bylo analyzováno 20 rostlin (tj. celkově 180 rostlin), viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Analyzované komerční odrůdy mezirodových hybridů *Festulolium* (*L. multiflorum* × *F. pratensis*)

Odrůda	Generace	Počet rostlin
Hostýn	SE1	20
	SE2	20
	C1	20
Perun	SE1	20
	SE2	20
	C1	20
Perseus	SE1	20
	SE2	20
	C1	20

4.2 Metodika

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

4.2.1 Analýza ploidie pomocí průtokové cytometrie

Analýza ploidie byla provedena podle protokolu Doležel *et al.* (2007). Suspenze jader byla připravena z 50 mg listů vybraných vzorků trav spolu s hrachem setým (*Pisum sativum* cv. Ctírad), který sloužil jako standard (obsah DNA hrachu, tj. 2C, odpovídá 9,09 pg; převzato z Doležel *et al.*, 1998). Vzorek byl nejprve spolu se standardem pomocí žiletky homogenizován v Petriho misce obsahující 0,5 ml roztoku Otto I. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes nylonovou membránu (42 μ m) a obarvena pomocí roztoku Otto II s přidaným 2 mg/ml β -merkaptoethanolem a 2 μ g/ml DAPI.

Následně byla pomocí průtokového cytometru vybaveného UV led diodovým laserem měřena ploidie. Pro finální výsledky byla použita pouze měření s variačním koeficientem pro píky G0/G1 fáze < 2,5 %.

4.2.2 Příprava rostlinného materiálu pro odběr kořínků, fixace kořínků

Pro cytogenetickou analýzu za účelem zjištění genomového složení byla semena vybraných odrůd *Festulolium* nejprve vložena na 1 den do kádinky s redestilovanou vodou a následně vyseta na Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem a umístěna na 3 dny do chladu. Po uplynutí této doby byly misky ponechány po dobu 3 dnů při laboratorní teplotě. Semenáčky byly z Petriho misek přesazeny do hlíny a umístěny do skleníku. Po 3 - 4 týdnech byly mladé rostliny přemístěny do hydroponické lázně obsahující Hydroponex o koncentraci 0,9 g/l.

Po 6 - 8 dnech byly rostlinám pomocí pinzety mezi 11. - 13. hodinou (z důvodu vysokého mitotického indexu meristematických buněk) odebrány asi 1 cm dlouhé kořenové špičky do zkumavek s redestilovanou vodou, které byly na ledu umístěny do chladové místnosti při 4 °C. Další den byly kořínky přemístěny do 1 ml fixačního roztoku ethanol: kyselina octová (3:1) a inkubovány 1 týden v termostatu při 37 °C.

4.2.3 Příprava roztlakových preparátů metafázních chromozomů

Před samotnou přípravou roztlakových preparátů byly kořínky nejprve barveny v 1% roztoku acetokarmínu po dobu nejméně 2 hodin. Roztlakové preparáty metafázních chromozomů byly zhotoveny podle protokolu Masoudi-Nejad *et al.* (2002). Na podložním skle očištěném 96% ethanolem byl proveden roztlak kořenové špičky v kapce 45% kyseliny octové pomocí párátka a sklo bylo následně ožehnuto nad lihovým kahanem. Po vychladnutí byl celý preparát silně roztlačen prsty a sklo bylo vloženo na blok suchého ledu (CO₂ v pevném skupenství) krycím sklíčkem dolů po dobu minimálně 45 minut. Poté byla krycí sklíčka odstraněna žiletkou a preparáty byly krátce inkubovány ve 45% kyselině octové nejprve při laboratorní teplotě, následně byly přeneseny na 3 minuty do 45% kyseliny octové o teplotě 50 °C. Po usušení byly pomocí světelného mikroskopu vyhodnoceny roztlaky metafázních chromozomů.

4.2.4 Genomová *in situ* hybridizace (GISH) a mikroskopování

GISH byla provedena podle protokolu Masoudi-Nejad *et al.* (2002). Z celogenomové DNA druhu *Festuca pratensis* (Fp) byla nejprve připravena sonda. Tato gDNA byla značena nick translací pomocí digoxigeninu za použití DIG-Nick Translation Mixu podle doporučení výrobce (Roche). Směs pro nick translaci obsahovala 1 µg gDNA, 4 µl DIG-Nick Translation Mixu a redestilovanou vodu doplněnou do celkového objemu 20 µl. Směs byla inkubována 1,5 hodiny při 15 °C, reakce byla poté zastavena krátkým působením na ledu. Následně byl přidán 1 µl 0,5 M EDTA a probíhala inkubace po dobu 10 minut při 65 °C. Dlouhodobě lze sondu uchovávat při -20 °C.

Pro přípravu blokovací DNA byla použita celogenomová DNA druhu *Lolium multiflorum* (Lm). Nejprve bylo doplněno 400 µg této gDNA redestilovanou vodou do objemu 384 µl, poté bylo přidáno 16 µl NaOH a důkladně promícháno. Vařením ve vroucí vodě po dobu 45 min byla gDNA následně našťipána na fragmenty o velikosti 200 - 500 bp. Poté byla inkubována na ledu po dobu 5 minut a bylo přidáno 400 µl 3 M octanu sodného (o pH 5,2). Nakonec bylo přidáno 800 µl 99,8% ethanolu a směs byla inkubována přes noc při -80 °C. Druhý den byla směs centrifugována po dobu 30 min při 14 000 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a zbylý pelet byl propláchnut 70% ethanolem. Po vysušení zbytkového ethanolu byl pelet rozpuštěn ve 40 µl TE pufru. Blokovací DNA lze dlouhodobě uchovávat při -20 °C.

Následně byla připravena hybridizační směs pro vlastní genomovou *in situ* hybridizaci s reagensy, včetně sondy Fp DIG a blokovací DNA (Lm), dle Tabulky 3. Předpokládaná úroveň stringence hybridizace dosahovala vzhledem ke koncentraci formamidu a SSC v hybridizační směsi cca 77 %.

Tabulka 3: Příprava hybridizační směsi pro výsledný objem 20 μ l

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

Na podložní sklo s fixovanými chromozomy bylo nanášeno 20 μ l hybridizační směsi, bylo přiklopeno krycí sklíčko a následovala denaturace po dobu 2:25 sekund při 80 °C. Poté byla směs spolu s chromozomy inkubována v hybridizační komůrce přes noc při 37 °C. Další den bylo krycí sklíčko odstraněno pomocí proudu redestilované vody, preparát byl inkubován 10 minut v 2x SSC a znovu opláchnut redestilovanou vodou.

Hybridizace sondy na cílovou sekvenci DNA byla detekována pomocí Anti-DIG-FITC konjugátu. 1% blokovací pufr o objemu 40 μ l byl smíchán s 0,4 μ l značené protilátky a nanášen na podložní sklo. Po přikrytí krycím sklíčkem byl preparát inkubován 1,5 hodiny v hybridizační komůrce při 37 °C. Po hybridizaci bylo pomocí proudu redestilované vody odstraněno krycí sklíčko a po osušení byly chromozomy vizualizovány pomocí 12 μ l Vectashield média obsahujícího DAPI (1,5 μ g/ml). Preparáty s metafázními chromozomy byly přikryty krycím sklíčkem a vyhodnoceny pomocí epifluorescenčního mikroskopu Olympus AX70 vybaveného SensiCam B/W kamerou. Pro úpravu výsledných fotek byly použity programy ScionImage a Adobe Photoshop. Pro každou rostlinu byly analyzovány nejméně 3 metafáze.

4.2.5 Analýza dat

U každé generace tří komerčních odrůd *Festulolium* (*L. multiflorum* × *F. pratensis*) bylo metodou GISH analyzováno celkem 20 rostlin. Oblast centromery byla rozhodující pro rozlišení původu rodičovského chromatinu jednotlivých chromozomů, tj. chromozomy pocházely z druhu *Festuca pratensis*, jestliže byly jejich centromery značeny sondou z celogenomové DNA *Festuca pratensis*. Díky této metodě bylo možno v souvislosti s podílem rodičovského chromatinu vyhodnotit u tří generací vybraných odrůd *Festulolium* celkem 10 charakteristických znaků, a to:

1. celkový počet chromozomů (Celk_chrom)
2. frekvenci aneuploidie (%)
3. celkový počet chromozomů původem z *Festuca pratensis* (Celk_F_chrom)
4. celkový počet chromozomů původem z *Lolium multiflorum* (Celk_L_chrom)
5. celkový počet homeologních rekombinací detekovaných na chromozomech původem z *Festuca pratensis* (F_rek)
6. celkový počet homeologních rekombinací detekovaných na chromozomech původem z *Lolium multiflorum* (L_rek)
7. podíl chromozomů původem z *Festuca pratensis* ke všem chromozomům
($F_chrom = Celk_F_chrom / Celk_chrom$)
8. podíl homeologních rekombinací detekovaných na chromozomech původem z *Festuca pratensis* k celkovému počtu homeologních rekombinací
($F_rek_chrom = F_rek / (L_rek + F_rek)$)
9. průměrný počet homeologních rekombinací v přepočtu na jeden chromozom původem z *Festuca pratensis* (homeo_F_rek = $F_rek / Celk_F_chrom$)
10. průměrný počet homeologních rekombinací v přepočtu na jeden chromozom původem z *Lolium multiflorum* (homeo_L_rek = $L_rek / Celk_L_chrom$).

4.2.6 Založení fenotypovací školky a pilotní fenotypování vybraných rostlin na mrazuvzdornost

Na základě získaných výsledků byla založena v červenci 2016 fenotypovací školka na pozemcích Ústavu experimentální botaniky v Olomouci-Holici. Každý ze 48 genotypů byl představován deseti rostlinami. Ty byly buď klonem jediné rostliny (v případě tetraploidní a triploidní košťavy luční italské) nebo jednotlivými rostlinami dané odrůdy či původu (ostatní).

