



Greining erfðamengja *xTriticoleymus* og *Rosa L.*

Petra Landmark Guðmundsdóttir



**Líf- og umhverfisvísindadeild
Háskóli Íslands
2013**

Greining erfðamengja *xTriticoylemus* og *Rosa L.*

Petra Landmark Guðmundsdóttir

10 eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í Líffræði

Leiðbeinandi
Kesara Anamthawat-Jónsson

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, desember 2013

Hér með lýsi ég því yfir að ritgerð þessi er samin af mér og að hún hefur hvorki að hluta né í heild verið lögð fram áður til hærri prófgráðu

Petra Landmark Guðmundsdóttir

Greining erfðamengja *xTriticoleymus* og *Rosa* L.

Útdráttur

Melhveiti (*xTriticoleymus*) er blendingur hveiti (*Triticum*) og melgresis (*Leymus*) tegunda. Erfðamengi *xTriticoleymus* er áhugavert vegna þess að blendingurinn er frjór og mögulega hægt að rækta hann sem nytjaplöntu. Í þessari rannsókn voru litningar einangraðir úr rótarendum *xTriticoleymus* og skoðaður fjöldi litninga *xTriticoleymus* og aðgreint hversu margir kæmu úr hvorri foreldrplöntu með genomic *in situ* hybridization (GISH). Auk þess voru 18S-25S rDNA gen kortlögð með fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Niðurstöður sýndu að *xTriticoleymus* hefði $2n=6x=42$ með 30 hveitilitninga og 12 melgresilitninga. Ríbósómgenin sýndu að önnur foreldrplantan væri hveiti með genamengi sem innihéldi B genamengi ásamt erfðamengi frá dúnmel (*Leymus mollis*). Mögulegt er að tveir *Leymus mollis* litningar skiptist út fyrir tvo hveitilitninga í tegundablöndunarferlinu og hveitiforeldrið sé því ferlitna með $2n=4x=28$ og AB genamengi.

Kristinn Guðsteinsson æxlaði saman tveimur rósategundum og fékk blendinginn *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' sem vex enn í garði hans. *Rosa* 'Dornröschen' hefur verið ræktuð á Íslandi um nokkurt skeið og er móðurplantan sem notuð var í æxlun blendingsins. Í þessari rannsókn var leitast við að ákvarða litnun og litningafjölda þessara tveggja rósaafbrigða. Það var gert með því að einangra litninga úr sprotabrumum með protoplast-dropping aðferð. Niðurstöðurnar sýndu að *Rosa* 'Dornröschen' væri tvílitna með $2n=2x=14$ og að breytileiki væri í litningafjölda innan blendingsins *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen'. Sú fruma sem var með fæsta litninga hafði $2n=28$ en sú sem hafði flesta var sexlitna með $2n=6x=42$. Sexlitna fruman hefur hugsanlega komið til með náttúrulegri tvöföldun litninga þríblendingsfrumna.

The karyotype of *xTriticoylemus* and *Rosa* L.

Abstract

The hybrid *xTriticoylemus* was established from a cross between wheat (*Triticum*) and lymegrass (*Leymus*) species. The hybrid is interesting because it is a fertile amphiploid and it might possibly be viable for cultivation as a grain crop. This research utilized an enzymatic root-tip squash method of chromosome preparation which was used to discover the genome composition in *xTriticoylemus*. The genomic *in situ* hybridization (GISH) method was used to distinguish how many came from each parental species. In addition, 18S-25S rDNA genes were mapped with fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The results showed that *xTriticoylemus* was an allohexaploid with $2n=6x=42$ from which 30 chromosomes came from wheat and 12 from lymegrass. The nucleolar organizing regions (Nor) showed that one of the parent plants was in fact a wheat containing B genome, whereas the other plant was probably *Leymus mollis*. Substitution is likely to have taken place during the hybridization process such that two of the *Leymus mollis* chromosomes were replaced by two of the wheat chromosomes. The wheat parent is probably a tetraploid with $2n=4x=28$ and AB genome.

Kristinn Guðsteinsson established a hybrid from a cross between *Rosa moyesii* var *fargesii* and *Rosa* 'Dornröschen'. Now this hybrid grows in his garden. *Rosa* 'Dornröschen', the mother plant which Guðsteinsson used in his crossing, has been cultivated in Iceland for a while now. The aim of this research was to determine the ploidy and the number of chromosomes by using a protoplast dropping method for shoot-tip chromosomes. The results showed that *Rosa* 'Dornröschen' was a diploid with $2n=2x=14$ and that there was a variation in the chromosome number of the hybrid *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen'. The cell that had the fewest chromosomes had $2n=28$ and the one that had the most was hexaploid with $2n=42$. The hexaploid cell has probably derived from chromosome doubling of the hybrid triploid cell by natural means.

Efnisyfirlit

Myndir	x
Skammstafanir	xi
Pakkir	xiii
1 Melhveiti (<i>xTriticoleymus G</i>).....	1
1.1 Inngangur.....	1
1.2 Efni og aðferðir	3
1.2.1 Efni og tæki.....	3
1.2.2 Aðferðir.....	5
1.3 Niðurstöður.....	9
1.4 Umræður.....	14
2 Rós (<i>Rosa L.</i>).....	15
2.1 Inngangur.....	15
2.2 Efni og aðferðir	16
2.2.1 Efni og tæki.....	17
2.2.2 Aðferðir.....	18
2.3 Niðurstöður.....	19
2.4 Umræður.....	21
Heimildir	23
Viðauki.....	25

Myndir

Mynd 1: Litningafjöldi <i>xTriticoleymus</i>	11
Mynd 2: Aðgreining litninga <i>xTriticoleymus</i>	12
Mynd 3: Kortlagning 18S-25S ríbósómgena í erfðamengi <i>xTriticoleymus</i>	13
Mynd 4: Litningafjöldi <i>Rosa moyesii</i> var <i>fargesii</i> x <i>Rosa</i> 'Dornröschen' $2n > 30$	20
Mynd 5: Litningafjöldi <i>Rosa moyesii</i> var <i>fargesii</i> x <i>Rosa</i> 'Dornröschen' $2n = 28$	20
Mynd 6: Litningafjöldi <i>Rosa</i> 'Dornröschen'	21

Skammstafanir

bp = basapör

cm = sentimetrar

g = grömm

kb = kílóbasapör

L = lítrar

M = mólur

mL = millilítrar

mm = millimetrar

mM = millimólur

nm = nanómetrar

rpm = hringir á mínútu (rounds per minute)

°C = gráður á Celsius

μl = míkrolítrar

Þakkir

Ég vil þakka leiðbeinanda mínum, Dr. Kesöru Anamthawat-Jónsson, fyrir hjálpina, samstarfið og allt sem hún kenndi mér á meðan á þessari rannsókn stóð.

Ég þakka Lilju Karlsdóttur fyrir aðstoðina og samstarfmönnum mínum fyrir gott samstarf.

Ég vil þakka systur minni, Ástu Guðmundsdóttur, fyrir yfirlestur og hjálp við uppsetningu. Einnig vil ég þakka öllum þeim sem lásu yfir ritgerðina fyrir mig.

Síðast en ekki síst vil ég þakka foreldrum mínum, þeim Jóhönnu Þórunni Sturlaugsdóttur og Guðmundi Helga Magnússyni, sérstaklega fyrir allan stuðninginn í gegnum alla mína skólagöngu.

1 Melhveiti (*xTriticoleymus G*)

1.1 Inngangur

Plöntur fara í gegnum ákveðna þroskunar- og þróunarferla sem valda því að litningafjöldinn breytist. Þroskunarferlar skiptast í einlitna kynliðastig (n) og tvílitna gróliðastig ($2n$). Grunntala er táknuð með x og stendur fyrir fjölda litninga á einlitna stigi í upprunalegri einstofna grein eða deild (Guerra, 2008, bls. 340). Grunntalan er þróunarferli.

Lífvera er sögð vera allopolyploid ef hún hefur blöndu erfðamengja frá fleiri en einni forfeðrategund (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 4). Amphiploid er millikynblendingur (interspecific hybrid) sem hefur allavega eitt heilt tvílitna litningapar frá hverri forfeðrategund. (Merriam-Webster, 2013).

Triticum aestivum tilheyrir ættbálkinum Triticeae (Anamthawat-Jónsson o.fl., 1997, bls. 293). Það er sexlitna planta, upprunin úr einni tvílitna plöntu, *Aegilops squarrosa* (DD), og einni allotetraploid plöntu, upprunni úr tveimur tvílitna plöntum *Triticum monococcum* (AA) og tegund sem líktist *Aegilops speltoides* (BB/SS) og er því kallað Brauðhveiti ABD (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 4). Ferlitna kynblandan sem er án D genamengisins er hveitið sem í dag er notað í pasta en brauðhveitið kom fram heldur seinna (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 4). Hveitið sem notað var við kynblöndun *xTriticoleymus*, eða melhveitis eins og það er kallað á íslensku, var að öllum líkindum ferlitna afbrigði af *Triticum* ættkvíslinni með AB genamengi (Anamthawat-Jónsson, 1999, bls. 1087).

Hitt foreldri *xTriticoleymus* er *Leymus mollis* (dúnmelur). En það er litna tegund með $2n=4x=28$ og $N^s_1N^s_2$ genamengi sem er líklega frá *Psathyrostachys* (Anamthawat-Jónsson, 2001, bls. 558). Dúnmelur er fjölært gras sem vex í sandi. Strá þess er hært rétt neðan við axið sem er með þétthærðar axagnir efst. Neðri blómögnin er hærð og týtulaus (Áskell Löve, 1970, bls. 118).

