

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Veronika Zoulová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Malování chromozomů u rostlin

Bakalářská práce

Veronika Zoulová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Denisa Šimoníková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika ZOULOVÁ**
Osobní číslo: **R19866**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Malování chromozomů u rostlin**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše zabývající se malováním chromozomů u rostlin, jeho vývoj a možné aplikace.
2. Příprava preparátů mitotických chromozomů a fluorescenčně značených sond, fluorescenční in situ hybridizace, mikroskopování.
3. Vyhodnocení získaných dat a sepsání experimentální části bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Čížková, J.; Hřibová, E.; Humplíková, L.; Christelová, P.; Suchánková, P.; Doležel, J. Molecular analysis and genomic organization of major DNA satellites in banana (*Musa spp.*). *PLoS One* 2013, 8, e54808.

Han, Y.; Zhang, T.; Thammapichai, P.; Weng, Y.; Jiang, J. Chromosome-specific painting in *Cucumis* species using bulked oligonucleotides. *Genetics* 2015, 200, 771–779.

Jiang, J. Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Res.* 2019, 27, 153–165.

Šimoníková, D.; Němečková, A.; Karafiátová, M.; Uwimana, B.; Swennen, R.; Doležel, J.; Hřibová, E. Chromosome painting facilitates anchoring reference genome sequence to chromosomes in situ and integrated karyotyping in banana (*Musa spp.*). *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 1503.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Denisa Šimoníková

Katedra buněčné biologie a genetiky

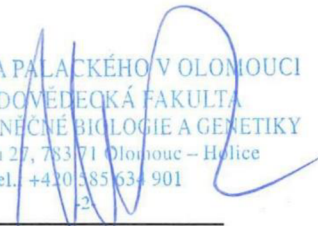
Datum zadání bakalářské práce: 23. února 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel. +420 585 634 901



Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Veronika Zoulová
Název práce	Malování chromozomů u rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Denisa Šimoníková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zabývá analýzou mezidruhových klonů banánovníku (*Musa* spp.), které vznikly přirozeným křížením mezi planě rostoucími druhy *Musa acuminata* a *Musa textilis*, s využitím cytogenetických a molekulárních metod. Teoretická část bakalářské práce pojednává o metodách studia malování chromozomů u rostlin, jejich vývoji a možných aplikacích s důrazem na banánovník (*Musa* spp.). Dále je popsáno taxonomické zařazení, původ jedlých typů banánovníku a cytogenetická charakterizace genomu banánovníku. Experimentální část byla zaměřena na cytogenetické mapování fluorescenčních sond specifických pro A genom (*Musa acuminata*) banánovníku a 5S rDNA na preparátech metafázních mitotických chromozomů tří mezidruhových A×T klonů banánovníku s využitím fluorescenční *in situ* hybridizace. Na základě provedené fluorescenční *in situ* hybridizace s použitím sond Radka 5 a Radka 6, které jsou specifické pro A genom banánovníku, se podařilo odlišit chromozomy pocházející z *Musa acuminata* (A genom) a *Musa textilis* (T genom). Rovněž byly identifikovány chromozomy, které nesou lokusy pro 5S rDNA. Druhá část byla zaměřena na analýzu repetitivních sekvencí specifických pro T genom (*Musa textilis*) ze sekce Australimusa pomocí Sangerova sekvenování a následné bioinformatické analýzy. Na základě vyhodnocených bioinformatických dat byla úspěšně sestavena a cytogeneticky zamapována repetece CL 33/3 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace u triploidního mezidruhového A×T klonu.

Klíčová slova	Malování chromozomů, fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace, banánovník (<i>Musa</i> spp.), 5S rDNA, umělý bakteriální chromozom, repetitivní sekvence
Počet stran	54 + x
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Veronika Zoulová
Title VIGS	Chromosome painting in plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Denisa Šimoníková, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

The presented bachelor thesis deals with the analysis of interspecific clones of banana (*Musa* spp.), which originated after natural crossing between wild species *Musa acuminata* and *Musa textilis*, using cytogenetic and molecular methods. The theoretical part of the bachelor thesis deals with chromosome painting in plants, their development and possible applications, especially on banana (*Musa* spp.). The taxonomic classification, origin of edible banana clones and cytogenetic characterization of the banana genome is described in the second part. The experimental part was focused on cytogenetic mapping of fluorescent probes specific for A genome (*Musa acuminata*) and 5S rDNA on metaphase mitotic chromosome preparations of three interspecific A×T banana clones using fluorescence *in situ* hybridization. Chromosomes derived from *Musa acuminata* (A genome) and *Musa textilis* (T genome) were distinguished by fluorescence *in situ* hybridization using Radka 5 and Radka 6 probes, which are specific for the A genome of the banana. Chromosomes carrying loci for 5S rDNA have been also identified. Molecular characterization was focused on the analysis of repetitive sequences specific for T genome (*Musa textilis*) from the Australimusa section using Sanger sequencing and subsequent bioinformatics analysis. Based on the evaluated bioinformatics data, the CL 33/3 repeat was successfully assembled and cytogenetically mapped using fluorescence *in situ* hybridization on a triploid interspecies A × T clone.

Keywords	Chromosome painting, fluorescent <i>in situ</i> hybridization, <i>Musa</i> spp., 5S rDNA, bacterial artificial chromosome, repeated sequence
Number of pages	54 + x
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Denisy Šimoníkové, Ph.D. a za použití citované literatury

V Olomouci dne:

.....

Veronika Zoulová

Touto cestou bych chtěla poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Denise Šimoníkové, Ph.D. za svůj vstřícný přístup, cenné rady, ochotu a čas, který mi při vypracování této práce věnovala. Dále děkuji Mgr. Evě Hříbové, PhD., která mě ochotně vedla problematikou sekvenování a analýzou bioinformatických dat. V neposlední řadě děkuji pracovnímu kolektivu Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za jejich ochotný přístup a příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Metody studia chromozomů u rostlin.....	3
3.1.1	Pruhování chromozomů.....	3
3.1.2	<i>In situ</i> hybridizace (ISH)	3
3.1.3	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	4
3.1.3.1	Využití repetitivních DNA sekvencí jako sond pro FISH u rostlin.....	5
3.1.3.2	Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH) u rostlin.....	6
3.1.3.3	Jednokopiové BAC klony jako sondy pro FISH.....	7
3.1.3.4	Oligo painting u rostlin.....	8
3.2	Malování chromozomů u čeledi banánovníkovité (<i>Musaceae</i>).....	9
3.2.1	Taxonomie čeledi <i>Musaceae</i>	9
3.2.2	Původ jedlých typů banánovníku	9
3.2.3	Cytogenetická charakteristika banánovníku.....	10
3.2.4	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace u banánovníku.....	11
3.2.4.1	Geny pro ribozomální rRNA	11
3.2.4.2	Repetitivní DNA sekvence - retrotranspozóny, satelity	13
3.2.4.3	Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH)	14
3.2.4.4	Jednokopiové BAC (bacterial artificial chromosome) klony	15
3.2.4.5	Oligo painting FISH	15
4	MATERIÁL A METODY	17
4.1	Biologický materiál	17
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	18
4.2.1	Použité chemikálie.....	18
4.2.2	Použité soupravy	19
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava.....	19
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21

4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.4.1	Odebírání kořínků a jejich fixace	22
4.4.2	Příprava nakapávaných preparátů metafázních chromozomů	22
4.4.2.1	Postfixace preparátů metafázních chromozomů.....	23
4.4.3	Příprava značených sond Radka sekvencí.....	23
4.4.3.1	Příprava sondy pro lokus 45S rDNA.....	23
4.4.3.2	Příprava sondy specifické pro lokus 5S rDNA.....	24
4.4.3.3	Příprava sondy Radka 5 a Radky 6.....	26
4.4.4	Příprava nových sond specifických pro genom banánovníků ze sekce Australimusa... 27	
4.4.4.1	Isolace a stanovení koncentrace genomové DNA	27
4.4.4.2	PCR amplifikace nových tandemových repetití identifikovaných v genomu zástupců sekce Australimusa.....	28
4.4.4.3	Přečištění PCR produktů a sekvenování.....	29
4.4.4.4	Bioinformatická analýza sekvenačních dat	30
4.4.4.5	Příprava sond specifických pro genom banánovníků ze sekce Australimusa	30
4.4.5	Přečištění fluorescenčních sond	31
4.4.6	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace a fluorescenční mikroskopie	32
5	VÝSLEDKY	34
5.1	Cytogenetická lokalizace repetitivních sekvencí specifických pro A genom banánovníku a 5S rDNA na metafázních chromozomech A×T hybridních klonů banánovníku.....	34
5.2	Analýza variability repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku	39
6	DISKUSE	43
7	ZÁVĚR.....	45
8	LITERATURA	46

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

BAC	Umělý bakteriální chromozom (bacterial artificial chromosome)
Bp	Pár bází (base pair)
CCD	Charged Coupled Device
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleotide acid)
dNTP	Deoxyribonukleotid trifosfát (deoxyribonucleotide triphosphate)
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
FITC	Fluorescein isothiokyanát
GISH	Genomická <i>in situ</i> hybridizace (genomic <i>in situ</i> hybridization)
IGS	Mezigenový mezerík (intergenetic spacer)
ITC	International Transit Centre
ITS	Vnitřní transkribovaný mezerík (internal transcribed spacer)
Kb	Kilobáze (kilobase)
NOR	Organizátor jadérka (nucleolar organizing region)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
rDNA	Ribozomální DNA (ribosomal DNA)
RNA	Ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rRNA	Ribozomální RNA (ribosomal RNA)
SSC	Citronan sodný dihydrát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	5
Obrázek 2: Jednotka 45S rDNA se skládá z genů pro 18S, 5.8S a 25S rRNA. Geny jsou navzájem odděleny vnitřními transkribovanými mezerníky (ITS1 a ITS2). 45S rDNA jednotky jsou od sebe odděleny dlouhým intergenovým mezerníkem (IGS)	6
Obrázek 3: Fotografie mitotických metafázních chromozomů <i>Musa</i>	12
Obrázek 4: Idiogram tří diploidních druhů <i>Musa</i> náležících do sekce Eumusa	16
Obrázek 5: Cytogenetické mapování sond Radka 5 a Radka 6 specifických pro A genom banánovníku na mitotických metafázních chromozomech A×T hybridních klonů.	36
Obrázek 6: Cytogenetické mapování sondy Radka 5 nebo Radka 6 specifických pro A genom banánovníku a sondy Radka 2 specifické pro 5S rRNA geny na mitotických metafázních chromozomech A×T hybridních klonů.....	38
Obrázek 7: Příklad mnohočetného přiřazení pro repetitivní sekvenci Fei 72 provedený pomocí MUSCLE v programovém balíku Seaview v5.0.5.....	40
Obrázek 8: Elektroforetická analýza PCR produktů získaných amplifikací vybraných vzorků izolované genomové DNA s osmi primery navrženými pro tandemově organizované repetitivní sekvence identifikované z Illumina sekvenačních dat zástupců sekce Australimusa. PCR produktu byly nanášeny v množství 1 µl.....	41
Obrázek 9: Cytogenetické mapování sondy CL 33/3 – repetitivní sekvence specifické pro T genom banánovníku na mitotických metafázních chromozomech A×T hybridního klonu ITC 1213 (2n = 3x = 32, genotyp AAT).	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam analyzovaných genotypů banánovníku	17
Tabulka 2: Rozpis PCR reakční směsi pro přípravu sondy specifické pro lokus 45S rDNA o celkovém objemu reakce 20 µl	24
Tabulka 3: Teplotní a časový profil PCR reakce pro přípravu sondy specifické pro lokus 45S rDNA	24
Tabulka 4: Rozpis PCR reakční směsi pro amplifikaci <i>Radka2</i> DNA klonu s T3 a T7 primery o celkovém objemu reakce 10 µl.....	25
Tabulka 5: Teplotní a časový profil PCR reakce pro amplifikaci <i>Radka2</i> DNA klonu.....	25
Tabulka 6: Rozpis PCR reakční směsi pro fluorescenční značení lokusu 5S rDNA o celkovém objemu reakce 50 µl	26
Tabulka 7: Rozpis PCR reakční směsi pro přípravu sond Radka 5 a Radka 6 o celkovém objemu reakce 20 µl.....	26
Tabulka 8: Seznam použitých primerů specifických pro genom sekce <i>Australimusa</i>	28
Tabulka 9: Reakční směs pro PCR amplifikaci úseků specifických pro <i>Australimusa</i> o celkovém objemu reakce 20 µl	28
Tabulka 10: Přečištění PCR produktu o celkovém objemu reakce 7 µl.....	29
Tabulka 11: Reakční směs pro sekvenační reakci o celkovém objemu reakce 10 µl	29
Tabulka 12: Teplotní a časový profil sekvenační reakce	30
Tabulka 13: Rozpis PCR reakční směsi pro amplifikaci genomové DNA položky ITC1716 s primery specifickými pro <i>Australimusa</i> o celkovém objemu reakce 20 µl.....	30
Tabulka 14: Teplotní a časový profil PCR reakce pro amplifikaci DNA – ITC1716 s primery specifickými pro <i>Australimusa</i>	31
Tabulka 15: Rozpis jedné PCR reakční směsi o objemu 20 µl pro značení sondy specifické pro <i>Australimusa</i>	31
Tabulka 16: Rozpis hybridizační směsi pro celkový objem 30 µl a stringenci 77 %	32

Tabulka 17: Teplotní a časový profil promývání preparátů po hybridizaci pomocí SSC o různých koncentracích.....	32
Tabulka 18: Genotypy analyzovaných položek banánovníků pomocí FISH.....	37
Tabulka 19: PCR amplifikace repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku	40
Tabulka 20: Variabilita repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku.....	40

1 ÚVOD

Malování chromozomů je metoda umožňující vizualizaci chromozomálních úseků nebo celých chromozomů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace a lze ji tak využít k identifikaci jednotlivých chromozomů v karyotypu. K identifikaci jednotlivých chromozomů napomáhají i různé druhy chromozomově specifických sond, kam patří sondy pro ribozomální geny, satelity nebo transpozóny. K malování chromozomů u rostlin lze využít chromozomově specifických BAC klonů, kdy je možné izolovat a poté fluorescenčně naznačit BAC klony jdoucí kontinuálně za sebou a pokrýt tak ramena vybraných chromozomů. Tato metoda je však pracná a lze ji provést jen u druhů s nízkým počtem repetitivních sekvencí v genomu. Alternativou je relativně nová metoda zvaná oligo painting FISH, která je založena na *in silico* identifikaci velkého množství krátkých, chromozomově specifických oligomerů. Následuje syntéza a fluorescenční značení identifikovaných oligonukleotidů, které jsou využívány jako sondy pro FISH analýzu. Metodu lze aplikovat na velké spektrum rostlinných druhů včetně banánovníku (*Musa* spp.).

Banánovník (*Musa* spp.) je jednoděložná bylina, jejíž původ je v jihovýchodní Asii. Jedná se o hospodářsky významnou rostlinu, jelikož se její plody vyvážejí do celého světa. Banánovník je náchylný na nejrozličnější patogeny, neboť se jedlé kultivary rozmnožují výhradně vegetativně a vznikají tak bezsemenné a sterilní rostliny. Řešením je šlechtění nových kultivarů odolným vůči nemocem, k čemuž je nutné znalost struktury genomu banánovníku a objasnění jeho původu. Fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím nejrozličnějších sond jsou v tomto směru velmi užitečné. Předložená bakalářská práce využívá metody FISH ke studiu struktury genomu *Musa* spp., přičemž analýza byla zaměřena na mezidruhové klony banánovníku vzniklé přirozeným křížením mezi planě rostoucími diploidními druhy *Musa acuminata* a *Musa textilis*.

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literárního přehledu o metodách studia malování chromozomů u rostlin, jejich vývoji a možných aplikacích s důrazem na banánovník (*Musa* spp.). Dále je popsáno taxonomické zařazení, původ jedlých typů banánovníku a cytogenetická charakterizace genomu banánovníku.
- 2) Příprava preparátů mitotických metafázních chromozomů a fluorescenčně značených sond.
- 4) Analýza genomového složení vybraných mezidruhových klonů banánovníku vzniklých přirozeným křížením mezi planě rostoucími druhy *M. acuminata* a *M. textilis* metodou fluorescenční *in situ* hybridizace.
- 5) Analýza variability repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku pomocí Sangerova sekvenování a následné bioinformatické analýzy.
- 6) Vyhodnocení získaných dat a sepsání experimentální části bakalářské práce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Metody studia chromozomů u rostlin

3.1.1 Pruhování chromozomů

Pruhování chromozomů je metoda umožňující rozlišit jednotlivé chromozomy v rámci karyotypu dané rostliny. Každý chromozom v karyotypu vykazuje charakteristické pruhy, které tvoří vysoce kondenzovaný heterochromatin. Heterochromatin je kvůli své vysoké kondenzaci snadno barvitelný a obsahuje transkripčně neaktivní oblasti. Zbylé slabě obarvené úseky jsou tvořeny rozvolněným euchromatinem, který je transkripčně aktivní. Kromě identifikace jednotlivých chromozomů metoda umožňuje sledovat také translokace nebo delecce (Bickmore, 2001).

První objevenou pruhovací technikou je Q-pruhování. Tato metoda využívá fluorescenčního barviva chinakrinu, které patří mezi AT-specifické fluorochromy. Vzniklé tmavé pruhy odpovídají oblastem vysoce kondenzovaného heterochromatinu. Vizualizace se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu. Při G-pruhování jsou chromozomy vystaveny působení trypsinu, který odstraňuje některé proteiny asociované s chromozomy. Následuje aplikace Giemsova barviva. Tmavé pruhy tvoří vysoce kondenzovaný heterochromatin, stejně jako u Q-pruhování. Další technikou je R-pruhování, kde aplikaci Giemsova barviva předchází inkubace preparátu v horkých roztocích pufrů. Výsledkem je barvení genově bohatých úseků chromatinu, tedy euchromatinu. Jedná se o opak G-pruhování a Q-pruhování. C-pruhování slouží k vizualizaci repetitivních oblastí, především centromery a telomery. Provádí se inkubací preparátu v roztoku hydroxidu barnatého s následným barvením pomocí Giemsova barviva (Moore *et Best*, 2001; Snustad *et al.*, 2017).

Pruhovací techniky umožňují odhalit pouze velké chromozomové přestavby (Lee *et al.*, 2001). U rostlin je metoda užitečná pouze u druhů s velkým podílem repetitivních sekvencí a s velkými genomy, jako je rýže a pšenice (Gill *et Kimber*, 1977).

3.1.2 *In situ* hybridizace (ISH)

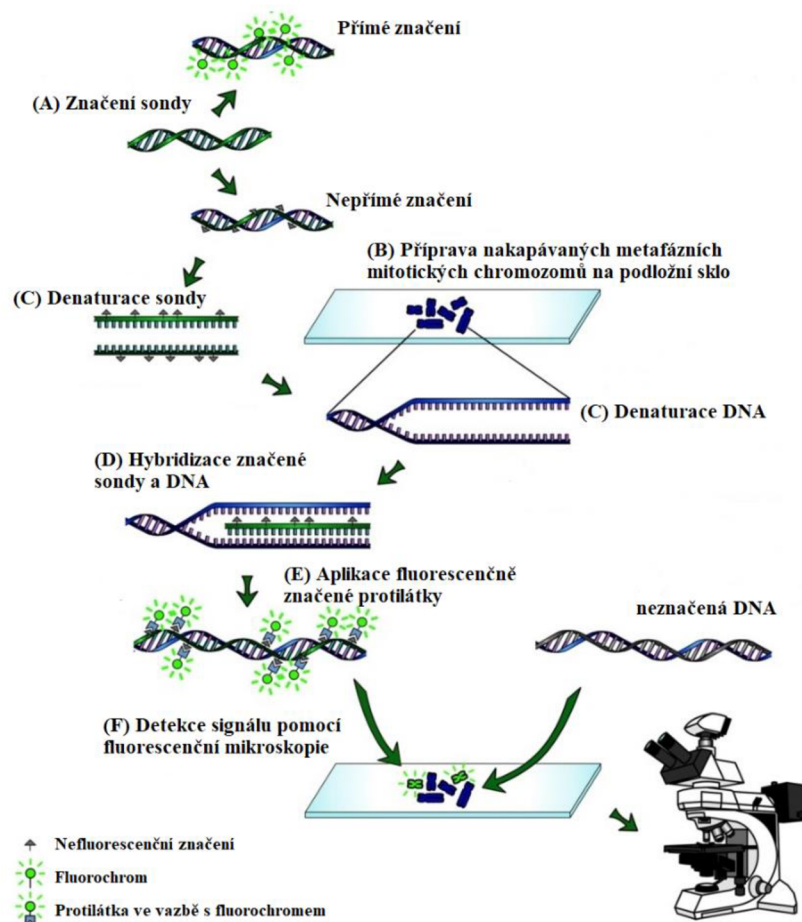
In situ hybridizace (ISH) je metoda využívající DNA sondy specifické k určité oblasti genomu. Nejprve dochází k denaturaci značené sondy s komplementárním úsekem DNA. Po denaturaci je sonda hybridizována s úsekem DNA, který vykazuje vysokou homologii. Dále je navázaná sonda detekována (viz níže). Nasedání a denaturace dvouvláknových úseků je ovlivněna mnoha faktory, jakým je teplota, koncentrace solí, pH, vlastnosti sondy a cílové molekuly (DNA). Jsou známy dva typy značení sond a tím je radioaktivní a neradioaktivní značení (Jin *et Lloyd*, 1997).

