

Univerzita Palackého v Olomouci

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2015

Marie Alexandrová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium genomového složení polyploidních košťav
pomocí molekulárně cytogenetických metod**

Bakalářská práce

Marie Alexandrová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2015

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Studium genomového složení polyploidních košťav pomocí molekulárně cytogenetických metod zpracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Davida Kopeckého, Ph.D., a s použitím zdrojů uvedených v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a odborné vedení a dále všem pracovníkům Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. v Olomouci, kteří mi trpělivě pomáhali.

SOUHRN

Trávy patří mezi jedny z nejdůležitějších a nejrozšířenějších rostlin na Zemi. Slouží jako krmivo pro většinu býložravců, a proto jsou velmi důležité v zemědělství. Rod kostřava (*Festuca* sp.), který patří do čeledi *Poaceae*, zahrnuje přes 500 druhů trav, z nichž řada je využívána v pícninářství a trávnickářství. Úroveň ploidie se mezi jednotlivými druhy kostřav liší a kolísá od diploidů, jako je například kostřava luční, přes tetraploidní kostřavu atlaskou, hexaploidní kostřavu obrovskou a kostřavu rákosovitou, dekaploidní poddruh kostřavy rákosovité (*F. arundinacea* subsp. *letourneuxiana*) po dodekaploidní *F. summilusitana*. Cílem mé bakalářské práce bylo stanovení či ověření ploidie kostřav podrodu *Schedonorus* a analýza jejich genomového složení pomocí molekulárně cytogenetické metody genomové *in situ* hybridizace (GISH). První část této práce zahrnuje obecné informace o druzích kostřav, které byly zahrnuty do bakalářské práce. Dále je zde vysvětlena základní problematika týkající se polyploidie a uvedeny příklady studia vybraných allopolyploidních druhů. Teoretická část práce je zakončena výčtem metod, které se uplatňují při studiu polyploidů a mezidruhových kříženců. V další kapitole jsou rozebrány laboratorní postupy, které byly využity v praktické části. První část práce obsahovala stanovení ploidie všech druhů pomocí roztlakových preparátů. Dále jsem využila GISH ke stanovení genomového složení vybraných polyploidních druhů kostřav. Výsledky byly korelovány s již získanými poznatky.

SUMMARY

Grasses are the most important and widely cultivated plant species. Among them, fescues (*Festuca* spp.) provide high quality fodder for livestock, are used for turf and amenity purposes, and play a fundamental role in environment protection. Genus *Festuca* L. is a member of the *Poaceae* family, and includes more than 500 grass species. The level of ploidy varies among *Festuca* species from diploidy to dodecaploidy. Agriculturally the most important species belong to the subgenus *Schedonorus* with majority of species being polyploid. Despite their importance for humankind, the phylogenetic relationships and genomic composition of polyploid taxa are largely unknown.

The aim of this bachelor thesis is review current knowledge on the polyploidy and the methods employed for the molecular analyses of polyploid and especially allopolyploid genomes and provide novel information on the origin and structure of genomes of selected polyploid fescue species and subspecies using genomic in situ hybridization (GISH). For the first time, the genomic composition of two subspecies of tall fescue – *F. arundinacea* subsp. *orientalis* and *F. arundinacea* subsp. *uechtriziana* was revealed. Moreover, GISH results indicated that *F. pratensis* subsp. *apennina* is not autotetraploidy cytotype of meadow fescue (*F. pratensis*), but more likely an allopolyploid. Besides this, the GISH analysis indicated the close relationship of tall fescue (*F. arundinacea*) with its two highly polyploid subspecies – *F. arundinacea* subsp. *atlantigena* and *F. arundinacea* subsp. *letourneuxiana* and also close relationship of *F. mairei* and *F. glaucescens*. Overall, this bachelor thesis provides new information on the genomic relationships and phylogeny of this group of grasses.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Charakteristika významných druhů kostřav	10
2.1.1 <i>Festuca pratensis</i> Huds. (kostřava luční)	10
2.1.1.1 Poddruhy kostřavy luční	11
2.1.2 <i>Festuca gigantea</i> (L.) Vill. (kostřava obrovská).....	12
2.1.3 <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. (kostřava rákosovitá).....	12
2.1.3.1 Poddruhy kostřavy rákosovité	13
2.1.4 <i>Festuca mairei</i> St. Yves (kostřava atlasská).....	13
2.2 Polyploidie	13
2.3 Allopolyploidní druhy vybraných čeledí.....	16
2.3.1 <i>Tragopogon</i> L. (<i>Asteraceae</i> Martinov).....	16
2.3.2 <i>Spartina</i> Schreb. (<i>Poaceae</i> Barnhart)	17
2.3.3 <i>Cardamine</i> L. (<i>Brassicaceae</i> Burnett), <i>Senecio</i> L. (<i>Asteraceae</i> Martinov).....	18
2.3.4 <i>Triticum aestivum</i> L. (<i>Poaceae</i> Barnhart).....	18
2.4 Metody používané k identifikaci hybridů.....	19
2.4.1 Analýza mezerníku ITS	20
2.4.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP).....	21
2.4.3 Diversity Arrays Technology (DArT)	21
2.4.4 Jedno-nukleotidové polymorfizmy (SNP)	22
2.4.5 <i>In situ</i> hybridizace (ISH).....	23
2.4.5.1 Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH)	23
3. CÍLE PRÁCE.....	26
4. MATERIÁL A METODY.....	27
4.1 Materiál.....	27
4.1.1 Rostlinný materiál.....	27

4.1.2	Přístroje	28
4.1.3	Chemikálie, roztoky a komerční kity	29
4.2	Metodika	30
4.2.1	Izolace genomové DNA	30
4.2.2	Měření koncentrace a čistoty DNA	32
4.2.3	Příprava fluorescenčně značených sond pro <i>in situ</i> hybridizaci pomocí Nick translace	32
4.2.4	Příprava kořínků pro roztlkové preparáty	33
4.2.5	Roztlakové preparáty	34
4.2.6	Genomová <i>in situ</i> hybridizace	34
4.2.7	Vyhodnocení experimentu	35
5.	VÝSLEDKY	37
5.1.	Stanovení ploidie	37
5.2.	Genomové složení kostřav	37
6.	DISKUZE	40
7.	ZÁVĚR	42
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	51

1. ÚVOD

Trávy jsou jedny z nejdůležitějších a nejrozšířenějších rostlin na Zemi. Vytvářejí významná společenstva, která se uplatňují především jako luční a pastevní porosty. Tyto porosty jsou důležité v zemědělství, protože slouží jako krmivová základna pro býložravce, především pro skot. Kvalita lučních a pastevních porostů se tedy odráží v celosvětové míře produkce hovězího masa a mléka (Regal et Šindelářová, 1970).

Čeď lipnicovitě (*Poaceae* Barnhart) zahrnuje okolo 10 000 druhů (Messing et al., 2008). Rod kostřava (*Festuca* L.), který patří do této čeledi, je nejpočetnější z podčeledi *Loliinae* a zahrnuje přes 500 druhů trav, které se navzájem značně liší morfologicky. Velkou variabilitu mají i v obsahu genomu a úrovni ploidie. Tato kolísá od diploidů ($2n=2x=14$) až po dodekaploidy ($2n=12x=84$), přičemž velké množství druhů je polyploidních. Kostřavy rostou od holarktické oblasti až po mírné pásmo jižní hemisféry (Catalán et al., 2004). Pro tyto trsnaté vytrvalé trávy jsou typické ploché nebo svinuté listy. Kvetou od jara do léta a květenstvím je nejčastěji hrozen s vícekvětnými klásky nebo lata. Rostou na slunných místech nebo v polostínu (Könemann et al., 2007). Jsou schopné přežít jak sucho, tak i silný mráz a dobře odolávají škůdcům. Slouží především jako pícní trávy ke krmným účelům, ale uplatnění najdou i jako okrasné trávníky. Rod kostřava je rozdělen do devíti podrodů, ze kterých je zemědělsky nejvýznamnější podrod *Schedonorus* P. Beauv. Podrod *Schedonorus* představuje komplexní skupinu kostřav, přičemž většina jeho zástupců je allopolyploidního původu. Úroveň ploidie se různí jak v rámci takto úzké skupiny druhů, tak i mezi jednotlivými poddruhy kostřav (Hand et al., 2010). Mezi zástupce tohoto podrodu můžeme zařadit kostřavu obrovskou, kostřavu atlasskou, dále kostřavu rákosovitou a její poddruhy a kostřavu luční a její poddruh kostřavu luční italskou.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Charakteristika významných druhů kostřav

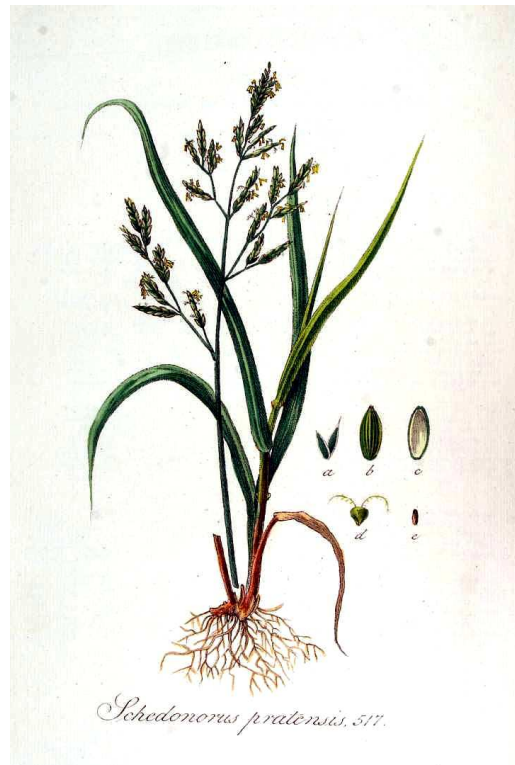
Jak bylo výše zmíněno, podrod *Schedonorus* zahrnuje řadu zemědělsky významných druhů kostřav. V následujícím textu bude podrobněji pojednáno o nejvýznamnějších zástupcích tohoto podrodu.

2.1.1 *Festuca pratensis* Huds. (kostřava luční)

Kostřava luční dosahuje středního až vyššího vzrůstu, stébla jsou až 120 cm dlouhá. Vytváří trsy a vykvétá od června do července. Je to vytrvalá, tmavě zelená tráva rostoucí převážně na pastvinách, v okolí cest a na kulturních loukách (Hand et al., 2010). Rozšířená je především v mírném pásu Asie a Evropy a v minulosti byla zavlečena do Ameriky. V České Republice je zastoupena v 38% všech přirozených porostů (Regal et Šindelářová, 1970). Tato tráva je velmi kvalitní pícninou. Vytváří větší množství listů, než stébel a pro její výtečnou chuť bývá často vyhledávána pasoucími se zvířaty. Vyznačuje se dobrou odolností proti sešlapu a je často využívána v travních či jetelotravních směsích (Regal et Šindelářová, 1970, Grau et al., 1998, Tříška, 1979). Je o ní také známo, že nese geny, díky kterým je velmi odolná proti zimě. Je diploidní ($2n=2x=14$) (Hand et al., 2010) a velikost jejího genomu je $1C=3,175$ Gbp (Kopecký et al., 2010). Na Britských ostrovech a v západní Francii, kde se vyskytuje ve stejném areálu populace kostřavy luční a jílku vytrvalého (*Lolium perenne* L.), byli nalezeni jejich kříženci (Humphreys et al., 2003). Takovýto kříženec se nazývá \times *Festulolium*. Různým křížením jílku vytrvalého či jílku mnohokvětého (*L. multiflorum* Lam.) s kostřavou luční se věnuje řada šlechtitelských stanic s cílem vypěstovat komerční odrůdy, které se budou vyznačovat kombinací agronomicky významných charakteristik obou rodů (Kopecký et al., 2006).

Obrázek č. 1 Kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.).