V březnu 2017 bylo provedeno fenotypování na mrazuvzdornost u všech 480 rostlin ve fenotypovací školce. Hodnotil se vzhled a přežití rostliny ve škále 0 - 6, přičemž 0 = mrtvá, uhynulá rostlina, 1 = velmi slabá rostlina s 1 - 2 stonky, 2 = slabá rostlina s 3 - 4 stonky, 3 = rostlina s 5 - 6 stonky, 4 = silnější rostlina se značným podílem suchých stonků a listů, 5 = silná rostlina s malým podílem suchých stonků a listů, 6 = velmi silná rostlina bez, nebo s velmi malým podílem suchých stonků a listů. Je žádoucí uvést, že toto hodnocení není nikterak exaktní a pouze indikuje míru mrazuvzdornosti jednotlivých genotypů. Z deseti rostlin jednotlivých genotypů byl vypočten průměr.

4.3 Použité chemikálie

- 100% Formamid (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- 99,8% Ethanol (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 99,8% Kyselina octová (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 35% kyselina chlorovodíková (HCl) (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments 200 µg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velká Británie)
- DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA)
- Dextran sulfát sodná sůl (SERVA Elctrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science, Penzberg, Německo)
- Dihydrát citronanu sodného (PLIVA - Lachema, a.s., Brno, Česká republika)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (Lachema, a.s., Brno, Česká republika)
- Hydroponex (Hu-Ben, Čerčany, Česká republika).
- Hydroxid sodný (NaOH) (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Imerzní olej Olympus (Tokio, Japonsko)
- Karmín (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Kyselina citronová monohydrát (Penta, s.r.o., Praha, Česká republika)

- Octan sodný (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Redestilovaná voda
- Tris-base (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornie, USA)
- β -merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

4.4 Použité roztoky a jejich příprava

1% acetokarmín

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

1% blokovácí pufr

- 0,5 g Blocking reagent
- rozpustit v 50 ml 4x SSC/Tween 20 po dobu 1 hodiny při 70 °C
- vyautoklávovat, uchovávat při -20 °C

4x SSC (4x SSC/Tween 20)

- 200 ml 20x SSC
- doplnit do 1 l redestilovanou vodou
- přidat 2 ml Tween 20
- upravit pH na 7,0, vyautoklávovat, uchovávat při laboratorní teplotě

20x SSC

- 175,3 g 3 M NaCl
- 88,2 g 0,3 M dihydrátu citronanu sodného
- doplnit do 1 l redestilovanou vodou
- upravit pH na 7,0, přefiltrovat, 25 min autoklávovat, uchovávat při laboratorní teplotě

2x SSC

- 100 ml 20x SSC
- doplnit do 1 l redestilovanou vodou
- upravit pH na 7,0, vyautoklávovat, uchovávat při laboratorní teplotě

50% dextran sulfát

- 2,5 g dextran sulfátu
- rozpustit v 5 ml redestilované vody při mírném zahřátí
- uchovávat při -20 °C

Fixační roztok ethanol: kyselina octová (3:1)

- 45 ml 99,8% ethanolu
- 15 ml 99,8% kyseliny octové
- vždy připravit čerstvou fixáž

Otto I

- 4,2 g 0,1 M kyseliny citronové monohydrátu
- 1 ml 0,5% Tween 20
- doplnit do 200 ml redestilovanou vodou
- filtrovat přes 0,22 µm filtr, uchovávat při 4 °C

Otto II

- 28,65 g 0,4 M Na₂HPO₄·12 H₂O
- doplnit do 150 ml redestilovanou vodou, případně mírně zahřát
- filtrovat přes 0,22 µm filtr
- přidat 10 ml zásobního roztoku DAPI
- doplnit do 200 ml redestilovanou vodou
- uchovávat ve tmě při laboratorní teplotě

Zásobní roztok DAPI

- 5 mg DAPI
- rozpustit v 50 ml redestilované vody
- míchat 60 minut, filtrovat přes 0,2 µm filtr, skladovat při -20 °C

3 M Octan sodný.3H₂O (pH 5,2)

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

Promývací roztoky pro průtokový cytometr

- Cleaning Solution (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Německo)
- Decontamination Solution (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Německo)
- uchovávat při laboratorní teplotě

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

- 1 ml 1 M Tris-HCl
- 200 µl 0,5 M EDTA
- doplnit do 100 ml redestilovanou vodou
- upravit pH na 8,0, vyautoklávovat, uchovávat při 4 °C

0,5 M EDTA (pH 8,0)

- 18,61 g EDTA
- rozpustit v 80 ml redestilované vody
- upravovat během rozpouštění pH na 8,0 pomocí NaOH, vyautoklávovat, uchovávat při laboratorní teplotě

1 M Tris-HCl (pH 8,0)

- 12,11 g Tris-base
- rozpustit v 80 ml redestilované vody, upravit pH na 8,0 koncentrovanou HCl

4.5 Seznam laboratorních přístrojů

- Autokláv 2340E (Tuttnauer, Breda, Nizozemsko)
- Centrifuga MiniStar silverline (VWR International, Jižní Korea)
- Digestoř Merci M (Merci, s.r.o., Brno, Česká republika)
- Hybridizační pec SM30 (Grant-Boeckel, Cambridge, Anglie)
- Lyofilizátor Heto Drywinner (Trigon Plus spol. s r.o., Říčany u Prahy, Česká republika) a vakuová pumpa (Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Německo)
- Mikrocentrifuga Prism R (Labnet International, Inc., Edison, New Jersey, USA)
- Průtokový cytometr CyFlow Space (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Německo)
- Přístroj na úpravu vody Aqua Osmotic 04 (AquaOsmotic s.r.o., Tišnov, 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)
- Světelný mikroskop Primo Star (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)
- Termocyklér na mikroskopavky PCT-200 (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts, USA)
- Termocyklér pro FISH - Mastercycler eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Termostat BT 120 (LABO-MS spol. s.r.o., Praha, Česká republika)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant Instruments, Cambridge, Anglie)
- Vortex Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- Výrobník ledové tříště Scotsman MF 26 Ice Flaker (Scotsman Ice Systems, Ipswich, Velká Británie)

5 Výsledky

5.1 Cytometrická analýza

Vzhledem k nejednoznačnému morfologickému odlišení diploidní kostřavy luční a tetraploidní *Festuca pratensis* subsp. *apennina* bylo nutné provést cytometrickou analýzu u genotypů (rostlin) nově získaných v rámci sběrové expedice (viz Tabulka 4). Ploidie se u analyzovaných rostlin pocházejících z odlišných lokalit (Švýcarsko, Itálie) lišila, významnou roli sehrála i nadmořská výška.

Při první sběrové expedici bylo analyzováno celkem 136 genotypů, z čehož 24 bylo identifikováno jako diploidních, 64 triploidních a 48 tetraploidních. Bylo zjištěno, že diploidní rostliny byly primárně zastoupeny v nižších nadmořských výškách, přičemž nebyly detekovány v nadmořské výšce nad 1750 m n. m. V oblastech do 1900 m n. m. byli zaznamenáni triploidní jedinci rostoucí společně s diploidními. Tetraploidní rostliny byly obvykle detekovány v oblastech nad 1500 m n. m., pouze jedna tetraploidní rostlina (získaná z lokality Moleson, Švýcarsko) se nacházela v nadmořské výšce 1401 m n. m. Ve většině švýcarských lokalit se nacházely společně na jednom místě dva nebo všechny tři různé cytotypy. Co se týče italské lokality Crissolo, byli zde detekováni pouze diploidní jedinci. Oproti tomu v italském Santo Stefano d' Aveto byly zaznamenány pouze tetraploidní cytotypy. Obecně vzato ve většině švýcarských oblastí převažovaly rostliny s triploidním genomem, na lokalitách Gsteig a na jedné lokalitě La Para se navíc nacházeli pouze jedinci s tímto genomovým složením.

Tabulka 4: Analyzované genotypy druhů *Festuca pratensis* a *Festuca pratensis* subsp. *apennina* nově získané z vybraných lokalit Švýcarska a Itálie

Lokalita	Nadmořská výška (m n. m.)	Celkový počet rostlin	Počet rostlin podle ploidie		
			2x	3x	4x
Mörlialp, Švýcarsko	1355	11	2	9	0
Glaubenbielen, Švýcarsko	1568	15	3	11	1
Fontanen, Švýcarsko	1703	7	0	0	7
Küblisbiehlschwand, Švýcarsko	1250	16	5	11	0
Stoos, Švýcarsko	1651	1	0	0	1
	1717	1	0	1	0
	1783	4	0	0	4
	1865	2	0	0	2
Moleson, Švýcarsko	1401	5	0	4	1
	1416	1	0	1	0
	1516	2	0	2	0
	1533	1	0	0	1
	1634	2	0	0	2
	1810	2	0	2	0
	1743	3	0	0	3
	1515	2	0	1	1
Gsteig, Švýcarsko	1737	5	0	5	0
	1703	5	0	5	0
	1541	5	0	5	0
La Para, Švýcarsko	2006	5	0	0	5
	1907	6	0	0	6
	1895	5	0	4	1
	1710	3	0	3	0
Crissolo, Itálie	1415	5	5	0	0
	1603	5	5	0	0
	1497	4	4	0	0
Santo Stefano d' Aveto, Itálie	1596	8	0	0	8
	1583	5	0	0	5

Pozn.: Nejčastěji se vyskytující cytotyp je u každé lokality zvýrazněn tučně.

Existence triploidních rostlin byla překvapivá, stejně jako jejich vysoké poměrové zastoupení. Po pilotním experimentu byla proto provedena detailnější analýza zaměřená na zastoupení různých cytotypů na třech švýcarských lokalitách. Ze švýcarské oblasti Mörlialp (1355 m n. m.) bylo analyzováno dalších 85 náhodně sesbíraných rostlin, kdy

cytometrická analýza odhalila 11,8 % diploidních a 88,2 % triploidních jedinců (nebyl detekován žádný tetraploid). Všechny dvacet rostlin, vybíraných na základě morfologie (jakožto tetraploidní *F. pratensis* subsp. *apennina*), bylo triploidních.

Z další švýcarské oblasti Glauhenbielen (1568 m n. m.) bylo ze 100 náhodně odebraných rostlin identifikováno 15 % diploidních, 52 % triploidních a 33 % tetraploidních rostlin. Z celkově 20 rostlin, vybraných podle morfologie, odhalila cytometrická analýza 3 diploidní, 13 triploidních a pouze 4 očekávané tetraploidní jedince.