Radioaktivní (izotopové) značení sond využívá nejčastěji ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P a v také ^{33}P . Vizualizace je u takto značených sond rentgenovým filmem nebo autoradiografickou emulzí (Wilcox, 1994). Dnes je radioaktivní značení často nahrazeno značením využívající neradioaktivní látky (Jin *et* Lloyd, 1997).

Neradioaktivní (neizotopové) značení je v dnešní době hojně využíváné. K nejběžnějším neradioaktivním značením se využívá biotin, digoxigenin, fluorescein, alkalická fosfatáza nebo bromdeoxyuridin (BrdU). Nejprve byly využívány sondy značené molekulou biotinu. Při přípravě sondy dochází k inkorporaci biotinylovaného dUTP. Hybridizační signály s biotinylovanými sondami lze detekovat přidáním avidinu nebo streptavidinu konjugovaného s alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou nebo částicemi koloidního zlata (Rayburn *et* Gill, 1985). Později se začaly sondy značit také digoxigeninem, jehož signály lze vizualizovat pomocí antidigoxigeninové protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou nebo křenovou peroxidázou. ISH nukleových kyselin byla poprvé popsána v roce 1969 (Gall *et* Pardue, 1969). Od té doby bylo vyvinuto mnoho variant, mezi které se řadí také fluorescenční *in situ* hybridizace (Wilkinson, 1993; Egger *et al.*, 1994; Wilcox, 1993).

3.1.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je v cytogenetice a molekulární genetice velmi oblíbenou metodou. Metoda nabízí výrazné zrychlení a zjednodušení procesu hybridizace. Principem fluorescenční *in situ* hybridizace je navázání specifického úseku DNA s fluorescenčně značenou sondou, která je komplementární k danému úseku DNA. Navázání, tzv. hybridizaci, předchází krátká denaturace vláken DNA a sondy (obrázek 1). Následná inkubace ve vlhkém prostředí při teplotě 37 °C umožní specifické hybridizaci sondy s komplementárním úsekem DNA.



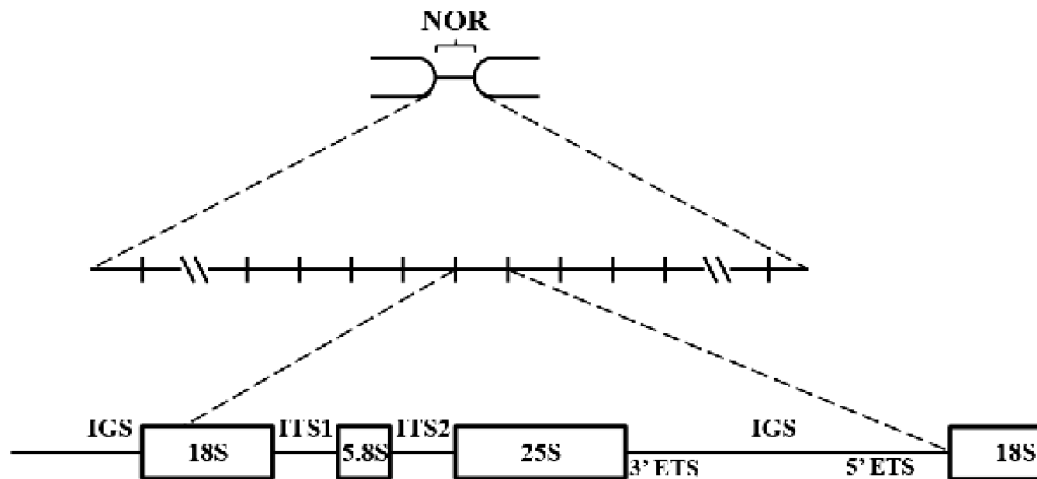
Obrázek 1: Schéma fluorescenční *in situ* hybridizace (Převzato s úpravami z Brammer *et al.*, 2013)

Značení pomocí fluorescenčních sond je dosaženo kovalentní vazbou s fluorochromem (Gall *et al.*, 1969). Excitační a emisní vlnové délky fluorochromů jsou různé, což umožňuje použití několika sond najednou (Nederlof *et al.*, 1989). Sonden jsou přímo značeny fluorochromy, jako je například fluorescein, nebo značeny nepřímo hapteny – biotinem/digoxigeninem a následně detekovány přidáním avidinu nebo streptavidinu spřaženého s fluorochromem. Signály jsou detekovány fluorescenčním mikroskopem. Metoda umožňuje zachycení fluorescenčních signálů pomocí speciálních CCD kamer a následnou analýzu digitálními zobrazovacími systémy (Wilkinson, 1993; Gray *et al.*, 1994).

3.1.3.1 Využití repetitivních DNA sekvencí jako sond pro FISH u rostlin

Jako sondu pro FISH je možné využít několik různých typů sekvencí. Běžně jsou využívány tandemově se opakující sekvence ribosomálních genů (rRNA). 5S a 45S rDNA byly úspěšně mapovány u mnoha rostlin jako pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmen (*Hordeum vulgare*) (Mukai *et al.*, 1990; Leitch *et al.*, 1992). Jedná se o vysoce konzervované geny vyskytující se u všech eukaryot (Appels *et al.*, 1980). Geny pro ribosomální RNA jsou v genomu uspořádány tandemově, čítající 250 až 22 000 kopií (Rogers *et al.*, 1987).

Ribosomální DNA se soustřeďuje ve dvou lokusech, kterými jsou 5S a 45S rDNA. Jednotka 45S rDNA rostlin se skládá z genů pro 18S, 5.8S a 26S rRNA. Jak je patrné z obrázku 2 níže, tyto geny jsou navzájem odděleny vnitřními transkribovanými mezerníky (ITS). Jednotlivé 45S rDNA jednotky jsou potom odděleny dlouhým intergenovým mezerníkem (IGS) (Hřibová *et al.*, 2010).



Obrázek 2: Jednotka 45S rDNA se skládá z genů pro 18S, 5.8S a 25S rRNA. Geny jsou navzájem odděleny vnitřními transkribovanými mezerníky (ITS1 a ITS2). 45S rDNA jednotky jsou od sebe odděleny dlouhým intergenovým mezerníkem (IGS) (Převzato s úpravami: Rodrigues *et al.*, 2017).

Repetitivní DNA je členěna podle její organizace v genomu na rozptýlenou nebo tandemově organizovanou. Rozptýlené sekvence jsou tvořeny především satelity, mobilními elementy a transpozóny. Rozptýlené i tandemové repetice jsou taktéž oblíbenými sondami pro FISH, jelikož poskytují chromozomově nebo druhově specifický signál (Jiang *et Gill* 1994). Byly úspěšně použity při studiu kukuřice, kostřavy nebo pšenice (Koo *et al.*, 2016; Křivánková *et al.*, 2017; Ruban *et Badaeva*, 2018).

3.1.3.2 Genomová *in situ* hybridizace (GISH) u rostlin

Genomová *in situ* hybridizace (GISH) je metoda využívající genomovou DNA jednoho z rodičů jako sondu, čímž umožňuje odlišit rodičovské chromozomy u mezidruhových hybridů. Hybridizace značené genomové sondy je způsobena přítomností genomově specifických repetitivních sekvencí DNA. Jsou-li dva genomy blízké příbuzné a sdílejí většinu repetitivních sekvencí DNA, pak se odlišení těchto genomů stává obtížné (Durnam *et al.*, 1985; Pinkel *et al.*, 1986).

Pomocí GISH se podařilo odlišit genomy ječmene (*Hordeum vulgare* a *Hordeum bulbosum*), ovsu a dalších rostlinných druhů (Ananthawat-Jonsson *et al.* 1993; Jellen *et al.*, 1994). Dále je GISH úspěšně

využívána v analýze chromozomové struktury alopolyploidních druhů. Poskytuje důležité informace o evoluci genomu a vzniku alopolyploidních druhů (Jiang *et al.* 1994a). GISH lze využít ve studiu párování homoeologních chromozomů (King *et al.*, 1993).

Chromozomální přestavby byly s využitím GISH objeveny u kříženců tabáku (*Nicotiana tabacum*) nebo ovsa (rod *Avena*) (Kenton *et al.*, 1993; Jellen *et al.*, 1994). Druhově specifická chromozomální translokace byla pozorována u *Triticum timopheevii*, *Triticum turgidum* a *Triticum aestivum* (Naranjo *et al.*, 1987; Jiang *et al.* 1994a).

3.1.3.3 Jednokopiové BAC klony jako sondy pro FISH

Jednou z možností identifikace jednotlivých chromozomů je využití jednokopiových fragmentů DNA klonovaných ve vektoru BAC (bacterial artificial chromosome), které jsou následně použity jako sondy pro FISH (Hanson *et al.*, 1995). BAC knihovny pro určitý druh se skládají z DNA klonů nesoucích inzerty o velikostech 70 – 200 kb (Vilarinhos *et al.*, 2002). Na rostlinných mitotických chromozomech lze detekovat signály o minimální velikosti 10 kb (Valárik *et al.*, 2004). BAC FISH byla úspěšně aplikována na rostliny s malými genomy. Tyto rostliny obsahovaly pouze malý podíl repetitivních sekvencí. Výsledky byly zaznamenány u čiroku, rýže, bavlny, pšenice, rajčat a brambor (Woo *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

Lysák *et al.* (2001) využil chromozomově specifických BAC (Bacterial Artificial Chromosome) klonů u *Arabidopsis thaliana* pro malování jednotlivých chromozomů, tzv. BAC FISH metoda. Sestavením velkého množství BAC klonů jdoucích kontinuálně za sebou se podařilo pokrýt celé rameno chromozomu. Po izolaci a fluorescenčnímu označení těchto klonů byla poté získána sonda pokrývající celé chromozomální rameno. Nicméně funkčnost této metody je podmíněna malým podílem repetitivní DNA v genomu. Je tedy vhodná především pro druhy s malými genomy, které jsou z velké části tvořeny euchromatinem. Kromě *Arabidopsis* byly BAC klony úspěšně použity pro malování chromozomů u *Brachypodium distachyon* (Idziak *et al.*, 2014).

Jako sondu je možné využít také jednokopiové nebo nízkokopiové geny. Mezi studie, které se věnovaly mapování jednokopiových sekvencí, patří T-DNA v *Crepis capillaris*, gen pro legumin v hrachu (*Pisum sativum*) nebo gen P-tubulinu ve vojtěšce (Ambros *et al.*, 1986; Simpson *et al.*, 1988; Schaff *et al.*, 1990).

3.1.3.4 Oligo painting u rostlin

Metoda malování (painting) chromozomů využívá sondy, které jsou vytvořeny ze sekvence celého chromozomu. Chromozomy pro tvorbu sond jsou získány tříděním průtokovou cytometrií nebo mikrodisekcí (Pinkel *et al.*, 1988). Umožňuje identifikovat velké úseky nebo celé chromozomy. Metoda byla široce využívána v cytogenetice savců i člověka, nicméně u rostlin nebyla použitelná kvůli repetitivní DNA, která je u rostlin rozprostřena napříč celým genomem (Ferguson-Smith, 1997; Schubert *et al.*, 2001). Jedinou možností bylo využití metody BAC FISH u *A. thaliana* a *B. dystachyon* pro malování rostlinných chromozomů (Lysák *et al.*, 2001; Idziak *et al.*, 2014).

Technický pokrok v syntéze DNA umožnil *de novo* syntézu tisíců oligonukleotidů (45-50 bp), které mohou být po naznačení použity jako chromozomově specifické sondy pro FISH. Metoda nazvaná oligo painting FISH je založena na *in silico* identifikaci velkého množství krátkých, chromozomově specifických (unikátních) oligomerů. *In silico* analýza sloužící k identifikaci oligomerů pokrývajících specifické oblasti genomu může být provedena pomocí softwaru Chorus, který byl k tomuto účelu vytvořen, nebo pomocí dalších bioinformatických nástrojů (Han *et al.*, 2015). Následuje syntéza těchto krátkých oligonukleotidů a fluorescenční značení, což umožňuje jejich použití jako fluorescenční sondy pro následnou FISH analýzu. Metoda byla úspěšně využita k malování celých chromozomů a analýze genomového uspořádání u mnoha rostlinných druhů včetně okurky seté, čeledi lipnicovité a lilkovité, jahodníku, orlíčku velkokvětého, bramboru, rýže, topolu, cukrové třtiny a kukuřice (Han *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2017; Braz *et al.*, 2018; Filiault *et al.*, 2018; He *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2018; Albert *et al.*, 2019; do Vale Martins *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020; do Vale Martins *et al.*, 2021). Genom kukuřice se z velké části skládá z repetitivních sekvencí DNA, které pocházejí z různých mobilních elementů. Sondy navržené pro všech 10 chromozomů kukuřice vykazovaly vysokou specificitu, což dokazuje účinnou eliminaci repetice během selekce oligomerů pomocí softwaru Chorus (Albert *et al.*, 2019).

K identifikaci chromozomů brambor a příbuzných druhů rodu *Solanum* spp. byl vyvinut tzv. oligo FISH barcode systém. Pro tuto metodu byly sestaveny dvě oligo sondy. Sondy byly navržené z jedné nebo více oblastí na každém chromozomu. Při FISH analýze signály ze dvou sond připomínají „čárový kód“, který identifikuje každý z 12 chromozomů bramboru. Stejný čárový kód (barcode) lze použít k identifikaci 12 homeologních chromozomů mezi vzdáleně příbuznými druhy rodu *Solanum* spp., včetně rajčat a lilku (Braz *et al.*, 2018).

3.2 Malování chromozomů u čeledi banánovníkovité (*Musaceae*)

3.2.1 Taxonomie čeledi *Musaceae*

Banánovník je jednoděložná bylina pocházející z jihovýchodní Asie, která je považována za centrum jeho primární diverzity. Banánovník se odtud dále rozšířil do tropických a subtropických oblastí celého světa (Karamura *et* Karamura, 1995). Taxonomická klasifikace řadí banánovník do říše *Plantae* (rostliny), oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné), třídy *Liliopsida* (jednoděložné), řádu *Zingiberales* (zázvořníkotvaré) a čeledi *Musaceae* (banánovníkovité) (www.biolib.cz). *Musaceae* je malá čeleď, která se rozčleňuje do tří rodů: *Ensete*, *Musa* a *Musella* (Wu *et* Kress, 2001). Nejpočetnější z těchto rodů je *Musa*, čítající přibližně 75 druhů, přičemž *Ensete* ($x = 9$) a *Musella* ($x = 9$) jsou zastoupeny pouze pár druhy. Podle základního chromozomového čísla (x) a morfologie rostliny je rod *Musa* rozdělen do čtyř sekcí: Eumusa ($x = 11$), Rhodochlamys ($x = 11$), Australimusa ($x = 10$) a Callimusa ($x = 9, 10$) (Cheesman, 1947). Argent (1976) vyčlenil pátou sekci, kterou nazval Ingentimusa. Tato sekce obsahuje pouze jeden druh *Musa ingens*, který má nejnižší základní chromozomové číslo ($x = 7$).

Nejpočetnější sekci je Eumusa, patří zde nejvýznamnější plané druhy *M. acuminata* Colla ($2n = 2x = 22$, genom A), *M. balbisiana* Colla ($2n = 2x = 22$, genom B) a nejběžnější jedlé typy banánovníku, které vznikly mezidruhovou nebo vnitrodruhovou hybridizací těchto planých druhů (Simmonds *et* Shepherd, 1955). *M. acuminata* je členěna do celkem 9 poddruhů, kterými jsou *banksii*, *burmannica*, *burmannicoides*, *errans*, *malaccensis*, *microcarpa*, *siamea*, *truncata*, a *zebrina* (Perrier *et al.*, 2011). Sekce Eumusa je fylogeneticky blíže příbuzná sekci Rhodochlamys, jejíž druhy jsou pěstovány především jako okrasné rostliny (Wong *et al.*, 2002). Sekce Australimusa zahrnuje *M. textilis* ($2n = 2x = 20$, genom T), která je pěstována pro svá vlákna, a také jedlé kultivary nazývané Fe'i (MacDaniels, 1947). Callimusa je nejvíce variabilní sekci. Druhy, které se k této sekci řadí, se liší základním chromozomovým číslem $x = 9$ nebo $x = 10$ (Cheesman, 1947; Čížková *et al.*, 2015).

3.2.2 Původ jedlých typů banánovníku

M. balbisiana a zmíněné poddruhy *M. acuminata* se podílely na vzniku většiny jedlých kultivarů banánovníku. Jedlé kultivary jsou partenokarpické, tedy bezsemenné, a rozmnožují se pouze vegetativně. Hlavními pěstovanými skupinami jsou diploidní (AA, AB) a triploidní kultivary (AAA, AAB a ABB), nicméně ve šlechtitelských programech vznikly také tetraploidní kultivary (AAAB, AABB) (Cheesman, 1947; Simmonds *et* Shepherd, 1955).

Plody banánovníků s genomovou konstitucí AAA se označují jako sladké banány „dessert bananas“. Tyto plody jsou konzumovány syrové. Hned po citrusech jsou druhou nejvyváženější plodinou světa. Dříve se jednalo o skupinu Gros Michel, která však byla zdemolována panamskou nemocí. Dnes je Gros Michel nahrazena skupinou Cavendish, která je však vůči virovým a plísňovým chorobám také stále

náchylnější (Gowen, 1995). Rychlé šíření chorob je zapříčiněno vegetativním rozmnožováním. Dochází ke vzniku geneticky identických klonů, které jsou sterilní. (Hřibová *et al.*, 2008). Pro efektivní pěstování nových kultivarů odolných vůči chorobám je třeba prohloubit znalosti o struktuře genomu *Musa* a o původu kultivovaných klonů (Valárik *et al.*, 2002).

Další významnou skupinu tvoří škrobové banány „cooking bananas“ s genomovou konstitucí AAB (plantainy), ABB nebo AAA (East African Highland bananas). Zmíněné skupiny jsou pěstovány pro lokální spotřebu, která tvoří 90% celkové produkce. Tyto banány se zpracovávají vařením nebo fermentací. V rozvojových zemích jsou hlavním zdrojem obživy pro milióny lidí (Gowen, 1995; Horry *et Jay* 1988; Lebot *et al.*, 1993). Využívány jsou také listy banánovníku, které slouží k balení potravy, k výrobě provazů nebo jako krmivo pro zvířata (Stover *et Simmonds*, 1987). Triploidní kultivary AAB a ABB vznikly mezidruhovým křížením mezi diploidním druhem *M. acuminata* ssp. nebo *M. balbisiana* a mezidruhovým AB hybridem. (Perrier *et al.*, 2011).