Převzato z http://plantgenera.org/illustration.php?id_illustration=136509



2.1.1.1 Poddruhy kostřavy luční

Poddruhem této kostřavy je *Festuca pratensis* subsp. *apennina* (De Not.) Hegi (kostřava luční italská). Roste v Alpách a Apeninách, k nalezení je však i v horách centrální a východní Evropy. Je morfologicky velmi podobná kostřavě luční. Nachází se ve vyšších nadmořských výškách než diploidní *F. pratensis*, s čímž souvisí rozdílné životní strategie obou druhů. Pro přerušení dormance semena tetraploidů vyžadují chlad, přes zimu se tedy nachází ve vegetativním klidu a klíčí až na jaře, což jim umožňuje přežít ve vyšších nadmořských výškách. Zatímco semena diploidního druhu nevyžadují pro klíčení chlad, klíčí již na podzim a semenáčky přežívají zimní měsíce. Jejich přežití v chladnějších podmínkách vyšších nadmořských výšek je tedy obtížné. Naopak tetraploidi v nižších nadmořských výškách nepřežívají. Jsou zde v selekční nevýhodě oproti kompetujícím druhům. Tyto druhy nejsou přes zimu dormantní, jsou tudíž vzrostlejší než tetraploidní kostřava luční italská, která se zde vyskytuje v mladším stádiu vývoje (Linnington et al., 1979, Tyler et al., 1978). Kostřava luční italská je tetraploidní

($2n=4x=28$) (Hand et al., 2010), přičemž dosud nebylo zjištěno, zda se jedná o autotetraploidní cytotyp kostřavy luční, či má tento poddruh allopolyploidní původ.

2.1.2 *Festuca gigantea* (L.) Vill. (kostřava obrovská)

Kostřava obrovská je víceletá mohutná tráva. K hlavním znakům tohoto druhu patří tvar listu, který je rýhovaný, tmavě zelený, plochý a mastně lesklý. Stéblo dosahuje délky až 200 cm. Kvete od července do srpna. Vyskytuje se ve stínu na vlhkých lesních půdách hlavně v Evropě, Asii a Africe. Roste jak v nížinách, tak i v horských oblastech, přičemž nejčastěji ji nalezneme v pásmu bučin. Její listy jsou pro zvířata dobře stravitelné, protože je ale stínomilná a vyhledává především lesní porosty, je jako pícnina nevyužitelná (Regal et Šindelářová, 1970, Dostál, 1989). Podle některých studií je *F. gigantea* schopná přirozeně tvořit křížence s *F. arundinacea*. V přírodě jsou však takoví hybridi zřídka k nalezení, protože tyto dva druhy okupují různá stanoviště (Nilsson, 1935). Kříží se také s jíllem vytrvalým, který spadá do rodu *Lolium* L. a tento hybrid se nazývá \times *Festulolium brinkmannii* (A. Braun) Asch. & Graebn (Grau et al., 1998) Kostřava obrovská je hexaploidní ($2n=6x=42$) (Hand et al., 2010).

2.1.3 *Festuca arundinacea* Schreb. (kostřava rákosovitá)

Kostřava rákosovitá je víceletá tráva, která se vyznačuje tvorbou hustých trsů a drsnými listy se štětkami na bázi čepele. Stébla dosahují okolo 150 cm. Vyskytuje se na vlhkých lukách a mokřích příkopech. I přesto je známá svou schopností odolat suchu, především díky hlubokému kořenovému systému. Vyskytuje se v severní Africe, mírném pásmu Asie a v Evropě kromě nejsevernějších oblastí, přičemž v České republice není příliš častá. Protože je velmi tvrdá a drsná, je špatně stravitelná a dobyt看em spásaná pouze v mladém stádiu. Produkuje i méně kvalitní seno, avšak díky velkým výnosům je například ve Francii běžně pěstovaná (Regal et Šindelářová, 1970, Dostál, 1989, Grau et al., 1998). V USA se často uplatňuje k tvorbě travníků. Kostřava rákosovitá je allohexaploidní ($2n=6x=42$, PPG₁G₁G₂G₂), a vznikla mezidruhovým křížením tetraploidní *F. arundinacea* var. *glaucescens* Boiss syn. *F. arundinacea* subsp. *fenas* (Lag.) Arcang. ($2n=4x=28$, G₁G₁G₂G₂) s diploidní kostřavou luční ($2n=2x=14$, PP) (Humphreys et al., 1995).

2.1.3.1 Podruhy kostřavy rákosovité

F. arundinacea má několik poddruhů, přičemž jejich fylogenetické vztahy a genomové složení je dosud neznámé.

V České Republice se vyskytují dva její podruhy, a to *F. arundinacea* subsp. *arundinacea* (kostřava rákosovitá pravá), která okupuje převážně okolí řek a mokré louky a *Festuca arundinacea* subsp. *uechtriziana* (Wiesb.) Beck (kostřava rákosovitá drsná), která má původ v jižní Evropě a u nás roste podél cest, na loukách a železničních náspech (Dostál, 1989). V Evropě můžeme najít i další podruhy, například oktoploidní *F. arundinacea* subsp. *atlantigena* (St.-Yves) Auquier, hexaploidní *F. arundinacea* subsp. *orientalis* (Hack.) Tzvelev a tetraploidní *F. arundinacea* subsp. *fenas* (Lag.) Arcang.

Dalším poddruhem je například dekaploidní *F. arundinacea* subsp. *letourneuxiana* St. Yves (Hand et al., 2010), rostoucí v Maroku v pohoří Atlas.

2.1.4 *Festuca mairei* St. Yves (kostřava atlasská)

Kostřava atlasská je travní druh s drsnými šedozelenými listy. Stébla má až 120 cm dlouhá a květenstvím je lata. Vyskytuje se jen v severozápadní Africe, a to v Maroku, v okolí pohoří Atlas. Díky zvýšené fotosyntéze a širokému kořenovému systému je tento druh kostřavy schopen velmi dobře odolávat suchu (Wang et al., 2008, Wang et al., 2009, Könnemann et al., 2007). V našich podmínkách se pěstuje jako okrasná trvalka. *F. mairei* je tetraploidní ($2n=4x=28$) s dosud neznámým genomovým složením.

2.2 Polyploidie

Během výzkumu v oblasti rostlinné biologie vědci došli k závěru, že v evoluci téměř všech hospodářsky významných rostlin sehrál důležitou roli fenomén, který se nazývá polyploidizace. Z hlediska šlechtění a pěstování tak významných plodin, jako je například pšenice, kukuřice, banánovník či bavlník a v neposlední řadě také mnoha druhů trav, je důležité porozumět procesům, které s polyploidizací souvisí (Skalická, 2005).

Polyploidizace je proces známý u rostlin a některých živočichů, kterým dochází ke znásobení základního chromozomového čísla (Riddle et al., 2003, Liu et Wendel, 2003). Pokud bychom se řídili definicí, pak je polyploidie charakterizována jako přítomnost tří a více kompletních chromozomových sad v jádře (Ramsey et Schemske,

1998). K polyploidizaci dochází častěji u rostlin než u živočichů, kterým tento jev zasahuje do mechanismu determinace pohlaví (Snustad et Simmons, 2009). Obecně je známo, že velké množství rostlinných druhů podstoupilo během své evoluce více než jednu polyploidizační událost (Kashkush et al., 2002). Polyploid vzniká buď v rámci jednoho druhu (autopolyploidie), či častěji křížením mezi různými druhy a následným zdvojením hybridního genomu (allopolyploidie či amfiploidie) (Ramsey et Schemske, 1998, Ha et al., 2009). Tyto dva typy polyploidů se tak liší v genomové konstituci (Bomblies et Madlung, 2014).

Autopolyploidní organizmus může vzniknout buď somatickým zdvojením, nebo spojením neredukovaných gamet. Somatickou polyploidizaci způsobuje endomitoza nebo c-mitoza a může být indukována abiotickým stresem (Ramsey et Schemske, 1998). Neredukované gamety vznikají díky chybám v průběhu meiozy. Všechny tyto anomálie jsou způsobeny změnou funkcí dělicího vřeténka (De Storme et Geelen, 2013). Autotriploid tedy vzniká fúzí neredukované ($2n$) a redukované (n) gamety, křížením tetraploida s diploidem nebo splynutím dvou samčích gamet s jednou samičí gametou (tento způsob polyploidizace je u rostlin známý a bylo pozorováno, že indukuje polyploidii například u některých orchidejí). Příkladem paleopolyploidního organismu může být samosprašná *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (huseníček rolní). Je to rostlina s velmi malým genomem, která byla dlouho považována za typického diploida (Beaulieu et al., 2009). Díky molekulárním a sekvenčním analýzám však bylo zjištěno, že huseníček podstoupil ve své historii nejméně dvě polyploidizační události. K prvnímu zdvojení genomů pravděpodobně došlo v dávné minulosti, poté co se oddělil od skupiny *Eudicotidae*. Další polyploidizace proběhla po jeho oddělení od ancestrálního předka *Malvaceae* Juss. a vzniku dvou samostatných rodů *Brassica* L. a *Arabidopsis* Heynh. Po každé polyploidizační události došlo ke značné rekonstrukci karyotypu spojené s diploidizací. Dalo by se očekávat, že genom této rostliny bude v důsledku těchto událostí mnohem větší. Hlavním důvodem, proč tomu tak není, je skutečnost, že po polyploidizaci obvykle následuje rozsáhlé odstraňování části genetického materiálu (Adams et Wendel, 2005).

Allopolyploidizace je známá především u vyšších rostlin, u kterých se významně podílí na vzniku druhů (Baumel et al., 2002). Jednou z možností vzniku allotetraploida je splynutí dvou gamet s redukovaným počtem chromozomů jedinců různých druhů. Po takovéto mezidruhové hybridizaci se nacházejí v genomu homeogní chromozomy (geneticky příbuzné chromozomy různých genomů). I když tyto chromozomy většinou

pochází z blízké příbuzných jedinců, často mezi nimi nedochází ke správnému párování během meiozy. Následkem chybného párování jsou nefunkční gamety s nevyváženou kombinací a počtem chromozomů. Tyto pohlavní buňky nejsou životné nebo, pokud dojde k jejich spojení, zárodek nepřežívá. F1 hybridy jsou tedy nečastěji částečně nebo úplně sterilní (Skalická, 2005). Sterilita bývá překonána celogenomovou duplikací, při níž dojde ke zdvojení veškerého genetického materiálu v genomu a vznikne tak pro každý chromozom jeho identická kopie. K tomuto dochází v embryu nebo později během vývoje rostliny. Po celogenomové duplikaci má tedy každý chromozom svůj homologní protějšek a v dospělosti vznikají funkční gamety. Další možností vzniku allotetraploida je splynutí dvou neredukovaných gamet diploidů, nebo splynutí redukovaných gamet tetraploidních jedinců různých druhů (Bomblies et Madlung, 2014).

Polyploidizace s sebou přináší změny, které se týkají genové exprese i architektury genomu (Comai et al., 2000, Bomblies et Madlung, 2014). Zvýšením počtu chromozomových sad se zvýší počet kopií všech genů a díky tomu rostlina musí čelit dvojnásobné genové expresi. U některých druhů rostlin bylo pozorováno, že se vyrovnávají s větším počtem chromozomových sad v jádře tím, že exprimují geny pouze jednoho z rodičovských genomů. Stává se tak krátce po celogenomové duplikaci a může se to týkat jen některého z pletiv dané rostliny. Jedná se o iniciační fázi polyploidizace (Bomblies et Madlung, 2014, Flagel et al., 2008). Osudy samotných duplikovaných genů jsou však různé. Může docházet k „neofunkcionalizaci“, kdy jeden z genů má původní funkci a druhý získá díky mutacím novou, často prospěšnou funkci. Oba geny jsou tedy zachovány. Opakem je „nonfunkcionalizace“, kdy se jedna kopie genu stává nefunkční, opět díky mutacím nebo epigenetickým změnám. V okamžiku, kdy mutace zasahují oba dva geny, dochází k „subfunkcionalizaci“. Oba geny jsou zachovány, ale každý pracuje jen na 50%. Míra exprese je tedy stejná, jako by existoval pouze původní gen, ale podílí se na ní dva geny. Tyto události patří z dlouhodobého hlediska k hnacím silám evoluce (Flagel et al., 2008).

V přírodě existují polyploidy, kteří nesou mnohem více chromozomových sad než již zmíněné čtyři. Tato vyšší úroveň ploidie vzniká nejčastěji tam, kde již nějaké polyploidy existují, tedy v rámci polyploidní populace. V tomto případě dochází ke spojení různě redukovaných a neredukovaných gamet, což dává vzniknout novým cytotypům polyploidů. Cytologické studie ukazují, že někteří jedinci autotetraploidní populace mívají autohexaploidní potomstvo. Příkladem může být *Beta vulgaris* L. (řepa obecná), u níž bylo zjištěno, že zhruba 2% z potomstva autotetraploidů jsou hexaploidní jedinci.