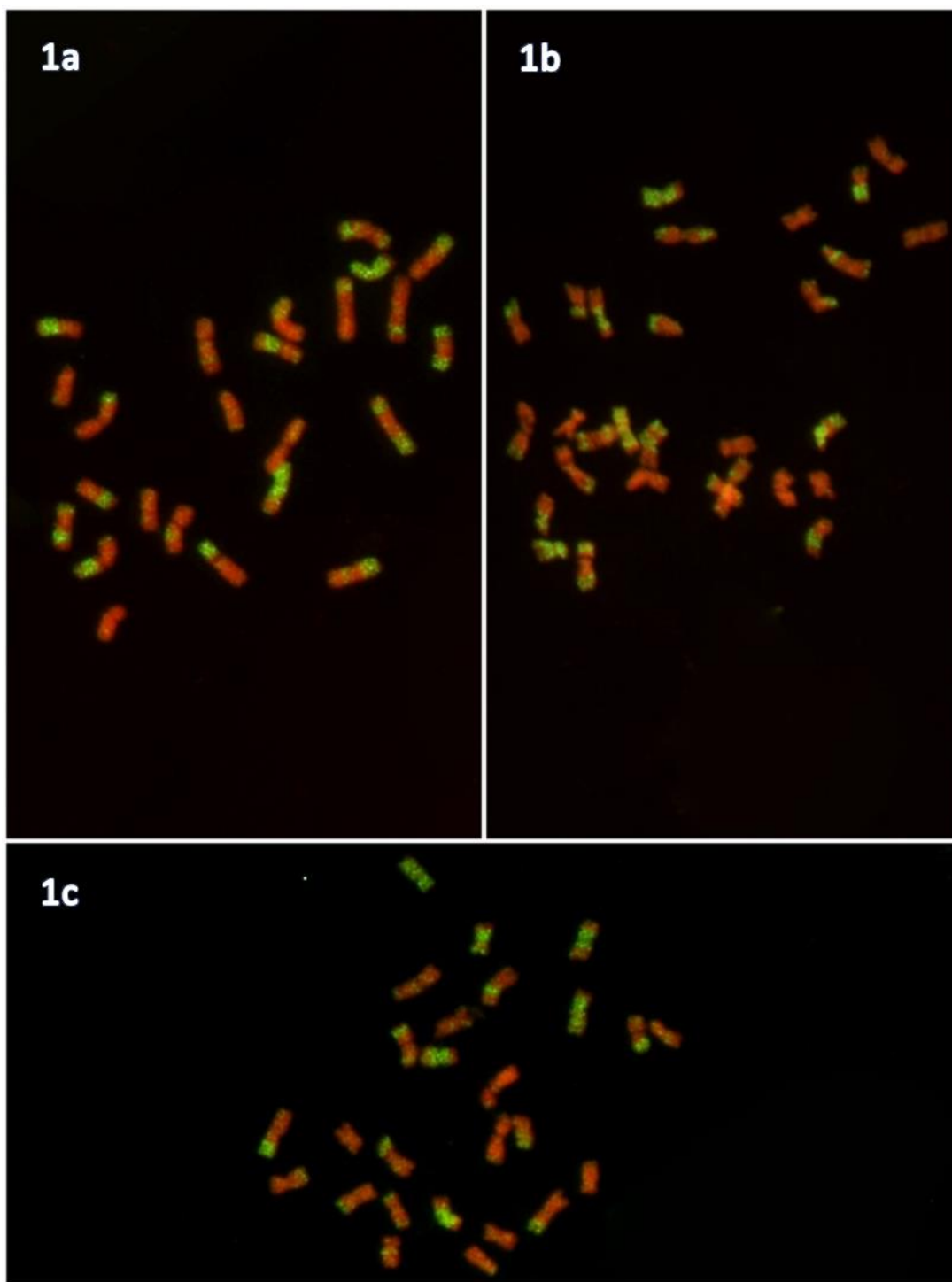
Dále bylo ze švýcarské oblasti Küblisbiehlschwand (1250 m n. m.) analyzováno celkem 89 náhodně sesbíraných rostlin, kdy bylo identifikováno 92,1 % diploidních a 7,9 % triploidních jedinců. Z celkově 20 rostlin, vybraných opětovně na základě morfologie typické pro tetraploidní cytotyp, bylo měřením identifikováno 14 diploidních a 6 triploidních rostlin.

Z těchto výsledků vyplývá, že není možné spolehlivě rozlišit diploidní, triploidní a tetraploidní rostliny na základě morfologických charakteristik v jejich vegetativním stádiu vývoje. Cytometrická analýza dále odhalila, že obecně ve vybraných lokalitách převažují triploidní cytotypy. V některých zkoumaných oblastech byli triploidi pouze jediným cytotypem. Pro úplnost je vhodné uvést, že následná cytogenetická analýza (která nebyla součástí této diplomové práce) prokázala, že triploidi jsou kříženci diploidní kostřavy luční a tetraploidní kostřavy luční italské.

5.2 Cytogenetická analýza

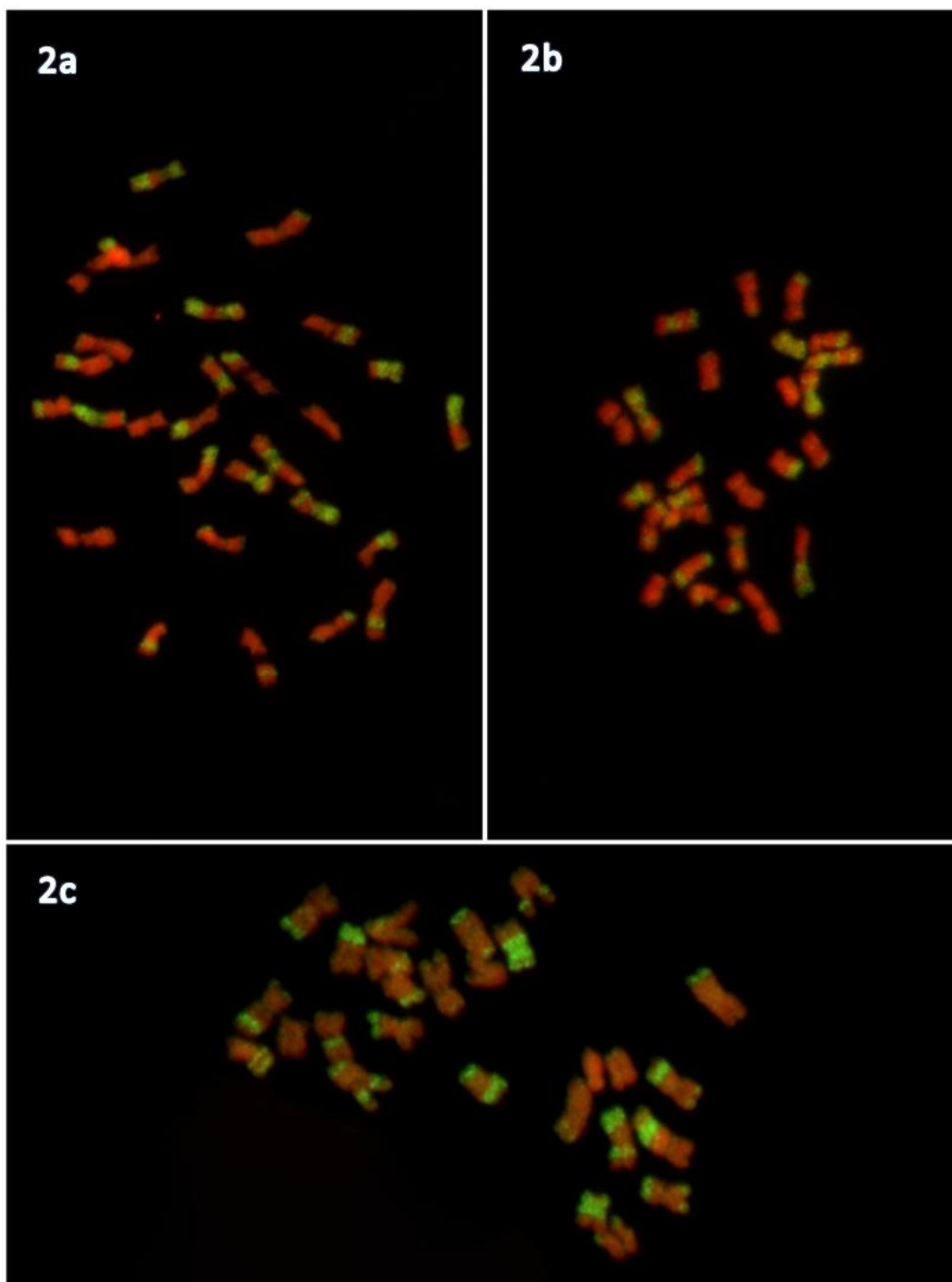
Hlavním cílem druhé části experimentů bylo zjištění stability genomového složení odrůd *Festulolium* na základě poměru jejich rodičovských genomů u tří po sobě jdoucích generací. V rámci každé ze tří zkoumaných odrůd (Hostýn, Perun a Perseus) byla pomocí genomové *in situ* hybridizace vyhodnocena genomová variabilita, zvláštní pozornost byla věnována posunům v genomovém složení z generace na generaci. Příklady cytogenetické charakterizace jednotlivých odrůd jsou uvedeny na Obrázku 4, 5 a 6.

Porovnáme-li tyto vybrané odrůdy, Perseus je charakteristický nejvíce nevyváženým poměrem rodičovských genomů. Oproti tomu Hostýn představuje relativně novou odrůdu s nejvyváženějším genomovým složením.



