



**Erfðamengjagreining melhveitis (*xTriticoleymus*) og  
aðgreining steinbrjótstegunda (*Saxifraga* L.) með litnun.**

Elísabet Alexandra Frick



**Líf og umhverfisvísindadeild  
Háskóli Íslands  
2013**

**Erfðamengjagreining melhveitis (*xTriticoleymus*) og aðgreining  
steinbrjótstegunda (*Saxifraga* L.) með litnun**

Elísabet Alexandra Frick

10 eininga ritgerð, Líf-265-rannsóknarverkefni í líffræði

Leiðbeinandi

Kesara Anamthawat Jónsson

Líf og umhverfisvísindadeild  
Verkfræði og náttúruvísindasvið  
Háskóli Íslands  
Reykjavík, janúar 2014



# Útdráttur

Ritgerð þessi er sett upp í tveimur hlutum:

*Leymus* Hochstetter (melgresi) og *Triticum* L. (hveiti) eru tegundir ættbálksins *Triticeae*. Melgresi er þekkt fyrir að lifa í umhverfi sem aðrar plöntur þola ekki. Lítil úrkoma, mikið sandfok og selta eru skilyrði sem melgresi þolir vel. Þessir þolnir eiginleikar eru einkar eftirsóknarverðir í landgræðslu og því hefur samþætting þessara eiginleika við hina hefðbundnu hveitiplöntu verið í brennidepli. Margar útfærslur hafa verið gerðar á blendingum hveitis og melgresis en í þessari rannsókn er blendingur melhveitis rannsökuð. Með aðferðinni Genomic in situ hybridization (GISH) voru genamengi melgresis og hveitis færð á þreifara og þáttatengd við rannsakaða melhveitið. Út fékkst heillitun 28 hveitilítninga og 14 melgresislitninga. Loks voru 18S-25S ríbósómgen kortlögð með Fluorescence intensity hybridization (FISH) aðferðinni sem sýndi genin Nor-B1, Nor-B2 ásamt ríbósómgen melgresis.

*Saxifraga* L. (steinbrjótur) er meðal ættkvísla tvíkímblöðunga sem hafa tekist að taka yfir sig breitt svið útlitseinkenna, breytileika í erfðum, vistfræðilega útbreiðslu og fjölbreytileika á lífsháttum. Í þessari rannsókn voru litningar fjögurra steinbrjótstegunda einangraðir með protoplast-dropping aðferð. Litningarnir voru taldir í flúormásjá í DAPI lit. Unnið var með *Saxifraga cernua*  $2n=30$ , *S. granulata*  $2n=30$ , *S. nivalis*  $2n=60$  og *S. rosacea*  $2n=30$ . Niðurstöður sýndu fjölbreytileika milli tegunda. Þessi breytileiki mætti útskýra útlitsbreytileika milli tegunda. Samkvæmt heimildum er grunntala *Saxifraga* L.  $x=6,7,8,9,10,11$  og  $13$  og er hann því fjöllitna. Þetta gerir plöntuna mjög áhugaverða til rannsóknar, hún vex villt og æxlast eðlilega. Þetta sýnir fram á eðlilega meiósu þrátt fyrir margvíslega fjöllitnun, upplýsingar um genamengi *Saxifraga* L. er því mjög mikilvæg.

# Abstract

This thesis is divided into two parts.

*Leymus* Hochstetter (lymegrass) and *Triticum* L. (wheat) are species of the tribe *Triticeae*. Lymegrass is particularly known for survival in habitats that other plants have difficulty surviving in. Drought, erosion and salinity are all conditions that lymegrass can thrive in. These resistant traits are very much sought after in agriculture, therefore the integration of these traits into the traditional wheat has been accomplished. Many versions of wheat x lymegrass hybrids have been made, the version used in this thesis is wheat x lymegrass hybrid which has been back-crossed with wheat multiple times. With the technique Genomic in situ hybridization (GISH), the genome of this particular plant was labelled with probes from wheat and lymegrass genomes. This resulted in a fully colored green (lymegrass) vs. red (wheat) coloring of its genome. The chromosomes of the plant were counted per genome and together as a whole, the results showed 14 lymegrass and 28 wheat chromosomes. The ribosomal genes 18S-25S were then mapped using Fluorescence in situ hybridization (FISH) approach which resulted in the labelling of the Nor genes Nor-B1 and Nor-B2 as well as the ribosomal genes of lymegrass.