Pravděpodobně tedy dochází ke splynutí redukovaných (n) a neredukovaných ($2n$) gamet autotetraploidů. Obdobně může vzniknout jedinec nonaploidního cytotypu z hexaploidních rodičů (Ramsey et Schemske, 1998).

Polyploidi mohou vznikat jak přirozeně, tak synteticky za pomoci člověka. Ve šlechtění a v laboratořích se pro tyto účely využívá chemikálie zvaná kolchicin. Je to alkaloidní činidlo získané z ocúnu jesenního (*Colchicum autumnale* L.) způsobující depolymerizaci mikrotubulů (Sahinul, 2010, Häntzschel et al., 2010). V závislosti na jeho koncentraci, délce působení a stupni vývoje mitotického vřetenka toto vřetenko buď ničí v jednotlivých jeho fázích, nebo předchází jeho vzniku (Gaulden, 1951). Během metafáze buněčného dělení tak zabraňuje přechodu do anafáze, čímž vzniká v jádře neredukovaný počet chromozomů (Sahinul, 2010). Díky kolchicinu tedy dochází ke zmnožení chromozomů v jednom a totéž jádře bez jeho rozdělení.

Příklady allopolyploidních organismů budou uvedeny v následující části bakalářské práce.

2.3 Allopolyploidní druhy vybraných čeledí

Protože polyploidních druhů rostlin je velké množství, nabízelo se uvést jako příklad několik jedinců, kteří jsou dobře prozkoumaní. Tito zástupci buď vznikli relativně nedávno, jako například kozí brada (*Tragopogon* L.) a zimolez (*Spartina* Schreb.) nebo jsou staršího původu. Takovým zástupcem je pšenice (*Triticum aestivum* L.).

2.3.1 *Tragopogon* L. (Asteraceae)

Mezidruhovým křížením *T. dubius* Scop. ($2n=12$) a *T. porrifolius* L. ($2n=12$) vznikl zhruba před osmdesáti lety amfiploid *T. mirus* Ownbey ($2n=24$). Tento druh byl objeven v roce 1949 na dvou různých místech ve státě Washington, USA. První kolonie rostla podél železniční tratě v Pullmanu a druhá na suchém úbočí kopce v Palouse. Později se ukázalo, že obě tyto kolonie tetraploidů vznikly nezávisle na sobě (Ownbey, 1950, Soltis et Soltis, 1991). Při zkoumání některých tetraploidů *T. mirus* pomocí metody GISH bylo zjištěno, že i když mají karyotyp $2n=4x=24$, dochází často k nerovnoměrnému příspěvku genetického materiálu od obou rodičovských druhů. Mezi zkoumanými rostlinami byly nalezeny takové, které měly 13 či 14 chromozomů z druhu *T. dubius* Scop. pocházelo a 11 či 10 chromozomů z druhu *T. porrifolius* L. (Chester et al., 2010).

V Americkém státě Idaho, ve městě Moscow byl objeven jiný tetraploidní druh, *T. miscellus* Ownbey ($2n=4x=24$), který se zde vyvinul z *T. dubius* Scop. ($2n=12$) a *T. pratensis* L. ($2n=12$) (Ownbey, 1950). Cytogenetické analýzy prokázaly, že genom tohoto tetraploida se skládá z 12 chromozomů *T. dubius* a 12 chromozomů *T. pratensis*. Podobně jako u *T. mirus* však byli objeveni hybridní karyotypy, u kterých byl příspěvek chromozomů od rodičovských druhů nerovnoměrný (Chester et al., 2012).

Oba allopolyploidní druhy *T. mirus* a *T. miscellus* se nachází v místě svého původu spolu se svými rodičovskými druhy a diploidními sterilními F1 hybridy, od kterých se liší především vysokou fertilitou (Ownbey, 1950).

2.3.2 *Spartina* Schreb. (*Poaceae* Barnhart)

V 19. století byla do Anglie zavlečena americká *Spartina alterniflora* Loisel., ($2n=62$) Hybridizovala zde s domorodým druhem *Spartina maritima* (M.A. Curtis) Fern. ($2n=60$). Vznikl F1 hybrid *Spartina* × *townsendii* H.Groves & J.Groves ($2n=60, 62$) (Baumel et al., 2002), který stále roste na původním místě hybridizace a je převážně sterilní. Zdvojení genomu v tomto hybridovi dalo vzniknout zhruba před 150 lety vytrvalému a fertiltnímu allopolyploidnímu druhu *Spartina anglica* C.E. Hubbard, který se rychle rozšířil do močálů a ústí řek celé západní Evropy. Protože jeho rodičovské druhy jsou hexaploidní, je *S. anglica* ($2n=120$) dodekaploidní. Tvoří ji 60 chromozomů *S. alterniflora* a 60 chromozomů *S. maritima*. Byli také objeveni nonaploidní jedinci, kteří se na daných stanovištích vyskytovali s téměř stejnou frekvencí jako dodekaploidi, a jejichž buňky obsahovaly 60 chromozomů původem od *S. alterniflora* a pouze 30 chromozomů ze *S. maritima*. (Chester et al., 2010). Cytologické analýzy rovněž prokázaly přítomnost jedinců se 122 a 124 chromozomy. Jejich genomové složení však nebylo studováno (Salmon et al., 2005).

Tyto allopolyploidní druhy tolerují níže položené bažiny a mají větší ekologický rozsah než jejich rodiče. Dále se ukázalo, že mají zvýšené fyziologické mechanismy, které jim umožňují snášet téměř anoxické sedimenty (Salmon et al., 2005).

2.3.3 *Cardamine* L. (*Brassicaceae* Burnett), *Senecio* L. (*Asteraceae* Martinov)

Dalšími recentními allopolyploidy jsou například řeřišnice *Cardamine* L. (*Brassicaceae* Burnett) a starček *Senecio* L. (*Asteraceae* Martinov).

Druh *Cardamine* × *insuenta* byl objeven v roce 1972 ve Švýcarském Urnerbodenu. Tento hybridní triploid ($2n=24$) je tvořen šestnácti velkými chromozomy druhu *C. rivularis* a osmi menšími chromozomy druhu *C. amara*. Další polyplodizací *C.* × *insuenta* vznikl allopolyploid *Cardamine schulzii* ($2n=48$) (Urbanska et al., 1997). Tohoto hexaploida tvoří 32 chromozomů *C. rivularis* a 16 chromozomů *C. amara* (Mandáková et al., 2013).

Senecio cambrensis ($2n=60$) se nachází v Severním Walesu a v Edinburghu na Britských Ostrovech. Vznikl kolem roku 1901 nezávisle na každém z těchto míst, nejdříve ve Walesu, později v Edinburghu. Jako jeho rodičovské druhy byly určeny tetraploidní *S. vulgaris* ($2n=40$) a diploidní *S. squalidus* ($2n=20$), allohexaploid *S. cambrensis* je fenotypově velmi podobný svým rodičům (Abbott et al., 2004).

2.3.4 *Triticum aestivum* L. (*Poaceae* Barnhart)

Vznik pšenice seté je datován do období neolitu a souvisel s křížením a domestikací planých druhů rostlin (Feuillet et al., 2007, Dubcovsky et Dvořák, 2007). Jedná se o allohexaploida ($2n=42$), jehož genom má původ ve třech různých druzích. Genom A pochází z *Triticum urartu* Thumanian ex Gandilyan (Dvořák et al., 1993), genom B pochází z rostliny podobné *Aegilops speltoides* Tausch (Starkar et Stebbins, 1956). Tyto dvě rostliny před 0,5 milionem let hybridizovaly a vytvořily sterilního jedince. U tohoto jedince pak došlo ke zdvojení genomu, čímž vznikl fertillní jedinec *Triticum turgidum* L., který měl genom BBAA. Dalším vývojem tohoto jedince vznikla dnešní tetraploidní pšenice, která se používá především pro výrobu těstovin.

Zhruba před 8-10 tisíci lety se *T. turgidum* zkřížil s diploidním druhem *Aegilops tauschii* Coss., který se stal donorem genomu D. Vzniklý triploid se díky své sterilitě nebyl schopen dále rozmnožovat. Rovněž u něj však došlo ke zdvojení genomu, díky čemuž vznikl hexaploidní druh *T. aestivum* s genomem BBAADD, jak jej známe dnes. Tento hybrid tedy v sobě nese 14 chromozomů původem z *T. urartu*, 14 chromozomů z trávy podobné *A. speltoides* a 14 chromozomů z *A. tauschii* (Feuillet et al., 2007).

2.4 Metody používané k identifikaci hybridů

Existuje řada různých způsobů, jak zjistit genomové složení, původ a příbuzenské vztahy mezi allopolyploidními druhy. Z historického hlediska si nejdříve vědci všímali rozdílných anatomických a morfologických vlastností rostlin. Jednotlivé druhy byly mezi sebou porovnávány, a to s ohledem na vlastnosti jejich vegetativních či generativních orgánů. Hodnocení jejich znaků bylo většinou kvantitativní a na základě vzájemné podobnosti byly rostliny rozdělovány do skupin. Propojení mezi jednotlivými skupinami odráželo jejich příbuzenské vztahy. Později se však ukázalo, že tato metoda pro určení fylogeneze nestačí. Některé blízké příbuzné druhy bylo těžké odlišit, a tak se taxonomové začátkem 19. století pokoušeli nalézt nové přístupy, které by změnily a upřesnily dosavadní zařazení rostlin. Takovýmto přístupem bylo například zkoumání pylu a spor, buněčného jádra, nebo sekundárních metabolitů (Hroudá, 2007). Druhá polovina devatenáctého století byla klíčová pro rozvoj karyologie a výzkum dědičnosti. V této době rakouský cytolog Walter Flemming poprvé popsal chromozomy jako vláknitá tělíška v dělicích se buňkách a vyvinul fixovací a barvicí metody pro zvýraznění cytologických detailů, což byl základ pro dnešní cytogenetiku (Paweletz, 2001). Následně se ukázalo, že právě chromozomy jsou nositeli dědičné informace a vědci se začali zajímat o jejich vlastnosti. Díky sledování proměnlivosti tvaru, počtu a velikosti chromozomů lépe charakterizovali různé taxonomické skupiny. Největší zásah do zavedeného systému však způsobil rozvoj molekulární biologie, která vznikla díky objevu dvojité šroubovice struktury DNA v roce 1953 (Snustad et Simmons, 2009). Tento obor nabídl nové metody studia fylogeneze.

Jako jedny z prvních molekulárně-biochemických markerů pro studium genetické variability byly použity izozymy (izoenzymy), což jsou proteiny, které se liší ve své struktuře, ale mají stejnou funkci. Protože proteiny jsou však ovlivněny prostředím, ve kterém se nacházejí, bylo třeba nalézt mnohem univerzálnější a variabilnější markery. Těmi se staly DNA markery. Dosud byla popsána celá řada různých DNA markerů založených na různých technikách molekulární biologie. Molekulární markery, pomocí kterých můžeme studovat fylogenetické vztahy či genetickou variabilitu, jsou například AFLP, DArT, SNP či studium ITS regionu. Dále je možné využít jednoduché opakující se sekvence (SSR), délkový polymorfismus restričních fragmentů (RFLP), polymorfismus náhodně amplifikované DNA (RAPD), analýzu chloroplastové sekvence *trnL-F* a jiné. Metodou schopnou poskytnout detailnější informace o původu

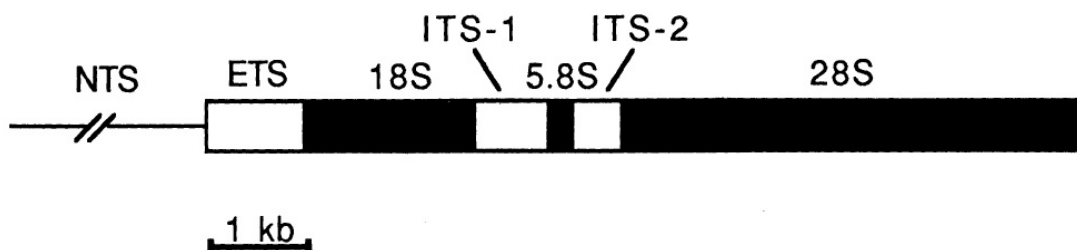
allopolyploidních druhů se stala rovněž hybridizace *in situ* a její varianty FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a GISH (genomová *in situ* hybridizace).

O nejvýznamnějších metodách bude pojednáno podrobněji v následujícím textu.