Na mezidruhové hybridizaci jedlých kultivarů se v menší míře podílí také *M. schizocarpa* (sekce Eumusa, $2n = 2x = 22$, genom S), která hrála roli např. při vzniku banánovníků východoafrické vysočiny (EAHB, East African Highland bananas, genom AAA) (Němečková *et al.*, 2018). Další jedlou odrůdu tvoří skupina Fe'i (sekce Australimusa, $2n = 2x = 20$) (Hřibová *et al.*, 2008). Plody Fe'i jsou charakteristické oranžové barvy, která je dána vysokým obsahem karotenoidů (Englberger *et al.*, 2006). K mezidruhové hybridizaci došlo také mezi vzdáleně příbuznými druhy *M. acuminata* (sekce Eumusa, genom A) a *M. textilis* (sekce Australimusa, genom T). Touto cestou vznikly A×T klony (D'Hont *et al.*, 2000).

3.2.3 Cytogenetická charakteristika banánovníku

Mimo výše popsanou taxonomii banánovníku k základním charakteristikám druhu patří také velikost jaderného genomu. Ta je důležitá při analýzách jeho struktury. Velikost genomu je měřena pomocí průtokové cytometrie, která se využívá také k analýze ploidie nebo buněčného cyklu. Průtoková cytometrie je založena na detekci fluorescenčního signálu, který je emitován DNA obarvenou fluorochromem. Jádra obarvená fluorochromem protékají celou průtokového cytometru jedno za druhým, což umožňuje laserům o specifických vlnových délkách měřit intenzitu fluorescence DNA každého jádra. Velikost jaderného genomu je charakterizována C-hodnotou (udávána v pg). Hodnota 1C je rovna množství DNA v jedné haploidní sadě chromozomů před replikací DNA (Doležel *et al.*, 2003).

Jaderný genom rodu *Musa* je poměrně malý. Velikost genomu sekce Eumusa byla stanovena na 600 Mbp (1C). 1C hodnota u *M. balbisiana* (genom B) byla stanovena na 552 Mbp a velikost *M. acuminata* (genom A) se podle kultivaru/poddruhu pohybovala mezi 593 a 607 Mbp/1C (Doležel *et al.* 1994; Lysák *et al.*, 1999). Tyto rozdíly v obsahu jaderné DNA jsou způsobeny odlišným

množstvím repetitivní DNA (Moore *et al.*, 1993). Bartoš *et al.* (2005) změřil obsah DNA u *M. schizocarpa* (genom S), přičemž výsledná velikost byla 673 Mbp/1C. Velikost genomu *M. textilis* (genom T) byla 701 Mbp/1C. Čížková *et al.* (2015) studovala velikost genomu sekce Callimusa pohybující se mezi 680 a 867 Mbp/1C. Pozorovala tak negativní korelaci mezi velikostí jaderného genomu (1C) a základním chromozomovým číslem (x). Druhy náležící k sekci Callimusa mají největší genomy ze všech banánovníků, ale zároveň nejmenší základní chromozomové číslo, které je pouze $x = 9$ nebo $x = 10$.

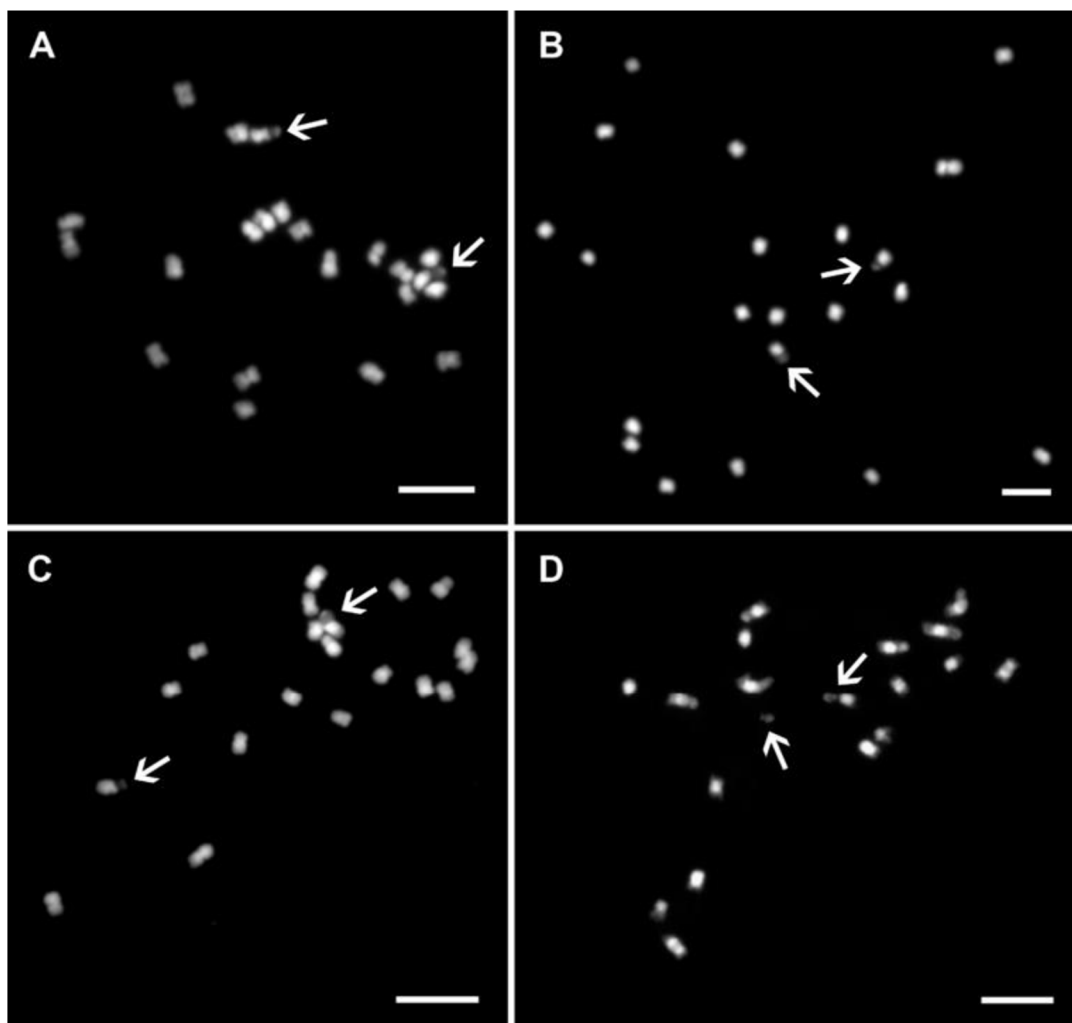
Soubor chromozomů v jádře je označován jako karyotyp. Jedná se o další důležitou charakteristiku druhu, která je dána počtem a morfologií chromozomů. Počet chromozomů závisí na sekci a druhu banánovníku. Pohybuje se mezi 9 a 11 chromozomy v haploidním genomu. Metafázní chromozomy *Musa* jsou metacentrické nebo submetacentrické a vysoce kondenzované. Chromozomy mají stejný tvar a velikost, která se pohybuje mezi pouhými 1 až 2 μm (Doležel *et al.* 1998). Jak již bylo zmíněno, velikost jaderného genomu je přibližně 600 Mbp, což znamená, že velikost průměrného chromozomu je okolo 50 Mbp DNA (Doležel *et al.* 1994). Tyto faktory mají za následek, že nelze jednoznačně určit polohu centromery (primární konstriktce). Nelze tak od sebe mnohdy jednoznačně rozlišit dlouhé a krátké rameno chromozomu. Snadno lze ale lokalizovat sekundární konstriktci, která koresponduje s ploidií banánovníku, a slouží tak jako důležitý morfologický znak k odlišení chromozomu. Sekundární konstriktce obsahuje oblast nesoucí geny pro 45S rRNA. Je lokalizována na konci krátkého raménka jednoho páru chromozomu a odděluje satelit. Problémem je, že se satelit během přípravy metafázních preparátů od chromozomu často ulomí a zcela oddělí. Tento ulomený fragment pak může být chybně považován za další chromozom. (Doleželová *et al.* 1998).

Pro šlechtění nových odrůd banánovníku je důležité identifikovat jednotlivé chromozomy v karyotypu a identifikovat jejich případné přestavby v genomu (Doležel *et al.* 1998). Zmíněné faktory značně ztěžovaly použití klasických molekulárních cytogenetických metod. Metoda pruhování chromozomů, která umožňuje identifikovat jednotlivé chromozomy u rostlinných druhů s velkými genomy bohužel u banánovníku nebyla použitelná (Greilhuber, 1977; Schubert *et al.*, 2001).

3.2.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace u banánovníku

3.2.4.1 Geny pro ribozomální rRNA

Pomocí sondy pro 45S rRNA geny je možné rozpoznat sekundární konstriktci, která je u diploidních druhů banánovníku lokalizovaná na krátkém raménku jednoho páru chromozomů (obrázek 3) (Doleželová *et al.*, 1998). Sekundární konstriktce obsahuje oblast nesoucí organizátor jadérka (NOR). 45S rRNA geny se u diploidních druhů nachází na dvou chromozomech, u triploidů na třech a tetraploidních druhů na čtyřech chromozomech. Odpovídají tedy ploidii rostliny (Doleželová *et al.*, 1998; Osuji *et al.*, 1998; Bartoš *et al.*, 2005; Čížková *et al.*, 2013).



Obrázek 3: Fotografie mitotických metafázních chromozomů *Musa*. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI. Měřítka = 5 μ m. Fotografie jsou zobrazeny v bíle pseudo barvě. Šipky znázorňují pozici sekundární konstriktce. (A) *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* ITC 0249 ($2n = 2x = 22$), sekce Eumusa; (B) *M. laterita* ITC 1575 ($2n = 2x = 22$), sekce Rhodochlamys; (C) *M. maclayi* ITC 1207 ($2n = 2x = 20$) sekce Australimusa; (D) *M. beccarii* ITC 1070 ($2n = 2x = 18$) sekce Callimusa. (převzato z Šimoníková *et al.*, 2022)

Vysoce konzervovaná jednotka 5S rDNA je u AA genotypů lokalizována na čtyřech až šesti chromozomech, u BB genotypů většinou na šesti chromozomech. Dále bylo pozorováno, že 45S rDNA a 5S rDNA se nenacházejí na stejných chromozomech. Počet 5S rDNA lokusů je v rámci různých druhů *Musa* značně variabilní v porovnání s 45S rDNA (Doleželová *et al.*, 1998; Osuji *et al.*, 1998; Čížková *et al.*, 2013; Němečková *et al.*, 2018; Šimoníková *et al.*, 2019). 5S rDNA a 45S rDNA jsou velice užitečnými cytogenetickými markery pro identifikaci chromozomů a přispěly k porozumění evoluce a variability genomů u zástupců rodu *Musa* (Osuji *et al.* 1998).

Valárik *et al.* (2002) sestavil částečné genomické knihovny *M. acuminata* a *M. balbisiana*, u kterých byl proveden skrínig pro klony obsahující repetitivní sekvence, mobilní elementy a rDNA. Klon pojmenovaný Radka1 je homologní s 26S rDNA genem rýže, který je přítomen v genomu mnoha

roślin. Pomocí tohoto klonu je po FISH možné odlišit sekundární konstrikci. Klon Radka 7 je 543 bp dlouhý fragment homologní s 26S rDNA genem rýže. Taktéž je lokalizovaný na organizátoru jadérka se signálem na jednom páru chromozomů u diploidních druhů. Tento klon však není homologní ke klonu Radka 1. Klon s názvem Radka 2 je homologní s 5S rDNA genem rýže.

Dalším izolovaným klonem je Radka 5, který je homologní s repetitivním elementem *M. acuminata*. Tento 61 bp dlouhý segment po FISH hybridizuje v centromerické oblasti na všechny chromozomy *M. acuminata*. Síla signálu u *M. balbisiana* je asi 30krát nižší než u *M. acuminata*, což značí velkou variabilitu v sekvenci DNA. Klon Radka 6 je tandemově organizovaná repetitivní sekvence lokalizovaná v centromerické oblasti všech chromozomů, síla signálu je u *M. balbisiana* přibližně 3krát slabší (Valárik *et al.*, 2002).

3.2.4.2 Repetitivní DNA sekvence - retrotranspozóny, satelity

Jaderný genom banánovníku je z 45 % tvořen repetitivními sekvencemi, které se člení na základě jejich organizace v genomu na rozptýlené a tandemově uspořádané (D'Hont *et al.*, 2012). K rozptýleným repetitím se řadí zejména transpozóny. Kódují proteiny, které usnadňují jejich replikaci a integraci do jaderného genomu (Kubis *et al.*, 1998). Tandemové repetice jsou složeny z nekódujících sekvencí organizovaných v dlouhé řetězce, které se za sebou mnohonásobně opakují (Charlesworth *et al.*, 1994).

Hříbová *et al.* (2010) ve své studii popsala repetitivní oblast genomu *Musa* pomocí 454 sekvenování. LTR retrotranspozóny tvoří významnou část genomu banánovníku. Konkrétně retrotranspozón Ty1/copia představuje 16 % genomu a při FISH jsou signály detekovány v (peri)centromerické oblasti všech chromozomů. Dalším hojně zastoupeným retrotranspozónem je Ty3/gypsy, který tvoří přibližně 7 % genomu. Ty3/gypsy také po FISH hybridizuje v (peri)centromerické oblasti všech chromozomů. Retrotranspozón monkey představuje 0,2 – 0,5 % genomu. Část kopií tohoto retrotranspozónu byly soustředěny především v oblasti organizátoru jadérka spolu s rRNA geny. Ostatní kopie elementu však byly rozptýleny napříč celým genomem (Balint-Kurti *et al.*, 2000).

Non-LTR retrotranspozóny jsou v genomu banánovníku vzácné, přičemž nejvýznamnější z nich se nazývá LINE, tvořící přibližně 1 % genomu. Signál LINE retrotranspozónu byl pozorován v centromerické oblasti všech chromozomů, což z něj dělá důležitý cytogenetický marker pro detekci primární konstrikce (Hříbová *et al.*, 2010; Čížková *et al.*, 2013).

Satelitní DNA je složena z tandemově uspořádaných repetitivních dlouhých až několik tisíc nukleotidů. Hojně se vyskytuje v oblastech bohatých na heterochromatin, které jsou typické pro centromerické a telomerické oblasti. Lokusy bohaté na satelity typicky vykazují specifické pruhování, což usnadňuje identifikaci, analýzu strukturních chromozomových změn a dělá z nich užitečný cytogenetický marker. Jaderný genom banánovníku (*Musa* spp.) je na rozdíl od mnoha rostlinných druhů na satelitní DNA chudý. Tvoří pouze 0,3 % genomu (Čížková *et al.*, 2013). Satelit CL33 je tandemově organizovaná repetice, přičemž délka opakující se jednotky je 130 bp. Signál lze pozorovat v telomerické oblasti dvou

párů chromozomů *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* cv. 'Calcutta 4'. Druhým identifikovaným satelitem je CL18. Taktéž se jedná se o tandemově organizovanou repetici, kdy délka jednotky činí 2 kb. CL18 lze detekovat v subtelomerické oblasti jednoho páru chromozomů *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* cv. 'Calcutta 4' (Hříbová *et al.*, 2010).

3.2.4.3 Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

Další metodou, která byla využita ke studiu struktury genomu banánovníku, je genomová *in situ* hybridizace (GISH), která umožňuje identifikovat původní rodičovské chromozomy u mezidruhových hybridů (Jiang *et Gill*, 1994). Sonda pro GISH je připravena z celkové genomové DNA jednoho druhu, což pomáhá určit původ a chromozomální přestavby u rostlinných hybridů (Schwarzacher *et al.*, 1992).

GISH byla u banánovníku použita k odlišení čtyř genomů rodu *Musa* (A, B, S a T) (Osuji *et al.*, 1997; D'Hont *et al.*, 2000). Sonda specifická k určitému genotypu však často nehybridizuje pouze na jediný genotyp. Většina hybridizovaných míst obsahuje repetitivní DNA sekvence, které jsou společné pro více genotypů banánovníku (Osuji *et al.*, 1997).

M. schizocarpa (genom S) je fylogeneticky blízce příbuzná s *M. acuminata* (genom A). *M. balbisiana* (genom B), která náleží do stejné sekce Eumusa, je těmto druhům o něco vzdálenější. Stále se však jedná o blízce příbuzné druhy. Druhy spadající do sekce Australimusa jsou vzdáleně příbuzné od tří zmíněných druhů náležících do sekce Eumusa. (Cheesman, 1947). To může být způsobeno tím, že druhy ze sekce Australimusa se vyskytují v jiných geografických oblastech (Shepherd, 1999). Po GISH na A×T hybriděch nedochází k téměř žádnému překrývání signálů, lze jednoznačně určit chromozomy pocházející z genomu A, resp. T. Naopak GISH u A×B a A×S hybridů není vhodná pro identifikaci chromozomů pocházejících z jednotlivých genomů, docházelo totiž k překrývání signálů, kdy sondy připravené z A i B, resp. S genomové DNA hybridizovaly po GISH na všechny chromozomy daného hybridu (D'Hont *et al.*, 2000).

Kromě hybridizace na mitotických metafázních chromozomech (Osuji *et al.*, 1997; D'Hont *et al.*, 2000), lze GISH aplikovat také na meiotické pachyténní chromozomy, což umožňuje studovat párování chromozomů. U sterilních hybridů dochází během meiózy kromě bivalentů také k tvorbě univalentů i multivalentů, a poměrně často také dochází k párování homeologních A a B chromozomů (Jeridi *et al.*, 2011).

Další nevýhodou GISH u banánovníku je, že genomické sondy nehybridizují na celé chromozomy, ale pouze na (peri)centromerické oblasti chromozomu. To bylo pozorováno jak u mitotických, tak u meiotických chromozomů (D'Hont *et al.*, 2000; Jeridi *et al.*, 2011). Tento jev byl pozorován u druhů s malými genomy, které obsahují většinu heterochromatinu blízko (peri)centromery (Kamisugi *et al.* 1993; Barre *et al.*, 1998). V distální oblasti chromozomu se nachází velmi málo repetitivních sekvencí,

což omezuje využití GISH pro detekci chromozomálních přestaveb, které jsou čtenější na koncích chromozomů (D'Hont *et al.*, 2000).

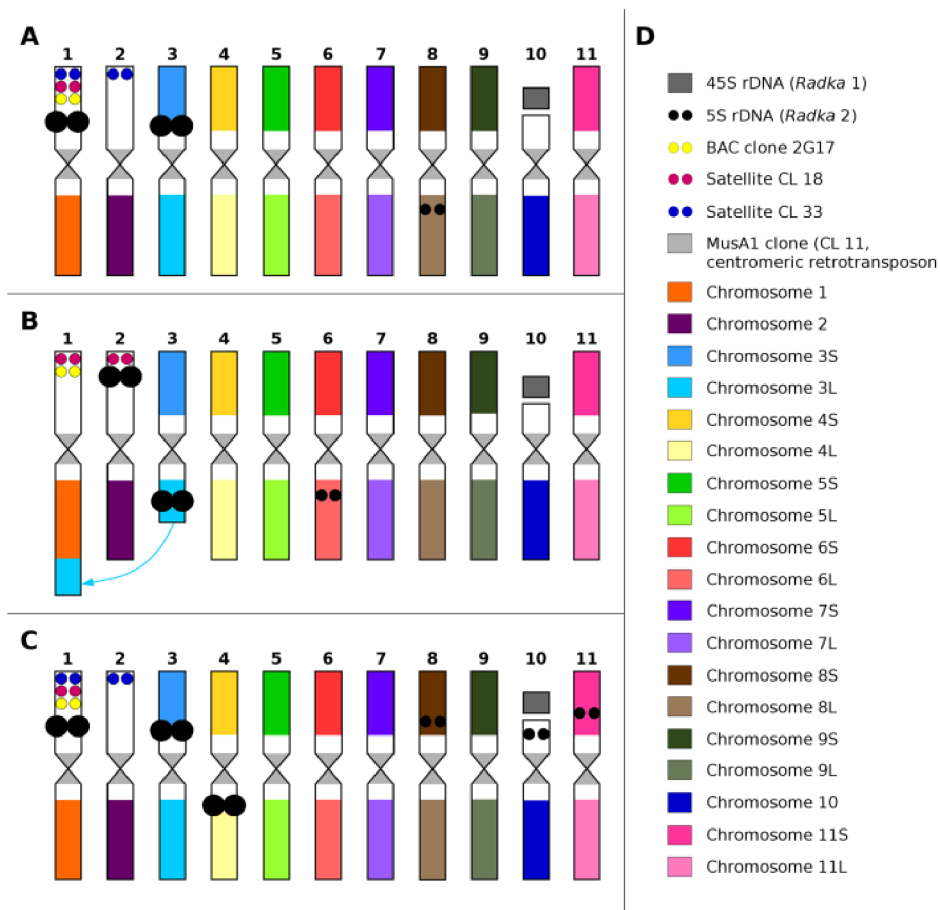
3.2.4.4 Jednokopiové BAC (bacterial artificial chromosome) klony

Kvůli snaze vytvořit sondy pro FISH z DNA fragmentů banánovníku klonovaných ve vektoru BAC, bylo selektováno osmdesát BAC klonů obsahujících nízké množství repetitivní DNA. Ty by tak potenciálně mohly být použity jako chromozomově specifické sondy pro FISH u banánovníku. Bohužel pouze jeden BAC klon s názvem 2G17 prokázal chromozomově specifický signál. BAC klon 2G17 je lokalizovaný v subtelomerické oblasti na jednom páru chromozomů *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* cv. 'Calcutta 4' v oblasti nesoucí geny pro 5S rRNA (Hřibová *et al.*, 2008).