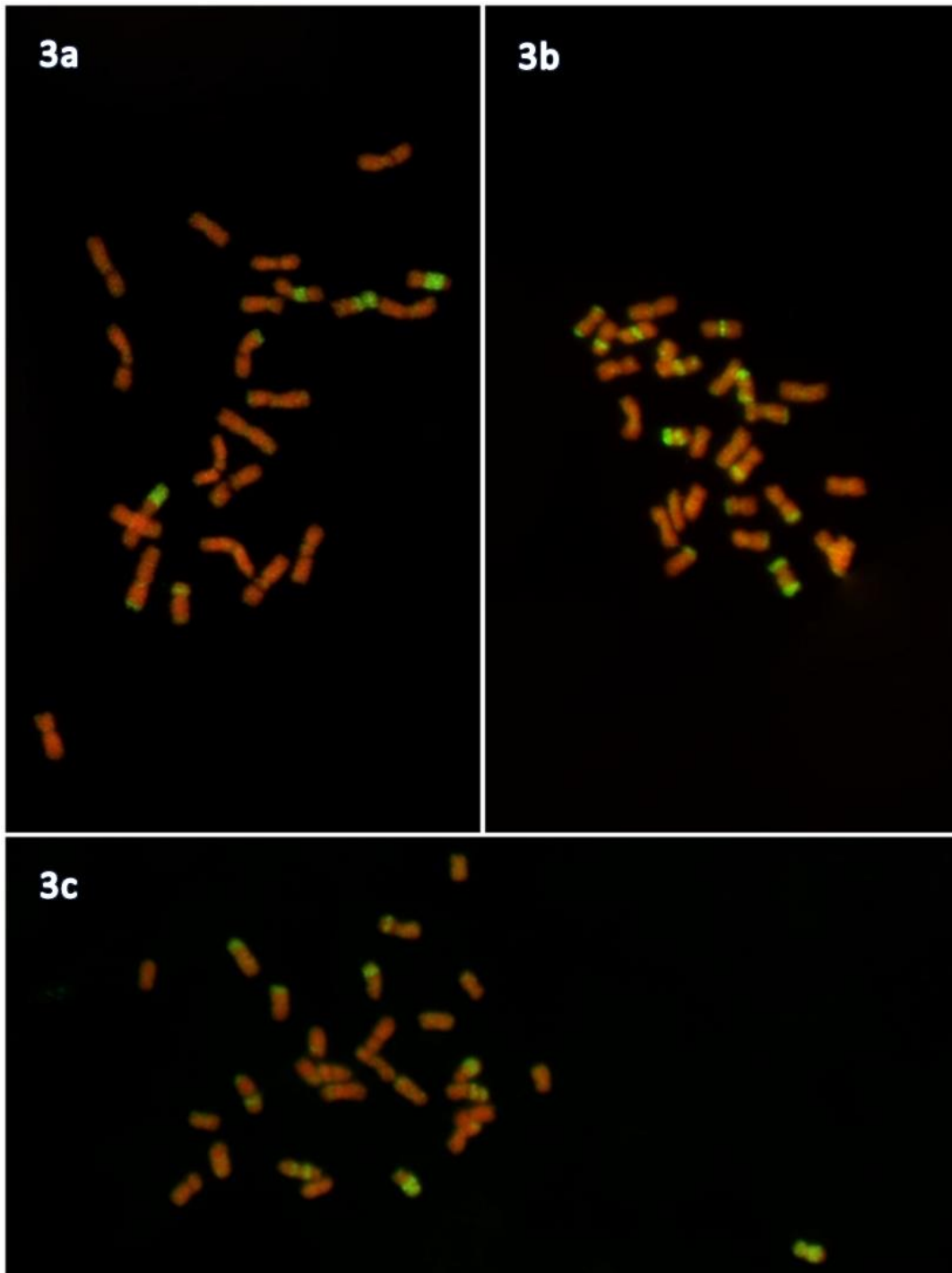
Obrázek 4: Příklady cytogenetické charakterizace tří po sobě jdoucích generací *Festulolium* odrůdy **Hostýn** (*L. multiflorum* × *F. pratensis*): Hostýn SE1 (1a), Hostýn SE2 (1b), Hostýn C1 (1c).

Genomová *in situ* hybridizace byla provedena na mitotických metafázních chromozomech, z celkové genomové DNA *F. pratensis* byla připravena sonda značená digoxigeninem (zelená). Naštěpená celková genomová DNA *L. multiflorum* posloužila jako blokovácí DNA. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI (červená pseudobarva).



Obrázek 5: Příklady cytogenetické charakterizace tří po sobě jdoucích generací *Festulolium* odrůdy **Perun** (*L. multiflorum* × *F. pratensis*): Perun SE1 (2a), Perun SE2 (2b), Perun C1 (2c).

Genomová *in situ* hybridizace byla provedena na mitotických metafázních chromozomech, z celkové genomové DNA *F. pratensis* byla připravena sonda značená digoxigeninem (zelená). Naštěpená celková genomová DNA *L. multiflorum* posloužila jako blokovácí DNA. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI (červená pseudobarva).



Obrázek 6: Příklady cytogenetické charakterizace tří po sobě jdoucích generací *Festulolium* odrůdy **Perseus** (*L. multiflorum* × *F. pratensis*): Perseus SE1 (3a), Perseus SE2 (3b), Perseus C1 (3c).

Genomová *in situ* hybridizace byla provedena na mitotických metafázních chromozomech, z celkové genomové DNA *F. pratensis* byla připravena sonda značená digoxigeninem (zelená). Naštěpená celková genomová DNA *L. multiflorum* posloužila jako blokovácí DNA. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI (červená pseudobarva).

5.2.1 Frekvence aneuploidie

U všech tří studovaných odrůd byla zjištěna vysoká frekvence aneuploidie (tj. ztráta či nadbytek chromozomů v karyotypu, kdy předpokládaný počet chromozomů je v tetraploidním stavu 28), a to mezi 60 - 80 %, nejméně byla pozorována u odrůdy Perun (63 %). Napříč generacemi odrůd Hostýn a Perseus frekvence aneuploidie klesala, u odrůdy Perun naopak stoupala.

Obecně byl celkový počet chromozomů u zkoumaných odrůd nižší (tzv. hypoploidie). Jednalo se průměrně o 26,9 chromozomů v případě odrůdy Perseus, 27,2 chromozomů u odrůdy Hostýn a 27,4 chromozomů u odrůdy Perun. Celkově byl nejnižší počet chromozomů (24) zjištěn u dvou rostlin odrůdy Hostýn a u jedné rostliny odrůdy Perseus. Oproti tomu bylo z celkového počtu 180 studovaných rostlin pouze 22 hyperploidních (tj. se zvýšeným počtem chromozomů). Tyto rostliny obsahovaly v karyotypu 29 chromozomů ($2n = 29$). Nejčastěji se u všech odrůd (celkově u 32 % rostlin) vyskytovalo 27 chromozomů ($2n = 27$). Očekávaných 28 chromozomů ($2n = 28$) bylo zjištěno pouze u 29 % rostlin (viz Tabulka 5). Napříč generacemi jednotlivých odrůd i mezi odrůdami navzájem nebyly zaznamenány výrazné změny v rozsahu aneuploidie.

Tabulka 5: Celkový počet chromozomů u jednotlivých generací studovaných komerčních odrůd *Festulolium* (*L. multiflorum* × *F. pratensis*)

Odrůda a generace	Celkový počet chromozomů v diploidním stavu (2n)					
	24	25	26	27	28	29
Hostýn SE1	1	1	2	9	4	3
Hostýn SE2		2	2	6	5	5
Hostýn C1	1	1	4	6	7	1
Perun SE1		1	3	5	8	3
Perun SE2		3	3	2	8	4
Perun C1			2	10	6	2
Perseus SE1		3	5	7	4	1
Perseus SE2		3	4	5	6	2
Perseus C1	1	3	3	8	4	1

Pozn.: Nejčastěji se vyskytující počet chromozomů je u každé generace jednotlivé odrůdy zvýrazněn tučně.

5.2.2 Podíl rodičovského chromatinu

Analýza genomového složení, tj. stanovení počtu chromozomů původem z jílku mnohokvětého (*L. multiflorum*) a kostřavy luční (*F. pratensis*), odhalila určité odlišnosti mezi studovanými odrůdami *Festulolium*. Při analýze 10 vybraných charakteristických znaků (viz Tabulka 8) byly mezi odrůdami ve všech případech detekovány značné rozdíly. Mezi jednotlivými generacemi studovaných odrůd byly ale rozdíly menší, zvyšovala se pouze míra rekombinací u chromozomů původem z genomu rodu *Festuca*.

Z výsledků bylo zjištěno, že stabilizace genomového složení a zastoupení rodičovských genomů by mohlo být dosaženo v generaci C1, která odpovídá generaci F9-F10 po počáteční mezirodové hybridizaci. U všech rostlin studovaných odrůd dominoval jílkový genom nad kostřavovým. U odrůdy Perseus byl rozdíl v zastoupení rodičovských genomů největší (průměrně 3,47 chromozomů pocházelo z genomu *Festuca* a 23,4 z genomu *Lolium*). V případě odrůdy Hostýn bylo průměrně 7,6 chromozomů původem z genomu kostřavy a 19,6 chromozomů z genomu jílku (viz Tabulka 6). Na základě těchto získaných hodnot bylo potvrzeno, že posun v genomovém složení u všech vybraných odrůd ve prospěch jílkového genomu je v následujících generacích po počáteční hybridizaci relativně stabilizován a výrazně se nezvyšuje.

Tabulka 6: Výsledky GISH analýzy provedené u tří po sobě jdoucích generací tří komerčních odrůd *Festulolium* (*L. multiflorum* × *F. pratensis*)

Odrůda a generace	Průměrný počet chromozomů původem z genomu <i>Festuca</i>		Průměrný počet chromozomů původem z genomu <i>Lolium</i>	
	Celkem	Bez homeologní rekombinace	Celkem	Bez homeologní rekombinace
Hostýn SE1	7,75	0,55	19,40	5,05
Hostýn SE2	7,60	0,45	19,85	4,50
Hostýn C1	7,45	0,20	19,55	3,60
Perun SE1	6,90	0,40	20,55	5,60
Perun SE2	7,10	0,40	20,25	5,35
Perun C1	5,90	0,10	21,50	7,30
Perseus SE1	2,65	0,00	24,10	10,65
Perseus SE2	4,10	0,05	22,90	10,30
Perseus C1	3,65	0,05	23,20	9,95

5.2.3 Homeologní rekombinace

Frekvence homeologní rekombinace, která byla spočítána na základě počtu translokací mezi homeologními chromozomy, se lišila u všech studovaných odrůd mezirodových hybridů *Festulolium*. Je známo, že homeologní rekombinace u kříženců negativně ovlivňuje stabilitu genomového složení a mohou rovněž způsobovat nevyvážené poměry rodičovských genomů. V případě odrůdy Perseus, která se vyznačuje nejvíce rozdílným poměrem rodičovských genomů (ve prospěch rodu *Lolium*), byla zjištěna největší míra rekombinace u chromozomů původem z genomu *Festuca* (průměrně 2,44 translokací/chromozom). Oproti tomu u odrůdy Hostýn, pro kterou je charakteristický nejvyváženější poměr rodičovských genomů, byl zjištěn největší podíl rekombinace u chromozomů původem z genomu *Lolium* (průměrně 1,67 translokací/chromozom), viz Tabulka 7.