2.4.1 Analýza mezerníku ITS

Ribozomální RNA geny, plnící jednu ze základních biochemických funkcí, jsou přítomny ve všech druzích. Jejich sekvenční analýza umožňuje studovat již rané evoluční události. Ribozomální DNA (rDNA) je DNA sekvence, která kóduje ribozomální RNA (rRNA). V jádře tuto rDNA pozorujeme jako jadérko a oblast, která rDNA obsahuje, se nazývá organizátor jadérka. V eukaryotním jaderném genomu je tato transkripční jednotka spolu s nepřepisovaným mezerníkem (NTS, nontranscribed spacer) přítomna v několika stech kopiích, které jsou poskládané tandemově za sebou (Obrázek č. 2). K určení fylogeneze mezi blízce příbuznými taxony se využívají především mezerníkové (spacerové) oblasti (ITS, internal transcribed spacer). ITS region je krátká sekvence, která se mezi blízce příbuznými druhy značně liší. Jedno či více nukleotidové změny (mutace) v tomto regionu slouží k identifikaci druhů a kmenů a studování hybridizace. ITS regiony jsou obklopeny vysoce konzervovanými oblastmi 18S, 5,8S a 28S genů, proto je jejich amplifikace a sekvenace relativně jednoduchá a hojně využívaná (Hills et al., 1991). K rekonstrukci fylogenetických vztahů širokolistých a úzkolistých kostřav tuto metodu použili Torrecilla et Catalán (2002). V širším pojetí ji znovu využila Catalán et al. (2004) pro studium podčeledi *Loliinae* a jí příbuzných podčeledí a určila jejich fylogenetické vztahy.

Obrázek č. 2 Oblast rDNA u eukaryot. Schématické vyobrazení oblasti ribozomální DNA, která se skládá z nontranscribed spaceru (NTS), external transcribed spaceru (ETS), 18S genu, internal transcribed spaceru 1 (ITS-1), 5,8S genu, internal transcribed spaceru 2 (ITS-2) a 28S genu. Upraveno podle Hills et al., 1991.



2.4.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)

Amplified fragment length polymorphism, nebo také česky polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů, je metoda využívající kombinaci dvou starších molekulárních metod, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Bensch et al., 2005). Podobně jako RFLP, využívá tato metoda štěpení genomové DNA pomocí restričních enzymů. Nejčastěji je využívána běžná restriční endonukleáza EcoRI a vzácná endonukleáza MseI. Na vzniklé lepkavé konce restričních fragmentů jsou ligací připojeny dvouvláknové oligonukleotidové adaptory, které tak vytvářejí templátovou DNA pro amplifikaci. Následují dvě po sobě jdoucí PCR amplifikace, během kterých dochází k redukci počtu fragmentů díky primerům, které obsahují selektivní nukleotidy (Vos et al., 1995). Zbylé fragmenty jsou separovány dle jejich velikosti na polyakrylamidovém gelu (Bensch et al., 2005). Výsledkem této metody je DNA fingerprint, který představuje fragmenty určité délky.

AFLP se využívá mimo jiné pro určení hybridních jedinců, ať vnitrodruhových nebo mezidruhových. Každý fragment ve fingerprintu znamená přítomnost dané alely v organismu. Substituce báze vede ke změně restričních míst endonukleáz, což vyústí v absenci nebo přítomnost proužku na gelu. Tím vzniká „pattern“ daného jedince. Pro určení hybridního jedince je porovnán pattern rodičů s patternem domnělého křížence a na základě míry podobnosti je možné posoudit jejich příbuznost (Shasany et al., 2005). AFLP metoda produkuje mnoho polymorfních markerů v rámci celého genomu bez nutnosti předchozí znalosti jeho sekvence. Metodu AFLP spolu s jinými metodami použil Alm et al., (2003), když prováděl komparativní studii mezi genomy kostřavy luční a jí příbuznými obilninami z tribu *Triticeae*, dále jílků, rýže, ovsa, kukuřice a čiroku. Zkonstruovali genetickou mapu kostřavy luční, která umožnila studium syntenických vztahů.

2.4.3 Diversity Arrays Technology (DArT)

Diversity Arrays Technology je metoda, která propojuje DNA fingerprint s hybridizací a umožňuje analýzu DNA polymorfizmů. Tento přístup, na rozdíl od AFLP a jiných fingerprintingových metod, nevyužívá gelovou elektroforézu, ale fragmentů DNA imobilizovaných na pevném podkladu, tedy čipu (microarray). Pro tvorbu čipu se využívá genomová DNA několika genotypů jednoho nebo více druhů, která se promíchá, rozštípe restriční endonukleázou a k fragmentům se připojí adaptory. Poté je nutná redukce

genomové komplexity, která se provádí pomocí PCR s primery, které mají specifické přesahy. V tomto kroku se snižuje množství genetického materiálu, vzniká tak genomová reprezentace, což je soubor DNA fragmentů z genomě bohatých oblastí. Tyto fragmenty jsou dále klonovány do vektorů, amplifikovány a umístěny na pevný podklad. Dále je nutné převést genomovou DNA dvou srovnávaných genotypů opět do genomové reprezentace, tentokrát ale každou zvlášť. Genomové reprezentace obou genomů se odliší fluorescenčními značkami (červenou a zelenou), smíchají se a nahybridizují na čip. Poté se měří hodnota intenzity fluorescence každého fragmentu. Tam, kde se nachází polymorfismus mezi dvěma genomy, převládá červená nebo zelená fluorescence (tomuto se také říká „polymorfní spoty“) (Jaccoud et al., 2001).

Poprvé byla tato metoda demonstrována na rýži, která má relativně malý genom. Později se ale ukázalo, že se dá efektivně využít i u polyploidních druhů s velkými genomy. DArT markery tak byly využity pro genomové studie pšenice (Akbari et al., 2006), či různých druhů kostřav a jílků a jejich kříženců (\times *Festulolium*) (Kopecký et al., 2009). Bylo zjištěno, že tato metoda dokáže s velkou přesností identifikovat mezidruhové křížence, určit jejich genomové složení a predikovat příbuzenské vztahy mezi druhy.

2.4.4 Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP)

SNP (single nucleotide polymorphism) je jednonukleotidový polymorfismus v sekvenci DNA. SNP lze identifikovat ze sekvenčních dat. Velmi často se využívají EST (expressed sequence tags), což jsou krátké DNA sekvence odvozené z cDNA. Tyto fragmenty jsou částmi DNA, která je komplementární k mRNA (Hillier et al., 1996). EST tedy představují části exprimovaných genů. K určení polymorfismu je nutné EST sekvencovat a porovnat (Rafalski, 2002). Dále můžeme sekvenční data pro identifikaci SNP získat pomocí sekvencování nové generace (Ganal et al., 2009) či resequencováním amplikonů. Detekovat je pak můžeme pomocí alelo-specifické hybridizace (Syvänen, 2005), SBE (single-base extension analýzy), HRM (high-resolution melting, čili analýzy teplotních křivek DNA) a jiných metod. Pro studium genetické variability u kostřavy rákosovité identifikovala Hand et al., (2012) velké množství SNP markerů, které umožnily jednoznačnou diskriminaci kontinentálního a mediteránního morfotypu a mají velký potenciál v rozlišení jednotlivých odrůd.

2.4.5 *In situ* hybridizace (ISH)

In situ hybridizace je molekulárně-cytogenetická metoda, pomocí které je možné studovat evoluci genomů, jejich organizaci, strukturu a funkci. Nachází využití například v medicíně, kde s její pomocí lze odhalit přítomnost genu určité nemoci nebo patogena. DNA hybridizace využívá nasednutí značené DNA sondy na cílovou DNA (což může být například celé jádro, chromozomy nebo vlákna DNA) nacházející se v preparátu na podložním sklíčku. K hybridizaci dochází na základě komplementarity párů bazí. Díky tomu je možné identifikovat chromozomy a jejich části či detekovat chromozomové nebo genomové přestavby. Další modifikací je RNA hybridizace, která nabízí možnost lokalizace RNA a genové exprese ve tkáních či pletivech.

Pro jedny z prvních *in situ* hybridizací v roce 1969 byly používány radioaktivně značené sondy (Gall et Pardue, 1969) nebo kolorimetrické metody. Kolorimetrická detekce, vhodná především pro RNA hybridizace, je velice citlivá, a proto se používá dodnes. Naproti tomu radioaktivní značení se dnes především kvůli jeho toxicitě téměř nepoužívá a plně ho nahrazují fluorescenčně značené sondy (FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace).

Sonda, nebo také próba, je uměle připravený úsek DNA nebo RNA, komplementární k cílové DNA nebo RNA, jehož místo hybridizace je možné detekovat, protože je značený. V závislosti na typu experimentu je možné pro vytvoření sondy použít jakýkoli úsek oligo- nebo polynukleotidů. Nejčastějšími sondami jsou PCR produkty, syntetické oligonukleotidy, klonované DNA sekvence nebo genomová DNA (Schwarzacher et Heslop-Harrison, 2000).

2.4.5.1 Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

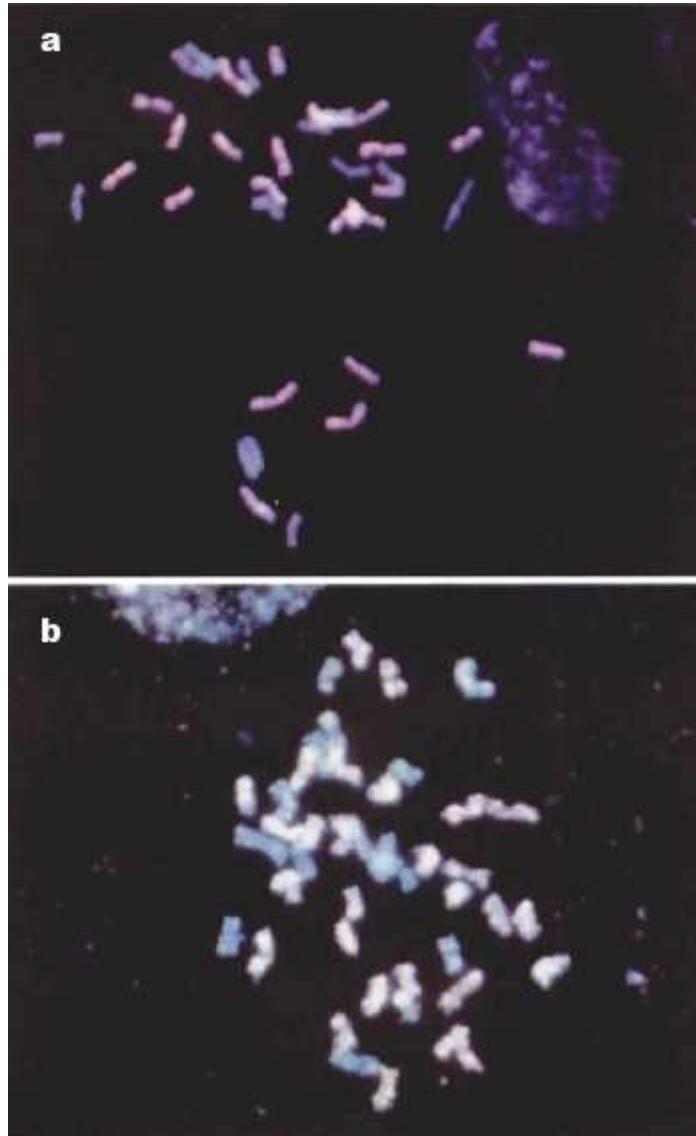
Pokud chceme získat informace o evoluci chromozomů mezidruhových hybridů a možných výměnách jejich částí mezi různými druhy, používá se nejčastěji celogenomová sonda. Takováto sonda pro genomovou *in situ* hybridizaci (GISH) je získána izolací celkové DNA (většinou pomocí komerčně dostupných kitů) z jader daného organismu. Takto velké molekuly DNA je vhodné rozdělit na fragmenty o velikosti 200-500 párů bazí, což zvýší efektivitu značení hybridizace *in situ*. Jak je uvedeno výše, nejrozšířenější jsou dnes neradioaktivní metody značení pomocí fluorochromů, což jsou chemické skupiny schopné fluoreskovat (po excitaci světlem s kratší vlnovou délkou tyto látky emitují světlo delší vlnové délky). Pro značení velkých úseků DNA je vhodná především Nick translace.