Signály ostatních BAC klonů byly po FISH buď rozptýlené na všech chromozomech, nebo signál nebyl detekován žádný. Přítomnost rozptýlených signálů byla způsobena přítomností repetitivních sekvencí DNA (Hřibová *et al.*, 2008). BAC klony, které nevykázaly žádný signál, mohou nést chloroplastovou nebo mitochondriální DNA, která se v malé míře v knihovnách vyskytuje (Vilarinhos *et al.*, 2002). Dalším faktorem, proč FISH s některými BAC klony selhala, může být vysoce kondenzovaný chromatin metafázních mitotických chromozomů. Řešením by mohlo být použití méně kondenzovaných meiotických pachyténních chromozomů (Lysák *et al.*, 2001). Většina BAC klonů nebyla kvůli přítomnosti rozptýlených repetitivních sekvencí v genomu *Musa* chromozomově specifická. Z toho důvodu BAC klony nepomohly k identifikaci chromozomů a sestavení karyotypu (Hřibová *et al.*, 2008).

3.2.4.5 Oligo painting FISH

Využitím kombinací výše zmíněných typů sond (geny pro rRNA, BAC klon 2G17, repetitivní DNA sekvence – CL33 a CL18) byla snaha identifikovat jednotlivé chromozomy a vytvořit tak karyotyp banánovníku. Ukázalo se, že dostupné sondy jsou pro identifikaci všech chromozomů nedostatečné (Čížková *et al.*, 2013). Tento problém vyřešila až moderní metoda oligo painting FISH. S využitím této metody byl poprvé sestaven karyotyp banánovníku (obrázek 4) (Šimoníková *et al.*, 2019).



Obrázek 4: Idiogram tří diploidních druhů *Musa* náležících do sekce Eumusa (převzato z Šimoníková *et al.*, 2019) (A) *M. acuminata* ssp. *malaccensis* “Pahang” (genom A) ITC 0609; (B) *M. balbisiana* “Tani” (genom B) ITC 1120; (C) *M. schizocarpa* “Schizocarpa” (genom S) ITC 0560; (D) schéma použitých sond.

Šimoníková *et al.* (2019) připravila 19 oligo malovacích sond specifických na jednotlivé chromozomy, resp. chromozomová ramena banánovníku. Pro *in silico* identifikaci krátkých unikátních oligomerů byla využita referenční genomová sekvence *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (D’Hont *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2016). Využitím kombinace oligo malovacích sond a dostupných cytogenetických markerů (tj. rDNA, BAC klon 2G17, satelity CL18 a CL33) byl poprvé sestaven karyotyp tří diploidních druhů banánovníku, a to *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (genom A), *M. balbisiana* (genom B) a *M. schizocarpa* (genom S) náležících do nejvýznamnější sekce Eumusa. Bylo tedy prokázáno, že touto metodou lze studovat také blízké příbuzné druhy. Navíc bylo zjištěno, že je metoda vhodná pro detekci chromozomální přestaveb (translokací). Sondy mohou být detekovány jak na mitotických, tak na meiotických chromozomech. Při použití meiotických pachytenních chromozomů, které jsou přibližně padesátkrát delší, je možné detailně pozorovat chromozomální strukturu. (Šimoníková *et al.*, 2019). Oligo malovací sondy připravené *M. acuminata* ssp. *malaccensis* byly později použity i na dalších 20 položek rodu *Musa* zahrnujících především jedlé hybridní klony a druhy, ze kterých klony vznikly (Šimoníková *et al.*, 2019).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro praktickou část této bakalářské práce bylo použito 12 genotypů diploidních a triploidních klonů banánovníku (*Musa* spp.), viz Tabulka 1, získaných z International *Musa* Transit Centre (ITC, Bioversity International, Lovaň, Belgie) ve formě *in vitro* zakořeněných rostlin. Rostliny byly přeneseny do substrátu ošetřeného Basamidem a uchovávány ve skleníku.

Tabulka 1: Seznam analyzovaných genotypů banánovníku

ITC číslo ¹	Rod	Sekce	Název položky	Druh/Skupina	Počet chromozomů	Ploidie
0079	<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa textilis</i> (Abaca)	textilis	40	4x (genom T)
0539	<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa textilis</i>	textilis	20	2x (genom T)
0614	<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa maclayi</i> type Hung Si	maclayi	20	2x
0618	<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa peekelii</i> ssp. angustigemma	peekelii	20	2x
0854	<i>Musa</i>	Eumusa x Australimusa	Umbubu	AT	21	2x
0917	<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa peekelii</i> ssp. peekelii	peekelii	20	2x
0927	<i>Musa</i>	Australimusa	Kawaputa	Fe'i	20	2x
0928	<i>Musa</i>	Eumusa x Australimusa	Kabulupusa	AAT	32	3x
0956	<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa lolodensis</i>	lolodensis	20	2x
1021	<i>Musa</i>	Australimusa	Menei	Fe'i	20	2x
1213	<i>Musa</i>	Eumusa x Australimusa	Sar	AAT	32	3x
1716	<i>Musa</i>	Australimusa	Tongkat Langit Papua	Fe'i	30	3x

¹Číslo přiděleno centrem International Transit Centre (ITC, Lovaň, Belgie).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 2-mercapto-ethanol (Fluka, kat. č. 63690)
- 5x Phusion pufr (New England Biolabs, kat.č. B0518S)
- 8-hydroxychinolin (SERVA, kat. č. 25368)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Aminoallyl-dUTP-Cy5 (Jena Bioscience, kat. č. 86376)
- Anti-dioxigenin-fluorescein isothiokyanát (Sigma-Aldrich, kat.č. 11207741910)
- Biotin-16-dUTP (Jena Bioscience, kat. č. NU-803-BIO16)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, kat. č. RPN418)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- Celuláza Onozuka R-10 (Yakult Honsa, kat. č. 150422-01)
- Citronan sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. S1804)
- Dextran sulfát (SERVA, kat. č. 9011-18-1)
- Digoxigenin-11-dUTP (Roche, kat. č. 11093088910)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Lach-Ner, kat.č. 30016-AP0)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Lach-Ner, kat. č. 20022-CT0-M5000-1)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, kat. č.20025-A96)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Formaldehyd 37% (Sigma-Aldrich, kat. č. 252549-1L)
- Formamid 99,5% (Sigma-Aldrich, kat. č. 47671-1L-F)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, kat. č.: SM0321)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č. G5516)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄ · 12 H₂O) (Lach-Ner, kat.č. 30067-AP0)
- Chlorid draselný (KCl) (Lach-Ner, kat. č. 7447-40-7)
- Chlorid horečnatý (MgCl₂) (Finnzymes, kat. č. AB0359)
- Imerzní olej Immersol 518 F (Carl Zeiss, kat. č. 12-624-66A)
- Kyselina boritá (Sigma-Aldrich, kat. č. B7660-500G)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Kyselina octová 99,8% (Lach-Ner, kat. č. 10047-A9B)
- Methanol 99,5% (Lach-Ner, kat. č. 20038-ATO)
- Nukleotidy: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, každý 100 mmol·l⁻¹ (VWR International, kat. č. 733- 1364)

- Pektolyáza Y-23 (Ducheva Biochemie, kat. č. 015595.02)
- Phusion polymeráza (New England Biolabs, kat.č. M0530S)
- Primer T3 (ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA) (New England Biolabs, kat.č. 67541565)
- Primer T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) (New England Biolabs, kat.č. 67541566)
- Pufr pro Taq polymerázu (New England Biolabs, kat.č. B7002S)
- Streptavidin Cy3 (Invitrogen, kat. č. 434315)
- Taq DNA polymeráza (New England Biolabs, kat.č. M0209L)
- TRIS (kat. číslo: 30009-AP0)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P2287)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, kat. č. H-1200)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č. X4126)

4.2.2 Použité soupravy

- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č.: 4337455)
- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, kat. č.: 78205.10.ML)
- Invisorb® spin plant mini kit (Stratec molecular, kat. č. 1037100300)
- PureLink™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K310001)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

0,05% 8-hydroxychinolin: 0,25 g 8-hydroxychinolinu – rozpustit v 500 ml deionizované vody v Erlenmayerově baňce – pracovat v digestoři

0,5 mol·l⁻¹ EDTA (100 ml): 18,61 g EDTA rozpustit v 80 ml deionizované vody – doplnit do 100 ml – autoklávovat – upravit pH na 8

1 mmol·l⁻¹ dTTP (200 µl): smíchat 2 µl 100 mmol·l⁻¹ dTTP a 198 µl deionizované vody

1 mmol·l⁻¹ směs dNTPs se značeným 1 mmol·l⁻¹ dUTP – Cy5 (50 µl): Nukleotidy zředit na 12,5 mmol·l⁻¹ – 1,25 µl nukleotidu (100 mmol·l⁻¹ dATP, 100 mmol·l⁻¹ dCTP, 100 mmol·l⁻¹ dGTP, 100 mmol·l⁻¹ dTTP) + 8,75 µl deionizované vody. Smíchat 1 µl 12,5 mmol·l⁻¹ dATP + 1 µl 12,5 mmol·l⁻¹ dCTP + 1 µl 12,5 mmol·l⁻¹ dGTP + 0,5 µl 12,5 mmol·l⁻¹ dTTP + 6 µl 1 mmol·l⁻¹ dUTP – Cy5 + 40,5 µl deionizované vody.

1% blokovací pufr: 0,5 g blocking reagent – rozpustit v 50 ml 4x SSC/Tween jednu hodinu při 70°C – vyautoklávovat – rozpipetovat po 1 ml

2 mmol·l⁻¹ dNTPs kromě dTTP (200 µl): smíchat 4 µl 100 mmol·l⁻¹ dATP + 4 µl 100 mmol·l⁻¹ dCTP + 4 µl 100 mmol·l⁻¹ dGTP + 188 µl deionizované vody

50 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr obsahující 0,2% 2-mercaptoethanolu (50,1 ml): 50 ml 50 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru (pH 7) + 100 µl 2-mercapto-ethanolu – pracovat v digestoři

50 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr: 2,267 g KH₂PO₄; 5,97 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O – rozpustit každé zvlášť v 250 ml deionizované vody – smíchat 175 ml Na₂HPO₄ · 12 H₂O + 75 ml KH₂PO₄ – pH upravit na 7

50% dextran sulfát: 2,5 g dextran sulfátu rozpustit za mírného míchání v 5 ml deionizované vody

5x TBE pufr: 54 g TRIS base + 27,5 g kyseliny borité + 20 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA, pH 8 – doplnit deionizovanou vodou do 1 l

6x STOP C (10 ml): 2 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA + 1 ml 10% SDS + 4,3 ml 99,9% glycerolu + 5 mg bromfenolové modři + 5 mg xylenecyanolu – doplnit deionizovanou vodou do 10 ml

70% ethanol (100 ml): 72,92 ml 96% ethanolu + 27,08 ml deionizované vody

90% ethanol (100 ml): 93,75 ml 96% ethanolu + 6,25 ml deionizované vody

Fixáž 99,8% kyselina octová: 99,5% methanol (9:1): 90 µl 99,8% kyseliny octové + 10 µl 99,5% methanolu – vždy připravit čerstvou fixáž

Fixáž ethanol: kyselina octová (3:1): 15 ml 96% ethanolu + 5 ml 99,8% ledové kyseliny octové – vždy připravit čerstvou fixáž

Pracovní roztok ethidium bromidu (1l): 50 mg ethidium bromidu rozpustit v 100 ml deionizované vody – doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Roztok 0,1x SSC + 2mmol·l⁻¹ Mg²⁺ · 6H₂O: 5 ml 20x SSC + 1 ml Tween + 0,406 g chloridu hořečnatého (hexahydrát) – doplnit vodou na 1 l – pH upravit na 7,0 – vyautoklávovat

Roztok 20x SSC: 175,3 g 3 mol·l⁻¹ NaCl + 88,2 g 0,3 mol·l⁻¹ citronan sodný (dihydrát) – rozpustit v 1 l deionizované vody – pH upravit na 7,0 – přefiltrovat, autoklávovat 25 min – rozlít po 500 ml do vyautoklávovaných lahví

Roztok 2x SSC: 300 ml 20x SSC + 2700 ml deionizované vody – pH upravit na 7,0 – vyautoklávovat

Roztok 4x SSC: 600 ml 20x SSC + 6 ml Tween – doplnit deionizovanou vodou do 3 l – pH upravit na 7,0 – vyautoklávat

Roztok 75mmol·l⁻¹ KCl + 7,5mmol·l⁻¹ EDTA: 2,796 g KCl; 0,396 g EDTA – rozpustit každé zvlášť v 200 ml deionizované vody – smíchat a doplnit deionizovanou vodou do 500 ml – pH upravit na 4

Roztok enzymů 4% celulázy a 1% pektolyázy (250 mikrozkušavek): 200 mg celulázy Onozuka R-10 + 50 mg pektolyázy Y-23 – rozpustit v 5 ml 75 mmol·l⁻¹ KCl a 7,5 mmol·l⁻¹ EDTA pufru – smíchat, centrifugovat – rozpipetovat po 20 µl do 250 mikrozkušavek

TE (TRIS-EDTA) pufr (50 ml): 500 µl 1M TRIS-HCl + 100 µl 0,5M EDTA – doplnit deionizovanou vodou na 50 ml – upravit pH na 8

TRIS pufr (pH 7,5): 10 mmol·l⁻¹ TRIS (302,85 mg) + 10 mmol·l⁻¹ Na₂-EDTA (930,6 mg) + 100 mmol·l⁻¹ NaCl (1,461 g) – doplnit do 250 ml deionizovanou vodou – upravit pH na 7,5

2 mmol·l⁻¹ směs dNTPs se značeným dUTP – pomocí digoxigenin-11-dUTP/ Biotin-16dUTP: dNTPs (dATP, dCTP, dGTP) o koncentraci 100 mmol·l⁻¹ zředit na 2 mmol·l⁻¹ smícháním 0,4 µl dCTP + 0,4 µl dGTP + 0,4 µl dATP + 58,8 µl deionizované vody. Smíchat a zředit dUTP (1 mmol·l⁻¹ Didoxigenin-11-dUTP/Biotin-16-dUTP) a 100 mmol·l⁻¹ dTTP 1:3 na koncentraci 2 mmol·l⁻¹ přidáním 0,75 µl dTTP + 25 µl dUTP + 24,25 µl deionizované vody. Smíchat 60 µl 2 mmol·l⁻¹ směsi dATP, dCTP, dGTP s 50 µl 2 mmol·l⁻¹ směsi dUTP s dTTP.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Micromax RF IEC (Thermo)
- Digestoř (Merci)
- Elektroforetická aparatura Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorescenční mikroskop Axio Imager.Z2 s CCD kamerou (Zeiss, Oberkochen, Německo)
- Fluorometr Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific)
- Hlubokomrazící mrazák (Thermo Scientific)
- Hybridizační komora Slide Moat 240000 (Boekel Scientific)
- Lyofilizátor Coolsave (Labogene)
- Odsávací systém (Nederman)
- Spektrofotometer NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Stolní centrifuga MiniStar silverline (VWR International)
- Termoblok Digital Dry Bath (Labnet International)

- Termocycler Mastercycler (Eppendorf)
- Termocycler C1000 Touch (Bio-Rad)
- Třepačka Reax Top (Heldolph Instruments)
- Třepačka s vodní lázní WB 14 s víkem WB 14-LI (Memmert)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene)
- Oscilační mlýn MM 301 (Retsch)
- Vodní lázeň SM 30 (Grant)
- Výrobník ledu MF 26 (Scotsman)
- Zdroj pro elektroforézu MP-300V (Major Science)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Praktická část bakalářské práce byla provedena na ÚEB AV ČR v.v.i. v Centru strukturní a funkční genomiky rostlin v Olomouci. Skládala se ze dvou částí. První část byla zaměřena na fyzické mapování A×T hybridních klonů banánovníku pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). K analýze byly využity 3 genotypy banánovníku (položky ITC 0854, ITC 0928 a ITC 1213).

Druhá část se věnovala analýze sekvencí specifických pro genom banánovníků ze sekce Australimusa, které by potenciálně mohly být využity jako sondy pro FISH. K analýze bylo využito 10 genotypů banánovníku (položky ITC 0079, ITC 0539, ITC 0614, ITC 0618 ITC 0854, ITC 0917, ITC 0927, ITC 0956, ITC 1021 a ITC 1213).

4.4.1 Odebírání kořínků a jejich fixace

Mladé kořínky byly pinzetou odebrány z rostlin ve skleníku do čerstvě připraveného roztoku obsahujícího 50 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru (pH 7) a 0,2% 2-merkptoethanol. V digestoři byly kořínky krátce osušeny na buničité vatě a následně byly přeneseny do 0,05% 8-hydroxychinolinu, kde byly inkubovány 3 hodiny při pokojové teplotě, což zapříčinilo akumulaci buněk v metafázi. Přes noc byly kořínky fixovány při -20 °C v čerstvě připravené fixázi 3:1 (96% ethanol: 99,8% kyselina octová). Následující den byly dvakrát promyty v 70% ethanolu po dobu 5 minut při pokojové teplotě (Doležel *et al.*, 1998). Takto připravené kořínky byly buď uchovány v 70% ethanolu při -20 °C, nebo byly ihned použity na přípravu nakapávaných preparátů metafázních chromozomů.

4.4.2 Příprava nakapávaných preparátů metafázních chromozomů

Příprava nakapávaných preparátů metafázních chromozomů probíhala na ledové tříšti na základě protokolu Kato *et al.* (2004, 2006) s úpravami podle článku Danilova *et al.* (2012). Zafixované kořínky byly v průběhu 10 minut třikrát promyty deionizovanou vodou v 2ml mikrozkuhavce obsahující 1–2

kořínky. Následně byly kořínky jednou promyty v $75\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a $7,5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pufru (pH 4) po dobu 5 minut. Skalpelem byla od každého kořínku oddělena 1–2 mm kořenová špička, která byla vložena do 20 μl enzymatické směsi obsahující 4% celulózu R-10 a 1% pektolýazu Y-23 v $75\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a $7,5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pufru. Následně byly kořenové špičky inkubovány v blokovém termostatu při $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 62 minut. Po inkubaci byly kořenové špičky v enzymatické směsi umístěny na led. Působení enzymů bylo zastaveno přidáním 200 μl TE (TRIS-EDTA) pufru (pH 8) po dobu 5 minut. Dále byly kořenové špičky v průběhu 10 minut třikrát promyty v 96% ethanolu. Macerovaný materiál byl v 31 μl čerstvě připravené fixáže 9:1 (99,8% kyselina octová: 99,5% methanol) homogenizován třením preparační jehly o stěnu mikroskopavky. Suspenze byla ponechána na ledové tříšti 5 minut, následně byla jemným poklepáním na mikroskopavku promísena. Z takto připravené homogenní suspenze bylo 5 μl nakápnuto na podložní sklíčko, které bylo vzápětí umístěno do polystyrenového boxu vyloženého papírovými navlhčenými ubrousky. V boxu s vysokou vlhkostí, který byl z poloviny překrytý víkem, byla sklíčka ponechána, dokud volně na vlhkém vzduchu neuschla.