Frekvence homeologní rekombinace byla u všech odrůd napříč generacemi vyšší u chromozomů původem z genomu *Festuca*. Tento jev může být částečně způsoben vyšším počtem chromozomů obsahujících chromatin výhradně z genomu *Lolium* (viz Tabulka 7). Celková míra homeologní rekombinace byla u vybraných odrůd relativně stabilní z generace na generaci, což naznačuje poměrně ustálené genomy studovaných kříženců. V případě odrůdy Hostýn mírně klesal napříč generacemi počet chromozomů bez rekombinace. Tento trend však nebyl pozorován u zbylých dvou odrůd Perun a Perseus (viz Tabulka 6).

Tabulka 7: Výsledky GISH analýzy provedené u tří po sobě jdoucích generací tří komerčních odrůd *Festulolium* (*L. multiflorum* × *F. pratensis*)

Odrůda a generace	Průměrný počet homeologních rekombinací				V celé buňce
	U chromozomů původem z genomu <i>Festuca</i>		U chromozomů původem z genomu <i>Lolium</i>		
	Celkem	U rekombinovaných chromozomů	Celkem	U rekombinovaných chromozomů	
Hostýn SE1	2,00	2,16	1,62	2,17	46,75
Hostýn SE2	2,31	2,43	1,64	2,11	49,75
Hostýn C1	2,09	2,17	1,77	2,16	50,20
Perun SE1	1,88	2,03	1,41	1,92	41,95
Perun SE2	2,14	2,26	1,50	2,04	45,55
Perun C1	2,24	2,35	1,27	1,94	41,20
Perseus SE1	2,27	2,34	1,02	1,81	30,60
Perseus SE2	2,55	2,57	1,09	2,00	35,55
Perseus C1	2,51	2,49	1,13	1,98	35,15

Tabulka 8: 10 charakteristických znaků vyhodnocených u tří komerčních odrůd *Festulolium* (*L. multiflorum* × *F. pratensis*) na základě genomové *in situ* hybridizace

Charakteristický znak	Odrůda	Průměrná hodnota
Celkový počet chromozomů (Celk_chrom)	Hostýn	27,2
	Perun	27,4
	Perseus	26,9
Frekvence aneuploidie (%)	Hostýn	73
	Perun	63
	Perseus	72
Celkový počet chromozomů původem z <i>Festuca pratensis</i> (Celk_F_chrom)	Hostýn	7,6
	Perun	6,6
	Perseus	3,5
Celkový počet chromozomů původem z <i>Lolium multiflorum</i> (Celk_L_chrom)	Hostýn	19,6
	Perun	20,8
	Perseus	23,4
Celkový počet homeologních rekombinací detekovaných na chromozomech původem z <i>Festuca pratensis</i> (F_rek)	Hostýn	16,2
	Perun	14,0
	Perseus	8,5
Celkový počet homeologních rekombinací detekovaných na chromozomech původem z <i>Lolium multiflorum</i> (L_rek)	Hostýn	32,7
	Perun	28,9
	Perseus	25,3
Podíl chromozomů původem z <i>Festuca pratensis</i> ke všem chromozomům (F_chrom)	Hostýn	0,28
	Perun	0,24
	Perseus	0,13
Podíl homeologních rekombinací detekovaných na chromozomech původem z <i>Festuca pratensis</i> k celkovému počtu homeologních rekombinací (F_rek_chrom)	Hostýn	0,33
	Perun	0,32
	Perseus	0,26
Průměrný počet homeologních rekombinací v přepočtu na jeden chromozom původem z <i>Festuca pratensis</i> (homeo_F_rek)	Hostýn	2,14
	Perun	2,09
	Perseus	2,44
Průměrný počet homeologních rekombinací v přepočtu na jeden chromozom původem z <i>Lolium multiflorum</i> (homeo_L_rek)	Hostýn	1,67
	Perun	1,39
	Perseus	1,08

5.3 Vytvoření fenotypovací školky

Na základě získaných výsledků cytometrické analýzy rostlinného materiálu ze sběrové expedice a cytogenetické charakterizace vybraných odrůd kříženců *Festulolium* bylo vybráno 48 genotypů, které byly vysázeny do fenotypovací školky. Genotypy tetraploidní *F. pratensis* subspp. *apennina* a triploidního cytotypu *F. pratensis* × *F. pratensis* subspp. *apennina* představovaly jednotlivé rostliny, které byly rozklonovány do deseti klonů. Genotypy ostatních druhů byly zastoupeny deseti různými rostlinami. Školka byla založena v červenci 2016 na experimentálním pozemku Ústavu experimentální botaniky v Olomouci-Holici. Rostliny byly zasázeny do osmi skleníků se zakrytou střechou a nezakrytými stěnami ve sponu 30x20 cm. V každém skleníku bylo 12 genotypů po pěti rostlinách. Každý genotyp byl vysázen dvakrát (po pěti rostlinách) s různým umístěním v rámci skleníku. Veškerý rostlinný materiál zahrnutý do fenotypovací školky je popsán v Tabulce 9.

Tabulka 9: Genotypy vybraných druhů košťav, jílků a jejich kříženců použité k založení fenotypovací školky

Kód	Druh	Genotyp/odrůda	Ploidie	Mrazuvzdornost*
FLCC1	<i>L. perenne</i>	Kertak	2x	3,3
FLCC2	<i>L. multiflorum</i>	Moravice	2x	1,4
FLCC3	<i>F. arundinacea</i>	Kora	6x	5,4
FLCC4	<i>Festulolium</i>	Hostýn	4x	2,3
FLCC5	<i>Festulolium</i>	Hathor Fa/Lm-Lp	4x	2,4
FLCC6	<i>Festulolium</i>	Hipast LmFa	6x	4,7
FLCC7	<i>Festulolium</i>	FPF22396 LmFa	6x	5,1
FLCC8	<i>F. pratensis</i>	FPR48643 Fp	2x	5,2
FLCC9	<i>F. mairei</i>	283312	4x	4,1
FLCC10	<i>F. mairei</i>	283313	4x	2,3
FLCC11	<i>F. mairei</i>	535747	4x	4,6
FLCC12	<i>F. mairei</i>	577097	4x	2,5
FLCC13	<i>F. mairei</i>	610941	4x	2,9
FLCC14	<i>F. mairei</i>	GR12850	4x	4,6
FLCC15	<i>F. glaucescens</i>	Fg01	4x	3,9
FLCC16	<i>F. glaucescens</i>	Fg03	4x	3,9
FLCC17	<i>F. glaucescens</i>	Fg08	4x	3,9
FLCC18	<i>F. glaucescens</i>	Fg14	4x	1,6
FLCC19	<i>F. glaucescens</i>	Fg17	4x	2,3

Tabulka 9: Pokračování 1

Kód	Druh	Genotyp/odrůda	Ploidie	Mrazuvzdornost*
FLCC20	<i>F. glaucescens</i>	Fg20	4x	3
FLCC21	<i>F. pratensis</i>	Giswil	2x	4,9
FLCC22	<i>F. pratensis</i>	Cosmonaut	2x	4,9
FLCC23	<i>F. pratensis</i>	Raskila	4x	2,2
FLCC24	<i>F. apennina</i>	25	4x	4,4
FLCC25	<i>F. apennina</i>	28	4x	1,6
FLCC26	<i>F. apennina</i>	34	4x	0,2
FLCC27	<i>F. apennina</i>	61	4x	2,1
FLCC28	<i>F. apennina</i>	65	4x	0,8
FLCC29	<i>F. apennina</i>	68	4x	0,3
FLCC30	<i>F. apennina</i>	69	4x	1,5
FLCC31	<i>F. apennina</i>	71	4x	2
FLCC32	<i>F. apennina</i>	80	4x	1,5
FLCC33	<i>F. apennina</i>	81	4x	0,8
FLCC34	<i>F. apennina</i>	85	4x	1,8
FLCC35	<i>F. apennina</i>	105	4x	1,7
FLCC36	<i>F. apennina</i>	106	4x	1,5
FLCC37	<i>F. apennina</i>	110	4x	1,1
FLCC38	<i>F. apennina</i>	111	4x	1,9
FLCC39	<i>F. apennina</i>	140	4x	4,6
FLCC40	<i>F. apennina</i>	141	4x	3,4
FLCC41	<i>F. apennina</i>	152	4x	4,7
FLCC42	<i>F. apennina</i>	153	4x	3,1
FLCC43	<i>F. apennina</i>	12	3x	3,3
FLCC44	<i>F. apennina</i>	41	3x	1,6
FLCC45	<i>F. apennina</i>	63	3x	0
FLCC46	<i>F. apennina</i>	72	3x	3,9
FLCC47	<i>F. apennina</i>	77	3x	3,5
FLCC48	<i>F. apennina</i>	91	3x	3,7

*) mrazuvzdornost byla hodnocena jakožto míra přežití na škále 0 - 6, přičemž 0 = mrtvá, uhynulá rostlina, 6 = velmi silná a zdravá rostlina s minimálním či žádným podílem suchých stonků a listů.