Nick translace využívá dvou enzymů, deoxyribonukleázy I (neboli DNáza I) a DNA polymerázy I z *E. coli* a značených nukleotidů. Enzym DNáza I je schopen hydrolyzovat DNA a vytváří tak náhodně zářezy ("nicky") na každém vlákně dvouvláknové DNA (sondy). DNA polymeráza I odstraňuje ze zářezů jednotlivé nukleotidy a místo nich na základě komplementarity poté začleňuje do volných míst značené nukleotidy. Takto vznikne DNA, kterou je možno později vizualizovat v preparátu. Nejčastější molekulou, která se využívá pro značení nukleotidů je biotin (vitamin H). Jeho přítomnost je v preparátu prokázána přidáním jeho protilátky, proteinu streptavidinu, ke kterému má vysokou afinitu, a který je značený fluorochromem, například Cy3 (cyanin 3). Obdobně může být využit digoxigenin, proti kterému se využívá protilátka anti-digoxigenin, značený fluorochromem, například FITC (fluorescein isothiokyanát). Z důvodu nutnosti použití protilátek pro detekci se jedná o nepřímé značení. U přímého značení jsou fluorochromem konjugovány přímo nukleotidy. Nepřímé značení je výhodnější z důvodu amplifikace signálu, přímé značení je naproti tomu rychlejší. Na jednom preparátu může být detekováno více sond současně, pokud například gDNA dvou druhů označíme barevně odlišnými fluorescenčními značkami. Na jednom preparátu tak detekujeme více cílových míst (Schwarzacher et Heslop-Harrison, 2000).

Pomocí genomové *in situ* hybridizace osvětlil Humphreys et al., (1995) původ allohexaploidní kostřavy luční (*F. arundinacea*, dále jako Fa). Zjistil, že je tvořena dvěma genomy tetraploidní *F. arundinacea* var. *glaucescens* (dále jako Fg) a jedním genomem diploidní *Festuca pratensis* (dále jako Fp). Při pokusu využíval uměle vytvořených hybridů vzniklých křížením $Fp \times Fg$, $Fp \times Fa$ a $Fg \times Fa \times Lm$ (*L. multiflorum* Lam.). Pomocí sondy z Fp aplikované na křížence $Fp \times Fg$ prokázal, že genom Fp není součástí genomu Fg, a že Fp tedy není rodičovský druh Fg. Po *in situ* hybridizaci hybrida $Fp (4x) \times Fa (6x)$ se sondou z Fp detekoval 21 chromozomů z Fp, čímž potvrdil, že v genomu Fa je obsažena jedna sada chromozomů z Fp (viz Obrázek č. 3a). Další pokus metodou GISH byl proveden na preparátu získaném z hybrida $(Lm \times Fg) (6x) \times Fa (6x)$, který hybridizoval se sondou z Fg. Tato sonda hybridizovala s 28 chromozomy a potvrdila tak, že Fg je druhým rodičovským druhem Fa (viz Obr. 3b).

Obrázek č. 3 Genomová *in situ* hybridizace provedena na chromozomech hybridů

(a) *F. pratensis* (4x) × *F. arundinacea* (6x) a (b) (*Lolium multiflorum* × *F. glaucescens*) (6x) × *F. arundinacea* (6x). Na obrázku 3a jsou chromozomy hybrida Fp (4x) × Fa (6x), po hybridizaci se sondou z Fp (červená barva). Na obrázku 3b jsou chromozomy hybrida (Lm × Fg) (6x) × Fa (6x) (modře), které hybridizovaly se sondou z Fg (červeně). Upraveno podle Humphreys et al., (1995).



3. CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši na téma studium genomového složení polyploidních kostřav pomocí molekulárně cytogenetických metod s použitím dostupných literárních zdrojů.
- Určit počet chromozomů a ploidii u vybraných druhů kostřav rodu *Schedonorus*. Zjistit genomové složení polyploidních kostřav pomocí genomové *in situ* hybridizace.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Semena rostlin pro fylogenetické studie byla objednána z Regional Plant Introduction Station, Washington State University, USA. Dvacet semen od každého vybraného genotypu bylo vyseto na Petriho misku opatřenou navlhčenou buničinou a filtračním papírem. Petriho misky byly uzavřeny a řádně popsány. Vyklíčená semena byla jednotlivě zasazena do sadbovačů a opatřena cedulkou s popisem. Soupis rostlinného materiálu je uveden v Tabulce č. I. Dále byla použita deklaploidní *Festuca arundinacea* subsp. *letourneuxiana*. První vzrostlý list byl vysazeným rostlinám zastřihnout pro přerušení apikální dominance a podporu tvorby trsů.

Tabulka č. I Přehled genotypů vysetých semen

Druh/poddruh	Genotyp	Ploidie	Původ	Počet vyklíčených rostlin
<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>pratensis</i>	659922	2x	Kyrgyzstán	20
<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i>	595054	4x	Itálie	0
<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i>	595055	4x	Itálie	3
<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i>	595073	4x	Itálie	6
<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i>	595074	4x	Itálie	6
<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i>	610808	4x	Švýcarsko	18
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>arundinacea</i>	659884	6x	Kyrgyzstán	20
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>arundinacea</i>	659897	6x	Kyrgyzstán	20

Druh/poddrh	Genotyp	Ploidie	Původ	Počet vyklíčených rostlin
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>atlantigena</i>	577096	8x	Velká Británie	20
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>fenas</i>	595048	4x	Francie	12
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>orientalis</i>	634282	?	Ukrajina	20
<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>uechtriziana</i>	283324	?	Československo	6
<i>Festuca mairei</i>	577097	4x	Francie	11
<i>Festuca mairei</i>	283313	4x	Francie	12
<i>Festuca mairei</i>	610941	4x	Maroko	20
<i>Festuca mairei</i>	535747	4x	Maroko	20
<i>Festuca mairei</i>	283312	4x	Švédsko	16
<i>Festuca gigantea</i>	430281	6x	Irsko	4
<i>Festuca gigantea</i>	345981	6x	Norsko	13
<i>Festuca gigantea</i>	206646	6x	Turecko	9
<i>Festuca gigantea</i>	440360	6x	Kazachstán	2
<i>Festuca gigantea</i>	430295	6x	Francie	11

4.1.2 Přístroje

Biologický termostat, BT 120, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Centrifuga Prism R, Labnet, Edison, USA

Digestoř Merci M, Merci s.r.o., Brno, ČR

Fluorescenční mikroskop AX70, Olympus, Tokio, Japonsko

Hybridizační komůrka SM30, Boekel Scientific Inc., Feasterville, USA

Homogenizační oscilační mlýn MM 301, Retsch, Německo

Lyofilizátor Jouan Heto DRYWINNER Trigon-plus, Říčany u Prahy, Česká Republika

PCR Termocycler PTC 200, MJ Research Inc., Waltham, USA

Kamera SensiCam 12 Bit Cooled Imaging, PCO CCD Imaging, Německo

Spectrophotometer NanoDrop ND-100 UV/VIS, Wilmington, USA

Stolní mikrocentrifuga Stratagene, Tomy Tech USA Inc., USA

Světelný mikroskop CX31, Olympus, Tokio, Japonsko

Termocycler PTC 100, Mj Research Inc., Waltham, USA

Třepačka Reax TOP, Heidoph, Německo

Vodní lázeň Jouan, Trigon Plus, Říčany u Prahy, Česká Republika

4.1.3 Chemikálie, roztoky a komerční kity

1% blokovací činidlo, 50 ml

Navážit 0,5 g Blokovacího reagent, rozpustit a míchat v 50 ml 4x SSC+Tween jednu hodinu při 70 °C. Autoklávovat a skladovat při -20 °C.

50% dextran sulfát

2,5 g dextranu rozpustit za mírného zahřátí v 5 ml destilované vody.

0,5M EDTA, 1 l

Navážit 186,1 g Na₂EDTA na 1000 ml dH₂O. Navážku vmíchat do 750-800 ml vody. Upravit pH na 8,5 přidáním NaOH. Poté doplnit objem do 1000 ml. Přefiltrovat přes filtrační papír.

Fixážní roztok Carnoy I, 60 ml

99,8% ethanol a 99,7% kyselina octová v poměru 3:1

45 ml ethanolu a 15 ml kyseliny octové.

45% kyselina octová, 50 ml

zásobní roztok 99,7% kyseliny octové, destilovaná voda

22,5 ml kyseliny octové a 27,4 ml dH₂O.

20x SSC, 1 l

175,3 g 3M NaCl a 88,2 g 0,3M citrátu sodného rozpustit v části destilované vody, upravit pH na 7,0 a doplnit destilovanou vodou na 1 l. Přefiltrovat a autoklávovat 25 min.

2x SSC, 1 l

zásobní roztok 20x SSC a destilovaná voda

100 ml 20x SSC doplníme do 1000 ml dH₂O.

Další komerčně dodávané chemikálie a kity:

Biotin-Nick Translation Mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo

dig-Nick Translation Mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo

Hydroponex, Hü-Ben, Čerčany

Invisorb Spin Plant Mini Kit, Invitex GmbH, Berlín, Německo

Vectashield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace genomové DNA

Pro izolaci genomové DNA byl použit Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex). Bylo postupováno dle protokolu, který byl součástí balení kitu.

Ze vzrostlých rostlin *Festuca pratensis*, *Festuca glaucescens*, *Festuca mairei*, *Festuca gigantea*, *Festuca arundinacea* a *Festuca arundinacea* subsp. *atlantigena* byly odebírány mladé listy. Tyto listy jednotlivých druhů rostlin (zhruba po 12 kusech) byly nastříhány do zkumavek. Pokud nebylo možné odebrat z jedné rostliny dostatek listů, byl vytvořen směsný vzorek z více rostlin stejného genotypu. Otevřené zkumavky byly umístěny po dobu minimálně 24 hodin do lyofilizátoru.

Extrakce DNA ze suchého rostlinného materiálu:

Předehřátí Elučního pufru:

Eluční pufr D byl napipetován v příslušném množství (dle počtu vzorků) do zkumavky.

Zkumavka s Elučním pufrem D byla umístěna do vodní lázně předehřáté na 65 °C.

1) Homogenizace rostlinného materiálu

Protokol doporučuje homogenizovat 60 mg rostlinného materiálu v tekutém dusíku v misce pomocí tloučku. Tento krok byl upraven tak, že po vysušení byly lístečky ve zkumavkách rozdrceny pomocí skleněných kuliček v homogenizačním oscilačním mlýnku (Retsch). Z takto homogenizovaného materiálu bylo odebráno 60 mg pro izolaci genomové DNA.

2) Lýze homogenátu

K připravenému homogenátu ve zkumavce bylo přidáno 400 μ l Lyzačního Pufru P a 20 μ l Proteinázy K. Vše bylo promícháno za pomoci vortexu a vloženo do lázně s teplotou 65 °C. Homogenát s lyzačním roztokem byl v lázni inkubován 30 minut a průběžně promícháván překlápěním a třepáním.

3) Filtrace lyzačního roztoku

Lyzační roztok byl přenesen do mikrozkuvek opatřených Prefiltrem a centrifugován 1 min při 12 000 otáčkách/min. Prefiltr byl odstraněn a dále byl používán pouze filtrát. Pro odstranění RNA ze vzorku bylo k filtrátu přidáno 15 μ l RNázy A, vše bylo důkladně promícháno za pomoci vortexu a 10 minut inkubováno při 37 °C. Poté bylo ke směsi přidáno 200 μ l binding Pufru P a vše důkladně promícháno za pomoci vortexu.

4) Vazba DNA na Spin filtr

Do 2 ml mikrozkuvky byl vložen Spin Filtr, na který byla přenesena suspenze z předešlého kroku a 1 min inkubována. Po inkubaci byla směs centrifugována při 12 000 otáčkách/min po dobu 1 minuty. Filtrát byl odstraněn a Spin Filtr byl opět vsazen do 2 ml mikrozkuvky.

5) Promývání I

Na Spin Filtr bylo aplikováno 550 μ l Wash pufu I. Mikrozkuvka byla centrifugována při 12 000 otáčkách/min po dobu 1 min. Filtrát byl odstraněn a Spin Filtr byl znovu vložen do 2 ml mikrozkuvky.

6) Promývání II

Na Spin Filtr bylo aplikováno 550 μ l Promývacího pufu II. Mikrozkuvka byla centrifugována při 12 000 otáčkách/min po dobu 1 min. Filtrát byl odstraněn a Spin Filtr byl znovu vložen do 2 ml mikrozkuvky. Tento promývací krok byl zopakován ještě jednou. Nakonec byl filtrát odstraněn a mikrozkuvka spolu se Spin Filtrem byla 2 minuty při 12 000 otáčkách/min samostatně centrifugována.