Na podložní sklíčko bylo přidáno 12 μl Vectashield montovacího média s DAPI a bylo překryto krycím sklíčkem. Kvalita preparátu byla zkontrolována na fluorescenčním mikroskopu Axio Imager.Z2 vybaveného CCD kamerou (Zeiss, Oberkochen, Německo). Jestliže se v preparátu vyskytovalo dostatek figur s metafázními mitotickými chromozomy, byla suspenze dále použita pro fluorescenční *in situ* hybridizaci.

4.4.2.1 Postfixace preparátů metafázních chromozomů

Postfixace byla provedena kvůli zlepšení kvality pozorovaných chromozomů, chromozomy tak po denuraci lépe drží svůj tvar.

V digestoři byly preparáty po dobu 10 minut při pokojové teplotě fixovány ve 4% formaldehydu, který byl připraven smícháním 5 ml 37% formaldehydu s 42 ml 2x SSC. Následně byly preparáty třikrát po dobu 4 minut promyty ve 2x SSC, dále pak v ethanolové řadě (70, 90 a 96% ethanol) vždy po dobu 2 minut. Ethanol se z preparátů nechal odpařit volně na vzduchu a takto připravená postfixovaná podložní skla byla použita na fluorescenční *in situ* hybridizaci.

4.4.3 Příprava značených sond Radka sekvencí

4.4.3.1 Příprava sondy pro lokus 45S rDNA

Sonda specifická pro lokus 45S rDNA byla připravena podle Čížková *et al.* (2013) PCR značením *Radka1* DNA klonu (45S rDNA) (Valárik *et al.*, 2002) s využitím biotin-16-dUTP. K PCR amplifikaci byly použity T3/T7 primery. Celkový objem PCR reakce byl 20 μl , PCR reakční směs byla pipetována podle tabulky 2.

Tabulka 2: Rozpis PCR reakční směsi pro přípravu sondy specifické pro lokus 45S rDNA o celkovém objemu reakce 20 μl

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Použitý objem [μl]
Pufr+ (s MgCl_2)	10x	1x	2
směs dNTPs s digoxigenin-11-dUTP	2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	2
Primery (T3 + T7)	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4
<i>Radka1</i> DNA klon	100x		1
<i>Taq</i> polymeráza	5U/ μl	2U/100 μl	0,08
H_2O			14,52

PCR amplifikace byla provedena podle níže uvedené tabulky 3. Pro ověření úspěšnosti provedené PCR amplifikace sondy specifické pro lokus 45S rDNA byla provedena elektroforéza v 1,2% agarózovém gelu. Následné přečištění sondy pomocí PureLink PCR Purification Kitu je popsáno v kapitole 4.4.3.6 (Přečištění fluorescenčních sond).

Tabulka 3: Teplotní a časový profil PCR reakce pro přípravu sondy specifické pro lokus 45S rDNA

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	50 s	
Nasedání primerů	55	50 s	30
Elongace	72	50 s	
Závěrečná elongace	72	5 min	1
Ukončení reakce	4		

4.4.3.2 Příprava sondy specifické pro lokus 5S rDNA

Přímo značená sonda specifická pro lokus 5S rDNA byla nejprve připravena podle Čížková *et al.* (2013) značením *Radka2* DNA klonu (5S rDNA) (Valárik *et al.*, 2002) podobným způsobem jako sonda pro lokus 45S rDNA (tabulka 2). Rozdíl byl v přímém značení *Radka2* DNA klonu za využití dUTP-Cy5. Molekula fluorochromu Cy5 je větší než například již zmíněná molekula digoxigeninu, tudíž pro lepší inkorporaci fluorochromu byl do amplifikační směsi přidán 1 μl DMSO. Touto cestou však po FISH byly získány pouze velmi slabé signály. Z tohoto důvodu byl využit jiný postup pomocí dvou kol PCR reakcí. PCR amplifikační směs o celkovém objemu 10 μl byla pipetována podle tabulky 4.

Tabulka 4: Rozpis PCR reakční směsi pro amplifikaci *Radka2* DNA klonu s T3 a T7 primery o celkovém objemu reakce 10 μl

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Použitý objem [μl]
Phusion pufr	5x	1x	2
Phusion polymeráza	2 U/ μl	2U/100 μl	0,1
<i>Radka 2</i> DNA klon	100x		2
dNTPs	10 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2
Primer T3	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	500 nmol $\cdot\text{l}^{-1}$	0,5
Primer T7	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	500 nmol $\cdot\text{l}^{-1}$	0,5
H ₂ O			4,7

PCR amplifikace byla provedena v termocykléru, který byl nastaven podle níže uvedené tabulky 5. Úspěšnost PCR amplifikace byla ověřena elektroforeticky v 1,2% agarózovém gelu.

Tabulka 5: Teplotní a časový profil PCR reakce pro amplifikaci *Radka2* DNA klonu

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů	55	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Závěrečná elongace	72	8 min	1
Ukončení reakce	4		

V druhé PCR reakci byl získaný PCR produkt značen za využití dUTP-Cy5. PCR reakce byla pipetována podle níže uvedené tabulky 6, přičemž celkový objem reakce činil 50 μl . Příprava 2 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ dNTPs kromě dTTP a 1 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ dTTP je popsána v kapitole 4.2.2 (Použité roztoky a jejich příprava). Nastavení teplotního a časového profilu na termocykléru bylo totožné s první PCR reakcí (viz tabulka 5). Úspěšné provedení PCR značení bylo ověřeno elektroforetickou separací v 1,2% agarózovém gelu. Sonda byla přečištěna pomocí PureLink PCR Purification Kitu.

Tabulka 6: Rozpis PCR reakční směsi pro fluorescenční značení lokusu 5S rDNA o celkovém objemu reakce 50 μl

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Použitý objem [μl]
Phusion pufr	5x	1x	10
Phusion polymeráza	2 U/ μl	2U/100 μl	0,5
PCR produkt			0,5
dNTPs - dTTP	2 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	5
dTTP	1 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	7,5
Aminoallyl-dUTP-Cy5	1 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	2,5
Primer T3	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	5
Primer T7	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	5
H ₂ O			14

4.4.3.3 Příprava sondy Radka 5 a Radky 6

Nepřímě značené sondy Radka 5 a Radka 6, které jsou specifické pro A genom *Musa acuminata* (Valárik *et al.*, 2002), byly připraveny pomocí PCR reakce, jejíž pipetovací schéma je popsáno níže v tabulce 7. Sonda Radka 5 byla připravena značením DNA klonu *Radka 5* s biotin-16-dUTP. DNA klon *Radka 6* byl značen pomocí digoxigenin-11-dUTP. Celkový objem reakce činil 20 μl .

Tabulka 7: Rozpis PCR reakční směsi pro přípravu sond Radka 5 a Radka 6 o celkovém objemu reakce 20 μl

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Použitý objem [μl]
Pufr+ (s MgCl ₂)	10x	1x	2
směs dNTPs s digoxigenin-11-dUTP/ biotin-16-dUTP	2 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	2
Primery (T3 + T7)	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4
DNA klon <i>Radka5</i> / DNA klon <i>Radka6</i>	100x		1
<i>Taq</i> polymeráza	5U/ μl	2U/100 μl	0,08
H ₂ O			14,52

PCR reakce probíhala při podmínkách uvedených v předešlé kapitole 4.4.3.1 (tabulka 3). Byla provedena elektroforéza v 1,2% agarózovém gelu, aby byla ověřena úspěšnost reakce. Následovalo přečistění sondy pomocí PureLink PCR Purification Kitu.

4.4.4 Příprava nových sond specifických pro genom banánovníků ze sekce *Australimusa*

Na základě *in silico* analýzy párových Illumina čtení tří druhů banánovníku sekce *Australimusa* (Hřibová, nepublikováno) pomocí programové pipeline RepeatExplorer (Novák *et al.*, 2013) byly mimo jiné identifikovány tandemově uspořádané sekvence, které byly v rámci bakalářské práce blíže charakterizovány a využity pro cytogenetické mapování.

4.4.4.1. Izolace a stanovení koncentrace genomové DNA

Ve skleníku byl ustržěn mladý svinutý list banánovníku a pomocí pinzety opatrně ponořen do tekutého dusíku. Rostlinný materiál byl na noc přemístěn do hluboko mrazícího boxu (-80 °C). Dalším krokem bylo vysušení listu mrazem v lyofilizátoru při přibližně -108 °C po dobu 2 dnů. Do 2ml mikrozkušavky byly vloženy dvě skleněné homogenizační kuličky a lyofilizovaný rostlinný materiál nastříhaný na drobné části. Následně byl materiál homogenizován na prášek pomocí oscilačního mlýnu po dobu 7 minut při 27 otáčkách za sekundu.

Genomová DNA byla izolována za využití Invisorb® Spin Plant Mini kitu. K homogenizovanému materiálu bylo přidáno 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy S. Suspenze byla řádně protřepána na třepačce a následně inkubována ve vodní lázni po dobu 30 minut při 65 °C. Veškerý obsah lyzační směsi byl přemístěn na kolonku Prefilter umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. K filtrátu bylo napipetováno 200 µl pufru A. Suspenze byla protřepána na třepačce a přepipetována na kolonku Spin Filter. Po inkubaci po dobu 1 minuty následovala centrifugace při 11 000 rpm po dobu 2 minut. Filtrát byl vylit na buničitou vatu a kolonka Spin Filter s navázanou DNA byla zpět nasazena na sběrnou mikrozkušavku. Na kolonku Spin Filter bylo napipetováno 550 µl promývacího pufru I. Opět následovala centrifugace při 11 000 rpm po dobu 1 minuty a vylití filtrátu na buničitou vatu. Kolonka Spin Filter byla vsazena zpět do sběrné mikrozkušavky a byla dvakrát promyta 550 µl promývacího pufru II s následnou centrifugací při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Po odstranění filtrátu byla kolonka Spin Filter centrifugována při 11 000 rpm po dobu 4 minut k odstranění zbytkového pufru. Posledním krokem izolace genomové DNA byla eluce. Kolonka Spin Filter byla nasazena do čisté 1,5ml mikrozkušavky a na střed filtru bylo napipetováno 100 µl elučního pufru předeřátého na 65 °C. Po třiminutové inkubaci při pokojové teplotě následovala centrifugace při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Filtrát obsahoval izolovanou genomovou DNA.

Kvalita izolované genomové DNA byla ověřena elektroforeticky v 1,2% agarózovém gelu. Koncentrace a čistota izolované DNA byla změřena na fluorometru Qubit 3 a následně byla k dalšímu použití uchována v -20 °C.

4.4.4.2 PCR amplifikace nových tandemových repetití identifikovaných v genomu zástupců sekce Australimusa

Vyizolovaná genomová DNA deseti genotypů banánovníku (ITC 0079, ITC 0539, ITC 0614, ITC 0618, ITC 0854, ITC 0917, ITC 0927, ITC 0956, ITC 1021 ITC 1213) byla zředěna deionizovanou vodou na $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a sloužila jako templát pro PCR amplifikaci, dále bylo použito osm kombinací primerů, které jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Seznam použitých primerů specifických pro genom sekce Australimusa

Název primeru	Sekvence
0614 52 (L + R)	CCCCCACTTAAACGACTTGA GGTTGATAGGCCAAAACGAA
1021 38 (L + R)	GATGCTCGGCAACGCTAC CAGTGAAACGCCGAACGTA
1021 45 (L + R)	TCACCGTGACATCCTTGAGA TCTGCTAAGCCGGTTTTGTT
CL 33/3 (L + R)	CGTATATGCTGGGCTTCGTT CACACTCCCGTGCCTTTAAT
Fei 72 (L + R)	CCCCCACTTAAACGACTTGA GGTTGATAGGCCAAAACGAA
Fei 80 (L + R)	AGGACCAGTCCATTCATGC GTGAACTCGGGCACAAATG
Fei 90 (L + R)	TGAAGGGAAAATTAGGGGAAA AGGTTGATGGCGGGTAGTTT
Fei 91 (L + R)	TTTGCCATGAATCCGAAA TTTCGGATTCATGGCAA

PCR reakce byla pipetována podle tabulky 9, přičemž objem reakce činil 20 μl .

Tabulka 9: Reakční směs pro PCR amplifikaci úseků specifických pro Australimusa o celkovém objemu reakce 20 μl

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem na jednu reakci [μl]
Pufr 10x bez MgCl_2	10x	1x	2
MgCl_2	$25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,8
<i>Taq</i> polymeráza	5U/ μl	2U/100 μl	0,08
dNTPs	$10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	$200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,4
H_2O			15,3
DNA			1
Primery (tabulka 8)	$50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,4

Reakční směs byla pipetována celkem do 80 jamek 96-jamkové desky, po důkladném protřepání na třepače byla směs amplifikována v termocykléru nastaveném podle tabulky 3 výše s rozdílem kratší elongace, která byla nastavena na 30s. Přítomnost PCR produktu byla ověřena s využitím elektroforetické separace v 1,2% agarózovém gelu. PCR produkt byl následně použit k sekvenční analýze.

4.4.4.3 Přečištění PCR produktů a sekvenování

PCR produkty získané v předešlé kapitole (4.4.4.2) byly enzymaticky přečištěny pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems). Reakční směs byla připravena podle tabulky 10 o objemu 7 μ l a následně inkubována v termocykléru podle následujícího programu: 30 minut při 37 °C a 20 minut při 80 °C.

Tabulka 10: Přečištění PCR produktu o celkovém objemu reakce 7 μ l

Chemikálie	Použitý objem [μ l]
PCR produkt	3
exonukleáza I (Exo)	0,05
alkalická fosfatáza (SAP)	0,5
Pufr P ⁺	3,45

Přečištěný produkt byl sekvenován pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems). Reakční směs byla připravena podle tabulky 11 o celkovém objemu 10 μ l.

Tabulka 11: Reakční směs pro sekvenční reakci o celkovém objemu reakce 10 μ l

Chemikálie	Množství na jednu reakci
Sekvenční pufr 5x	1 x (1,5 μ l)
BIG DYE roztok	0,5 μ l
H ₂ O	4 μ l
Primer (tabulka 8)	10 μ mol \cdot l ⁻¹ (1 μ l)
Přečištěný PCR produkt	30 ng (3 μ l)

Reakce byla pipetována do 96-jamkové desky firmy ABI a protřepána na třepače. Amplifikace probíhala v termocykléru, který byl nastaven podle tabulky 12.

Tabulka 12: Teplotní a časový profil sekvenační reakce

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	5 min	1
Denaturace	96	10 s	
Nasedání primerů	50	5 s	60
Elongace	60	4 min	
Ukončení reakce	4		

Sekvenační reakce byla přečištěna pomocí magnetických kuliček Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter), dle protokolu udávaného výrobcem. Informace o pořadí nukleotidů v sekvencích byla získána kapilární elektroforézou na ABI 3730xl DNA analyzátoru (96-kapilárový; Applied Biosystems) a generované sekvence byly dále analyzovány.

4.4.4.4 Bioinformatická analýza sekvenačních dat

Sekvenační data byla editována pomocí programu Trev, který je součástí programového balíku Staden Package v2.0 (<https://sourceforge.net/projects/staden/>). Sekvence byly uloženy ve formátu fasta.

Sekvence jednotlivých typů tandemových repetice byly společně se sekvencí rekonstruovanou z Illumina sekvenačních čtení tří zástupců sekce Australimusa (Hříbová, nepublikováno) použity pro mnohočetné přiřazení (tzv. multiple alignment) s cílem identifikovat míru homologie sekvencí získaných z různých genotypů. Pro multiple alignment byl použit program MUSCLE (Edgar, 2004), který je součástí programového balíku Seaview v5.0.5 (Gouy *et al.*, 2010).

4.4.4.5 Příprava sond specifických pro genom banánovníků ze sekce Australimusa

Osm nepřímo značených sond specifických pro genom banánovníků patřících do rodu *Musa*, sekce Australimusa, bylo připraveno dvěma koly PCR reakce. Seznam osmi použitých primerů viz tabulka 8. První kolo PCR reakce bylo pipetováno podle níže uvedené tabulky 13 o celkovém objemu 20 μ l.

Tabulka 13: Rozpis PCR reakční směsi pro amplifikaci genomové DNA položky ITC1716 s primery specifickými pro Australimusa o celkovém objemu reakce 20 μ l.

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem na jednu reakci [μ l]
Puf+ (s MgCl ₂)	10x	1x	2
<i>Taq</i> polymeráza	5U/ μ l	2U/100 μ l	0,08
dNTPs	10 mmol·l ⁻¹	200 μ mol·l ⁻¹	0,4
DNA – ITC1716	50 ng· μ l ⁻¹	25 ng· μ l ⁻¹	1
H ₂ O			16,12
Primery (L+R)	50 μ mol·l ⁻¹	1 μ mol·l ⁻¹	0,4

Připravená reakční směs byla vložena do termocykléru nastaveného dle níže uvedené tabulky 14. Po PCR amplifikaci byla přítomnost produktu ověřena elektroforetickou separací na 1,2% agarózovém gelu.

Tabulka 14: Teplotní a časový profil PCR reakce pro amplifikaci DNA – ITC1716 s primery specifickými pro *Australimusa*

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	50 s	30
Nasedání primerů	56	50 s	
Elongace	72	50 s	1
Závěrečná elongace	72	5 min	
Ukončení reakce	4		

Dále bylo provedeno druhé kolo PCR reakce, kde došlo k fluorescenčnímu značení PCR produktu biotinem nebo digoxigeninem. Celkový objem jedné reakce byl 20 μ l (tabulka 15).

Tabulka 15: Rozpis jedné PCR reakční směsi o objemu 20 μ l pro značení sondy specifické pro *Australimusa*

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Použitý objem [μ l]
Pufr+ (s $MgCl_2$)	10x	1x	2
<i>Taq</i> polymeráza	5U/ μ l	2U/100 μ l	0,25
PCR produkt			2
směs dNTPs s digoxigenin-11-dUTP/ biotin-16-dUTP	2 mmol \cdot l ⁻¹	200 μ mol \cdot l ⁻¹	2
Primery (L+R)	50 μ mol \cdot l ⁻¹	1 μ mol \cdot l ⁻¹	0,4
H ₂ O			13,35

Termocyklér byl nastaven podle již uvedené tabulky 14. Následovalo ověření přítomnosti produktu elektroforetickou separací na 1,2% agarózovém gelu. Připravené sondy byly přečištěny a dále byly použity pro FISH.

4.4.5 Přečištění fluorescenčních sond

Přečištění fluorescenčních sond proběhlo kvůli odstranění neinkorporovaných nukleotidů, čímž se snížilo nespecifické pozadí po hybridizaci sondy s denaturovanou DNA během fluorescenční *in situ* hybridizace. Přečištění bylo provedeno pomocí PureLink PCR Purification Kitu.

K 60 μ l sondy bylo přidáno 240 μ l pufru B2, který obsahoval isopropanol. Roztok byl přepipetován do kolonky PureLink Spin Column, která byla vložena do sběrné mikrozkuřavky a centrifugována při 10 000 RCF po dobu 1 minuty. Filtrát byl vylit na buničičitou vatu. Do kolonky bylo přidáno 650 μ l

promývacího pufru, následovala centrifugace při 10 000 RCF po dobu 1 minuty. Obsah mikrozkušky byl opět vylit na buničitou vatu. Kolonka byla centrifugována při maximální rychlosti po dobu 2–3 minut, aby byla zbavena zbytku promývacího pufru. Kolonka byla vložena do nové sběrné mikrozkušky. Doprořed kolonky bylo napipetováno 50 µl elučního pufru, který byl s kolonkou inkubován 1 minutu. Kolonka byla centrifugována při maximální rychlosti po dobu 2 minut. Mikrozkuška obsahovala přečištěný PCR produkt, tedy sondu, která mohla být ihned využita pro fluorescenční *in situ* hybridizaci nebo skladována při -20 °C.