*Saxifraga* L. (saxifrage) are one of the genera of dicots that has managed to incorporate a broad spectrum of morphological, genetic, ecological and life cycle differences. In the following research, the chromosomes of four different saxifrage species were isolated by using shoot tip protoplast dropping method and counted using a Fluorescence microscope with DAPI dye. The researched species were *Saxifraga cernua*  $2n=30$ , *S. granulata*  $2n=30$ , *S. nivalis*  $2n=60$  og *S. rosacea*  $2n=30$ . Results showed a variable between species. According to other sources the base number *Saxifraga* L. are  $x=6, 7, 8, 9, 10, 11, 13$  and it is therefore polyploid. Species of *Saxifraga* L. grow wild and are fertile despite various forms of polyploidy, which makes the genome of *Saxifraga* L. an important for further studies in plant-genome research.

# Efnisyfirlit

Útdráttur .....	i
Abstract.....	ii
Þakkir .....	iv
<b>1. Inngangur .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Leymus</i> Hochstetter.....	1
1.1.2 <i>Triticum</i> L.....	1
1.1.3 <i>xTriticoleymus</i> .....	2
1.2 <i>Saxifraga</i> L. (steinbrjótur) .....	2
1.3 Einkímblöðungar og tvíkímblöðungar .....	5
1.4 GISH & FISH.....	5
<b>2. Markmið .....</b>	<b>6</b>
2.1 Fyrri hluti .....	6
2.2 Seinni hluti.....	6
<b>3. Efni og aðferðir .....</b>	<b>7</b>
3.1 Plöntur .....	7
3.2 Litningaeinangrun <i>xTriticoleymus</i> .....	7
3.2.1 Plöntusýni .....	7
3.2.2 Búnaður og áhöld .....	8
3.3 Aðferðafræði litningaeinangrunar <i>xTriticoleymus</i> .....	8
3.4 FISH (fluorescent in situ hybridization) meðhöndlun á <i>xTriticoleymus</i> .....	9
3.4.1 Búnaður og áhöld .....	9
3.4.2 Þreifarar .....	9
3.5 Litun litninga með FISH & GISH.....	10
3.5.1 Formeðhöndlun litninga .....	10
3.5.2 Undirbúningur þreifarablöndu, eðlissvipting og skolun.....	10
3.6 Einangrun steinbrjótslitninga. ....	11
3.6.1 Plöntusýni .....	11
3.6.2 Búnaður og áhöld .....	11
3.7 Aðferðafræði Steinbrjótslitningaeinangrunar. ....	11
<b>4 Niðurstöður .....</b>	<b>13</b>
4.1 Erfðamengjagreining <i>xTriticoleymus</i> .....	13
4.2 Litnun mismunandi tegunda <i>Saxifraga</i> L. og hugsanleg tengsl þeirra.....	15
<b>5 Umræður .....</b>	<b>18</b>
5.1 <i>xTriticoleymus</i> .....	18
5.2 Umræður ribósómgen <i>L. arenarius</i> og <i>Triticum</i> L. ....	19
5.3 Umræður <i>Saxifraga</i> .....	20
5.4 Lokaorð.....	21
<b>6 Heimildaskrá .....</b>	<b>22</b>

# **Þakkir**

Ég vil þakka Dr. Kesöru Anamthawat –Jónsson fyrir þetta frábæra tækifæri





# 1. Inngangur

## 1.1.1 *Leymus Hochstetter.*

Meltegundir tilheyra ættkvíslinni *Leymus Hochstetter* en til hennar teljast um 30 fjölliðna, fjölærar tegundir. Megin útbreiðsla helstu meltegunda er eftir norðanverðri strandlengju meginlands Evrópu, á Íslandi má finna eina meltegund sem vex villt. Melgresi (*L. arenarius*) er einkennistegund *Leymus* ættkvíslarinnar og var verkefnið tileinkað því.