7) Eluce DNA

V posledním kroku byl Spin Filtr umístěn do 1,5 ml mikrokumavky. Bylo k němu přidáno 100 μ l předeřátého Elučního pufru D, ve kterém se DNA během 3 minut inkubace rozpustila. Vše bylo centrifugováno po dobu 1 min při 10 000 otáčkách/min. Filtr byl odstraněn a vzorky byly uloženy v mrazícím boxu.

4.2.2 Měření koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota gDNA byla měřena spektrofotometricky na NanoDropu. Přístroj byl očištěn a pozadí bylo nastaveno proměřením ddH₂O nebo Elučního Pufru D. Každý vzorek byl poté několikrát proměřen. Pokud byla koncentrace DNA ve vzorku nižší než 75 ng/ μ l, vzorek nebyl použit pro následnou přípravu sondy a izolace DNA byla zopakována. Vzorky byly dále uchovávány v mrazícím boxu.

4.2.3 Příprava fluorescenčně značených sond pro *in situ* hybridizaci pomocí Nick translace

Pro přípravu sond byla použita gDNA předpokládaných rodičovských druhů košťav, a to *Festuca pratensis*, *Festuca glaucescens*, *Festuca mairei*, *Festuca gigantea*, *Festuca arundinacea* a *Festuca arundinacea* subsp. *atlantigena*. gDNA byla značena pomocí Biotin-Nick translačního mixu či dig-Nick translačního mixu (Roche).

Příprava sondy

1) výpočet objemu jednotlivých složek sondy:

Pro jednotlivé vzorky na základě změřené koncentrace DNA bylo dle vzorce (viz Výpočet č. 1) vypočítáno množství gDNA a ddH₂O nutné pro přípravu sondy.

Výpočet č. 1: Výpočet objemu jednotlivých složek sondy

gDNA (μ l) = 1000/koncentrace vzorku (μ l)

ddH₂O (μ l) = 16g – gDNA (μ l)

Biotin-Nick translační mix či dig-Nick translační mix (Roche) = 4 μ l

2) Postup přípravy sond

Práce probíhala ve flow boxu. Všechny složky pro přípravu sondy (gDNA, ddH₂O, Biotin-Nick translační mix (Roche)) byly uchovány na ledu. Jednotlivé složky byly pipetovány do vychlazených a řádně označených 0,5 ml PCR mikrozkušavek v příslušných množstvích v následujícím pořadí: nejprve promíchaná gDNA, poté ddH₂O a nakonec Biotin-Nick translační mix či dig-Nick translační mix (Roche), který je citlivý na změny teplot a po napipetování byl ihned vrácen do mrazicího boxu. Všechny složky sond v mikrozkušavkách byly centrifugovány ve stolní mikrocentrifuze a inkubovány při 15 °C po dobu 105 min v termocyleru. Po inkubaci byl do každé mikrozkušavky k sondě přidán 1 µl EDTA. Vše bylo krátce promícháno za pomoci vortexu, krátce centrifugováno ve stolní centrifuze a inkubováno 10 min při 65 °C v termocyleru. Poté byla sonda i zbylé vzorky DNA uchovány v mrazícím boxu.

4.2.4 Příprava kořínků pro roztlačové preparáty

Kořínky byly získány z různých genotypů jednotlivých druhů kostřav *Festuca arundinacea* 8x, *Festuca arundinacea* 10x, *Festuca mairei*, *Festuca arundinacea* subsp. *uechtriziana* a *Festuca arundinacea* subsp. *orientalis* a *Festuca apennina*. Nejprve byly jednotlivé rostliny řádně očištěny a jejich kořeny důkladně promyty a zastřiženy. Poté byly rostliny umístěny na jeden týden do roztoku hydroponexu (Hü-Ben). Po uplynutí jednoho týdne byly rostlinám mezi 11–13 hodinou odebírány světlé, mladé, nově vyrostlé kořínky. Tato doba je pro odběr nejvhodnější z důvodu vysokého mitotického indexu meristematických buněk kořínků. Kořínky byly umístěny do zkumavek s destilovanou vodou a na ledu inkubovány po dobu 28–30 hodin v chladové místnosti při 4 °C. Po inkubaci byly kořínky fixovány v 1 ml fixážního roztoku Carnoy I, který byl napipetován do 1,5 ml zkumavek. Do fixážního roztoku ve zkumavkách byly vloženy kořínky a inkubovány po dobu jednoho týdne ve 37 °C v termostatu. Po inkubaci byly kořínky barveny v 1% roztoku acetokarmínu po dobu 2 hodin.

4.2.5 Roztlakové preparáty

Po vyjmutí z acetokarmínu byla kořínku odříznuta kořenová čepička, čímž byl eliminován balastní materiál. Obarvená kořenová špička (zhruba 1 mm) byla odříznuta, přenesena na vyleštěné podložní sklo a zakápnuta 45% kyselinou octovou. Preparát byl překryt krycím sklem a pomocí párátko byl proveden roztlak. Poté byla provedena fixace nad plamenem, při které se částečně odpařila kyselina octová a byla rozpuštěna buněčná cytoplazma. Preparát byl uložen minimálně 0,5 hodiny na suchém ledu krycím sklem dolů. V tomto kroku došlo k zafixování chromozomů na podložní sklo.

Po inkubaci na suchém ledu bylo odstraněno krycí sklo, preparát byl naložen po dobu 1 minuty v 45% kyselině octové při pokojové teplotě. Poté byl preparát odmyván po dobu 3 minut v 45% kyselině octové zahřáté ve vodní lázni na 50 °C. Po oschnutí skel byly preparáty pozorovány optickým mikroskopem, byla vyhodnocena jejich kvalita a vhodnost dalšího použití pro *in situ* hybridizaci.

4.2.6 Genomová *in situ* hybridizace

Pro hybridizaci jsme používali na podložním skle fixované metafázní chromozomy kostřav *Festuca arundinacea* 8x, *Festuca arundinacea* 10x, *Festuca arundinacea* subsp. *uechtriziana* a *Festuca arundinacea* subsp. *orientalis*, *Festuca mairei* a *Festuca apennina*, u kterých jsme chtěli otestovat hypotézu, že jejich rodičovskými druhy mohly být *Festuca pratensis*, *Festuca glaucescens*, *Festuca mairei*, *Festuca gigantea*, *Festuca arundinacea* 6x a 8x. Z gDNA jednotlivých potenciálních rodičovských druhů byla připravena sonda značená biotinem. V rámci optimalizace byla prováděna *in situ* hybridizace při pěti různých stringencích: 61%, 77%, 84%, 93% a 98%. Hybridizační premixy byly připraveny dle tabulky (Schwarzacher et Heslop-Harrison, 2000). Objemy jednotlivých složek hybridizačních premixů pro dané stringence jsou uvedeny v Tabulce č. II. Připravené premixy byly uchovávané v mrazícím boxu, nebo ihned použité.

Tabulka č. II Složení hybridizačních premixů v závislosti na jejich stringenci

	Stringence				
	61%	77%	84%	93%	98%
Formamid (100%) [μ l]	350	500	500	500	500
Dextran sulfát (50%) [μ l]	200	200	200	200	200
SSC (20x) [μ l]	250	100	32,5	10	5
dH ₂ O [μ l]	0	0	67,5	90	95

Pro hybridizační mix bylo použito 16 μ l premixu určujícího stringenci, 1 μ l značené sondy a objem reakční směsi byl do 20 μ l doplněn třemi mikrolitry redestilované vody. V některých případech byly použity dvě sondy (z gDNA dvou různých druhů) – jedna značená biotinem a jedna značená digoxigeninem. Hybridizační mix byl v mikrozkuhavce několikrát důkladně promíchán za pomoci vortexu a centrifugován ve stolní mikrocetřifuze. Poté byl celý objem reakční směsi napipetován na preparát na podložním skle, překryt krycím sklem a inkubován na topné desce termocycleru při 80 °C po dobu přesně 145 sekund. Následně byl preparát přenesen do připravené hybridizační komůrky, kde byl 16 hodin inkubován při 37 °C.

Následující den, po uplynutí inkubační doby, bylo z preparátu proudem dH₂O odmyto krycí sklo a podložní sklo s preparátem bylo naloženo do 2x SSC po dobu 15 minut. Následně bylo provedeno opláchnutí destilovanou vodou. Poté bylo na preparát aplikováno 30 μ l 1% blokovacího činidla s protilátkou streptavidin-Cy3 (v poměru 1:1000) či antidig-FITC (v poměru 1:200). Vše bylo překryto krycím sklem a inkubováno v hybridizační komůrce při 37 °C 2 hodiny. Po uplynutí inkubace bylo krycí sklo odmyto, preparát osušen a převrstven 15 μ l Vectashieldu s DAPI (Vector Laboratories). Po zakrytí krycím sklem a 30 min odležení bylo možné preparát vyhodnotit pomocí fluorescenčního mikroskopu. Preparáty bylo možné uchovávat v chladničce, v temném prostředí.

4.2.7 Vyhodnocení experimentu

Pro pozorování hybridizovaných preparátů byl použit fluorescenční mikroskop Olympus AX70 s chlazenou CCD kamerou, která umožnila přenos obrazu pozorovaného v okuláru na monitor počítače. Preparát byl umístěn na křížový stolek mikroskopu a upevněn do vodiče preparátu. Po vyhledání vhodné metafáze při filtru pro DAPI

a zvětšení 20x, byl na krycí sklo preparátu aplikován imerzní olej a použit objektiv se zvětšením 100x. Po zaostření metafáze byl obraz kamerou přenesen do počítače, kde v programu MicroImage byla možná jeho další úprava. Metafáze byla snímána pod filtrem pro DAPI, který svítí modrou fluorescencí a filtrem pro Cy3, jehož fluorescence je červená. Po nasnímání metafáze pod oběma filtry byly v programu MicroImage snímky spojeny. Snímku zobrazujícímu fluorescenci DAPI byla v programu přiřazena červená pseudobarva a snímku s fluorescencí Cy3 byla přiřazena zelená pseudobarva. Ve výsledném obrázku tedy byly očekávány na černém pozadí červené chromozomy se zeleně svítící sondou. Dále byl upraven kontrast a sytost barev a snímek uložen. Na jednom sklíčku bylo vyfoceno minimálně pět metafází.

5. VÝSLEDKY

V první části experimentální práce jsem se zabývala ověřením a v některých případech stanovením počtu chromozomů a ploidie vybraných druhů polyploidních kostřav. Druhá část pak byla zaměřena na zjištění genomového složení u vybraných genotypů. V této části jsem využívala metodu genomové *in situ* hybridizace.

5.1. Stanovení počtu chromozomů a ploidie

Nejprve byly ověřeny a u některých genotypů stanoveny počty chromozomů a ploidie. Všechny druhy měly stejný počet chromozomů jako dosud uváděné. *F. mairei* a *F. pratensis* subsp. *apennina* měly 28 chromozomů a byly tudíž tetraploidní, *F. arundinacea* subsp. *atlantigena* měla 56 chromozomů (oktoploid) a *F. arundinacea* subsp. *letourneuxiana* byla dekaploidní se 70 chromozomy. Vůbec poprvé bylo zjištěno, že *F. arundinacea* subsp. *uechtriziana* je hexaploid, jehož celkový počet chromozomů je 42 (viz Obrázek č. 6a) Druhým druhem s dosud neurčeným počtem chromozomů byla *F. arundinacea* subsp. *orientalis*, která se rovněž ukázala být hexaploidem s 42 chromozomy, což lze vidět na Obrázku č. 6b.

5.2. Genomové složení kostřav

Metodou GISH byla provedena charakterizace genomů jednotlivých vybraných druhů kostřav, kterými byly *Festuca pratensis* subsp. *apennina* (De Not.) Hegi, *Festuca mairei* St. Yves, *Festuca arundinacea* subsp. *uechtriziana* (Wiesb.) Beck, *Festuca arundinacea* subsp. *orientalis* (Hack.) Tzvelev, *Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *atlantigena* (St.-Yves) Auquier a *Festuca arundinacea* subsp. *letourneuxiana* St. Yves. Na preparátech z těchto druhů byly testované sondy z rostlin *Festuca pratensis* Huds., *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* Boiss, *Festuca mairei* St. Yves, *Festuca gigantea* (L.) Vill., *Festuca arundinacea* Schreb. a *Festuca arundinacea* subsp. *atlantigena* (St.-Yves) Auquier. Cílem bylo určit jednotlivé rodičovské druhy kostřav. Celkem bylo vytvořeno 90 preparátů.