Þrjár gerðir amphiploid úr kynblöndun hveitis og dúnmels hafa verið greindar með FISH tækni, sem verður útskýrð síðar. Þessar þrjár gerðir eru kallaðar M, G og U. Þær áttu það

allar sameiginlegt að vera allohexaploid með $2n=6x=42$ (Anamthawat-Jónsson, 1999, bls. 1087). Í þessari tilraun var notast við gerð *G. xTriticoleymus* er frjó með svipaða kornuppskeru og hveiti í réttu og stöðugu umhverfi: Við 15 °C á daginn og 13 °C á nóttunni og með 16 klukkustunda dagsljós. Plantan hefur ekki myndað fræ við íslenskar aðstæður (Anamthawat-Jónsson, 1999, bls. 1088).

Fjöldi litninga í erfðamengi er mjög mikilvægt kennileiti þess af nokkrum ástæðum. Það er ódýr og auðveld leið til að afla sér grunnupplýsinga um tegund eða grein. Hvorki ytri aðstæður né þróun hafa áhrif á fjölda litninga, auk þess sem fjöldi litninga er oftast sá sami innan tegundar, enda leiðir rangur litningafjöldi í flestum tilfellum til vandamála í meiósu eða ófrjósemi (Guerra, 2008, bls. 339).

Í vaxtarvef rótarenda verður mikil frumuskipting til að lengja ræturnar. Rótarendarnir eru oft settir í ísvatn áður en litningaeinangrunin er gerð, þetta er kallað formeðferð. Markmiðið er að fá sem flestar frumur í metafasa svo litningarnir séu vel aðgreindir. Tímasetningin er mjög mikilvæg til að ná frumum í metafasa. Tíminn sem rötarendarnir eru hafðir í ísvatninu fer eftir stærð genamengisins, yfirleitt 26-28 klukkustundir fyrir hveititegundir (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 8). Því stærra sem genamengið er því lengur eru ræturnar hafðar í ísvatninu.

Í frumuferðafræði er notast mikið við tvær aðferðir sem kallast fluorescence *in situ* hybridization (FISH) og genomic *in situ* hybridization (GISH). Með FISH eru litningar merktir með flúrljómandi nemum sem hafa þekkta genaröð (Anamthawat-Jónsson, 2001). GISH er gert eins og FISH nema við GISH er notað heilt genamengi sem flúrljómandi nema (Anamthawat-Jónsson, 1990) Þetta er gert til að komast að því hversu stórt hlutfall genamengis kynblendingsins er sameiginlegt með hvorri foreldraþöngu.

Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) eru marg endurteknar genaraðir í erfðamengi lífvera (Wicke, Costa, Muñoz og Quandt, 2011, bls. 321). Í erfðamengi Triticeae eru raðirnar 5S og 18S-25S rDNA til staðar (Castilho og Heslop-Harrison, 1995, bls 91). 18S genaraðirnar tjá fyrir minni ríbósóm einingunni en 25S genaraðirnar tjá fyrir þeirri stærri. Allar helstu landplöntuættir eiga það sameiginlegt að hafa svokallaða S gerð nrDNA, en þá mynda 5S raðirnar þyrpingar aðskildar 45S röðunum (Wicke o.fl., 2011, bls. 321-322).

Tilgangur tilraunarinnar var að aðgreina og flokka (karyotyping) litninga í *xTriticoleymus*, það er athuga hversu margir þeirra væru frá hveiti og hversu margir frá dúnmel. Jafnframt að greina erfðamengið og kortleggja ríbósómgenin, það er skoða í hvaða litningum og hvar á þeim ríbósómgenin eru tjáð.

1.2 Efni og aðferðir

Farið var eftir fyrirmælum í kennslubókinni *Selected Methods in Plant Cytogenetics* (Anamthawat-Jónsson, 2013).

1.2.1 Efni og tæki

Litningaeinangrun úr rótarendum

- Fræ Melhveitis voru ræktuð og notaðir rótarendar þeirra.
- Tæki: Víðsjá, smásjá, flúrsmásjá, 37 °C hitakassa og skápur fyrir dafnandi vöxt fræanna.
- Almennar rannsóknarstofuvörur: 1,5 mL eppendorf glös, petriskálar, sýnisgler, þekjugler, 9 cm síupappír, krukkur, pinsettur, nálar, rakvélablað, línskafslausar þurrkur, dropper flaska, tilraunaglasagrind, penni til að rispa gler (glass- or diamond –tip pen), sýnisglerjabakki og geymslubox.
- Festivökvi: Samanstóð af einum hluta ísediksýru (glacial acetic acid) á móti þremur hlutum af 96% etanóli.
- Ensímbuffer: Til að byrja með voru gerðar tvær stofnlausnir, A og B. Gerðir var 500 mL af lausn A þannig að 10,5 g (0,1 M) af einvatnaðari sítrónusýru (citric acid monohydrate) var látin leysast upp í vatni sem var fyllt upp í 500 mL. 500 mL lausn B var gerð þannig að 14,7 g (0,1 M) trínatrium sítrat (trisodium citrate) var látið leysast upp í vatni sem var fyllt upp í 500 mL. Til að gera 1 L af ensímbuffer var blandað saman 40 mL af lausn A, 60 mL af lausn B og 900 mL af eimuðu vatni.
- Sýruhreinsuð sýnisgler: voru hreinsuð í krómsýru (krómtríoíð í 80% brennisteins-sýru), í 24 klukkustundir eða lengur. Þau voru síðan skoluð fyrst með kranavatni og síðan með eimuðu vatni og geymd í 96% etanóli.
- Ensímblanda fyrir rótarenda: Til að gera 10 mL af ensímblöndu var blandað 1 g af sellulósa (Onozuka R10 frá Merck #102321) við 1,2 mL af pektínasa (Sigma P-

4716, úr *Aspergillus niger*) og 8,8 mL af ensímbuffer. Ensímblandan var geymd við -20 °C.

- 45% ediksýra
- Nítrógen í vökvaformi
- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole): Lausn með 100 µl DAPI í hverjum mL af vatni var gerð í upphafi. Síðan var lausnin þynnt í 1 µl/mL með McIlvaine's citrate buffer pH 7 (blandað saman 18 mL af 0,1 M einvatnaðari sítrónusýru og 82 mL af 0,2 M Na₂HPO₄) og geymd við -20 °C.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

- Litningar sem búið er að einangra úr rótarendum.
- Tæki: 55-60 °C heitt vatnsbað, thermocycler og flúrsmásjá með fimm síum, það er fyrir DAPI, FITC/Fluorescein, Spectrum Red/Cy3, double green and red og triple blue, green and red og önnur almenn rannsóknastofutæki sem notuð eru þegar unnið er með sameindir.
- Almennar rannsóknarstofuvörur: Smásjarglerjakrukkur, loftþétt plastbox, naglalakk eða lím, þekjugler, pinsettur, hitamælir, sýnisglerjabakki og aðrar almennar rannsóknarstofuvörur sem notaðar eru þegar unnið er með sameindir.
- Nemar: notaðar voru tvær gerðir nema fyrir GISH tilraunir. Ta nemar sem samsvöruðu öllu genamengi hveitisins og Lm sem samsvöruðu öllu genamengi *Leymus mollis*. Fyrir FISH tilraunir var notað klón pTa71 úr hveiti, sem er 9 kb langur og inniheldur hluta 18S og allt 5,8S og 25S táknrófssvæðin, var notaður sem 18S-25S rDNA nemi.
- RNasi A: 10 mg af RNasi A (Sigma R-9009 eða R-6513, án DNasi) voru leyst upp í 10 mM Tris pH 8, 15 mM NaCl. Athuga þurfti DNasi virkni með rafdráttargeli. Geymt við -20 °C. Við notkun var 20 µl RNasi blandaður við 40 mL af 2x SSC, þ.e. styrkur þess var 5 µl/mL.
- SSC buffer: 1 L af 20x SSC með pH 7 var gerður með að blanda 3 M NaCl (175,4 g) og 0,3 M Na₃ citrate (88,2 g). pH var stillt af með að bæta við lausnina 1 N HCl (um það bil 0,7 mL). Og það sett í dauðhreinsun. Til að gera 2xSSC var sett 10% af 20x SSC á móti 90% af eimuðu vatni.
- 4% Paraformaldehýð: Til að gera 50 mL af 4% paraformaldehýði voru 2 g af paraformaldehýði sett í 40 mL af vatni og það hitað í 70 °C. Þremur dropum af 1 M

NaOH var bætt út í til að gera lausnina tærari. pH gildið átti að vera 7-7,5. Hægt að geyma við -20 °C.

- 20% dextran súlfat: 20% af dextran var blandað á móti 80% af vatni og það hitað upp að 70 °C þar til dextranið leystist upp. Geymt við stofuhita en fyrir notkun var það hitað upp í 40 °C því það er mjög seigt.
- Formamíð: Geymt við -20 °C sem 100% formamíð (Sigma F7508 eða Merck 9684). 90% formamíð var gert með að gera blöndu með 90% af formamíði og 10% af 2xSSC.
- DAPI: sama aðferð og notuð var í *litningareinangrun úr rótarendum* hér á undan nema hér var notað 2 µl/mL DAPI þar sem hitt var ekki til staðar og áhrifin sem það hefði á sýnið nánast þau sömu.
- Antifade mountant: Er notað til að halda í flúrljómunina sem lengst þegar sýnið er í flúrsmásjanni. Hér var notað Citifluor AF1 (Citifluor Ltd, Connaught Bldg, City University, Northhampton Square, London EC1V 0HB, UK).
- Almenn efni sem notuð eru í sameinda- og frumuferðafræðirannsóknum: 0,3 M EDTA (pH 8), 3 M natríumasetat, 1x TE (pH 8) úr 10 mM Tris og 1 mM EDTA, 10 % SDS, festivökvi (sami og notaður var í *litningaeinangrun úr rótarendum*).