5.3.1 Pilotní fenotypování mrazuvzdornosti u jednotlivých genotypů z fenotypovací školky

Na konci března 2017 bylo provedeno pilotní fenotypování jednotlivých rostlin ve fenotypovací školce. Byla zjištěna velká variabilita mezi druhy, ale i v rámci jednotlivých druhů. Obecně měly vyšší míru mrazuvzdornosti kostřavy, především kostřava rákosovitá a kostřava luční. Nejnižší míra mrazuvzdornosti byla zaznamenána u jílku mnohokvětého. Velká variabilita byla zaznamenána u kostřavy luční italské, kdy se některé genotypy (FLCC39 a FLCC41) blížily kostřavě rákosovité. Oba tyto genotypy pocházely z Itálie. Překvapivě byla vyšší míra mrazuvzdornosti zaznamenána u triploidních cytotypů, byť jejich nejlepší genotypy nepřevyšovaly nejlepší tetraploidní genotypy. Z výše uvedených dat je zřejmé, že cílená selekce rostlin bude nutná pro identifikaci genotypů vhodných pro nové šlechtění mezidruhovou hybridizací.

6 Diskuze

Dlouhodobým cílem současného šlechtitelství je vytvoření nových odrůd, které by reflektovaly budoucí změny klimatu. Vzhledem k omezené genetické variabilitě jednotlivých druhů je proto žádoucí vnášet nové alely z jiných zdrojů. Velmi elegantním řešením je využití mezidruhové hybridizace, která umožňuje kombinovat požadované vlastnosti dvou různých biologických druhů v jediném organismu. Tohoto přístupu bylo využito i v případě šlechtění píceňích a trávnickových trav, kdy byla vytvořena celá řada odrůd kříženců kostřav a jílků zvaných *Festulolium*. Nejčastěji je využívána kombinace jílku mnohokvětého a kostřavy luční na tetraploidní úrovni, kdy bylo vyšlechtěno téměř padesát amfiploidních odrůd (Ghesquiere *et al.*, 2010). I přes nesporný úspěch těchto kříženců je žádoucí identifikovat nové genotypy planých příbuzných druhů, které by mohly nést agronomicky významné znaky především pro odolnost k abiotickým stresům, jako je suchovzdornost a mrazuvzdornost. Cílem této práce bylo založit fenotypovací školku z vybraných druhů kostřav, jílků a jejich hybridů na základě cytometrické a cytogenetické analýzy a provést pilotní fenotypování na mrazuvzdornost.

Identifikace různých cytotypů u druhů kostřava luční a kostřava luční italská

Vzhledem k nejednoznačné morfologické identifikaci diploidní kostřavy luční od tetraploidní kostřavy luční italské ve vegetativním stádium byla v rámci experimentální části diplomové práce nejprve provedena cytometrická analýza rostlin nově získaných ze sběrové expedice na vybraných lokalitách Švýcarska a Itálie. Analýza odhalila diploidní, triploidní a tetraploidní jedince. Vliv na výskyt těchto jedinců měla daná oblast a také nadmořská výška, běžně se vyskytovaly dva nebo všechny tři cytotypy společně. Z výsledků bylo dále zjištěno, že obecně ve studovaných lokalitách překvapivě převažovaly triploidní cytotypy.

Je známo, že triploidní cytotypy jsou obvykle sterilní, jejich rozmnožování je tak možné pouze vegetativně (Kopecký *et al.*, 2016). Vysoká míra triploidních jedinců není v přírodě běžná, v dřívějších studiích nebyli dokonce žádní triploidní jedinci u těchto druhů detekováni, jednalo se vždy o diploidní a tetraploidní jedince (Borrill *et al.*, 1976; Tyler *et al.*, 1978). Zvýšený výskyt triploidů poukazuje na určitou selekční výhodu, která pravděpodobně chybí u diploidů a tetraploidů. Touto výhodou může být asexuální reprodukce pomocí rhizomů, které byly u triploidů výrazně delší než u tetraploidů, přičemž u diploidů

nebyly vůbec pozorovány. Triploidní rostliny byly rovněž identifikovány mezi přirozeně se vyskytujícími kříženci *Festulolium loliaceum* (Huds.) P. Fourn., vzniklými křížením diploidních druhů *Festuca pratensis* a *Lolium perenne* (Humphreys et Harper, 2008). Triploidní cytotypy, které vznikly pravděpodobně splynutím redukované gamety jednoho rodiče a neredukované gamety rodiče druhého, se na rozdíl od rodičovských druhů vyskytovaly i na silně podmáčených půdách na březích řek. Výskyt neredukovaných gamet je obecně u kostřav běžný (Morgan *et al.*, 1988), neredukované gamety pravděpodobně hrály velkou roli v evoluci polyploidních druhů kostřav.

Druhou možností vzniku triploidních cytotypů je mezidruhovú hybridizace mezi diploidními a tetraploidními cytotypy, což bylo potvrzeno i v této diplomové práci, kdy triploidní rostliny vznikly křížením druhů *Festuca pratensis* a *Festuca pratensis* subsp. *apennina* na mnoha místech švýcarských Alp. Triploidní rostliny se v naší fenotypovací školce jeví jako sterilní, což je v souladu s výsledky Clarke *et al.* (1976), kteří vytvořili pomocí umělého křížení těchto dvou druhů triploidního hybridu, který byl rovněž sterilní. Jeho fertilitu bylo možné navodit až genomovou duplikací, která vedla ke vzniku hexaploidního genotypu.

Stabilita genomového složení kříženců kostřav a jilků (Festulolium)

Stabilita genomového složení je díky párování homeologních chromozómů a četným rekombinacím mezi kostřavovými a jilkovými chromozómy (Thomas *et al.*, 1994; Zwierzykowski *et al.*, 1998) v odrůdách kříženců velkou neznámou. Z tohoto důvodu byla v rámci diplomové práce provedena cytogenetická analýza u třech generací tří odrůd *Festulolium* (Hostýn, Perseus a Perun) s využitím metody genomové *in situ* hybridizace (GISH). Výsledky poskytly užitečné informace o struktuře genomu na chromozomální úrovni.

V rámci této práce bylo dosaženo všech potřebných experimentálních dat u celkem 180 rostlin (bylo testováno 20 rostlin u každé generace studované odrůdy). Nejprve byl vyhodnocen celkový počet chromozómů u každé rostliny, a s tím související frekvence aneuploidie. Jak se předpokládalo, ne všechny rostliny měly očekávaných 28 chromozómů ($2n = 4x = 28$), jejich počet se pohyboval mezi 24 až 29 chromozómy. Z výsledků vyplývá, že průměrná frekvence aneuploidie byla vyšší u odrůd Hostýn a Perseus (73 %, resp. 72 %), u odrůdy Perun se jednalo o 63 %. Nejvyšších hodnot aneuploidie bylo dosaženo obecně u generace SE1 (odpovídá generaci F6-F7), u odrůd Hostýn a Perseus byl pozorován po dvě

následující generace dokonce mírný pokles. Míra aneuploidie se po následující generace u všech studovaných odrůd tedy nezvyšovala a zůstala relativně stabilní. Výsledky korelují s předchozími studii genového složení u různých odrůd *Festulolium* (Canter *et al.*, 1999; Kopecký *et al.*, 2006), kde frekvence aneuploidie u kříženců často přesahovala 50 %.

Ze získaných výsledků bylo rovněž zjištěno, že se zastoupení rodičovských genomů kříženců lišilo mnohem více mezi jednotlivými rostlinami daných odrůd než mezi odrůdami navzájem. Tato vysoká variabilita v genomovém složení se v rámci jednotlivých odrůd z generace na generaci nesnižovala. Cytogenetická analýza dále odhalila, že u všech studovaných odrůd převažoval chromatin z genomu *Lolium* nad genomem *Festuca*. Takováto dominance jednoho rodičovského genomu nad druhým byla popsána u různých rostlinných kříženců. U kříženců *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* dochází k úplné eliminaci druhého rodičovského genomu hned v F1 generaci (Symko, 1969). U kříženců kostřav a jílků je tento proces plynulý z generace na generaci.

Dominancí jílkového genomu se detailněji zabývali Zwierzykowski *et al.* (2006, 2011), když analyzovali genomové složení následných generací tetraploidních hybridů vzniklých křížením *Lolium perenne* × *Festuca pratensis*. Autoři pozorovali postupné zvyšování podílu genomu jílku z F2 do F7 generace. Výsledky naznačují, že mezi generacemi F7 a F8 se podíl rodičovských genomů pravděpodobně stabilizuje. Vzhledem k tomu, že výsledky mohl ovlivnit výběr rostlin s vhodnými agronomickými vlastnostmi, byly provedeny další experimenty (Zwierzykowski *et al.*, 2012) s populacemi F2-F4 náhodných rostlin. Tato analýza potvrdila předchozí studii, když se i u náhodně vybraných rostlin postupně měnil poměr genomového složení ve prospěch jílku. K tomuto posunu pouze docházelo pomaleji.

Udržet stabilní genom kříženců *Festulolium* je pro šlechtění a následnou registraci nové odrůdy velkým problémem. Bylo by proto velmi žádoucí najít způsob, jak hybridní genom stabilizovat. Toho by mohlo být dosaženo vnesením mechanismu, který by zabránil párování homeologních chromozomů při meióze. Takový regulační mechanismus je znám již u některých alopolyloidních kostřav, včetně hexaploidní *Festuca arundinacea* či alotetraploidní *Festuca pratensis* subsp. *apennina*, *Festuca mairei* či *Festuca glaucescens* (Clarke *et al.*, 1976; Jauhar, 1975; Kopecký *et al.*, 2009b). Tento genetický systém však není běžný u diploidní kostřavy luční či jílků (Kopecký *et al.*, 2009b). Optimální možností je tedy pro počáteční křížení odrůd zvolit alotetraploidní druhy kostřav zmíněné výše (Kopecký *et al.*, 2016). Problémem ale je, že systém kontroly striktního párování homologních

chromozomů, detekovaný u alopolyloidních kostřav, je funkční pouze v přítomnosti dvou kopií daného genu či genů a je proto nutná inkorporace dvou kopií (Jauhar, 1975).