F. pratensis subsp. *apennina*: Na tento druh byly použity sondy připravené z gDNA *F. pratensis*, *F. glaucescens*, *F. mairei* a *F. gigantea*. Sonda z *F. pratensis* poskytovala nerovnoměrný signál mezi jednotlivými chromozomy, což lze vidět na Obrázku č. 4. Přesto se nepodařilo spolehlivě potvrdit, že dvě sady chromozomů (14 chromozomů)

pochází z tohoto druhu a jde tudíž o allotetraploida. Ostatní sondy poskytovaly disperzní či žádný signál u všech chromozomů v závislosti na zvolené stringenci.

F. mairei: Při nízkých stringencích (61% a 77%) byl detekován disperzní signál na všech 28 chromozomech u všech testovaných sond a při vyšších stringencích (84% a víc) signál detekován nebyl vůbec.

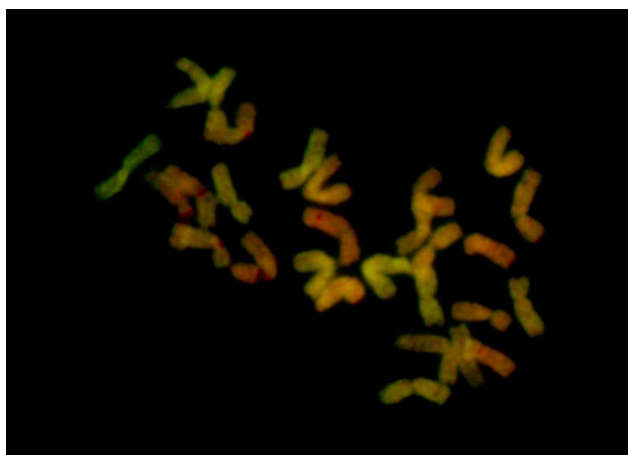
Festuca arundinacea subsp. *atlantigena*: Při nízké stringenci (61%) byl detekován disperzní signál na všech chromozomech při použití sond z *F. mairei*, *F. gigantea* a *F. arundinacea*. Při podmínkách vyšší stringence byl tento signál detekován jen při použití sondy z *F. arundinacea* (viz Obrázek č. 5).

Festuca arundinacea subsp. *letourneuxiana*: Při nízké stringenci (61%) byl detekován disperzní signál na všech chromozomech při použití sond z *F. arundinacea* a *F. arundinacea* subsp. *atlantigena*. Při stringenci 77% byl tento signál u všech chromozomů detekován při použití sondy z *F. arundinacea*. Při vyšších stringencích (84% a víc) již detekován nebyl.

F. arundinacea subsp. *uechtriziana*, *F. arundinacea* subsp. *orientalis*: Genomová *in situ* hybridizace prokázala, že tyto dva druhy mají stejné genomové složení jako *F. arundinacea* Schreb., tj. jeden subgenom (14 chromozomů) pochází z druhu *F. pratensis* a dva subgenomy (28 chromozomů) pochází z druhu *F. glaucescens* (viz Obrázek 6a a 6b). Genomové složení těchto poddruhů bylo zjištěno vůbec poprvé.

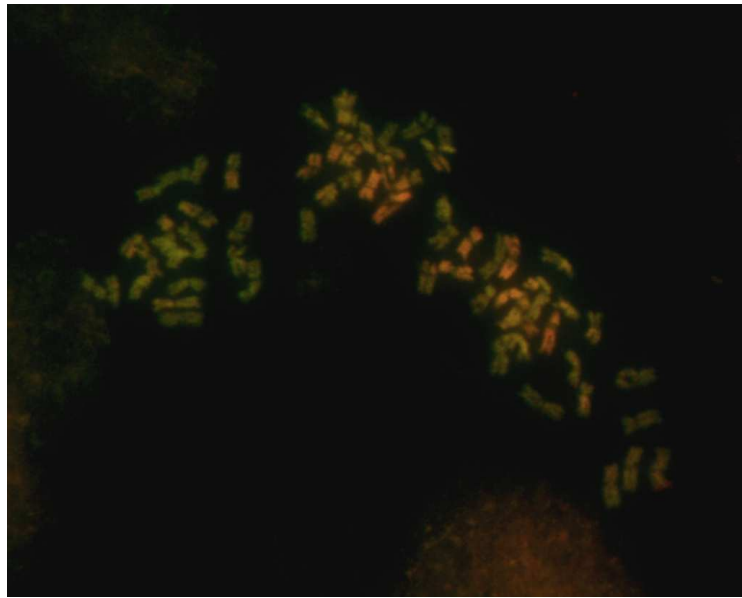
Obrázek č. 4 Cytogenetická charakterizace chromozomů kostřavy luční italské.

Genomová *in situ* hybridizace na roztlaku metafázních chromozomů tetraploidní *F. pratensis* subsp. *apennina*. Jako sonda byla použita gDNA z diploidní kostřavy luční (*F. pratensis*) značena digoxigeninem (zelená barva). Všechny chromozomy byly podbarveny DAPI (červená pseudobarva). Jak je patrné z fotografie, hybridizační signál má různou intenzitu na různých chromozomech, což indikuje allopolyploidní původ tohoto poddruhu.



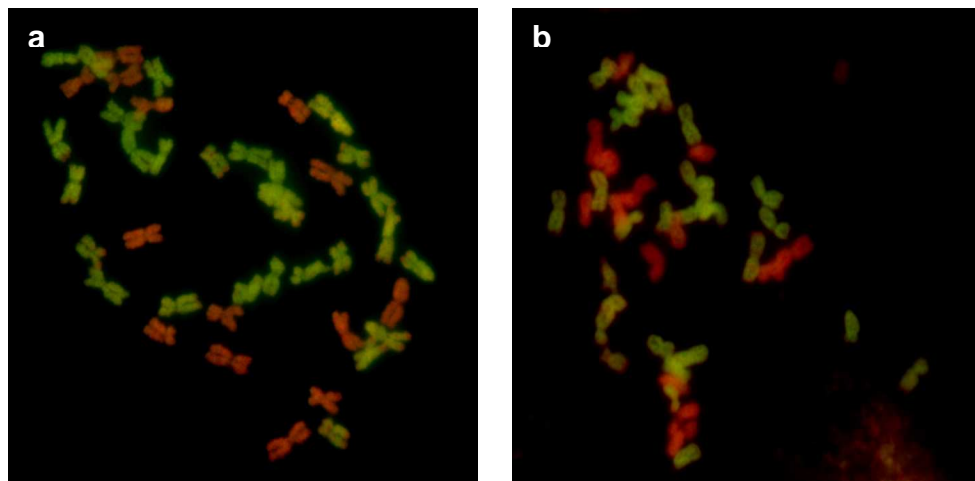
Obrázek č. 5 Cytogenetická charakterizace chromozomů *Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *atlantigena* (St.-Yves) Auquier

Genomová *in situ* hybridizace na roztlaku metafázních chromozomů oktaploidní *F. arundinacea* subsp. *atlantigena* se sondou z gDNA hexaploidní kostřavy rákosovité (*F. arundinacea*) značené digoxigeninem (zelená barva). Všechny chromozomy byly podbarveny DAPI (červená pseudobarva). GISH nedokázala odlišit jednotlivé subgenomy tohoto oktaploidního poddruhu a byl lokalizován disperzní signál na všech chromozomech.



Obrázek č. 6 Cytogenetická charakterizace chromozomů *F. arundinacea* subsp. *uechtritziana* (a) a *F. arundinacea* subsp. *orientalis* (b).

Genomová *in situ* hybridizace na roztlaku metafázních chromozomů hexaploidních *F. arundinacea* subsp. *uechtritziana* (a) a *F. arundinacea* subsp. *orientalis* (b) se sondami z gDNA *F. glaucescens* značené digoxigeninem (zelená barva) a gDNA *F. pratensis* značené biotinem (červená barva). K povšimnutí je stejné genomové složení obou poddruhů, které rovněž odpovídá genomovému složení hexaploidní kostřavě rákosovité (*F. arundinacea*).



6. DISKUZE

Zástupci kostřav podrodu *Schedonorus* patří mezi nejvýznamnější druhy trav používané v pícninářství a trávnickářství. Přes jejich význam je značně nejasná fylogeneze této skupiny a příbuzenské vztahy mezi jednotlivými druhy a poddruhy. Tato skupina zahrnuje velké množství polyploidů a rovněž genomové složení je většinou zcela neznámé. Tato práce tedy měla přispět k poznatkům o evoluci a struktuře genomů těchto trav. Ověřila jsem stupeň ploidie u vybraných taxonů a vůbec poprvé určila genomové složení dvou poddruhů kostřavy rákosovité – *F. arundinacea* subsp. *uechtritziiana* a *F. arundinacea* subsp. *orientalis*. Oba dva poddruhy mají shodné genomové složení a odpovídají rovněž genomovému složení kostřavy rákosovité (*F. arundinacea* s.s.), které určil taktéž pomocí genomové *in situ* hybridizace Humphreys et al. (1995). Genomová *in situ* hybridizace (GISH) se na poli určování genomového složení kříženců trav využívá již přes dvacet let. Poprvé tuto metodu použil Thomas et al. (1994) pro stanovení genomového křížení kříženců *Festuca* x *Lolium* a od té doby bylo publikováno značné množství vědeckých prací u těchto mezidruhových hybridů (shrnuto v Kopecký et al., 2008). Naproti tomu nebyla dosud publikována žádná zpráva o možnosti použití GISH u polyploidních kostřav. Můžeme pouze spekulovat, zda je to výsledek neúspěšnosti experimentů nebo jejich neprovedení. V mém případě se nepodařilo spolehlivě určit genomové složení většiny studovaných taxonů. Přesto moje výsledky indikují původ či příbuzenské vztahy některých druhů či poddruhů.

F. pratensis subsp. *apennina* byla dosud označována jako autotetraploidní cytotyp kostřavy luční (*F. pratensis* s.s.) (Lewis, 1977). GISH analýza ale ukázala nerovnoměrný signál hybridizace se sondou z gDNA kostřavy luční a indikuje, že jeden subgenom *F. pratensis* subsp. *apennina* je kostřavě luční bližší než druhý a tento poddruh je tedy spíše allopolyploidního původu. Thomas et al. (1997) použil FISH se sondami z rDNA u pěti druhů kostřav. Jeho výsledky ukazují, že *F. glaucescens* je blízce příbuzná s *F. mairei*, což koreluje i s mými výsledky, kdy GISH nebyla od sebe schopna odlišit tyto genomy ani při vyšších stringencích. Dle jejich výsledků se rovněž dá předpokládat, že kostřava obrovská a kostřava rákosovitá spolu sdílejí jeden nebo dva subgenomy. Moje experimenty však nebyly úspěšné a potvrzení této domněnky nepřinesly. Fylogenezí polyploidních kostřav se zabývala i Catalán et al. (2004) a Hand et al. (2010) a obě práce určily blízkou příbuznost kostřavy rákosovité s jejími poddruhy *F. arundinacea* subsp.

atlantigena a *F. arundinacea* subsp. *letourneuxiana*. Rovněž mé výsledky ukazují, že tyto genomy jsou si blíže příbuzné a hybridizační signál byl detekován i při vysoké stringenci. Jak bylo zmíněno výše, genom poddruhů *F. arundinacea* subsp. *orientalis* a *F. arundinacea* subsp. *uechtriziana* je dle výsledků GISH shodný s genomem kostřavy rákosovité a nabízí se otázka, zda by tyto dva poddruhy neměly být sloučeny do jednoho druhu. K tomu by však bylo třeba provést další molekulární analýzy.