1.2.2 Aðferðir

Litningaeinangrun úr rótarendum

Í upphafi var fræspírun melhveitis sett upp. Sett voru sjö fræ á petriskál og þau vökvuð. Fjórum dögum síðar var safnað rótarsýnum og þau sett í ísvatn. Rætur fræanna áttu að vera 1-2 cm en þær höfðu vaxið of mikið og því var einungis tekinn rótarhluti (1-2 cm) með rótarenda. Notað var eppendorf glas. Fyrir var klaki í $\frac{3}{4}$ af glasinu og svo var bætt við dálitlu af vatni við stofuhita til að bræða klakann örlítið. Settar voru 13 rætur í glasið, það merkt og geymt í kæli við 4 °C í 28 klukkustundir. Ræturnar voru hafðar í þetta langan tíma vegna þess að *xTriticoleymus* er með fremur stórt genamengi. Ef rótarendarnir hefðu verið hafðir í styttri tíma í ísvatninu hefði mítósan ekki verið komin nógu langt. Hins vegar ef þeir hefðu verið í lengri tíma hefði mítósan verið komin of langt.

Ræturnar voru teknar upp úr ísvatninu og léttþurrkaðar á pappír. Þær voru settar í eppendorf glas sem í var festivökvi. Ræturnar voru hafðar í glasinu í klukkutíma við

stofuhita og var svo skipt um festivökva og glasið haft áfram við stofuhita í aðra klukkustund. Síðan var glasið með rótunum sett í frost við -20°C .

Nokkrum dögum síðar var bætt við öðru glasi með 10 rótum. Aðferðirnar voru þær sömu og áður; fræspírur var sett upp, safnað rótarsýnum, þau sett í ísvatn og festivökva.

Litningar voru einangraðir úr rótarsýnum. Nokkrar rætur voru settar í ensímbuffer við stofuhita, fyrst í 10 mínútur í eina buffer lausn og svo var skipt um lausn og ræturnar hafðar í henni í að minnsta kosti 10 mínútur. Þá var tekin ein rót í einu og rótarendinn (2-3 mm) skorinn af og settur á sýruhreinsað sýnisgler. Glerið var sýruhreinsað til að litningarnir myndu festast á því en ekki á þekjuglerinu og einnig til að hreinsa burt óhreinindi. Á rótina voru settir 18 μl af ensímblöndu. Á fyrstu sýnin var ensímið sem notast var við líklega of hreint þannig þau meltu oft alveg frumuhimnurnar og úr varð litningasúpa. Í seinni sýnum var notast við annað ensím sem var líklega ekki jafn hreint og skildi eftir smá frumuhimnu. Sýnisglerið var sett á petriskál og henni lokað svo rótarendinn myndi ekki þorna. Þar næst var petriskálin sett í 37°C heitan ofn í 15-20 mínútur. Unnið var með rótarenda úr fræi, þeir eru oft mýkri en rótarendar fullvaxinna plantna og þurfa því styttri tíma í ofninum. Petriskálin var svo tekin úr ofninum og settur dropi af ensímbuffer á rótarendann, dropinn dreginn út með pappír og settur annar sem var látinn liggja á glerinu í 5-10 mínútur. Hann var þurrkaður með síupappír og settur dropi af 45% ediksýru. Dropinn var dreginn út og settur annar dropi af 45% ediksýru og hann látinn liggja á glerinu í 3-8 mínútur.

Þá var vaxtarvefur rótarendans dreginn út með nál. Það var gert undir víðsjá og rótarendanum sjálfum var hent. Vaxtarvefnum var dreift um mitt sýnisglerið með nál, svo sett þekjugler yfir og pikkað örlítið í það með nálarendanum alveg lóðrétt án þess að færa neitt til. Síðan voru teknir tveir síupappírar, þeir brotnir í tvennt, sýnisglerið sett á milli þeirra og þrýst á með putta. Mikilvægt var að fara varlega að færa ekkert til eins og áður því þá gátu frumurnar rifnað og litningarnir farið út. Sýnisglerið var skoðað undir smásjá og séð hvernig til tókst. Ef litningaeinangrunin hafði tekist ágætlega var sýnisglerinu dýft í fljótandi nítrogen, þekjuglerið tekið af með rakvélarblaði og sýnisglerið látið þorna. Það var síðan rispað undir á þeim stað sem þekjuglerið hafði verið til að auðvelda vinnu síðar við að finna frumur. Sýnisglerin voru síðan geymd í sýnisglerjaboxi við 4°C .

Notast var við stjörnukerfi til að flokka sýnin eftir gæðum. Gæðin fóru eftir því hversu margar frumur sáust í metafasa, hreinleika sýnis og hvort litingarnir væru vel dreifðir án þess að vera út um allt. Sýnin gátu fengið 0-3½ stjörnu. Sýni sem fengu minna en tvær stjörnur var hent. Sýni sem fengu 2 eða 2½ stjörnur voru lituð og frumur í þeim nýttar í að telja litninga og sýni sem fengu 3 eða 3½ stjörnu voru notuð í FISH.

Valin voru sýni til litunar og talningar litninga. 10-20 µl af DAPI lit voru settir á sýnið og þekjugler látið yfir. Síðan var sýnið skoðað í flúormásjá með 340-380 nm UV örvun og 430-450 nm endurkasts bylgjulengdar sem varð til þess að ljósið endurkastaðist blátt. Sýnin voru skoðuð með 20x linsu sem er 200x stækkun en CCD myndirnar voru teknar með 100x linsu sem er 1000x stækkun.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Formeðferð litninga var gerð þannig að fyrst var 20 µl RNase blandað við 40 mL 2xSSC í sýnisglerjakrukku og hún sett í ofn við 37 °C í eina klukkustund. Sýnisglerið var þvegið tvisvar sinnum í fimm mínútur með 2xSSC (með 20 µl Rnase) sem var 37°C heitt, það er sýnisglerið haft í fimm mínútur í krukunni í hvort skiptið. Þá var sýnið sett í 4% paraformaldehýð við stofuhita í 10 mínútur. Síðan var það þvegið aftur með 2xSSC í fimm mínútur, en nú var 2xSSC við stofuhita. Til að þurrka sýnið var það sett í 70% etanól í tvær mínútur, þá 90% etanól í tvær mínútur og að lokum í 96% etanól í tvær mínútur. Etanólið var haft í frysti þar til sýninu var dýft í það. Að lokum var sýnið loftþurrkað.

Fyrst var búin til nemablanda fyrir GISH. Það var byrjað á því að hita dextran. Ástæðan fyrir því að það er hitað er að dextran er mjög seigt og það er auðveldara að ná því upp í pípettuoddinn ef það er heitt. Auk þess var örlítið af enda pípettuoddsins klipptur af til að auðvelda ferlið enn frekar. Byrjað var á að setja 4 µl af dextran í eppendorf glas. 11 µl af formamíði var bætt úti, 2 µl 20xSSC og að lokum 1 µl 10% SDS. Það var spunnið í Quick-spin og þá var öll blandan komin í botn glassins og orðin vel blönduð.

Nú var nemunum bætt úti glasið. Það var settur 1 µl af grænum nemum, Lm Rch, sem lituðu litninga *Leymus mollis* og 1 µl af rauðum nemum, Ta Fluorored, sem lituðu litninga hveitisins. Blandan var samtals 20 µl.

Blandan var sett í Quick-spin og síðan soðin í sex mínútur, svo sett á ís í fimm mínútur og hún spunnin aftur í Quick-spin. 20 µl af nemablöndu voru settir á sýnisglerið. Loftbólur sem mynduðust voru sprengdar með horni þekjuglers og það sett á sýnisglerið.

Til að eðlissvipta frumurnar var sýnið sett í thermocycler í 10 mínútur við 89 °C. Það var samt lengri tíma í thermocycler því það tók dálítinn tíma að komast upp í 89 °C. Svo þurfti að lækka hitann í 10 °C skrefum þar til hann var kominn niður í um 40 °C til að geta tekið sýnið út. Sýnin voru sett í plastbox með rimlagrind og sett 2xSSC í botninn til að viðhalda raka. Boxið var geymt við 37 °C yfir nótt. Þetta var gert til að stuðla að blöndun (Hybridization).

Daginn eftir var sýnið þvegið. Þá var þekjuglerið tekið af og sýnisglerið sett í sýnisglerjakrúkkum með 2xSSC sem var við 37 °C og haft í eina mínútu og sett í aðra krúkkum með 2xSSC við 37 °C. Þegar vökva er hellt í sýnisglerjakrúkkur er betra að hafa vökvann vel yfir sýnunum svo rusl fljóti upp á yfirborðið í staðinn fyrir að festast á sýninu, sérstaklega ef vökvanum er helt af.

Sýnisglerið var sett í aðra krúkkum með 0,1xSSC sem var við 55-60 °C og það haft í fimm mínútur og skipt um 0,1xSSC tvisvar, það er gert þrisvar sinnum. Hér þurfti snögglega að skipta um vökva svo sýnið myndi ekki kólna á milli. Sýnið var sett í 2xSSC við 37 °C og látið standa þar til það var við stofuhita. Síðan var það látið í 4xSSC-Tween við stofuhita í fimm mínútur 20 µl af DAPI (notað 2 µl/mL, hefði verið ákjósanlegra að nota 1 µl/mL en var ekki til staðar) var sett á sýnið og eftir eina mínútu var glerið hreinsað með að sprauta dH₂O á glerið og það síðan látið þorna. Þá voru settir 19 µl af antifade, látið þekjugler yfir og loftbólum þrýst út ef þær voru til staðar. Sýnisglerin voru síðan geymd í ísskáp þar til þau voru skoðuð.