4.4.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace a fluorescenční mikroskopie

Na podložní sklo s nakapávaným preparátem metafázních chromozomů bylo nanášeno 30 µl hybridizační směsi podle tabulky 16. Hybridizační směs byla přikryta krycím sklíčkem a následně byla spolu s preparátem metafázních chromozomů denaturována při 80 °C po dobu 50 s, v případě post-fixovaného preparátu 90 až 110 s. Po denuraci byl preparát přenesen do vlhké hybridizační komůrky, kde probíhala hybridizace přes noc při 37 °C.

Tabulka 16: Rozpis hybridizační směsi pro celkový objem 30 µl a stringenci 77 %

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Použitý objem [µl]
Formamid	100%	50%	15
SSC (citronan sodný dihydrát)	20x	2x	3
sonda		200–400 ng	1,5–4
Dextran sulfát	50%		Doplnit do výsledného objemu 30 µl

Následující den bylo odstraněno krycí sklíčko a preparát s navázanými sondami byl promyt v kvyetě v roztocích SSC o různých koncentracích při pokojové teplotě nebo ve vodní lázni se zapnutou třepačkou při 42 °C, viz následující tabulka 17.

Tabulka 17: Teplotní a časový profil promývání preparátů po hybridizaci pomocí SSC o různých koncentracích

Počet opakování	Koncentrace SSC	Doba promývání [min]	Teplota
2x	2x SSC	7	42 °C
1x	0,1x SSC	10	42 °C
1x	2x SSC	5	42 °C
2x	4x SSC	7	Pokojová teplota

Po promytí bylo na podložní sklo nanášeno 100 µl 1% blokovacího pufru, sklo bylo překryto parafilmem a inkubováno po dobu 10 minut při pokojové teplotě. V případě, že byly použity sondy značené nepřímým digoxigeninem nebo biotinem, bylo třeba přidat protilátky značené fluoroforem. K 100 µl

1% blokovacího pufru byla přidána protilátka antidigoxigenin-FITC zředěná v poměru 1:200 a nebo streptavidin-Cy3 zředěná v poměru 1:100. Před nanesením protilátek bylo podložní sklo okapáno o buničitou vatu. Protilátky s 1% blokovacím pufrem byly napipetovány na podložní sklo, které bylo opět převrstveno parafilmem a vloženo do vlhké hybridizační komůrky na 1 hodinu při 37 °C.

Po inkubaci bylo podložní sklo třikrát promyto po dobu 5 minut ve 4x SSC ve vodní lázni se zapnutou třepačkou při 42 °C. Na takto připravené podložní sklo bylo přidáno 12 µl Vectashield montovacího média s DAPI a bylo překryto krycím sklíčkem. Preparát byl pozorován na fluorescenčním mikroskopu Axio Imager Z.2 Zeiss vybaveným chlazenou CCD kamerou a příslušnými optickými filtry (Zeiss, Oberkochen, Německo). Fluorescenční signály byly zachyceny na počítači propojeném s mikroskopem pomocí softwaru ISIS 5.4.7 (Metasystems). Dále byly pořízené fotografie zpracovány v programu Adobe Photoshop CC 2019.

5 VÝSLEDKY

5.1 Cytogenetická lokalizace repetitivních sekvencí specifických pro A genom banánovníku a 5S rDNA na metafázních chromozomech A×T hybridních klonů banánovníku

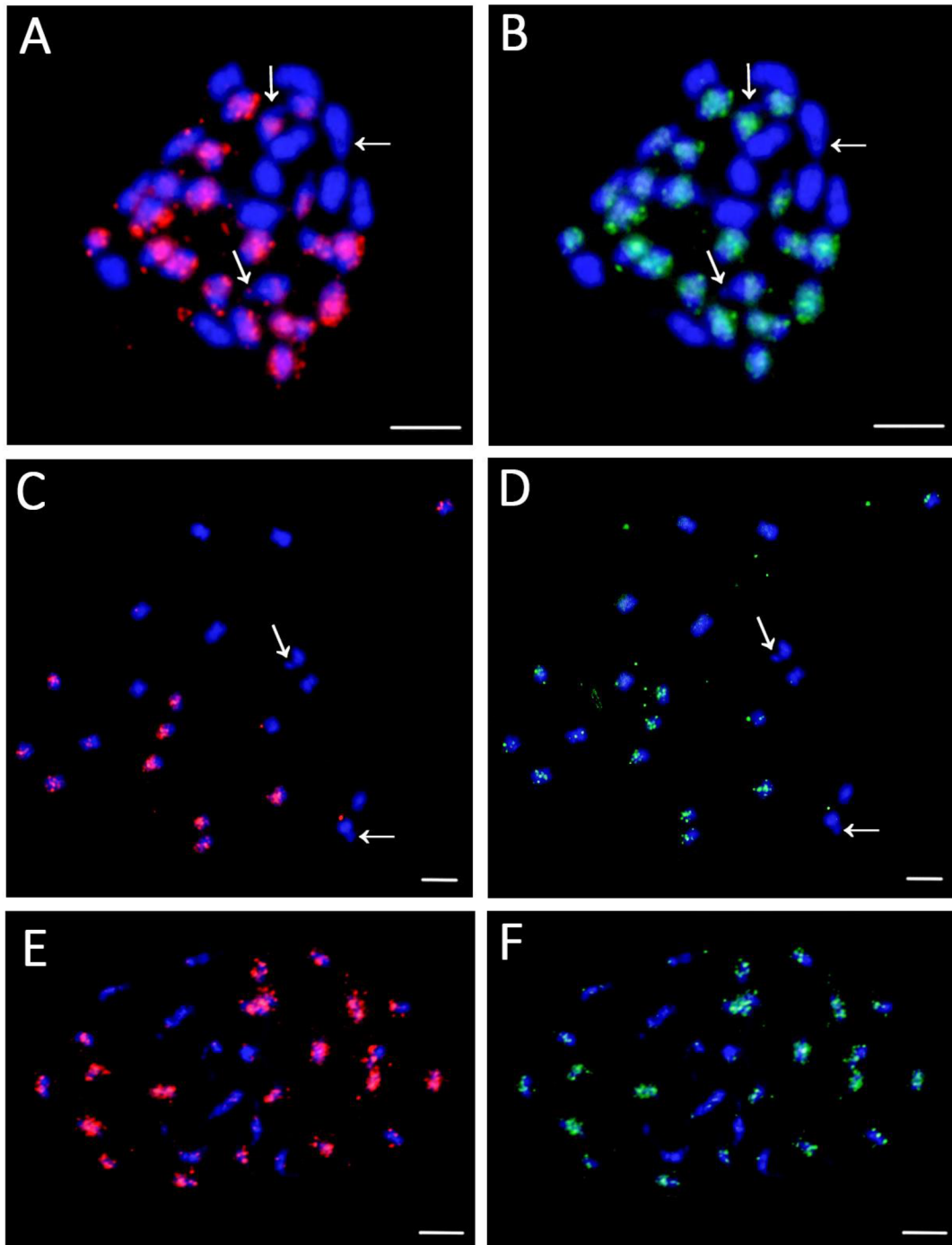
Pro analýzu pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace byly využity mezidruhové klony banánovníku vzniklé přirozeným křížením mezi planě rostoucími diploidními druhy *M. acuminata* ($2n = 2x = 22$, genotyp AA, sekce Eumusa) a *M. textilis* ($2n = 2x = 20$, genotyp TT, sekce Australimusa). Byla analyzována jedna diploidní položka ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT) a dva triploidní klony: ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) a ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT). Z vybraných klonů banánovníku byly připraveny preparáty metafázních mitotických chromozomů metodou nakapávaných protoplastů.

Pomocí polymerázové řetězové reakce byly připraveny fluorescenčně značené sondy. Sondy specifické pro A genom (Radka 5 a Radka 6) byly připraveny značením DNA klonu *Radka 5* a *Radka 6* pomocí biotin-16-dUTP a digoxigenin-11-dUTP. Pro amplifikaci byly použity primery T3 a T7 (kapitola 4.4.3.3). Sonda Radka 2 je specifická ke genu pro 5S rRNA a byla připravena dvěma PCR reakcemi. Během první reakce byl DNA klon *Radka 2* amplifikován a během druhé reakce za využití dUTP-Cy5 fluorescenčně značen. Opět byly použity primery T3 a T7.

Fluorescenční *in situ* hybridizace byla u tří analyzovaných položek provedena nejprve s kombinací sond Radka 5 a Radka 6. Tyto sondy jsou specifické pro A genom. Sondy dle očekávání lokalizovaly na stejných chromozomech a s jejich pomocí se podařily odlišit chromozomy náležící A, resp. T genomu (Obrázek 5).

Základní chromozomové číslo (x) banánovníků ze sekce Eumusa je 11, ze sekce Australimusa 10 (Cheesman, 1947). Jak je patrné z obrázku 5C a 5D, sondy Radka 5 a Radka 6 u diploidního klonu ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT) dle očekávání hybridizovaly na 11 chromozomů, které pocházejí od *M. acuminata* (genom A, sekce Eumusa). Zbývající chromozomy náleží *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa). Podobně je tomu tak u triploidních klonů ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT; obrázek 5E, 5F) a ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT; obrázek 5A, 5B), kdy na 22 chromozomech byl detekován signál sond Radka 5 a Radka 6. Chromozomy bez hybridizovaných sond pak pocházejí z *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa). Chromozomy na obrázku 5E a 5F analyzované položky ITC 0928 jsou méně kondenzované, sondy tak na tyto prometafázní chromozomy hybridizovaly snáz než na plně kondenzované metafázní chromozomy.

Sekundární konstriktce nese geny pro 45S rRNA a odděluje satelit, který je světle barvitelný a je okem rozpoznatelný. Počet sekundárních konstriktcí v genomu odpovídá ploidii rostliny. Nicméně sekundární konstriktci bez použité sondy pro 45S rDNA lze rozpoznat pouze u metafázních mitotických chromozomů. Bohužel se na fluorescenčním mikroskopu nepodařilo nasnímat plně metafázni chromozomy všech analyzovaných položek. Sekundární konstriktce se podařila pozorovat na dvou chromozomech u diploidní položky ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT; obrázek 5E, 5F) a na třech chromozomech triploidního klonu ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT; obrázek 5A, 5B), což odpovídá ploidii rostliny.



Obrázek 5: Cytogenetické mapování sond Radka 5 a Radka 6 specifických pro A genom banánovníku na mitotických metafázních chromozomech A×T hybridních klonů. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI. Měřítko = 5 μ m. Radka 5 – červeně, Radka 6 – zeleně, šipky poukazují na sekundární konstriktci. (A, B) ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT); (C, D) ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT); (E, F) ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT).

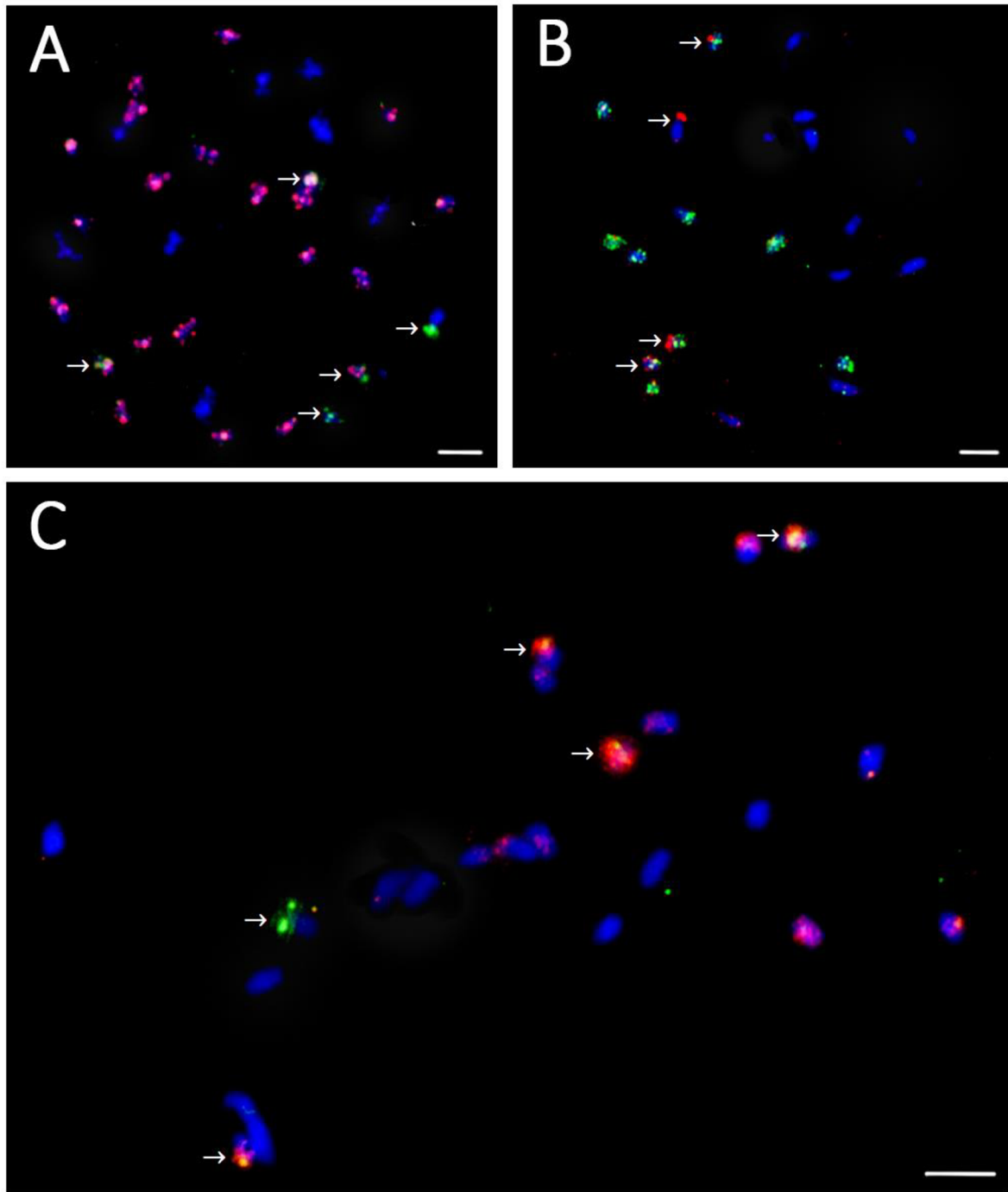
Dále byla analýza stejných položek banánovníku rozšířena o mapování genů pro ribozomální DNA pomocí FISH. Byla použita sonda Radka 2, která je specifická pro 5S rDNA. Lokusy 5S rDNA u diploidní položky ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT; obrázek 6B) byly detekovány na 4 chromozomech, u triploidní položky ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT; obrázek 6C) a ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT; obrázek 6A) na 5 chromozomech (tabulka 18).

Tabulka 18: Genotypy analyzovaných položek banánovníků pomocí FISH

ITC číslo ¹	Název položky	Genomové složení	Počet chromozomů	Ploidie	Počet 5S rDNA lokusů
0854	Umbubu	AT	21	2x	4
0928	Kabulupusa	AAT	32	3x	5
1213	Sar	AAT	32	3x	5

¹Číslo přiděleno centrem International Transit Centre (ITC, Lovaň, Belgie).

Lokusy 5S rRNA genů u diploidní položky ITC 0854 byly pozorovány celkem na čtyřech chromozomech (obrázek 6B), přičemž tato sonda kolokalizuje se sondou Radka 6 na třech chromozomech pocházejících od *M. acuminata* (genom A, sekce Eumusa). Pouze jeden signál 5S rDNA nese chromozom pocházející z *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa). U triploidních položek ITC 0928 a ITC 1213 sonda Radka 2 hybridizovala celkem na 5 chromozomů. 5S rDNA se u položky ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) nacházela na jednom chromozomu z *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa; obrázek 6C). U zbylých čtyř signálů byla pozorována kolokalizace sondy Radka 2 a Radka 5 na stejných chromozomech. Jedná se tedy o chromozomy, které pocházejí od *M. acuminata* (genom A, sekce Eumusa). Triploidní položka ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) se lišila v počtu signálů, kdy kolokalizovala sonda Radka 2 a Radka 5 pouze na třech chromozomech (obrázek 6A). Dva signály tedy náleží chromozomům z *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa). Sekundární konstrikce se nepodařila pozorovat, jelikož na fotografiích nejsou plně kondenzované metafázní mitotické chromozomy (obrázek 6A, 6B). Během praktické části této práce byla připravena také sonda specifická pro lokus 45S rDNA značením *Radka 1* DNA klonu. Bohužel se z časového hlediska nepodařilo tuto sondu cytogeneticky zamapovat na tři zmíněné A x T hybridní klony, a proto není přiložena fotografie, kde by byla sekundární konstrikce fluorescenčně značena.

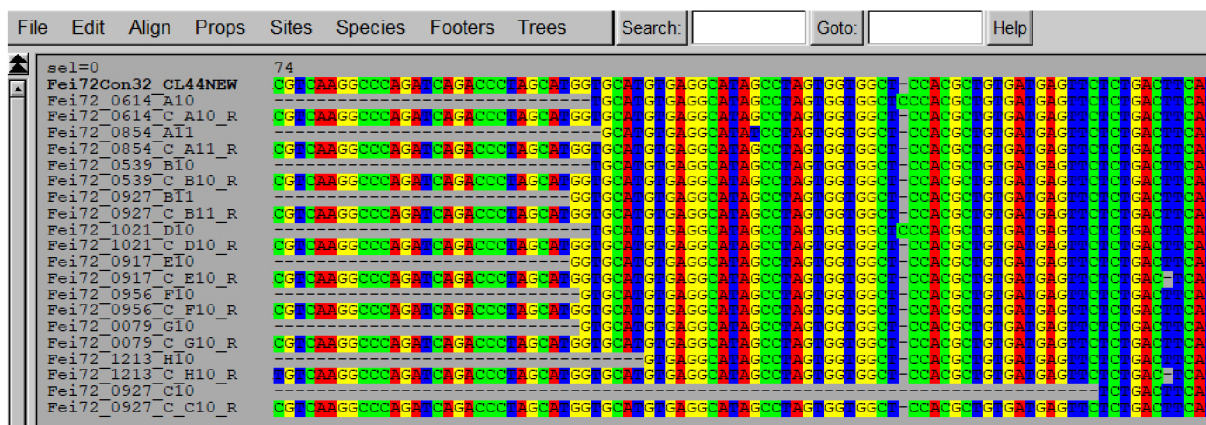


Obrázek 6: Cytogenetické mapování sondy Radka 5 nebo Radka 6 specifických pro A genom banánovníku a sondy Radka 2 specifické pro 5S rRNA geny na mitotických metafázních chromozomech A×T hybridních klonů. Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI. Měřítka = 5 μ m. Šipky znázorňují lokalizaci sondy Radka 2 (A) ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT), Radka 5 – červeně, Radka 2 – zeleně; (B) ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT), Radka 6 – zeleně, Radka 2 – červeně; (C) ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT), Radka 5 – červeně, Radka 2 – zeleně.