7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studium genomového složení vybraných polyploidních druhů a poddruhů kostřav z podrodu *Schedonorus* - *F. pratensis* subsp. *apennina*, *F. mairei*, *F. arundinacea* subsp. *atlantigena*, *Festuca arundinacea* subsp. *letourneuxiana*, *F. arundinacea* subsp. *uechtriziana* a *F. arundinacea* subsp. *orientalis* pomocí genomové *in situ* hybridizace (GISH). Výsledky ukázaly, že *F. arundinacea* subsp. *uechtriziana* a *F. arundinacea* subsp. *orientalis* mají stejné genomové složení s kostřavou rákosovitou (*F. arundinacea* s.s.) a jsou s tímto druhem i spolu navzájem velmi blízce příbuzní. Výsledky genomové *in situ* hybridizace rovněž indikují, že *F. pratensis* subsp. *apennina* je spíše allopolyploidního původu než dosud předpokládaným autoteraploidním cytotypem kostřavy luční (*F. pratensis* s.s.). GISH spolehlivě neprokázala genomové složení ostatních polyploidních kostřav, indikují však blízkou příbuznost *F. mairei* a *F. glaucescens* a rovněž kostřavy rákosovité (*F. arundinacea*) s jejími vysokopolyploidními poddruhy – *F. arundinacea* subsp. *atlantigena* a *Festuca arundinacea* subsp. *letourneuxiana*. Závěrem lze říci, že tato bakalářská práce přispěla k objasnění fylogenetických vztahů této skupiny trav a indikovala genomové složení některých taxonů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbott, R. J., Lowe, A. J. (2004): Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society* 82 : 467–474

Adams, K. L., Wendel, J. F. (2005): Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8 : 135-141

Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J. (2006): Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* 113 : 1409-1420

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

Baumel, A., Ainouche, M., Kalendar, R., Schulman, A. H. (2002): Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* CE Hubbard (*Poaceae*). *Molecular Biology and Evolution* 19: 1218-1227

Beaulieu, J., Jean, M., Belzile, F. (2009): The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 421-435

Bensch, S., Åkesson, M. (2005): Ten Years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14 : 2899-2914

Bomblies, K., Madlung, A. (2014): Polyploidy in the *Arabidopsis* genus. *Chromosome Research* 22 : 117-134

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

Chester, M., Gallagher, J. P., Symonds, V. V., Cruz da Silva, A. V., Mavrodiev, E. V., Leitch, A. R., Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2012): Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 : 1176-1181

Chester, M., Leitch, A. R., Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2010): Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). *Genes* 1 : 166-192

Comai, L. (2000): Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant molecular biology* 43 : 387-399

De Storme, N., Geelen, D. (2013): Sexual polyploidization in plants-cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* 198 : 670-684

Dostál, J. (1989): *Nová květena ČSSR 1, 2*. Academia nakladatelství Československé akademie věd. Praha.

Dubcovsky, J., Dvořák, J. (2007): Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science* 316 : 1862-1866

Dvořák, J., Terlizzi, P., Zhang, H. B., Resta, P. (1993): The evolution of polyploid wheats : identification of the A genome donor species. *Genome* 1 : 21-31

Feuillet, C., Langridge, P., Waugh, R. (2007): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics* 24 : 24-32

Flagel, L., Udall, J., Nettleton, D., Wendel, J. (2008): Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* 6 : 16

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* 69 : 378-383

- Ganal, M. W., Altmann, T., Röder, M. S. (2009): SNP identification in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12 : 211-21
- Gaulden, M. E., Carlson, J. G. (1951): Cytological effects of colchicine on the grasshopper neuroblast in vitro with special reference to the origin of the spindle. *Experimental cell research* 2 : 416-433
- Grau, J., Steinbach, G., Váňa, J. (1998): Trávy. Lipnicovité, šáchorovité, sítinovité a rostliny podobné travám Evropy. Ikar. Praha
- Ha, M., Lu, J., Tian, L., Ramachandran V., Kasschau, K. D. (2009): Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 : 17835-17840
- Hand, M. L., Cogan, N. O. I., Forster, J. W. (2012): Genome-wide SNP identification in multiple morphotypes of allohexaploid tall fescue (*Festuca Arundinacea* Schreb). *BMC Genomics* 13 : 219
- Hand, M. L., Cogan, N. O., Stewart, A. V., Forster, J. W. (2010): Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evolutionary biology* 10 : 303
- Häntzschel, K. R., Weber, G. (2010): Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma* 241 : 99–104
- Hillier, L., Lennon, G., Becker, M., Bonaldo, M. F., Chiapelli, B., Chissoe S. (1996): Generation and Analysis of 280,000 Human Expressed Sequence Tags. *Genome Research* 6 : 807-828
- Hills, M. D., Dixon M. T. (1991): Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology* 66 : 411-453

Hrouda, L. (2007): Změny ve fylogenetické klasifikaci cévnatých rostlin. In: Sekerka, P. (ed.): Botanický systém a evidence rostlin v botanických zahradách Botanické zahrady 2007, pp. 4-22

http://plantgenera.org/illustration.php?id_illustration=136509

<http://botany.cz/cs/festuca-arundinacea>

http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosomal_DNA

<http://www.biolib.cz/cz/formsearch/?action=execute&searcharea=1&string=festuca+pratensis>

Humphreys, M. W., Canter, P. J., Thomas, H. M. (2003): Advances in introgression technologies for precision breeding within *Lolium – Festuca* complex. *Annals of Applied Biology* 143 : 1-10

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

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A. (2001): Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 15; 29 (4) : E25

Kashkush, K., Feldman, M., Avraham A. L. (2002): Gene Loss, Silencing and Activation in a Newly Synthesized Wheat Allotetraploid. *Genetics* 160 : 1651-1659

Kopecký D, Lukaszewski AJ, Doležel J (2008): Cytogenetics of Festulolium (*Festuca* x *Lolium* hybrids). *Cytogenetics and Genome Research* 120: 370–383

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

Kopecký, D., Havránková, M., Lourerio, J., Castro S., Lukaszewski, A. J., Bartoš, J., Kopecká, J., Doležel, J. (2010): Physical distribution of homeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium Multiflorum*. *Cytogenetic and genome research* 129 : 162-172

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

Könemann, Königswinter, (2007): *Botanika, Ilustrovaný abecední atlas 10 000 druhů rostlin z celého světa s návodem jak je pěstovat.* Slovart.

Lewis, E. J. (1977): Studies in festuca IV. A phyletic study of festuca pratensis var. apennina (De Not.) Hack., hybridization with synthetic tetraploid F. pratensis Huds. *Genetica* 47: 59-64.

Linnington, S., Bean, E. W., Tyler, B. F. (1979): The effects of temperature upon seed germination in *Festuca pratensis* var. *apennina*. *Journal of Applied Ecology* 16 : 933-938

Liu, B., Wendel, J. F. (2003): Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 : 365-379

Mandáková, T., Kovařík, A., Zozomová-Lihová, J., Shimizu-Inatsugi, R., Shimizu, K. K., Mummenhoff, K., Marhold, K., Lysak, M. A. (2013): The More the Merrier: Recent Hybridization and Polyploidy in Cardamine. *The Plant Cell* 25 : 3280-3295

Messing, J., Bennetzen. J. L. (2008): Grass Genome Structure and Evolution. *Plant Genomes* 4 : 41-56

- Nilsson, F. (193): Amphiploidy in the hybrid *Festuca arundinacea* × *gigantea*. *Hereditas* 20 : 181-198
- Ownbey, M. (1950): Natural hybridization and amphiploidy in the genus *Tragopogon*. *American Journal of Botany* 37: 487–499
- Paweletz, N. (2001): Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 : 72-76
- Rafalski, A. J. (2002): Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162 : 329-333
- Ramsey, J., Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 29 : 467-501
- Regal, V., Šindelářová, J. (1970): Atlas nejdůležitějších trav. Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- Riddle, N. C., Birchler, A. J. (2003): Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in genetics* 19 : 597-600
- Salmon, A., Ainouche, M. L., Wendel J. F. (2005): Genetic and epigenic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* 14 : 1163-1175
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000): Practical *in situ* Hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Shahinul, I. S. M. (2010): The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Australian Journal of Crop Science* 4 : 660-665

- Shasany, A. K., Darokar, M. P., Dhawan J., Gupta, A. K., Gupta, S., Shukla, A. K., Patra, N. K., Khanuja, S. P. S. (2005): Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity* 96 : 542-549
- Skalická, K. (2005): Polyploidie dokáže s rostlinnými genomy pořádně zatřást. *Živa* 2 : 50-53
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2009): *Genetika*. Muni Press, Brno
- Soltis, D. E., Mavrodiev, E. V., Meyers S. C. (2012): Additional origins of *Oenothera* *Tragopogon mirus*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2 : 297-311
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. (1991): Multiple Origins of the Allotetraploid *Tragopogon mirus* (Compositae): rDNA Evidence. *Systematic Botany* 3 : 407-413
- Starkar, P., Stebbins, G. L. (1956): Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *American Journal of Botany* 43 : 297-304
- Syvänen, A. C., (2005): Toward genome-wide SNP genotyping. *Nature Genetics Supplement* 37 : S5-S10
- Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith M. R., Humphreys M. W., Thomas H., Leggett J. M. (1994): Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* × *Festuca pratensis* by genomic in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 88 : 909-913
- Thomas, H. M., Harper, J. A., Meredith, M. R., Morgan, W. G., King, I. P. (1997): Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by in situ hybridization. *Genome* 40:406-410
- Torrecilla, P., Catalan, P. (2002): Phylogeny of broad-leaved and Fine-leaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany* 27 : 241-251
- Tříška, J. (1979): *Evropská flóra*. Artia. Praha.

Tyler, B., Borrill, M., Chorlton, K. (1978): Studies in *Festuca*. X. Observations on Germination and Seedling Cold Tolerance in Diploid *Festuca pratensis* and Tetraploid *F. pratensis* var. *Apennina* in Relation to Their Altitudinal Distribution. *Journal of Applied Ecology* 15 : 219-226

Urbanska, K. M., Hurka, H., Landolt, E., Neuffer, B., Mummenhoff, K. (1997): Hybridization and evolution in *Cardamine* (*Brassicaceae*) at Urnerboden, Central Switzerland: Biosystematic and molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 204 : 233-256

Vos, P., Hogers R., Bleeker, M., Reijans, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 : 4407-4414

Wang, P. J., Bughrara, S. S. (2008): Evaluation of drought tolerance for Atlas fescue, perennial ryegrass, and their progeny. *Euphytica* 164 : 113-122

Wang, P. J., Bughrara, S. S., Mian, R. M. A., Malay, C. S., Sleper, D. A. (2009): Parental genome composition and genetic classification of derivatives from intergeneric crosses of *Festuca mairei* and *Lolium perenne*. *Molecular Breeding* 23 : 299-309

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AFLP	polymorfismus délek amplifikovaných fragmetů (amplified fragment length polymorphism)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
Cy3	cyanin 3 (cyanine 3)
DArT	Diversity Arrays Technology
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DNázaI	deoxyribonukleáza I (deoxyribonuclease I)
dH ₂ O	destilovaná voda
ddH ₂ O	redestilovaná voda
<i>E. coli</i>	střevní bakterie <i>Escherichia coli</i>
EST	expressed sequence tags
ETS	vnější přepisovaný mezerník (external transcribed spacer)
F1	první filiální generace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
Fa	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i>)
Fa 6x	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i>)
Fa 8x	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>atlantigena</i>)
Fa 10x	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>letourneuxiana</i>)
Fape	kostřava luční italská (<i>Festuca pratensis</i> subsp. <i>apennina</i>)
Fg	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i> var. <i>glaucescens</i> , <i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>fenas</i>)
Fgig	kostřava obrovská (<i>Festuca gigantea</i>)
FITC	fluorescein isothiokyanát
Fm	kostřava atlasská (<i>Festuca mairei</i>)
Fp	kostřava luční (<i>Festuca pratensis</i>)
Gbp	miliardy párů bazí (giga base pair)
gDNA	genomová DNA (genomic DNA)
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace (genomic <i>in situ</i> hybridization)
HRM	analýza teplotních křivek DNA (high-resolution melting)
ISH	<i>in situ</i> hybridizace (<i>in situ</i> hybridization)
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník (internal transcribed spacer)
Lm	jílek mnohokvětý (<i>Lolium multiflorum</i>)

mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
NTS	nepřepisovaný mezerník (nontranscribed spacer)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RAPD	polymorfizmus náhodně amplifikované DNA (randomly amplified polymorphic DNA)
rDNA	ribosomální DNA (ribosomal DNA)
RFLP	délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RNázaA	ribonukleáza A (ribonuclease A)
rRNA	ribosomální RNA (ribosomal RNA)
SBE	single-base extension
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (single nucleotide polymorphism)
s.s.	sensu stricto
SSC	citrát sodný (saline-sodium citrate)
SSR	jednoduché opakující se sekvence (simple sequence repeat)
syn.	synonymum
<i>trnL-F</i>	vnitřní mezerník (intergenic spacer)