Þessi aðferð var notuð á fyrsta sýnið en það varð of mikil eðlissvipting, mögulega komst raki inn á sýnið sjálft þegar það var sett í rakaboxið við 37 °C, en nokkrar frumur komu samt sem áður ágætlega út en sýnið var ekki nægilega gott til að geta gert RE-FISH. Því var GISH gert við annað sýni. Það var allt gert eins og áður nema það sem tekið er fram hér á eftir.

Sýnið var fixerað í 10 mínútur við stofuhita, það er sýnið var sett í festivökva sem samanstóð af þremur hlutum af etanóli á móti einum hluta af ediki. Það var þvegið tvisvar í 96% etanóli og haft í 10 mínútur í hvoru og síðan loftþurrkað.

Skipt var út rauðu nemablöndunni fyrir aðra Ta(S) sem var sterkari og þá var bara sett 0,5 μ l af honum í stað 1 μ l. Einnig var breytt magni SDS en nú voru settir 0,5 μ l í stað 1 μ l. Til að hafa 20 μ l eins og áður var bætt við 1 μ l af H₂O.

Til að koma í veg fyrir að raki kæmist inn á sýnið var sett lím meðfram þekjuglerinu, en það hefði jafnvel verið betra að nota naglalakk. Jafnframt var hitastigið í thermocycler lækkað um 1 °C, það er haft við 88 °C.

Það var minnkað magn DAPI, nú sett 10 μ l, vegna þess að það hafði verið óþarflega mikið áður (hafði engin áhrif á sýnið). Auk þess var sett 15 μ l af antifade af sömu ástæðum.

Sýnisglerin voru skoðuð í flúrsmásjá við 1000x linsu, það er 10.000x stækkun.

Að lokum var gert re-FISH með ríbósómnemum úr hveiti. Notaðir voru nemarnir pTa71 sem 18S-25S rDNA nemi. Sýnið var sett aftur í festivökvann, ríbósómnemunum var komið á, gerð eðlissvipting og blöndun.

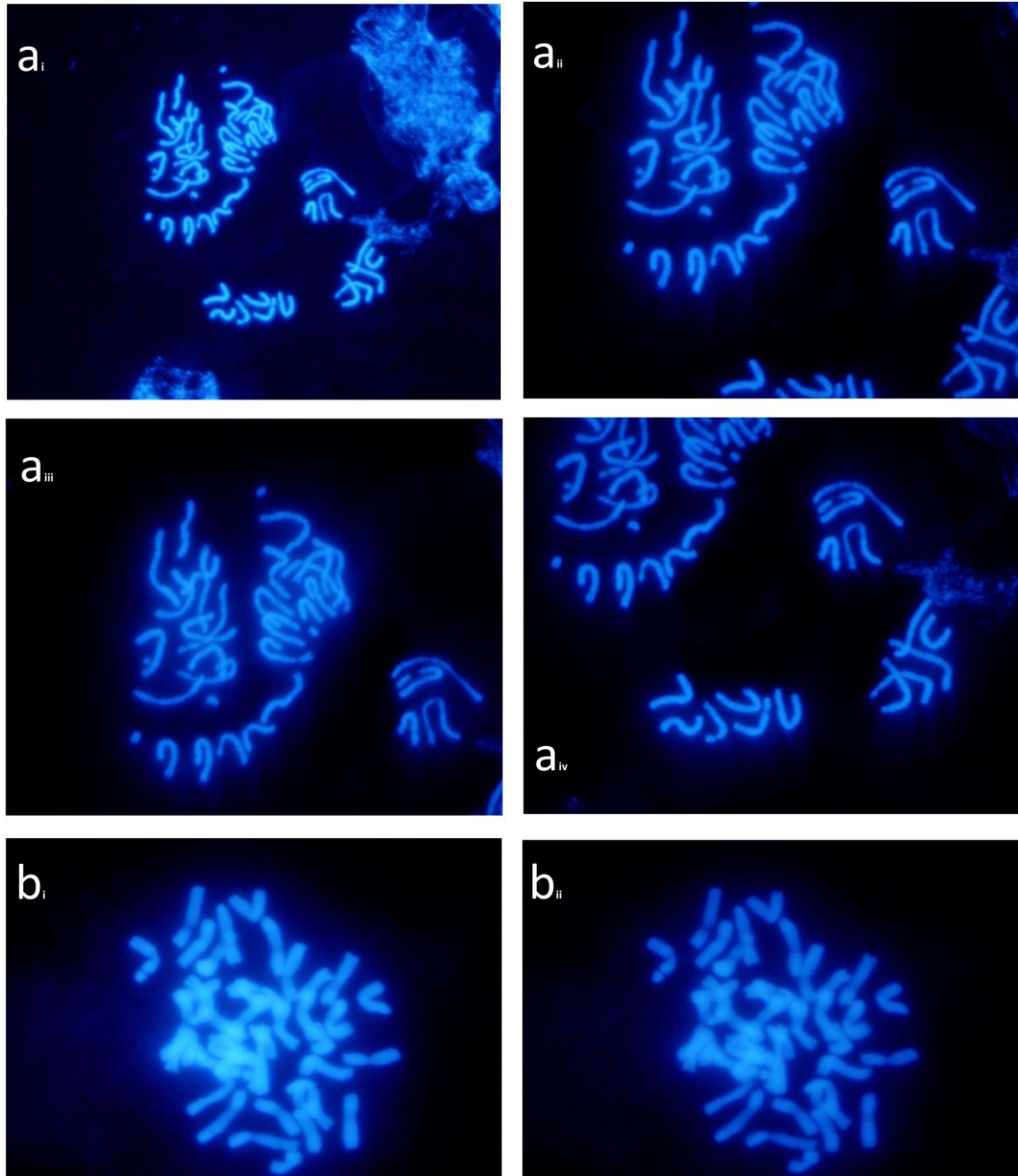
1.3 Niðurstöður

Frumur *xTriticoleymus* voru skoðaðar í mítósuskiptingu. Þær sem voru í metafasa voru valdar til að skoða frekar og taka myndir því þær höfðu best aðgreinda 2n litninga. Frumurnar voru skoðaðar í flúrsmásjá með fimm síum.

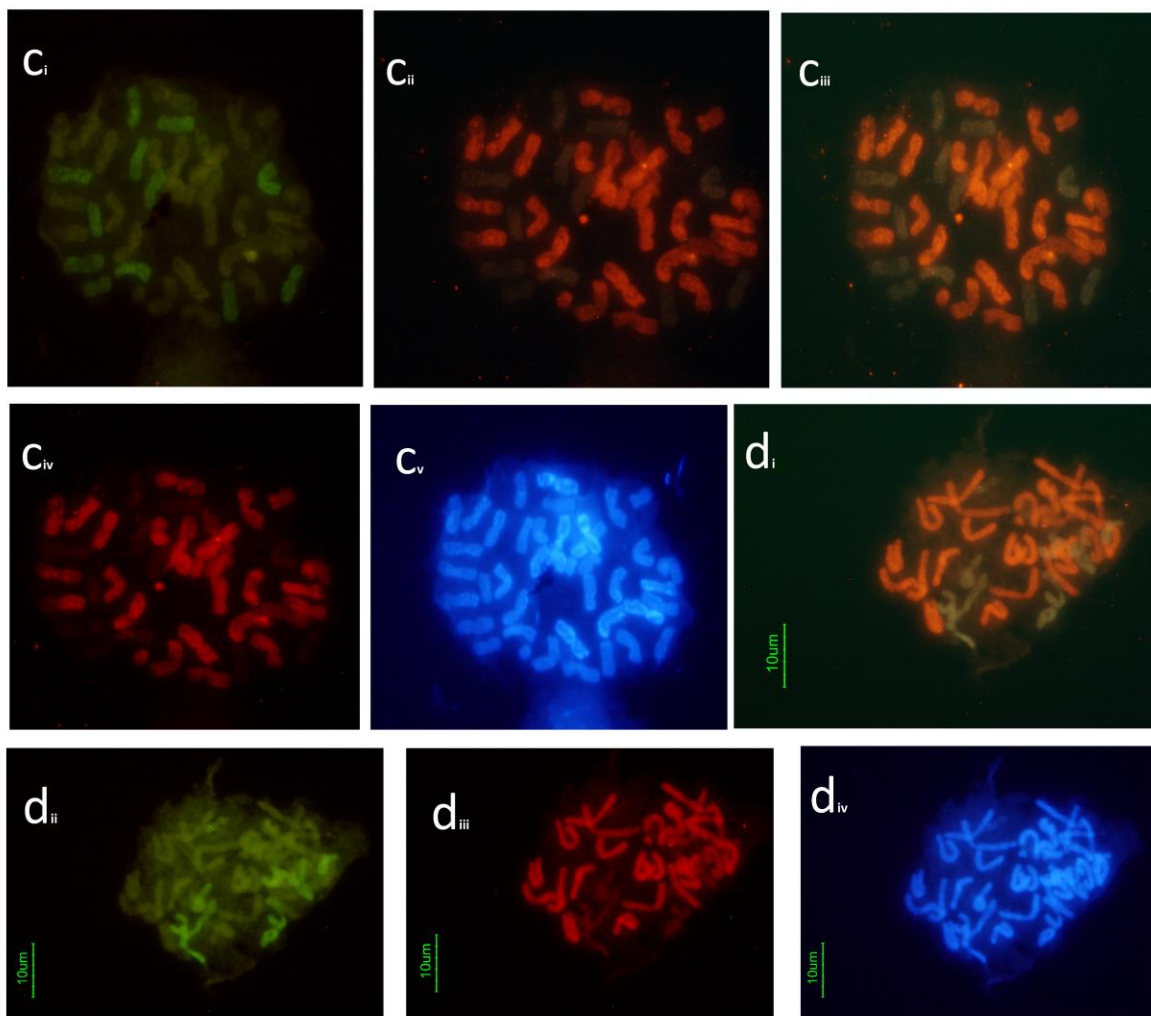
Við talningu litninga *xTriticoleymus* sést að plantan hefur 2n=42 litninga (sjá mynd 1). Þegar litningarnir eru skoðaðir eftir litun með GISH tækni sést að 30 litningar lituðust rauðir og eru þar með frá hveititegundinni (sjá mynd 2: (c_{ii}), (c_{iii}), (c_{iv}), (d_i) og (d_{iii})) og 12 litningar sem lituðust grænir eru frá *Leymus mollis* (sjá mynd 2: (c_i), (c_{iii}), (d_i) og (d_{ii})).