Identifikace genotypů planých druhů pro šlechtění nových mezirodových kříženců

Na základě cytometrické analýzy nově získaných genotypů planých druhů kostřav ze sběrové expedice (Švýcarsko, Itálie) a cytogenetické charakterizace vybraných komerčních odrůd *Festulolium* bylo pro založení fenotypovací školky zvoleno 48 genotypů. Každý genotyp představovalo celkem 10 rostlin, u kterých byl vyhodnocen stupeň mrazuvzdornosti (tj. míra přežití). Nejodolnějšími byly podle očekávání odrůda Kora hexaploidní kostřavy rákosovité spolu s odrůdami diploidní kostřavy luční, o kterých je známo, že jsou dobře přizpůsobeny chladnějšímu podnebí (Rognli *et al.*, 2010). Za zmínku stojí i dvě hexaploidní odrůdy kříženců *Festulolium* (FPF22396 LmFa a Hipast LmFa), které vykazují velmi podobné hodnoty. Tito kříženci si tedy uchovali míru mrazuvzdornosti jako u kostřavového rodiče. Jílky se v porovnání s kostřavami vyznačují nižší odolností proti abiotickým stresům (Yamada *et al.*, 2005), což bylo potvrzeno i v této práci, kdy byla nejnižší mrazuvzdornost v rámci všech 48 genotypů zaznamenána u jílku mnohokvětého.

Z výsledků byla dále zjištěna velká variabilita ve stupni mrazuvzdornosti mezi vybranými genotypy planého druhu *Festuca pratensis* subsp. *apennina*, nejvyšší míra přežití byla detekována u tetraploidních genotypů (FLCC39 a FLCC41), které pocházejí z Itálie. Za pozornost však stojí poměrně vysoká míra přežití zjištěná u některých triploidních cytotypů, které vznikly již zmíněnou mezidruhovou hybridizací mezi diploidní *Festuca pratensis* a tetraploidní *Festuca pratensis* subsp. *apennina*. Tyto plané triploidní cytotypy, převažující ve studovaných oblastech Švýcarska (Kopecký *et al.*, 2016), tak mohou být spolu s tetraploidními cytotypy využity po dalším ověření ke šlechtění nových odrůd mezirodových kříženců.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo založit fenotypovací školku na základě cytometrické a cytogenetické analýzy a provést pilotní fenotypování jednotlivých rostlin na mrazuvzdornost. Výsledky této práce dále umožní identifikovat vhodné genotypy planých druhů trav pro šlechtění nových odrůd pomocí mezidruhové hybridizace. První část práce zahrnovala cytometrickou analýzu nově získaných genotypů druhu *Festuca pratensis* subsp. *apennina* z vybraných lokalit Švýcarska a Itálie. Druhá část experimentální části byla zaměřena na cytogenetickou analýzu genomového složení tří komerčních odrůd *Festulolium* vzniklých křížením druhů *Lolium multiflorum* × *Festuca pratensis* (Hostýn, Perseus a Perun).

Na základě cytometrické analýzy byly identifikovány rostliny diploidní kostřavy luční, tetraploidní kostřavy luční italské, ale překvapivě i triploidní cytotypy. Bylo zjištěno, že ve většině švýcarských lokalit se nacházely společně na jednom místě dva nebo všechny tři cytotypy, které jsou od sebe morfologicky těžko odlišitelné zejména ve vegetativním stádiu vývoje. Obecně vzato převažovaly rostliny s triploidním genomem, v některých lokalitách se nacházeli pouze tyto jedinci. V italské oblasti Crissolo byli detekováni výhradně diploidní jedinci, oproti tomu v italském Santo Stefano d' Aveto byly zaznamenány pouze tetraploidní cytotypy.

Cytogenetická analýza tří studovaných *Festulolium* odrůd Hostýn, Perseus a Perun pomocí genomové *in situ* hybridizace odhalila vysokou frekvenci aneuploidie. U všech odrůd byl z generace na generaci pozorován posun v genomovém složení ve prospěch jílkového genomu, který dominoval nad kostřavovým. V následujících generacích po počáteční hybridizaci byl však tento posun relativně stabilizován a dále se nezvyšoval.

Pilotní fenotypování jednotlivých rostlin ve fenotypovací školce indikovalo značné rozdíly v míře mrazuvzdornosti nejen mezi jednotlivými druhy, ale rovněž v rámci druhů. Bylo zjištěno, že nejvyšší míru mrazuvzdornosti měly odrůdy kostřavy rákosovité a kostřavy luční. I přesto bylo možné identifikovat genotypy planých druhů, především kostřavy luční italské, které se vyznačovaly vysokou mírou mrazuvzdornosti. Po následném ověření stupně mrazuvzdornosti (a dalších agronomických znaků) budou tyto genotypy použity pro mezidruhové křížení s vybranými genotypy jílku.

Diplomová práce tak přispěla k rozšíření našich znalostí o struktuře a evoluci polyploidních a hybridních genomů rostlin. Vedle získaných teoretických poznatků má tato práce přínos i pro šlechtitele.

8 Seznam použitých zkratek

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
BAC	umělý bakteriální chromozom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
bp	páry bází (<i>base pairs</i>)
cM	centimorgan
cv.	odrůda (<i>cultivar</i>)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DArT	diversity array technology
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
F1	první filiální generace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (<i>fluorescent in situ hybridization</i>)
FITC	fluorescein isothiokyanát (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
Fp	kostřava luční (<i>Festuca pratensis</i>)
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 (<i>genomic in situ hybridization</i>)
GWAS	celogenomová asociační studie (<i>genome wide association study</i>)
ISH	<i>in situ</i> hybridizace (<i>in situ hybridization</i>)

kb	tisíc párů bází (<i>kilo base pairs</i>)
Lm	jílek mnohokvětý (<i>Lolium multiflorum</i>)
Lp	jílek vytrvalý (<i>Lolium perenne</i>)
MAS	selekce za pomoci markerů (<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	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</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>)
susbp.	poddruh (<i>subspecies</i>)

9 Použitá literatura

Aiken, S. G., Darbyshire, S. J. (1990): Fescue grasses of Canada. Ottawa, Canadian Government Publishing Centre.

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.

Ardenghi, N. M. G., Foggi, B. (2015): Lectotypification and combination of *Festuca apennina* (*Poaceae*). *Taxon* 64: 1038 - 1041.

Balfourier, F. (2000): Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe. A cpDNA study. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 131 - 138.

Banfi, E., Galasso, G., Foggi, B., Kopecký, D., Ardenghi, N. M. G. (2017): From *Schedonorus* and *Micropyropsis* to *Lolium* (*Loliinae*, *Poaceae*): new combinations and typifications. *Taxon*, v tisku.

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: 1133 - 1147.

Beard, J. B. (1973): Turfgrass: Science and culture. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.

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 *F. pratensis* var. *apennina* (De Not.) Hack - tetraploid. *Cytologia* 41: 219 - 236.

Brammer, S. P., Poersch, L. B., Oliveira, A. R., Vasconcelos, S., Brasileiro-Vidal, A. C. (2009): Hibridização genômica *in situ* em triticeae: Um enfoque metodológico. Passo Fundo: Embrapa Trigo.

Brammer, S. P., Zanotto, M., Caverzan, A. (2007): Citogenética vegetal: da era clássica a molecular. Passo Fundo: Embrapa Trigo.

- Brasileiro-Vidal, A. C., Guerra, M. (2002):** Citogenética Molecular em Cereais. In: Brammer, S. P., Iorczeski, E. J., (eds.): Atualização em Técnicas Celulares e Moleculares Aplicadas ao Melhoramento Genético Vegetal, pp. 277 - 298, Passo Fundo: Embrapa Trigo.
- 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 II, 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: 816 - 826.
- Canter, P. H., Pašakinskiene, I., Jones, R. N., Humphreys, M. W. (1999):** Chromosome substitutions recombination in the amphiploid *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* cv. Prior (2n = 4x = 28). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 809 - 814.
- 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: 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.
- Comai, L. (2005):** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6: 836 - 46.
- Czaban, A., Sharma, S., Byrne, S. L., Spannagl, M., Mayer, K. F. X., Asp., T. (2015):** Comparative transcriptome analysis within the *Lolium/Festuca* species complex reveals high sequence conservation. *BMC Genomics* 16: 249.
- Černoč, V., Našinec, I., Šramek, P. (2003):** Share of grassland on landscape forming in the Czech Republic. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 39: 158 - 162.

- Dierking, R., Azhaguvel, P., Kallenbach, R., Saha, M., Bouton, J., Chekhovskiy, K., Kopecký, D., Hopkins, A. (2015):** Linkage maps of a Mediterranean × Continental tall fescue (*Festuca arundinacea*) population and their comparative analysis with other *Poaceae* species. *The Plant Genome* 8. doi:10.3835/plantgenome2014.07.0032.
- Dodsworth, S., Leitch, A. R., Leitch, I. J. (2015):** Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Current Opinion in Genetics and Development* 35: 73 - 78.
- Doležel, J., Bartoš, J. (2005):** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99 - 110.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., Obermayer, R. (1998):** Plant genome size estimation by flow cytometry: interlaboratory comparison. *Annals of Botany* 82: 17 - 26.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (2007):** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233 - 2244.
- Donnison, I. S., O'Sullivan, D. M., Thomas, A., Canter, P., Moore, B., Armstead, I., Thomas, H., Edwards, K. J., King, I. P. (2005):** Construction of a *Festuca pratensis* BAC library for map-based cloning in *Festulolium* substitution lines. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 846 - 851.
- 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: 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: e103567. doi: 10.1371/journal.pone.0103567.
- Fjellheim, S., Rognli, O. A., Fosnes, K., Brochmann, C. (2006):** Phylogeographical history of the widespread meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) inferred from chloroplast DNA sequences. *Journal of Biogeography* 33: 1470 - 1478.
- Flavell, R. B. (1985):** Repeated sequences and genome change. In: Hohn, B., Dennis, E. S., (eds.): *Genetic Flux in Plants*, pp. 129 - 166, Springer Verlag, Wien, New York.