5.2 Analýza variability repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku

Analýza variability repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku byla provedena za pomoci 8 kombinací primerů navržených pro repetitivní sekvence specifické pro sekci *Australimusa* (0614 52 L+R, 1021 45 L+R, 1021 38 L+R, Fei 80 L+R, Fei 90 L+R, Fei 72 L+R, CL 33/3 L+R a Fei 91 L+R). Primery byly použity pro PCR amplifikaci genomové DNA položky ITC 1716 ($2n = 3x = 30$, sekce *Australimusa*). V druhé PCR reakci pak došlo k fluorescenčnímu značení PCR produktů. Touto cestou bylo vytvořeno 8 sond značených digoxigenin-11-dUTP nebo biotin-16-dUTP. Úspěšnost PCR amplifikace byla ověřena elektroforetickou separací. Ve dvou případech, kdy byly pro značení PCR produktu použity primery CL 33/3 L+R a Fei 91 L+R, neproběhla amplifikace. Značení bylo opakováno, avšak stále bez výsledku. Sondy, které se podařilo úspěšně naznačit, byly použity pro fluorescenční *in situ* hybridizaci na mitotických metafázních preparátech chromozomů položek ITC 0618 ($2n = 2x = 20$, sekce *Australimusa*), ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) a ITC 1716 ($2n = 3x = 30$, sekce *Australimusa*). FISH byla opakována třikrát, avšak ani v jednom případě nebyl detekován hybridizační signál. Nepomohlo ani přečištění sond a snížení stringence při hybridizaci z 77% na 71%. Snížení stringence zajistí lepší hybridizaci sondy na vyšetřovaný úsek DNA, zároveň je ale snížena specifita sondy pro daný úsek.

DNA vybraných deseti druhů, resp. klonů banánovníku (ITC 0079, ITC 0539, ITC 0614, ITC 0618, ITC 0854, ITC 0917, ITC 0927, ITC 0956, ITC 1021 a ITC 1213) byla amplifikována PCR reakcí s 8 kombinacemi primerů (viz výše), které byly navrženy pro DNA úseky specifické k *M. textilis* (genom T, sekce *Australimusa*). Amplifikovaná DNA byla enzymaticky pomocí exonukleázy a fosfatázy přečištěna a byla provedena sekvenační reakce. Získaná data byla analyzována a upravena v programovém balíku Staden package. V programu SeaView (obrázek 7) byla porovnána homologie sekvencí s referenční sekvencí (tabulka 19 a 20) identifikované pomocí Repeat Explorer analýzy párových Illumina sekvenačních čtení tří zástupců sekce *Australimusa* sestavené dříve v laboratoři Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci (Hřibová, nepublikováno). Vysoká míra homologie mezi původní referenční sekvencí a sekvencemi získanými v této bakalářské práci potvrdila přítomnost vybraných tandemových repetitivních sekvencí v genomu analyzovaných genotypů.



Obrázek 7: Příklad mnohočetného přiřazení pro repetitivní sekvenci Fei 72 provedený pomocí MUSCLE v programovém balíku Seaview v5.0.5

Tabulka 19: PCR amplifikace repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku

Genomová DNA položky ITC ¹	Primery specifické pro určitou tandemovou repetici							
	0614/52	1021/45	1021/38	Fei/80	Fei/90	Fei/72	CL33/3	Fei/91
ITC 0614	A	A	N	N	A	A	N	N
ITC 0539	A	N	N	N	A	A	N	N
ITC 0927	N	N	N	N	A	A	N	N
ITC 1021	A	A	N	N	A	A	N	N
ITC 0917	A	A	N	N	A	A	N	N
ITC 0956	A	A	N	N	A	A	N	N
ITC 0079	A	N	N	N	A	A	N	N
ITC 1213	A	N	N	N	N	A	A	N
ITC 0854	A	A	N	N	A	A	A	N
ITC 0618	A	N	N	N	A	N	N	N

¹Číslo přiděleno centrem International Transit Centre (ITC, Lovaň, Belgie).

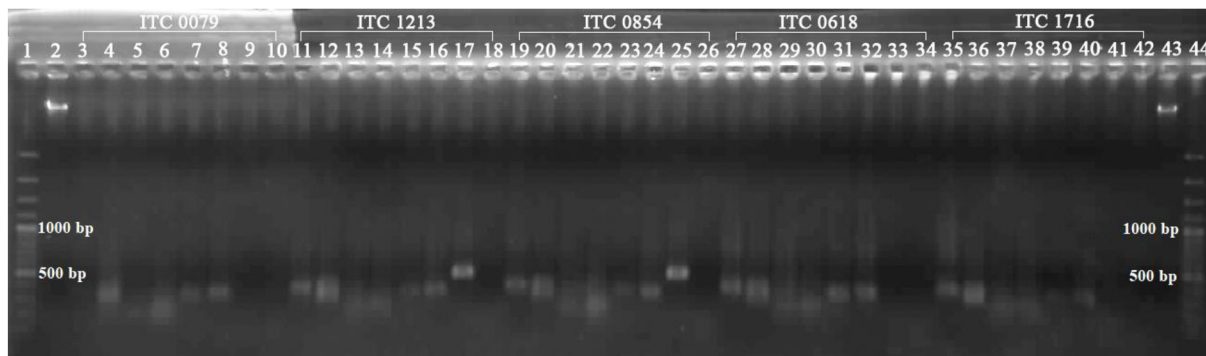
A: Došlo k úspěšné amplifikaci; **N:** Nedošlo k amplifikaci

Tabulka 20: Variabilita repetitivních sekvencí specifických pro T genom banánovníku

Genomová DNA položky ITC ¹	Počet variabilních míst pro primery specifické pro určitou tandemovou repetici							
	0614/52	1021/45	1021/38	Fei/80	Fei/90	Fei/72	CL33/3	Fei/91
ITC 0614	1,4 %	35,2 %	-	-	10,3 %	1,7 %	-	-
ITC 0539	0,7 %	-	-	-	6,3 %	0 %	-	-
ITC 0927	-	-	-	-	3,0 %	0,8 %	-	-
ITC 1021	58,6 %	6,9 %	-	-	4,7 %	7,29 %	-	-
ITC 0917	0 %	2,0 %	-	-	5,1 %	12,4 %	-	-
ITC 0956	3,2 %	2,8 %	-	-	0 %	0 %	-	-
ITC 0079	1,4 %	-	-	-	0 %	0 %	-	-
ITC 1213	2,5 %	-	-	-	-	12,5 %	4,0 %	-
ITC 0854	5,8 %	21,1 %	-	-	0 %	1,0 %	11,0 %	-
ITC 0618	9,8 %	-	-	-	16,2 %	-	-	-

¹Číslo přiděleno centrem International Transit Centre (ITC, Lovaň, Belgie).

Z 10 položek banánovníku zmíněných výše bylo vybráno celkem 5 položek (ITC 0079, ITC 0618, ITC 0854, ITC 1213 a ITC 1716), které jsou uchovávány ve skleníku a bylo tak možné odebrat jejich kořinky pro přípravu suspenzí protoplastů a následně preparátů metafázních mitotických chromozomů pro FISH analýzu. Znova byla provedena PCR reakce za využití genomové DNA těchto pěti druhů, resp. klonů banánovníku s 8 primery navrženými pro repetitivní sekvence specifické pro T genom banánovníku. Účelem této PCR amplifikace bylo zjistit, zda-li je daná DNA amplifikována s použitím příslušného primeru či nikoliv (obrázek 8) a zda ji tedy lze fluorescenčně naznačit a použít pro FISH.



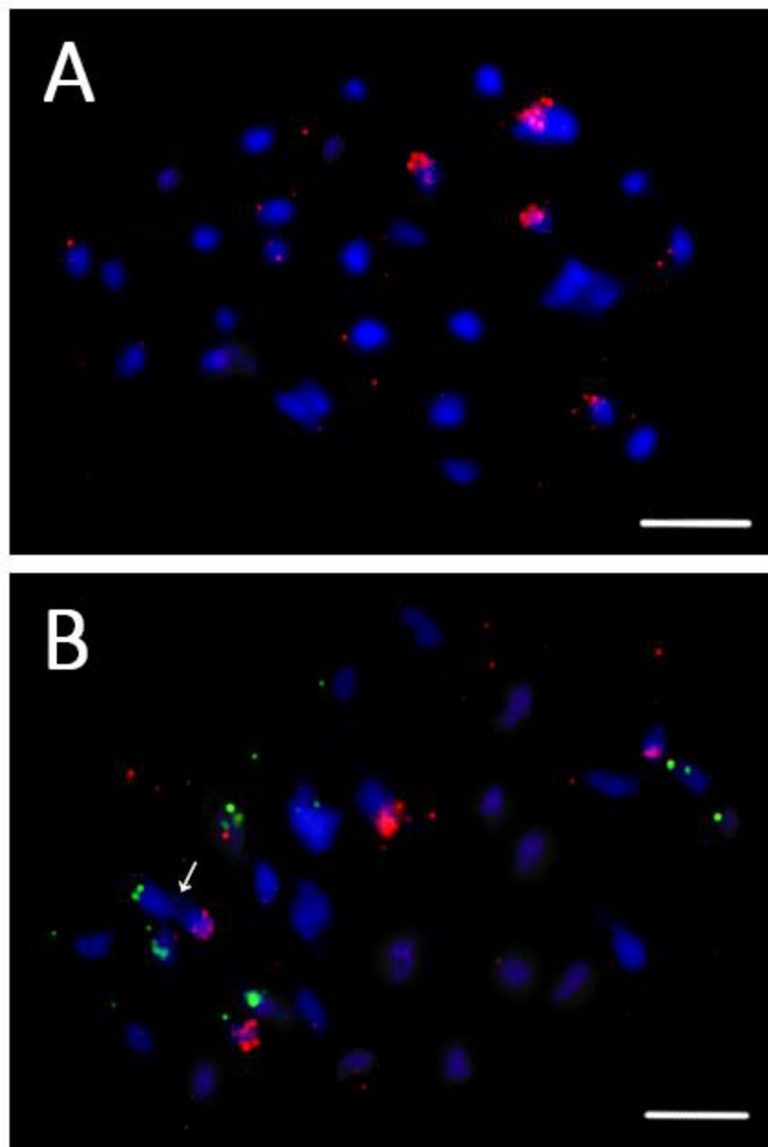
Obrázek 8: Elektroforetická analýza PCR produktů získaných amplifikací vybraných vzorků izolované genomové DNA s osmi primery navrženými pro tandemově organizované repetitivní sekvence identifikované z Illumina sekvenačních dat zástupců sekce Australimusa (Hřibová, nepublikováno). PCR produktu byly nanесeny v množství 1 μ l.

1 a 44: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus; **2** – standard (λ DNA, 100 ng/ μ l); **43:** standard (λ DNA, 50 ng/ μ l); **3–10:** PCR amplifikace s templátovou DNA získanou z ‘*Musa textilis*’ ITC 0079; **11–18:** PCR amplifikace s templátovou DNA získanou z ‘Sar’ ITC 1213; **19–26:** PCR amplifikace s templátovou DNA získanou z ‘Umbubu’ ITC 0854; **27–34:** PCR amplifikace s templátovou DNA získanou z ‘*Musa pekelii* ssp. angustigemma’ ITC 0618; **35–42:** PCR amplifikace s templátovou DNA získanou z ‘Tongkat Langit Papua’ ITC 1716. Každý genotyp byl amplifikován s primery specifickými pro tandemovou repetici 0614/52 (**3, 11, 19, 27, 35**), 1021/45 (**4, 12, 20, 28, 36**), 1021/38 (**5, 13, 21, 29, 37**), Fei80 (**6, 14, 22, 30, 38**), Fei90 (**7, 15, 23, 31, 39**), Fei72 (**8, 16, 24, 32, 40**), a tandemovou repetici CL 33/3 (**9, 17, 25, 33, 41**) a Fei/91 (**10, 18, 26, 34, 42**).

Na základě výsledků ze Sangerova sekvenování byly vybrány tandemové repetice, které se amplifikovaly u většího množství vybraných genotypů (CL 33/3, Fei 80 a Fei90) a které byly následně cytogeneticky mapovány na vybrané zástupce sekce Australimusa. Pro přípravu cytogenetických sond byla amplifikována genomová DNA položek ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT) a ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) za použití primerů CL 33/3 L+R, Fei 80 L+R a Fei 90 L+R. Byly vytvořeny 3 fluorescenčně značené sondy. Přítomnost PCR produktu byla potvrzena elektroforetickou separací a takto připravené sondy byly využity k FISH na preparátech mitotických metafázních chromozomů položek ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) a ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT). Hybridizační signály byly zaznamenány pouze u jedné sondy s názvem CL 33/3 na preparátu mitotických metafázních chromozomů položky ITC 1213 ($2n = 3x = 32$,

genotyp AAT; obrázek 9). Zbylé sondy byly přečištěny, avšak ani poté nebyl detekován žádný signál. FISH analýza byla provedena pouze dvakrát, tudíž mohlo dojít k chybám během FISH procedury nebo se repetitivní sekvence v genomu nachází v příliš nízkém počtu kopií, aby byly detekovány pomocí metody FISH.

Tandemová repetice CL 33/3 byla detekována na 4 chromozomech triploidního klonu 'Sar' ITC 1213. Následně byla provedena FISH s repeticí CL 33/3 v kombinaci se sondou Radka 2 specifickou pro 5S rRNA geny (obrázek 9B). Sonda Radka 2 hybridizovala na pěti chromozomech. Byla pozorována kolokalizace sondy Radka 2 a CL 33/3 na jednom chromozomu (obrázek 9B, označeno šípkou).



Obrázek 9: Cytogenetické mapování sondy CL 33/3 – repetitivní sekvence specifické pro T genom banánovníku na mitotických metafázních chromozomech A×T hybridního klonu ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT). Chromozomy byly vizualizovány pomocí DAPI. Měřítko = 5 μm . (A) ITC 1213, CL 33/3 – červeně; (B) ITC 1213, CL 33/3 – červeně, Radka 2 – zeleně.

6 DISKUSE

Cílem první části této bakalářské práce bylo provést cytogenetickou analýzu pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím sond specifických k *M. acuminata* (genom A) a pomocí nich odlišit A a T genom banánovníku. K analýze byly použity mezidruhové klony banánovníku vzniklé přirozeným křížením mezi planě rostoucími druhy *M. acuminata* (genom A, sekce Eumusa) a *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa). Tyto druhy jsou fylogeneticky vzdáleně příbuzné. Byla analyzována jedna diploidní položka ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT) a dva triploidní klony: ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) a ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT). Jako sondy byly použity fluorescenčně značené klony *Radka 5* a *Radka 6*. Jedná se o tandemově organizované repetitivní sekvence homologní s repetitivním elementem *M. acuminata*. Tyto klony lokalizují na všechy chromozomy *M. acuminata* v (peri)centromerické oblasti (Valárik *et al.*, 2002). Po FISH s využitím sondy *Radka 5* a *Radka 6* na metafázních mitotických chromozomech diploidní položky ITC 0854 byly zaznamenány signály na 11 chromozomech, u triploidních klonů ITC 0928 a ITC 1213 pak na 22 chromozomech.

Ve studii D'Hont *et al.* (2000) byl odlišen A a T genom u mezidruhových A x T hybridů pomocí genomové *in situ* hybridizace. Jako sonda byla využita genomová DNA z *M. acuminata* ($2n = 2x = 22$, genom A) značena pomocí FITC, a genomová DNA z *M. augustigemma* ($2n = 2x = 20$, genotyp TT) značena pomocí Texas Red. Sondy byly použity pro GISH na metafázní mitotické chromozomy triploidního klonu 'Karoína' ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT). 22 chromozomů bylo přiřazeno k *M. acuminata* a 10 chromozomů k sekci Australimusa.

FISH analýza dále byla obohacena o mapování genů pro ribozomální RNA. Pro analýzu byly použity stejné položky banánovníku a jako sonda byl použit fluorescenčně značený klon s názvem *Radka 2*, který je homologní s 5S rDNA genem rýže (Valárik *et al.*, 2002). Geny pro ribosomální RNA (rRNA) jsou tandemově se opakující sekvence, které jsou rozlišovány na 45S rDNA a 5S rDNA. Tyto vysoce konzervované geny se běžně vyskytují v rostlinách, kde se úspěšně podařily mapovat. Příkladem je pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmen (*Hordeum vulgare*) (Mukai *et al.*, 1990; Leitch *et al.* 1992).

Po FISH se sondou *Radka 2* (5S rDNA) byly u diploidního klonu ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT) pozorovány 4 chromozomy nesoucí signál. Stejný počet lokusů u klonu ITC 0854 pozorovala ve své studii také Čížková *et al.* (2013). V této studii byl lokus pro 5S rDNA lokalizován na 4 chromozomech diploidních položek *M. acuminata* 'Long Tavoy' (ITC 0283, genotyp AA), *M. acuminata* 'TuuGia' (ITC 0610, genotyp AA), *M. acuminata* 'Maia Oa' (ITC 0728, genotyp AA), dále na 6 chromozomech *M. acuminata* 'Pahang' (ITC 1511, genotyp AA) a 8 chromozomech *M. acuminata* 'Calcutta 4' (ITC 0249, genotyp AA). Toto pozorování dokazuje vysokou variabilitu v počtu chromozomů

nesoucích 5S rDNA (Čížková *et al.*, 2013). Variabilita v počtech lokusů nesoucích 5S rDNA v rámci této studie byla pozorována při porovnání diploidního klonu ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT), který po FISH hybridizoval na 4 chromozomy, a triploidních klonů ITC 0928 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) a ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT), které hybridizovaly na 5 chromozomech. Pravděpodobně došlo ke ztrátě lokusů při vzniku hybridů, tj. při přeuspořádání genomu, kdy vznikají chromozomální přestavby.

Jednotka 45S rDNA, která se nachází v oblasti sekundární konstriktce, byla analyzována bez využití fluorescenčně značených sond. Sekundární konstriktce odděluje satelit, který se nachází na krátkém raménku chromozomů a je okem rozpoznatelný. Počet lokusů nesoucích 45S rDNA je v genomu banánovníku oproti 5S rDNA konstantní a odpovídá ploidii rostliny. To bylo pozorováno hned v několika studiích, přičemž u všech diploidních druhů byly pozorovány dva lokusy nesoucí 45S rDNA a tři lokusy u triploidních druhů (Osuji *et al.*, 1998; Čížková *et al.*, 2013; Němečková *et al.*, 2018; Šimoníková *et al.*, 2019). Stejně výsledky byly pozorovány i v rámci této práce, kdy u diploidního klonu ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT) byly zaznamenány 2 lokusy nesoucí 45S rDNA a 3 lokusy u triploidního klonu ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT). Získané výsledky potvrzují, že počet 45S rDNA lokusů odpovídá ploidii banánovníku.

Druhá část této studie byla zaměřena na molekulární analýzu nových repetitivních sekvencí specifických pro sekci Australimusa. Pracovalo se s celkem 8 primery (tabulka 8, kapitola 4.4.3.1), které byly navrženy jako potencionálně specifické pro genom *M. Textilis* (genom T, sekce Australimusa). Primery byly využity pro PCR amplifikaci deseti vybraných genotypů banánovníku ze sekce Australimusa (ITC 0079, ITC 0539, ITC 0614, ITC 0618, ITC 0854, ITC 0917, ITC 0927, ITC 0956, ITC 1021 ITC 1213). Následně byla provedena sekvenační analýza, na základě které byly vybrány tandemové repetice (CL 33/3, Fei 80 a Fei90), které se amplifikovaly u většího množství vybraných genotypů a které byly následně fluorescenčně naznačeny a mapovány pomocí FISH na vybrané zástupce sekce Australimusa. Hybridizační signály byly zaznamenány pouze u jedné sondy s názvem CL 33/3, která byla připravena PCR amplifikací genomové DNA položky ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT) pomocí kombinace primerů CL 33/3, a byla značena haptenem (biotin-16-dUTP). Po FISH byly pozorovány signály na 4 chromozomech na preparátu mitotických metafázních chromozomů položky ITC 1213 ($2n = 3x = 32$, genotyp AAT). Čížková *et al.* (2013) také mapovala satelit CL 33/3 na mezidruhovém klonu z *M. acuminata* (genom A, sekce Eumusa) a *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa), konkrétně se jednalo o diploidní klon ITC 0854 ($2n = 2x = 21$, genotyp AT). U této položky byly po FISH pozorovány 2 signály.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést cytogenetickou a molekulární analýzu u vybraných mezidruhových klonů banánovníku, které vznikly přirozeným křížením mezi planě rostoucími druhy *M. acuminata* a *M. textilis*, a přispět tak ve znalostech jejich původu a struktury genomu.