Einnig var notað klóninn pTa71 sem nema ríbósómgena og þau skoðuð sérstaklega. Á mynd 3 sjást átta ríbósómgenasvæði í öllum frumunum en samkvæmt Anamthawat-Jónsson (1999, bls. 1087) eru níu Nor-svæði (nucleolar organizing region): tvö m1 og tvö m2 svæði á dúnmelslitningunum og eitt B1, tvö B2 og tvö A1 svæði á hveitilítningunum.

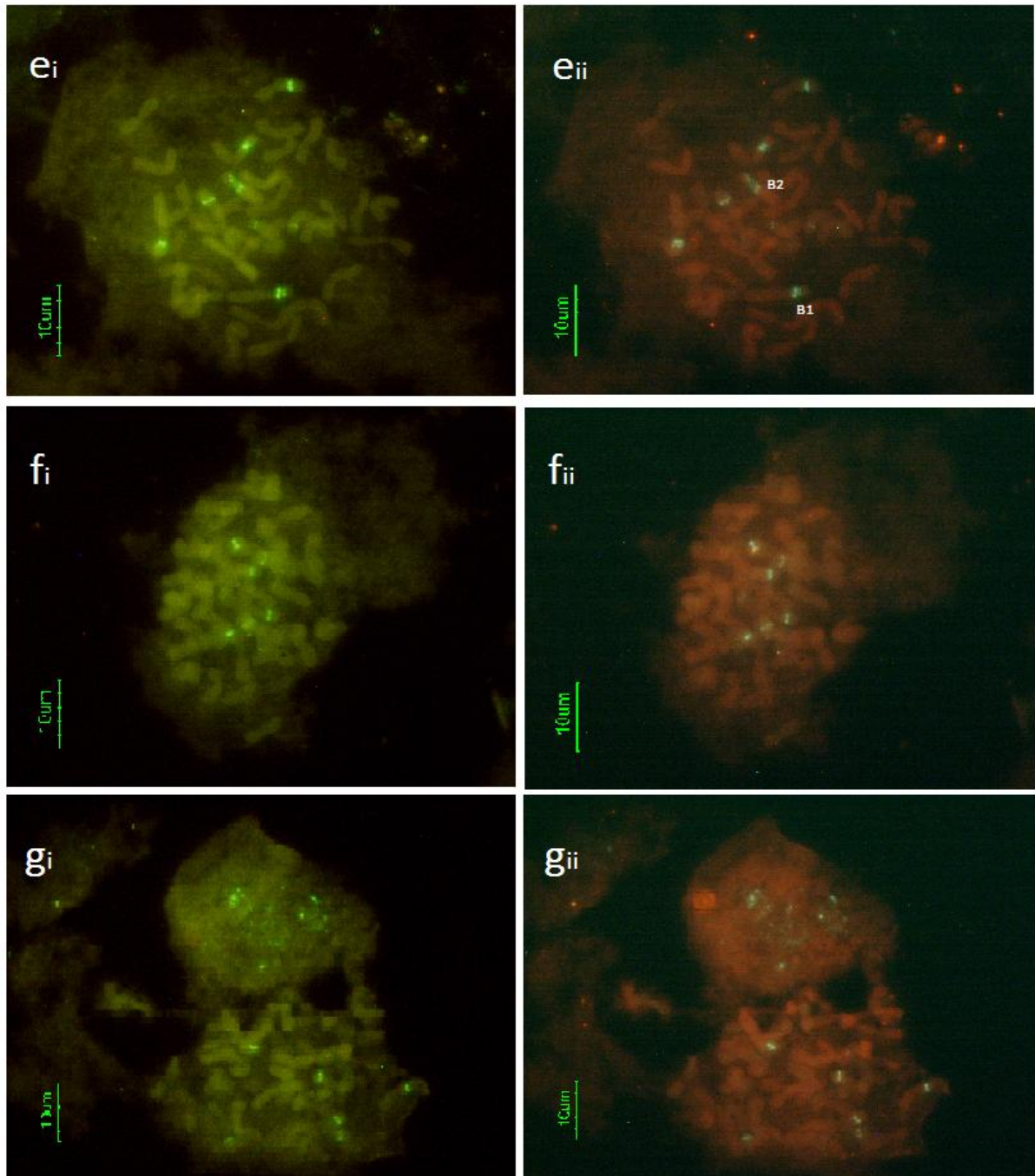
Á mynd 3 var mögulegt að greina eitt Nor-B1 og aðeins annað Nor-B2 en ekki tókst að greina hitt (Sjá myndir (e_{ii}), (f_{ii}) og (g_{ii})). Greiningin var gerð með að bera saman litninga frumanna á mynd 3 við litningana og svæðin á þeim sem Anamthawat-Jónsson greindi (1999, bls. 1089). Á mynd 3 var notaður klóninn pTa71 sem namar ríbósómgena. pTa71 er 9 kb langur og var notaður sem nemi fyrir 18S-25S rDNA. Samkvæmt rannsókn Anamthawat-Jónsson (1999, bls. 1089) þá sýna Nor-B1 og Nor-B2 öll 18S-26S ríbósómgen, svo sömu svæði hér ættu að sýna 18S-25S ríbósómgen.



Mynd 1: Litningafjöldi *xTriticoleymus* Hér má sjá frumur *xTriticoleymus* í metafasa mítósu. Frumurnar voru litaðar með DAPI litun og myndirnar teknar með 1000x stækkun í flúrsmásjá. (a_i), (a_{ii}), (a_{iii}) og (a_{iv}) eru ein og sama fruma. Hún er heldur dreifð en engin önnur fruma í metafasa fannst nálægt henni svo það er hægt að segja með nokkurri vissu að litningarnir tilheyri allir einni og sömu frumunni. (b_i) og (b_{ii}) eru sama fruma. Talning gefur 42 litninga.



Mynd 2: Aðgreining litninga *xTriticoleymus* Á myndinni eru frumur *xTriticoleymus* í metafasa mítósu. Notast var við GISH tækni til að lita frumurnar og þær skoðaðar með fimm mismunandi síum í flúrsmásjá við 10.000x stækkun. Notaðir voru grænir nemar (Lm) til að lita litninga *Leymus mollis* og rauðir nemar (Ta fluorored) til að lita litninga hveitisins með GISH. (c_i), (c_{ii}), (c_{iii}), (c_{iv}) og (c_v) eru ein og sama fruman og eins eru (d_i), (d_{ii}), (d_{iii}) og (d_{iv}) sama fruman. Mælikvarðastíkan á myndum (d_i), (d_{ii}), (d_{iii}) og (d_{iv}) tákna 10 µm. Á myndunum sést að um 30 hveitilitninga og 12 dúnmelslitninga er að ræða.



Mynd 3: Kortlagning 18S-25S ríbósómgena í erfðamengi *xTriticoleymus* Hér var notuð FISH tækni til að lita frumur *xTriticoleymus* í metafasa mítósu og þær voru skoðaðar í flúormásjá með fimm ólíkum síum við 10.000x stækkun. Notaður var neminn pTa71 sem kortleggur 18S-25S rDNA. (e_i) og (e_{ii}) eru sama fruman. Á mynd (e_{ii}) sjást Nor-B1 á einum litningi og Nor-B2 á einum litningi. Eins sýna (f_i) og (f_{ii}) sömu frumuna og (g_i) og (g_{ii}) einnig. Mælikvarðastikan á myndunum táknar 10 µm.

1.4 Umræður

Markmiðum tilraunarinnar, að aðgreina og flokka litninga *xTriticoleymus* og að greina erfðamengið og kortleggja ríbósómgenin, var náð.

Á mynd 1 sést að um 42 litninga er að ræða. En eins og tekið var fram í inngangi var við því að búast og fengust sömu niðurstöður í rannsókn Anamthawat-Jónsson (1999, bls. 1092) sem komst að því að *xTriticoleymus* væri allohexaploid með $2n=6x=42$ litninga og hefur því 2 eintök af 21 ólíkum litningum.

Við talningu litninga *xTriticoleymus* frá *Leymus mollis* sem endurkastast í grænum lit kemur í ljós að þeir eru 12 talsins, það er sex pör og að litningar hveitisins sem endurkastast rauðir eru 30 talsins og því 15 pör (sjá mynd 2). Þetta kemur heim og saman við niðurstöður í rannsókn Anamthawat-Jónsson (1999, bls. 1092). Þar sem plantan er með fastan fjölda litninga í pörum geta frumurnar auðveldlega farið í gegnum meiósu (Anamthawat-Jónsson, 1999, bls. 1092). Plantan er því frjó.

Við meiósu *Leymus mollis* verða $n=14$ litningar svo það lítur út fyrir að tveir litningar glattist við kynblöndunina við hveitiafbrigðið og skiptast að öllum líkindum út fyrir hveitilítningana sem eru 30 talsins. Því má ætla að hveitilítningarnir séu líka $n=14$ í meiósu. Því er líklegt að hveitið sé ferlitna með $2n=4x=28$ og með AB genamengi.