- Frame, J. (1991):** Herbage production and quality of a range of secondary grass species at five rates of fertilized nitrogen application. *Grass and Forage Science* 46: 139 - 151.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., Firoozabady, E. (1983):** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049 - 1051.
- Ghesquiere, 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, pp. 293 - 316, Springer Science + Business Media, Berlin.
- Guerra M (2004):** Hybridization *in situ*: Princípios Básicos. In: Guerra, M., (ed.): FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética, pp. 1 - 32, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto,
- Hand, M. L., Cogan, N. O., Stewart, A. V., Forster, J. W. (2010):** Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evolutionary Biology* 10: 303.
- Hanson, A. A., Juska, F. V., Burton, G. W. (1969):** Species and varieties. In: Hanson, A. A., Juska, F. V., (eds.): Turfgrass science, pp. 370 - 409, Agronomy Monograph 14. ASA, Madison, Wisconsin.
- Heller, F. O. (1973):** DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytometrie. *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437 - 441.
- Heslop-Harrison, J. S. (1991):** The molecular cytogenetics of plants. *Journal of Cell science* 100: 15 - 21.
- Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T. (2011):** Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* 66: 18 - 33.
- Hubbard, C. E. (1992):** Grasses. A guide to their structure, identification, uses, and distribution in the British Isles. Revised edition. Penguin Books.
- Hultén, E., Fries, M. (1986):** Atlas of North European vascular plants: north of the Tropic of Cancer I-III. Koeltz Scientific Books, Königstein.

Humphreys, M. W., Harper, J. A. (2008): *Festulolium loliaceum*, an understudied natural UK grass hybrid species that may provide benefits to UK grasslands with standing the on sets of climate change. *Crop Wild Relatives* 6: 7 - 9.

Humphreys, M. W., O' Donovan, S. A., Farrell, M. S., Gay, A. P., Kingston-Smith, A. H. (2014): The potential of novel *Festulolium* ($2n = 4x = 28$) hybrids as productive, nutrient-use-efficient fodder for ruminants. *Food and Energy Security* 3: 98 - 110.

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

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

Humphreys, M. W., Yadav, R. S., Cairns, A. J., Turner, L. B., Humphreys, J., Skøt, L. (2006): A changing climate for grassland research. *New Phytologist* 169: 9 - 26.

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, pp. 211 - 260, Springer Science + Business Media, Berlin.

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

Church, G. L. (1929): Meiotic phenomena in certain *Graminiae*. I. *Festuceae, Aveneae, Agrostidaceae, Chlorideae* and *Phalarideae*. *Botanical Gazette* 87: 608 - 629.

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* No. 18. Springer-Verlag, Berlin.

Jenkin T. J. (1959): Fescue species (*Festuca* L.). In: *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, 2. auflage, pp. 418 - 434, Band IV. Paul Parey in Berlin und Hamburg.

Jenkin, T. J. (1933): Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses. Initial crosses. *Journal of Genetics* 28: 205 - 264.

Kellog, E. A. (2001): Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125: 1198 - 1205.

Kopecný, D., Bartoš, J., Lukaszewski, A. J., Baird, J. H., Černoč, V., Kölliker, R., Rognli, 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: 473.

Kopecný, 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: 170 - 178.

Kopecný, D., Harper, J., Bartoš, J., Gasió, 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.

Kopecný, D., Havránková, M., Loureiro, J., Castro, S., Lukaszewski, A. J., Bartoš, J., Kopecná, J., Doležel, J. (2010): Physical distribution of homoeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 162 - 172.

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

Kopecný, D., Lukaszewski, A. J., Doležel, J. (2005): Genomic constitution of *Festulolium* cultivars released in the Czech Republic. *Plant Breeding* 124: 454 - 458.

Kopecný, D., Lukaszewski, A. J., Doležel, J. (2008): Cytogenetics of *Festulolium* (*Festuca* × *Lolium* hybrids). *Cytogenetic and Genome Research* 120: 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: 1323 - 1337.
- Kopecký, D., Šimoníková, D., Ghesquiere, M., Doležel, J. (2017):** Stability of genome composition and recombination between homoeologous chromosomes in *Festulolium* (*Festuca* × *Lolium*) cultivars. *Cytogenetic and Genome Research*. doi: 10.1159/000458746.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Mosgöller, W., Bennett, M. D., Heslop-Harrison, J. S. (1991):** Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma* 101: 206 - 213.
- 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.
- Lewis, E. J., Tyler, B. F., Chorlton, K. H. (1973):** Development of *Lolium-Festuca* hybrids, pp. 34 - 37, Report Welsh Breeding Station for 1972.
- Löve, A., Löve, D. (1948):** Chromosome numbers of northern plant species. Reykjavik.
- Lübberstedt, T., Andreasen, S. B., Holm, B. P. (2003):** Development of ryegrass allele-specific (GRASP) markers for sustainable grassland improvement - a new EU framework V project. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 39: 125 - 128.
- Madlung, A. (2013):** Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* 110: 99 - 104.
- Malik, C. P., Thomas, P. T. (1966):** Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species, *Caryologia* 19: 167 - 196.
- Mason, A. S., Pires, J. C. (2015):** Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends in Genetics* 31: 5 - 10.

- 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: 349 - 357.
- Mirsky, A. E., Ris, H. (1951):** The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *Journal of General Physiology* 34: 451 - 462.
- Morgan, W. G., Thomas, H., Lewis, E. J. (1988):** Cytogenetic studies of hybrids between *Festuca gigantea* Vill. and *Lolium multiflorum* Lam. *Plant Breeding* 101: 335 - 343.
- Pardue, M. L., Gall, J. G. (1969):** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 64: 600 - 604.
- Parokony, A. S., Marshall, J. A., Bennett, M. D., Cocking, E. C., Davey, M. R., Brian Power, J. (1997):** Homoeologous pairing and recombination in backcross derivatives of tomato somatic hybrids [*Lycopersicon esculentum* (+) *L. peruvianum*]. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 713 - 723.
- Pfeifer, M., Martis, M., Asp, T., Mayer, K. F., Lubberstedt, T., Byrne, S., Frei, U., Studer, B. (2013):** The perennial ryegrass GenomeZipper: targeted use of genome resources for comparative grass genomics. *Plant Physiology* 161: 571 - 582.
- 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: 873 - 881.
- Renny-Byfield, S., Wendel, J. F. (2014):** Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany* 101: 1711 - 1725.
- Robson, M. (1967):** A comparison of British and North African varieties of tall fescue (*Festuca arundinacea*). I. Leaf growth during winter; effects of temperature and day length. *Journal of Applied Ecology* 4: 475 - 484.
- 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, pp. 261 - 292, Springer Science + Business Media, Berlin.

- Ruemmele, B. A., Brilman, L. A., Huff, D. R. (1995):** Fine fescue germplasm diversity and vulnerability. *Crop Science* 35: 313 - 316.
- Ruttink, T., Sterck, L., Rohde, A., Bendixen, C., Rouzé, P., Asp, T., Van de Peer, Y., Roldan-Ruiz, I. (2013):** Orthology guided assembly in highly heterozygous crops: creating a reference transcriptome to uncover genetic diversity in *Lolium perenne*. *Plant Biotechnology Journal* 11: 605 - 617.
- Sampoux, J. P., Huyghe, C. (2009):** Contribution of ploidy level variation and adaptive trait diversity to the environmental distribution of taxa in the 'fine-leaved' lineage (genus *Festuca* subg. *Festuca*). *Journal of Biogeography* 36: 1978 - 1993.
- Sears, E. R., Okamoto, M. (1958):** Intergenomic chromosome relationships in hexaploidy wheat. *Proceedings of the 10th International Congress of Genetics, Montreal* 2: 258 - 259.
- Schumer, M., Rosenthal, G. G., Andolfatto, P. (2014):** How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution* 68: 1553 - 1560.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000):** Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Silva, G. S., Souza, M. M. (2013):** Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research* 12: 2953 - 2965.
- Sleper, D. A., Buckner R. C. (1995):** The fescues, In: Barnes, R. F., Miller, D. A., Nelson, C. J., Health, M. E., (eds.): *Forages*, pp. 345 - 356, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. (1993):** Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12: 243 - 273.
- Soltis, P. S., Marchant, D. B., Van de Peer, Y., Soltis, D. E. (2015):** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics and Development* 35: 119 - 125.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2000):** The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7051 - 7057.

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

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*, pp. 199 - 210, CRC Press, London.

Stočes, 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. doi: 10.3835/plantgenome2016.02.0017.

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

Swift, H. (1950): The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 36: 643 - 654.

Symko, S. (1969): Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) × *Hordeum vulgare* (2x). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 11: 602 - 608.

Thomas, C. A. (1971): The genetic organisation of chromosomes. *Annual Review of Genetics* 5: 237 - 256.

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

Thomas, H., Humphreys, M. O. (1991): Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *Journal of Agricultural Science* 117: 1 - 8.

- Tyler, B. F., Borrill, H., Chorlton, K. H. (1978):** Studies in *Festuca pratensis* and tetraploid *F. pratensis* var. *apennina* in relation to their altitudinal distribution. *Journal of Applied Ecology* 15: 219 - 226.
- Wang, Y., Zhi, H., Li, W., Li, H., Wang, Y., Huang, Z., Diao, X. (2009):** A novel genome of C and the first autotetraploid species in the *Setaria* genus identified by genomic *in situ* hybridization. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 843 - 850.
- Wendel, J. F. (2000):** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225 - 249.
- Xu, W. W., Sleper, D. A., Hoisington, D. A. (1991):** A survey of restriction fragment length polymorphisms in tall fescue and its relatives. *Genome* 34: 686 - 692.
- Yamada, T., Forster, J. W., Humphreys, M. W., Takamizo, T. (2005):** Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca* grass species complex. *Grassland Science* 51: 89 - 106.
- Zwierzykowski, Z., Kosmala, A., Zwierzykowska, E., Jones, N., Joks, W., Bocianowski, J. (2006):** Genome balance in six successive generations on the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne*. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 539 - 547.
- Zwierzykowski, Z., Ksiazczyk, 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* × *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., Tayyar, R., Brunell, M., Lukaszewski, A. J. (1998):** Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *Journal of Heredity* 89: 324 - 328.
- Zwierzykowski, Z., Zwierzykowska E., Taciak, M., Jones, N., Kosmala, A., Krajewski, P. (2008):** Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Research* 16: 575 - 585.

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

10 Přílohy

Příloha 1:

Kopecký, D., Harper, J., Bartoš, J., Gasió, 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.

Příloha 2:

Kopecký, D., Šimoníková, D., Ghesquiere, M., Doležel, J. (2017): Stability of genome composition and recombination between homoeologous chromosomes in *Festulolium* (*Festuca* × *Lolium*) cultivars. *Cytogenetic and Genome Research*. doi: 10.1159/000458746.