V první části byly pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace mapovány sondy Radka 5 a Radka 6 specifické pro A genom banánovníku a sonda Radka 2 specifická pro 5S rDNA na mitotických metafázních chromozomech. Pro analýzu byl použit jeden diploidní a dva triploidní A×T hybridní klony. S použitím sond Radka 5 a Radka 6, které jsou specifické pro A genom banánovníku, se podařilo odlišit chromozomy, které pocházejí z *M. acuminata* (genom A, sekce Eumusa) od chromozomů, které pocházejí z *M. textilis* (genom T, sekce Australimusa). Dále byla za pomoci sondy pro lokus 5S rDNA analýza rozšířena o mapování ribozomálních genů.

Druhá část práce byla zaměřena na molekulární analýzu nových repetitivních sekvencí specifických k sekci Australimusa. Byla provedena sekvenační analýza deseti vybraných genotypů banánovníku ze sekce Australimusa za využití osmi kombinací primerů navržených jako potenciálně specifické k *M. Textilis* (genom T, sekce Australimusa). Po vyhodnocení bioinformatických dat získaných sekvenováním byly vybrány tandemové repetice, které byly úspěšně amplifikovány u většiny vybraných genotypů a následovalo jejich fluorescenční značení a cytogenetické mapování metodou FISH na mitotických metafázních chromozomech položek ze sekce Australimusa. Tandemová repetice s názvem CL 33/3 jako jediná úspěšně hybridizovala na chromozomy A×T hybridního triploidního klonu 'Sar' ITC 1213. Práce ukázala na nové potenciální repetice specifické pro sekci Australimusa, které by mohly být předmětem dalšího studia a napomoci v porozumění původu a struktury genomu banánovníku (*Musa*).

8 LITERATURA

- Albert P. S., Zhang T., Semrau K., Rouillard J. M., Kao Y. H., Wang C. R., Danilova T. V., Jiang J., Birchler J. A. (2019): Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(5): 1679–1685.
- Ambros P.F., Matzke M.A., Matzke A.J.M. (1986): Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 94: 11–18.
- Anamthawat-Jónsson K., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S. (1993) Behavior of parental genomes in the hybrid *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum*. *Journal of Heredity* 84(1): 78-82.
- Appels R., Gerlach W. L., Dennis E. S., Swift H., Peacock W. J. (1980): Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma*: 78(3), 293–311.
- Argent G. C. G. (1976): The wild bananas of Papua New Guinea. *Notes R. Bot. Gard. Edinburgh*: 35 (1), 77–114
- Balint-Kurti P. J., Clendennen S. K., Doleželová M., Valárik M., Doležel J., Beetham P. R., May G. D. (2000): Identification and chromosomal localization of the monkey retrotransposon in *Musa* sp. *Molecular and General Genetics MGG*, 263(6), 908–915.
- Barre P., Layssac M., D’Hont A., Louarn J., Charrier A., Hamon S., Noirot M. (1998): Relationship between parental chromosomal contribution and nuclear DNA content in the coffee interspecific hybrid *C. pseudozanguebariae* × *C. liberica* var “dewevrei.” *Theoretical and Applied Genetics*: 96(2), 301–305.
- Bartoš J., Alkhimova O., Doleželová M., De Langhe E., Doležel J. (2005): Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. *Cytogenetic and Genome Research*: 109(1-3), 50–57.
- Bickmore W. A. (2001): Karyotype Analysis and Chromosome Banding. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Brammer S. P (2013): Genomic in situ hybridization in Triticeae: a methodological approach. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. In Tech.
- Braz G. T., He L., Zhao H., Zhang T., Semrau K., Rouillard J. M., Torres G. A., Jiang J. (2018): Comparative Oligo-FISH Mapping: An Efficient and Powerful Methodology To Reveal Karyotypic and Chromosomal Evolution. *Genetics* 208(2): 513–523.

- Čížková J., Hříbová E., Humplíková L., Christelová P., Suchánková P., Doležel J. (2013): Molecular Analysis and Genomic Organization of Major DNA Satellites in Banana (*Musa* spp.). *PLoS ONE*: 8(1), e54808.
- Čížková J., Hříbová E., Christelová P., Van den Houwe I., Häkkinen M., Roux N., Swennen R., Doležel J. (2015): Molecular and Cytogenetic Characterization of Wild *Musa* Species. *PLOS ONE*: 10(8), e0134096.
- D'Hont A., Denoeud F., Aury J.-M., Baurens F. C., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da Silva C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lenggellé J., Rodier-Goud M., Alberti A. (2012): The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*: 488(7410), 213–217.
- D'Hont A., Paget-Goy A., Escoute J., Carreel F. (2000): The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*: 100(2), 177–183.
- do Vale Martins L., de Oliveira Bustamante F., da Silva Oliveira A. R., da Costa A. F., de Lima Feitoza L., Liang Q., Zhao H., Benko-Iseppon A. M., Muñoz-Amatriaín M., Pedrosa-Harand A., Jiang J., Brasileiro-Vidal A. C. (2021): BAC- and oligo-FISH mapping reveals chromosome evolution among *Vigna angularis*, *V. unguiculata*, and *Phaseolus vulgaris*. *Chromosoma* 130(2-3): 133–147.
- do Vale Martins L., Yu F., Zhao H., Dennison T., Lauter N., Wang H., Deng Z., Thompson A., Semrau K., Rouillard J. M., Birchler J. A., Jiang J. (2019): Meiotic crossovers characterized by haplotype-specific chromosome painting in maize. *Nature Communications* 10(1): 4604.
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003): Letter to the editor. *Cytometry*: 51A(2), 127–128.
- Doležel J., Doleželová M., Novák F. J. (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum* 36 (3): 351-357.
- Doležel J., Doleželová M., Roux N., Van den houwe I. (1998): A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa* spp. *Infomusa*: 7:3-4
- Doleželová M., Valárik M., Swennen R., Horry J. P., Doležel J. (1998): Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. *Biologia Plantarum* 41(4): 497–505.
- Dong F., Song J., Naess S. (2000): Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101: 1001–1007.
- Durnam D. M., Gelinás R. E., Myerson, D. (1985): Detection of species specific chromosomes in somatic cell hybrids. *Somatic cell and molecular genetics* 11(6): 571–577.

- Edgar R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*: 32(5), 1792–1797.
- Egger D., Troxler M., Bienz K. (1994): Light and electron microscopic in situ hybridization: non-radioactive labeling and detection, double hybridization, and combined hybridization-immunocytochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 42(6): 815–822.
- Englberger L., Wills R. B. H., Blades B., Dufficy L., Daniells J. W., & Coyne T. (2006): Carotenoid Content and Flesh Color of Selected Banana Cultivars Growing in Australia. *Food and Nutrition Bulletin*: 27(4), 281–291.
- Ferguson-Smith M. A. (1997): Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications. *European journal of human genetics: EJHG* 5(5)\. 253–265.
- Filiault D.L., Ballerini E.S., Mandáková T. (2018): The *Aquilegia* genome provides insight into adaptive radiation and reveals an extraordinarily polymorphic chromosome with a unique history. *Elife* 7: e36426.
- Gall J. G., Pardue M. L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 63(2): 378–383.
- Gill B. S., Kimber G. (1977): Recognition of Translocations and Alien Chromosome Transfers in Wheat by the Giemsa C-banding Technique I. *Crop Science* 17(2): 264–266.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010): SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution*: 27(2), 221–224.
- Gowen S. R. (1996): Bananas and plantains. Chapman & Hall.
- Gray J. W., Pinkel D., Brown J. M. (1994): Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. *Radiation research* 137(3): 275–289.
- Greilhuber J. (1977): Why plant chromosomes do not show G-bands. *Theoretical and Applied Genetics*: 50(3), 121–124.
- Han Y., Zhang T., Thammaphichai P., Weng Y., Jiang J. (2015): Chromosome-Specific Painting in Cucumis Species Using Bulk Oligonucleotides. *Genetics*: 200(3), 771–779.
- Hanson R. E., Zwick M. S., Choi S., Islam-Faridi M. N., McKnight T. D., Wing R. A., Price H. J., Stelly D. M. (1995): Fluorescent in situ hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* 38(4): 646–651.

- He L., Braz G. T., Torres G. A., Jiang, J. (2018): Chromosome painting in meiosis reveals pairing of specific chromosomes in polyploid *Solanum* species. *Chromosoma* 127(4): 505–513.
- Horry J., Jay M. (1988): Distribution of anthocyanins in wild and cultivated banana varieties. *Phytochemistry*: 27(8), 2667–2672.
- Hou L., Xu M., Zhang T., Xu Z., Wang W., Zhang J., Yu M., Ji W., Zhu C., Gong Z., Gu M., Jiang J., Yu H. (2018): Chromosome painting and its applications in cultivated and wild rice. *BMC plant biology* 18(1): 110.
- Hřibová E., Doležalová M., Doležal J. (2008): Localization of BAC clones on mitotic chromosomes of *Musa acuminata* using fluorescence in situ hybridization. *Biologia Plantarum*: 52(3), 445–452.
- Hřibová E., Neumann P., Matsumoto T., Roux N., Macas J., Doležal J. (2010): Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing. *BMC Plant Biology*: 10(1), 204.
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. (1994): The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*: 371(6494), 215–220.
- Cheesman E.E. (1947): Classification of the bananas. The genus *Ensete* Horan and the genus *Musa* L. *Kew Bull*: 2:97-117.
- Idziak D., Hazuka I., Poliwczak B., Wiszynska A., Wolny E., Hasterok R. (2014): Insight into the karyotype evolution of brachypodium species using comparative chromosome barcoding. *PloS one* 9(3): e93503.
- Jellen E. N., Gill B. S., Cox T. S. (1994): Genomic in situ hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome* 37(4): 613–618.
- Jeridi M., Bakry F., Escoute J., Fondi E., Carreel F., Ferchichi A., D'Hont A., Rodier-Goud M. (2011): Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic in situ hybridization. *Annals of Botany*: 108(5), 975–981.
- Jiang J., Gill B. S. (1994): Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37(5): 717–725.
- Jiang J., Gill B. S. (1994a): Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 2(1): 59–64.

- Jiang J., Gill B. S., Wang G. L., Ronald P. C., Ward D. C. (1995): Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(10): 4487–4491.
- Jin L., Lloyd R. V. (1997): In situ hybridization: Methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*: 11(1), 2–9.
- Kamisugi Y., Furuya N., Iijima K., Fukui K. (1993): Computer-aide automatic identification of rice chromosomes by image parameters. *Chromosome Research*: 1(3), 189–196.
- Karamura E. B., Karamura D. A. (1995): Banana morphology — part II: the aerial shoot. In *Bananas and Plantains* Springer Netherlands: pp. 190–205.
- Kenton A., Parokonny A. S., Gleba Y. Y., Bennett M. D. (1993): Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular & general genetics: MGG* 240(2): 159–169.
- King I., Purdie K., Orford S. (1993): Detection of homoeologous chiasma formation in *Triticum durum* × *Thinopyrum bessarabicum* hybrids using genomic in situ hybridization. *Heredity* 71: 369–372.
- Koo D. H., Zhao H., Jiang J. (2016): Chromatin-associated transcripts of tandemly repetitive DNA sequences revealed by RNA-FISH. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 24(4): 467–480.
- Křivánková A., Kopecký D., Stočes Š., Doležel J., Hříbová E. (2017): Repetitive DNA: A Versatile Tool for Karyotyping in *Festuca pratensis* Huds. *Cytogenetic and genome research* 151(2): 96–105.
- Kubis S. (1998): Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes. *Annals of Botany*: 82, 45–55.
- Lebot V., Aradhya K. M., Manshardt R., Meilleur B. (1993): Genetic relationships among cultivated bananas and plantains from Asia and the Pacific. *Euphytica*: 67(3), 163–175.
- Lee C., Gisselsson D., Jin C., Nordgren A., Ferguson D. O., Blennow E., Fletcher J. A., Morton C. C. (2001): Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *American journal of human genetics* 68(4): 1043–1047.
- Leitch I.J., and Heslop-Harrison J.S. (1992): Physical mapping of the 18s-5.8s-26s rRNA genes in barley by in situ hybridization. *Genome* 35: 10 13 - 10 18.
- Lysák M. A., Doleželová M., Horry J. P., Swennen R., Doležel J. (1999): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*: 98(8), 1344–1350.
- Lysák M. A., Fransz P. F., Ali H. B., Schubert I. (2001): Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 28(6): 689–697.

- MacDaniels L.H. (1947): A study of the Fe'i banana and its distribution with reference to Polynesian migrations. *Bull. Bernic.*
- Martin G., Baurens F. C., Droc G., Rouard M., Cenci A., Kilian A., Hastie A., Doležel J., Aury J. M., Alberti A., Carreel F., D'Hont A. (2016): Improvement of the banana "Musa acuminata" reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatics methods. *BMC Genomics*: 17(1).
- Meng Z., Zhang Z., Yan T., Lin Q., Wang Y., Huang W., Huang Y., Li Z., Yu Q., Wang, J., Wang K. (2018): Comprehensively Characterizing the Cytological Features of *Saccharum spontaneum* by the Development of a Complete Set of Chromosome-Specific Oligo Probes. *Frontiers in plant science* 9: 1624.
- Moore C. M., Best R. G. (2001): Chromosome Preparation and Banding. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- Moore G., Gale M. D., Kurata N., Flavell R. B. (1993): Molecular Analysis of Small Grain Cereal Genomes: Current Status and Prospects. *Nature Biotechnology*: 11(5), 584–589.
- Mukai Y., Endo T. R., Gill B. S. (1990): Physical Mapping of the 5S rRNA Multigene Family in Common Wheat, *Journal of Heredity* 81: 290–295.
- Naranjo T., Roca A., Goicoechea P. G., Giraldez R. (1987): Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* 29(6): 873–882.
- Nederlof P. M., Robinson D., Abuknesha R., Wiegant J., Hopman A. H., Tanke H. J., Raap A. K. (1989): Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10(1): 20–27.
- Němečková A., Christelová P., Čížková J., Nyine M., Van den houwe I., Svačina R., Uwimana B., Swennen R., Doležel J., Hříbová E. (2018): Molecular and Cytogenetic Study of East African Highland Banana. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Novák P., Neumann P., Pech J., Steinhaisl J., Macas J. (2013): RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*: 29(6), 792–793.
- Osuji J. (1997): Identification of the Genomic Constitution of *Musa* L. Lines (Bananas, Plantains and Hybrids) Using Molecular Cytogenetics. *Annals of Botany*: 80(6), 787–793.
- Osuji J. (1998): Molecular Cytogenetics of *Musa* Species, Cultivars and Hybrids: Location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and Telomere-like Sequences. *Annals of Botany* 82(2): 243–248.

- Perrier X., De Langhe E., Donohue M., Lentfer C., Vrydaghs L., Bakry F., Carreel F., Hippolyte I., Horry J. P., Jenny C., Lebot V., Risterucci A. M., Tomekpe K., Doutrelepont H., Ball T., Manwaring J., de Maret P., Denham T. (2011): Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 108(28), 11311–11318.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 9138-9142.
- Pinkel D., Straume T., Gray J. W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(9): 2934–2938.
- Qu M., Li K., Han Y., Chen L., Li Z., Han Y. (2017): Integrated Karyotyping of Woodland Strawberry (*Fragaria vesca*) with Oligopaint FISH Probes. *Cytogenetic and genome research* 153(3): 158–164.
- Rayburn A.L., Gill B.S. (1985): Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity* 76: 78-81.
- Rodrigues J., Viegas W., Silva M. (2017): 45S rDNA external transcribed spacer organization reveals new phylogenetic relationships in *Avena* genus. *PLOS ONE*: 12(4), e0176170.
- Rogers S. O., Bendich A. J. (1987): Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology* 9(5): 509–520.
- Ruban A. S., Badaeva E. D. (2018): Evolution of the S-Genomes in *Triticum-Aegilops* Alliance: Evidences From Chromosome Analysis. *Frontiers in plant science* 9: 1756.
- Shepherd K. (1999): *Cytogenetics of the genus Musa*. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, ISBN: 2-910810-25-9.
- Schaff D. A., Koehler S. M., Matthews B. F., Bauchan G. R. (1990): In situ Hybridization of β -Tubulin to Alfalfa Chromosomes, *Journal of Heredity* 81: 480–483.
- Schubert I., Fransz P. F., Fuchs J., de Jong J. H. (2001): *Methods in Cell Science*: 23(1/3), 57–69.
- Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S., Ananthawat-Jónsson K., Finch R. A., Bennett M. D. (1992): Parental Genome Separation in Reconstructions of Somatic and Premeiotic Metaphases of *Hordeum Vulgare* \times *H. Bulbosum*. *Journal of Cell Science*: 101(1), 13–24.
- Simmonds N.W., Shepherd K. (1955): The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *J. Linn. Soc., Bot.* 55:302-312.

- Danilova T. V., Friebe B., Gill B. S. (2014): Development of wheat single gene FISH map for analyzing homoeologous relationship and chromosomal rearrangements within the triticeae. *Theor. Appl. Genet*: 127 (3), 715–730.
- Simpson P.R., Newman MA., Davies D.R. (1988): Detection of legumin gene DNA sequences in pea by in situ hybridization. *Chromosoma* 96: 454–458.
- Snustad P. D., Simmons M. J., Relichová J., Doškař J., Fajkus J., Hořín P., Knoll A., Kuglík P., Šmarda J., Šmardová J., Veselská R., Vyskot B. (2017): *Genetika*. Masarykova Univerzita.
- Song J., Dong F., Jiang J. (2000): Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome* 43(1): 199–204.
- Song X., Song R., Zhou J., Yan W., Zhang T., Sun H., Xiao J., Wu Y., Xi M., Lou Q., Wang H., Wang X. (2020): Development and application of oligonucleotide-based chromosome painting for chromosome 4D of *Triticum aestivum* L. *Chromosome Research* 28(2): 171–182.
- Stover R. H., Simmonds N.W. (1987): *Bananas*, 3rd edn. London: Longman.
- Šimoníková D., Čížková J., Zoulová V., Christelová P., Hříbová E. (2022): Advances in the Molecular Cytogenetics of Bananas, Family Musaceae. *Plants*: 11(4), 482.
- Šimoníková D., Němečková A., Čížková J., Brown A., Swennen R., Doležel J., Hříbová E. (2020): Chromosome Painting in Cultivated Bananas and Their Wild Relatives (*Musa* spp.) Reveals Differences in Chromosome Structure. *International Journal of Molecular Sciences*: 21(21), 7915.
- Šimoníková D., Němečková A., Karafiátová M., Uwimana B., Swennen R., Doležel J., Hříbová E. (2019): Chromosome Painting Facilitates Anchoring Reference Genome Sequence to Chromosomes In Situ and Integrated Karyotyping in Banana (*Musa* Spp.). *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Valárik M., Bartoš J., Kovářová P., Kubaláková M., de Jong J. H., Doležel J. (2004): High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *The Plant Journal*: 37(6), 940–950.
- Valárik M., Simková H., Hříbová E., Safár J., Doleželová M., & Doležel J. (2002): Isolation, characterization and chromosome localization of repetitive DNA sequences in bananas (*Musa* spp.). *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*: 10(2), 89–100.
- Vilarinhos A. D., Piffanelli P., Lagoda P., Thibivilliers S., Sabau X., Carreel F., D'Hont A. (2002): Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theoretical and Applied Genetics*: 106(6), 1102–1106.
- Wilcox J. N. (1993): Fundamental principles of in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 41(12): 1725–1733.

Wilkinson D.G. (1993): *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. IRL Press—Oxford University Press, New York.

Woo S.S., Jiang J., Gill B.S., Paterson A.H., Wing R.A. (1994): Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* 22(23): 4922-31.

Wu T.L., Kress W.J. (2001): Musaceae. In: Wu, C.Y., Raven, P.H. (eds.) *Flora of China*. Science Press, Beijing: 24:314-318.

Zhang P., Li W., Fellers J., Friebe B., Gill B. S. (2004): BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma* 112(6): 288–299.

Internetové zdroje

Staden package. [online] [navštíveno 24.3.2022] Dostupné z <https://sourceforge.net/projects/staden/>

Biological library. [online] [navštíveno 16.1.2022] Dostupné z www.biolib.cz