Mynd 3 sýnir kortlagningu ríbósómgena 18S-25S. Erfitt reyndist að greina hvaða ríbósómgen væru á dúnmelslítningum og hvaða væru á hveitilítningum sökum daufrar litunar. En með því að styðjast við niðurstöður frá Anamthawat-Jónsson (1999, bls. 1089) og skoða útlit litninganna var mögulegt að greina B1 og B2 sem sýnir að önnur foreldragerðin er líklega hveiti sem inniheldur B genamengi. Því miður tókst ekki að greina m1 sem hefði sýnt fram á að *Leymus mollis* væri hin foreldragerðin.

2 Rós (*Rosa L.*)

2.1 Inngangur

Í þroskun hveggjar plöntu verða reglulega breytingar á litnun. Táknið n er notað til að útskýra litningafjölda einlitna kynliðastigsins (n) og tvílitna gróliðastigsins ($2n$). Á sama hátt er x notað til að tákna grunntölu sem er fjöldi litninga á einlitna stigi í upprunalegri einstofna grein eða deild (Guerra, 2008, bls. 340). Plöntur sem eru allopolyploid hafa blendið genamengi frá fleiri en einni forfeðrategund (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 4).

Til að ákvarða kjarngerð plöntu þurfa frumurnar sem skoðaðar eru að vera í metafasa því þá eru litningarnir vel aðgreindir. Sýnin eru sett í ísvatn áður en litningaeinangrunin er gerð til að auka mítósuskiptingu vefjarins og þannig fá sem flestar frumur í metafasa. Mikilvægt er að hafa sýnin hvorki of stutt né of lengi í ísvatninu til að flestar frumurnar séu í metafasa en ekki öðrum fösum mítósu. Því stærra sem genamengið er því lengur eru sýnin höfð í ísvatninu (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 8).

Æskilegra er að nota frumur úr vaxtarvef rótarenda en þegar litningarnir eru litlir og/eða margir getur það reynst ómögulegt að greina kjarngerð plöntunnar. Þá er leitast eftir því að nota litninga sem eru útþandir. Því eru protoplast dropping aðferð notuð á litninga sprotabruma (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 13-14).

Rósaættin (Rosaceae) er fjölbreytt ætt með um 2000 tegundir í 100 ættkvíslum. Þar á meðal eru nytjaplöntur með steinaldin, til dæmis kirsuber, og beraldin, svo sem epli. Ættkvíslin *Rosa* hefur meðal einkenna þyrnótta runna, endastæð blóm sem annaðhvort eru ein og sér eða í skúfi. Blómin eru úr átta bikarblöðum og yfirleitt fimm krónublöðum (Blamey og Grey-Wilson, 1992, bls. 177-178).

Í rósablendingnum *Rosa moyesii* var *fargesii* \times *Rosa* 'Dornröschen' var *Rosa* 'Dornröschen' notuð sem fræmóðir og *Rosa moyesii* var *fargesii* sem frjógjafi (Hjörtur Þorbjörnsson, 2001).

Rosa moyesii var *fargesii* er afbrigði af meyjarrós með $2n=4x=28$ (Hjörtur Þorbjörnsson, 2001; Krüssmann, 1974, bls. 279). *Rosa moyesii* er runni sem getur orðið þrjú metrar að hæð. Hann er með rauðbrúna stilka, paraða gulleita þyrni og nokkur dökk vínráuð blóm saman á grein. Það sem aðgreinir *Rosa moyesii* var *fargesii* frá *Rosa moyesii* eru laufin sem eru styttri og ávalari (Krüssmann, 1974, bls 279).

Rosa acicularis eða Heiðarós er sumargrænn runni með langa, beina þyrna og stinn burstahár. Runninn er með purpuraletit eða bleik blóm og hærð, blágræn smáblöð. Rósin finnst á meginlandi Evrópu og er blómgunartími hennar í júní og júlí (Blamey og Grey-Wilson, 1992, bls. 178). Afbrigði *Rosa acicularis* í Norður-Ameríku er með $2n=6x=42$ og einstaka afbrigði með $2n=4x=28$. Afbrigði sem finnst í Evrópu og Asíu eru með $2n=8x=56$ (Elven (ritstjóri), (e.d.)). *Rosa* 'Dornröschen' er afbrigði af *Rosa acicularis* og latneskt heiti þess er *Rosa acicularis* Lindl. 'Dornröschen' (Hoppe, Boos, Fisher, Vogelpohl og Stützel, 2013; Gróðrastöðin Mörk, (e.d.)). *Rosa* 'Dornröschen' úr garði Kristins Guðsteinssonar er talin vera ferlitna (Hjörtur Þorbjörnsson, 2001).

Flestar rósir virðast vera tvílitna með $2n=2x=14$ eða ferlitna með $2n=4x=28$ (Yokoya, Roberts, Mottley, Lewis og Brandham, 2000, bls. 560). Þá eru tegundir rósa oftast með $2n=2x=14$ og flest ræktunarafrígðir og pottaafbrigðir hafa $2n=4x=28$. Ferlitna ræktunarafrígðum hefur stundum verið æxlað við tvílitna tegundir, oft í von um að ræktunarafrígðir öðlist þol gegn sveppasjúkdómum sem er þá til staðar í tvílitna tegundinni. Æxlunin gefur þá af sér ófrjótt þrílitna afbrigði en tvöföldun litninga gæti gert afbrigðið frjótt (Khosravi, Kermani, Nematzadeh, Bihanta og Yokoya, 2008, 267-268).

Tilgangur tilraunarinnar var að ákvarða litnun og litningafjölda tveggja tegunda rósa (*Rosa* L.), flokka þær og skoða möguleg þróunartengsl þeirra á milli.

2.2 Efni og aðferðir

Farið var eftir fyrirmælum í kennslubókinni *Selected Methods in Plant Cytogenetics* (Ananthawat-Jónsson, 2013).

2.2.1 Efni og tæki

Litningaeinangrun úr sprotabrumum

- Sprotabrum úr tveimur tegundum rósa. Sýni voru tekin af eftirfarandi rósum; *Rosa moyesii* var. *Fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' sem er uppruninn hjá Kristni Guðsteinssyni og vex við Sunnuveg og *Rosa* 'Dornröschen' sem vex við Selvogsgrunn 10.
- Tæki: Smásjá, flúrsmásjá, pípettur P100 og P200 og micro-centrifuge.
- Almennar rannsóknarstofuvörur: 1,5 mL eppendorf glös, petriskálar, þekjugler, skurðhnífar, pinsettur, nælon net, krukkur, pípettuendar, tilraunaglasastandur, penni sem rispar gler (glass or diamond-tip pen), sýnisglerjabakki og geymslubox.
- Sýruhreinsuð sýnisgler: voru hreinsuð í krómsýru (krómtríoíð í 80% brennisteins-sýru) í 24 klukkustundir eða lengur. Þau voru síðan skoluð fyrst með kranavatni og síðan með eimuðu vatni og geymd í köldu eimuðu vatni.
- Ísvatn: Eppendorf glös voru hálfyllt með eimuðu vatni og sett í frost. Áður en sprotabrumin voru sett á glösin var dálítið vatn sett á ísinn til að bræða hann örlítið.
- Festivökvi: samanstóð af einum hluta ísediksýru (glacial acetic acid) á móti þremur hlutum af 96% etanóli. Þurfti að vera notað á innan við einum degi.
- Ensímblanda sprotabruma: Gerðir voru 10 mL. Þá var 500 - 800 einingar af sellulósa (Onozuka R10 frá Merck #102321) og 300 einingum af pektínasa (Sigma P-4716, úr *Aspergillus niger*) blandað saman við ensímbuffer sem innhélt 75 mM KCl og 7,5 mM EDTA (pH4). Magnið var gert sem margfeldi af 100 µl. Ensímblandan var geymd við -20 °C.
- Ensímbuffer: Gerðir voru 10 mL. 1,5 mL 1 M KCl og 0,75 mL 0,2 M EDTA (pH 4,5) var blandað saman við 17,8 mL af eimuðu vatni.
- KCl lausn: Gerðir voru 100 mL. Gerð var 75 mM KCl lausn (pH 7) með að blanda 7,5 mL af síuðu 1 M KCl við 92,5 mL af eimuðu vatni. Lausnin var geymd í kæli.
- Etanól: notað var 95% etanól til að þurrka sýnisglerin.
- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole): Lausn með 100 µl DAPI í hverjum mL af vatni var gerð í upphafi. Síðan var hún þynnt út í 1 µl/mL með McIlvaine's citrate buffer pH 7 (blandað saman 18 mL af 0,1 M einvatnaðari sítrónusýru og 82 mL af 0,2 M Na₂HPO₄) og geymd við -20 °C.

2.2.2 Aðferðir

Litningaeinangrun úr sprotabrumum

Í upphafi var safnað sýnum úr sprotabrumum og þau sett í ísvatn við 4 °C í um 26 klukkustundir til að fá sem flestar frumur í metafasa. Notuð voru sýni úr tveimur tegundum rósa.

Sprotabrumin voru síðan léttþurrkuð á pappír, sett í festivökva og höfð í honum í tvær klukkustundir við stofuhita. Á þessum tveimur klukkustundum var skipt um festivökva einu sinni. Þá voru sprotabrumin geymd við -20 °C.

Sprotabrum voru léttþurrkuð á pappír og sett á petriskál með eimuðu vatni. Eitt sprotabrum var tekið í einu og og náð sem mest af laufum og sprota utan af vaxtarvefnum. Þá var sprotabrumið með vaxtarvefnum sett aftur í petriskálina og það haft þar í 30 mínútur. Á þeim tíma var skipt einu sinni um vatn.

Sprotabrumin voru þá sett í eppendorf glas og 100 µl af ensímblöndu var sett í það. Þetta var gert við sýni úr sex rósum og því voru notuð sex eppendorf glös. Glösin voru merkt og geymd yfir nótt við stofuhita.

Plöntuhlutinn var brotinn vel niður í ensímblöndunni með pípettuenda. Jafnframt var blásið í og sogið upp með pípettu sem stillt var á 10-20 µl. Plöntuleifarnar voru sigtaðar gegnum nælon net í eppendorfglas og það merkt eins og áður.

Hér eftir var alltaf notaður sami pípettuendinn fyrir hvert sýni til að missa sem minnst af frumum inní pípettuendann.

1,5 mL af köldu mM KCl var sett í hvert glas og það látið standa. Fyrstu sýnin voru lätin standa í 10 mínútur en osmósan var ekki nægilega mikil og því voru sýnin þar á eftir lätin standa í 15 mínútur.

Þá voru glösin spunnin í fimm mínútur á 7000 rpm.

KCl var þá hellt úr eppendorfglasinu og strax þurrkað glasið á pappír án þess að snúa því við á milli.

Nú var 1 mL af köldum festivökva bætt út í glasið og hann hafður í glasinu í 10 mínútur við stofuhita. Á meðan var innihald glassins reglulega dregið inn og út með pípettu. Eppendorfglasið var spunnið í fimm mínútur á 7000 rpm. Festivökvanum var hellt úr glasinu og það þurrkað á pappír án þess að snúa því við á milli. Þetta skref var endurtekið tvisvar, í fyrra skiptið var festivökvinna aftur hafður í glasinu í 10 mínútur en í seinna skiptið var hann hafður í 30 mínútur.

Nú var örlitlum festivökva, 30-50 μ l, bætt út í glasið. Magn festivökvens fór eftir magni þess sem var fyrir í glasinu. Síðan var hrært í og látið standa í allavega eina mínútu.

Nú var dropi tekinn úr yfirborði vökvens í glasinu og hann látinn detta úr 20 cm hæð á kalt, blautt sýnisgler, endi þess þurrkaður og merktur, glerinu dýft í 96% etanól og það loftþurrkað. Sýnisglerin voru geymd í ísskáp þar til þau voru skoðuð í rafeinsasmásjá.

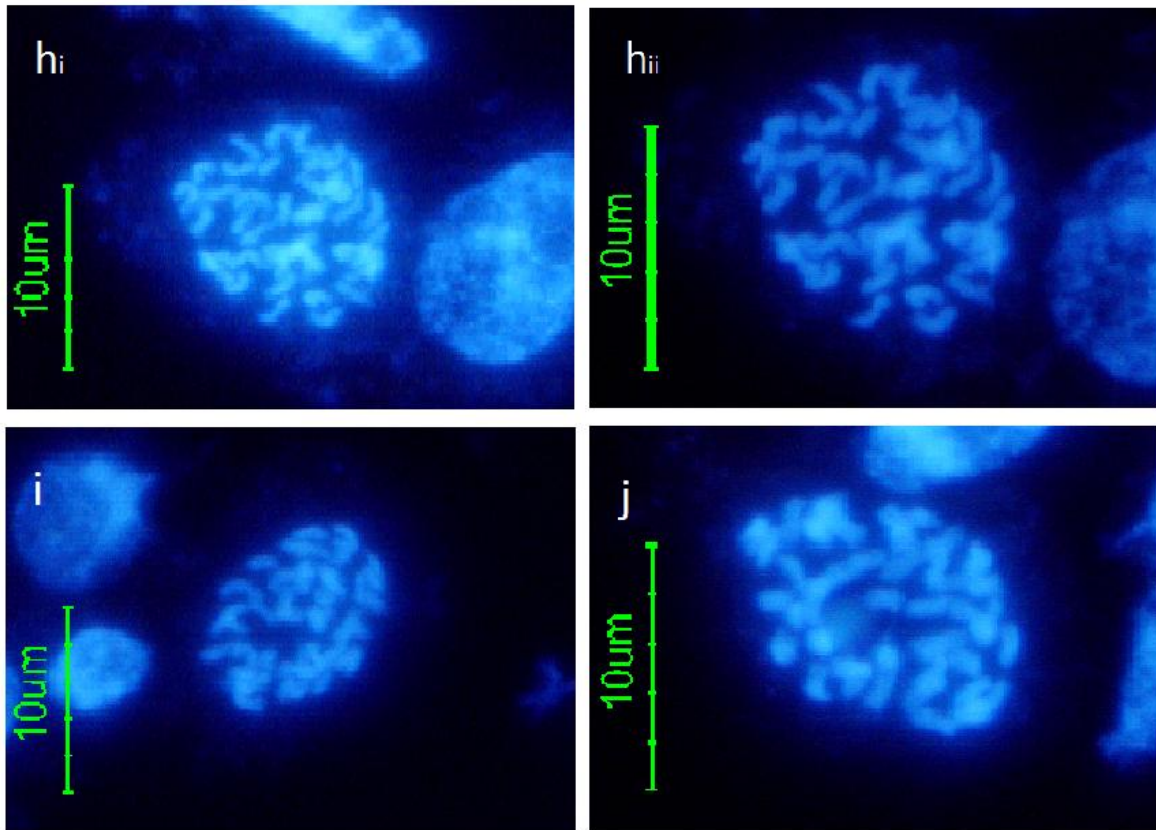
10-15 μ l Fluorochrome DAPI var sett á sýnisglerin, haft á í eina mínútu og sett þekjugler yfir. Þau voru síðan skoðuð í flúrsmásjá við 340-380 nm örvun og 430-450 nm endurkast bylgjulengdar.

2.3 Niðurstöður

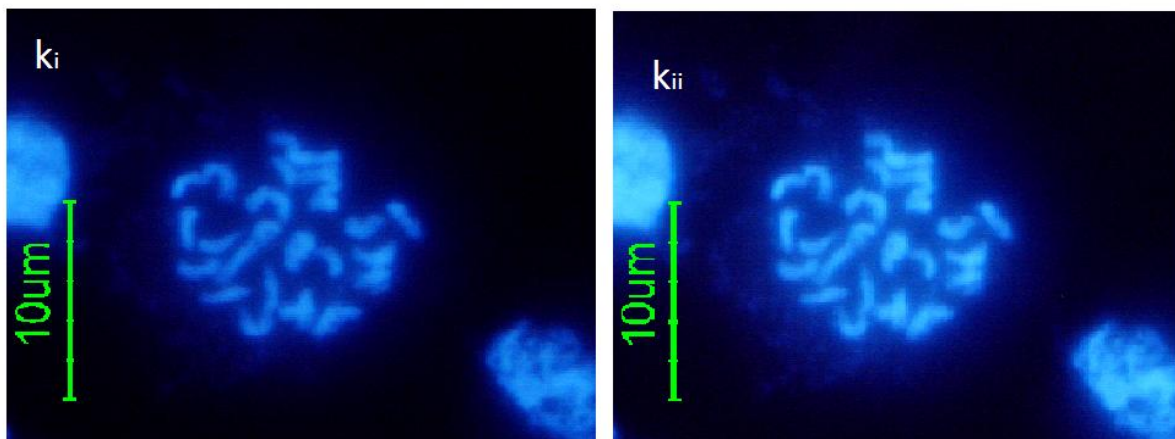
Frumur rósarafbrigðanna sem voru valdar til að skoða frekar voru í metafasa mítósu. Ástæðan fyrir að best var að skoða þær í metafasa var að þá voru litningar frumanna best aðgreindir. Notuð var flúrsmásjá með DAPI síu til að skoða frumurnar og taka myndir.

Við talningu litninga blendingsins *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' kom í ljós að breytileiki væri á litningafjölda. Fruman með fæsta litninga hafði $2n=28$ og sú sem hafði flesta var með $2n=42$ (sjá mynd 4 og mynd 5).

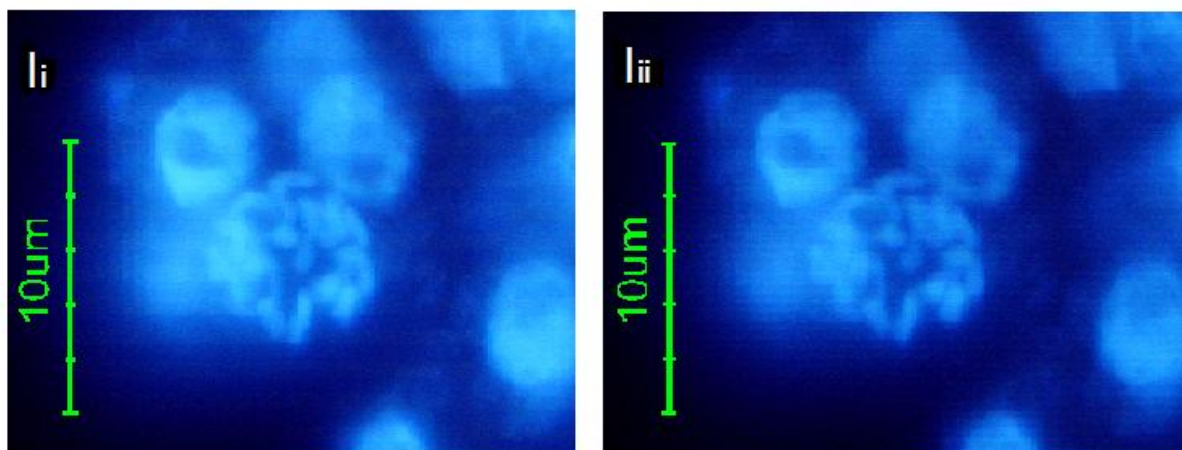
Erfitt var að áætla nákvæman fjölda litninga *Rosa* 'Dornröschen'. Talning gefur að fjöldi litninga sé á bilinu 12-18 (mynd 6). Auk þess sést með samanburði á frumu blendingsins *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' með $2n=28$ (mynd 5) við frumu *Rosa* 'Dornröschen' (mynd 6) að fruma *Rosa* 'Dornröschen' er um það bil helmingi minni en $2n=28$ fruma blendingsins.



Mynd 4: Litningafjöldi *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' með $2n > 30$ Myndirnar eru af frumum blendingsins *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' í metafasa í mítósuskiptingu. Sýnin voru lituð með DAPI litun og myndirnar teknar með 1000x stækkun í flúrsmásjá. Myndirnar (h_i) og (h_{ii}) eru af einni og sömu frumunni og reyndist fruman hafa $2n=42$. Fruman á mynd (i) virðist vera með litningafjöldann á bilinu 30-36 og fruman á mynd (j) á bilinu 38-42. Mælistikan á öllum myndum táknar 10 µm.



Mynd 5: Litningafjöldi *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' með $2n=28$ Myndirnar eru af frumu *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' í metafasa í mítósuskiptingu. Sýnið var lituð með DAPI litun og myndirnar teknar með 1000x stækkun í flúrsmásjá. Myndirnar (k_i) og (k_{ii}) eru af einni og sömu frumunni og reyndist fruman hafa $2n=28$. Mælistikan á öllum myndum táknar 10 µm.



Mynd 6: Litningafjöldi *Rosa* 'Dornröschen' Hér var notuð DAPI litun til að lita frumu *Rosa* 'Dornröschen' í metafasa í mítósuskiptingu. Fruman var skoðuð í flúrmásjá með DAPI síu og myndirnar teknar við 1000x stækkun. (i) og (ii) eru ein og sama fruman. Mælistikan á myndunum sýnir 10 µm.

2.4 Umræður

Markmiðum tilraunarinnar, að ákvarða litningafjölda tveggja tegunda rósa, var náð fyrir blendinginn *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' en ekki náðist að ákvarða nákvæman fjölda litninga út frá mynd 5 sem sýnir að fjöldi litninga *Rosa* 'Dornröschen' sé á bilinu 12-18. Auk þess lítur fruman út fyrir að vera um það bil helmingi minni en frumur blendingins með $2n=28$ (sjá mynd 4). En *Rosa* 'Dornröschen' er afbrigði af *Rosa acicularis* eins og nefnt var í inngangi (Hoppe, Boos, Fisher, Vogelpohl og Stützel (2013); Gróðrastöðin Mörk (e.d.)). *Rosa acicularis* hefur fundist í Norður-Ameríku með $2n=6x=42$ og í Evrópu og Asíu með $2n=8x=56$ (Lewis, 1959; Elven (ritstjóri), (e.d.)). Auk þess hafa fundist afbrigði í Norður-Ameríku með $2n=4x=28$ (Elven (ritstjóri), (e.d.)). Það sem þessi afbrigði eiga öll sameiginlegt er að grunntalan er $x=7$. Hægt er að gera ráð fyrir að *Rosa* 'Dornröschen' sé það jafnframt og að hún sé því líklega tvílitna með $2n=2x=14$.

Niðurstöðurnar sýna breytileika í litningafjölda innan blendingins *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen' en litningafjöldinn var fæstir litningar sem fundust í einni frumu voru 28 (sjá mynd 5) en flestir 42 (sjá mynd 4). Annaðhvort getur verið að um sé að ræða líffræðilegan breytileika eða tæknileg mistök. Eins og kom fram í inngangi hefur *Rosa moyesii* var *fargesii* $2n=4x=28$ (Krüssmann, 1974, bls. 279) en *Rosa* 'Dornröschen' er tvílitna með $2n=2x=14$. Því ætti blendingurinn að vera þrílitna með $2n=3x=21$ en líklega er um að ræða fjölgun litninga í frumum og að í einhverjum verði tvöföldun, þ.e. frumurnar verða sexlitna með $2n=6x=42$.

Þróunartengslin milli plantnanna eru nokkuð augljós þar sem *Rosa* 'Dornröschen' er fræmóðir *Rosa moyesii* var *fargesii* x *Rosa* 'Dornröschen'.

Markmiðum tilraunarinnar, að ákvarða litnun og litningafjölda tveggja tegunda rósa, flokka þær og skoða möguleg þróunartengsl þeirra á milli, var náð.

Heimildir

- Anamthawat-Jónsson, K. (1999). Variable genome composition in *TriticumxLeymus* amphiploids. *Theoretical and Applied Genomics*, 99(7-8), 1087-1093.
- Anamthawat-Jónsson, K. (2013). *Selected methods in plant cytogenetics*. Reykjavík: Háskólaprent.
- Anamthawat-Jónsson, K., Böðvarsdóttir, S. K. (2001). Genomic and genetic relationships among species of *Leymus* (Poaceae: Triticeae) inferred from 18S-26S ribosomal genes. *American Journal of Botany*, 88(4), 553-559.
- Anamthawat-Jónsson, K., Böðvarsdóttir, S. K., Bragason, B. T., Guðmundsson, J., Martin, P.K. og Koebner, R.M.D. (1996). Wide hybridization between wheat (*Triticum* L.) and lymegrass (*Leymus* Hochst.). *Euphytica*, 93, 293-300.
- Anamthawat-Jónsson, K., Schwarzacher, T., Leitch, A.R., Bennett, M.D. og Heslop-Harrison, J.S. (1990). Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. *Theoretical and Applied Genetics*, 79, 721-728.
- Áskell Löve. (1970). *Íslensk ferðaflóra*. Reykjavík: Almenna bókafélagið.
- Blamey, M. og Grey-Wilson, C. (1992). *Myndskreytt flóra Íslands og Norður-Evrópu*. Skjaldborg.
- Castilho, A. og Heslop-Harrison, J.S. (1995). Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome*, 38, 91-96. Sótt af <http://www.le.ac.uk/bl/phh4/openpubs/openpubs/aeumbrdna.pdf>
- Elven, R. (ritstjóri). (e.d.) 640601 *Rosa acicularis* Lindl. *Panarctic flora*. Sótt af <http://nhm2.uio.no/paf/640601>
- Gróðrarstöðin Mörk. (e.d.). Rós 'Dornroeschen'. Sótt af http://www.mork.is/morkweb/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.e.tpl&product_id=2009&category_id=7&option=com_virtuemart&Itemid=24
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res*, 120, 339-350. doi: 10.1159/000121083
- Hjörtur Þorbjörnsson. (2001). Garður Kristins Guðsteinssonar. *Garðyrkjuritið: Ársrit Garðyrkjufélags Íslands*, 81. Garðyrkjufélag Íslands.
- Hoppe, J.R., Boos, E., Fisher, S., Vogelpohl, C. og Strützel, T. (2013). SysTax – detailed information in taxon. *Rosa acicularis* Lindl. 'Dornröschen'. Sótt af http://www.biologie.uni-ulm.de/cgi-bin/query_all/details.pl?id=77143&stufe=S&typ=PFL

- Khosravi, P., Kermani, M. J., Nematzadeh, G. A., Bihamta, M. R. og Yokoya, K. (2008). Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa Euphytica*, 160, 267-275.
- Krüssmann, G. (1974). *Roses*. London, B T Batsford Ltd.
- Lewis, W. H. (1959, 15. janúar). A monograph of the genus *Rosa* in North America. I. *R. acicularis*. *Brittonia*, 11, 1-24. Sótt af <http://link.springer.com/article/10.2307%2F2805073>
- Merriam-Webster. (2013). Merriam-Webster Medical. Sótt af <http://www.merriam-webster.com/medical/amphiploid> [Sótt 19. október 2013]
- Wicke, S., Costa, A., Muñoz, J. og Quandt, D. (2011, nóvember). Restless 5S: The re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 321-332. Sótt af <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790311003125>
- Yokoya, K., Roberts, A.V., Mottley, J., Lewis, R., Brandham, P. E. (2000). Nuclear DNA Amounts in Roses. *Annals of Botany* 85, 557-561.

Viðauki

Hluti A

Flúormásjá: Notast var við flúormásjá með fimm síum. Hver sía getur endurkastað ljósi við ákveðna bylgjulengd og fluorochrome gleypir ljósið í þessari ákveðnu bylgjulengd og endurkastar því í annarri bylgjulengd. Hvert fluorochrome örvast einungis við eina stærð bylgjulengdar og endurkastar einungis einni stærð bylgjulengdar. DAPI örvast við 345 nm ljós, endurkastar 458 nm og gefur þannig frá sér bláa flúrljómun. FITC/Fluorescein örvast við 494 nm ljós endurkastar 518 nm og gefur frá sér græna flúrljómun. Cy3 örvast við 548 nm ljós, endurkastar 562 nm og gefur frá sér rautt ljós. (Anamthawat-Jónsson, 2013, bls. 26)

Quick-spin: Tækið snýst 6000 rpm. Í þessa vél eru sett eppendorf glös til að hræra það sem í þeim er og fá það til að fara alveg í botn glassins.

Thermocycler: Þetta tæki eðlissviptir nemana og litningana með hita annað hvort saman eða í sitthvoru lagi. Eðlissviptingin verður við ákveðinn hita (70-90 °C). Í þessari tilraun voru nemarnir og litningarnir eðlissviptir saman á sýnisgleri við 88-89 °C. Þegar eðlissviptingin hefur átt sér stað er sýnisglerið tekið úr thermocycler og sett við 37 °C. Þá tengjast nemarnir við litningana á þeim stað þar sem viðeigandi röð er til staðar.