Melgresi (*L. arenarius*) er áttlitna ( $2n=8x=56$ ) einkímblöðungur sem vex víða um Ísland. Það vex best í sendnum svæðum og því er auðvelt að finna það við strendur landsins, einnig má finna það á sendnum svæðum við hálendið. Melgresi er þekkt fyrir að þola umhverfisskilyrði sem aðrar plöntur eiga bággt með að þrífast í, til dæmis; litla úrkomu, mikið sandfok og seltu (Sveinsson, 2009). Þessir eiginleikar eru eftirsóknarverðir í landgræðslu og því hefur verið reynt að samþætta þolnu eiginleika melgresis við hina hefðbundnu hveitiplöntu.

## 1.1.2 *Triticum L.*

*Triticum L.* (hveiti) er ein mest ræktaða planta til manneðis á eftir hrísgrjónum, það er upprunnið á gresjum SV-Asíu og hófst nýting þess til manneðis fyrir tæplega 12 þúsund árum (Willcox, 2013). Í fyrstu voru villtar tegundir notaðar sem nú eru ókunnar en fljótt var því víxlblandað uns kom fram hið hefðbundna ræktaða hveiti. *Triticum aestivum* (brauðhveiti) þekkist hvergi villt og það er ófært um að vaxa af sjálfsdáðum í náttúrunni án hjálpar mannsins, það er ræktað í tempruðum löndum og einkum sunnan til. Hveiti er því þó nokkuð viðkvæm planta, t.d. þarf það meiri hita en bygg og hafrar, og betri jarðveg en rúgur.

Genamengi brauðhveitis er sexlitna ( $2n=6x=42$ ) og það er einkímblöðungur eins og melgresi (Anamthawat-Jónsson og Böðvarsdóttir, 1998). Það byggist á þremur mismunandi genamengjum, AA, BB og DD sem hægt er að greina í sundur með GISH.

### **1.1.3 x*Triticoleymus***

*Triticoleymus* er blandingstegund *Triticum* L. og *Leymus* Hochstetter. Blandingar af þessum toga hafa sýnt mikinn fjölbreytileika í meiósu. Niðurstöður meiósu þessara plantna eru svipaðar og það sem fyrirfinnst í öðrum svokölluðum breytilegum blendingum (e. Wide hybrid). Þörun litninga getur farið á mis og komið hefur fyrir að litningar parast ekki og valdi mislitnun. Frumuskipting getur verið illa samstillt í kjarna. Tekist hefur, þrátt fyrir þessari óreglu, að fá stöðugan fjöllitna blending sem sýnir hefðbundna tvílitna meiósu (Anamthawat-Jónsson, 1998). Í *Triticum* L. er vitað að genið Ph1 tryggir jafna þörun systralitninga og endurröðun þeirra. Genið má finna á litningi 5B, genaröðun litninga 5A, 5B og 5D er einkar svipað en starfsemi Ph1 er einstakt meðal 5B. Genið hefur ekki einungis virkni í hveitiplöntunni sjálfri heldur er það virkt í blendingum einnig. (Griffiths, et al., 2006). Í fyrri hluta þessa verkefnis voru litningar úr rótarenda melhveitiplöntu einangraðir, til að rannsaka hvaða gen og litningar melgresis væru enn til staðar eftir bakvíxlun upprunalega blendingsins við hveitiplöntu.

### **1.2 *Saxifraga* L. (steinbrjótur)**

*Saxifraga* L. (steinbrjótur) eru ein af þeim plöntuhópum tvíkímblöðunga sem hafa tekist að innlima breitt svið útlitseinkenna, genamengja breytileika, vistfræðilegrar útbreiðslu og lífsferlafjölbreytileika innan sinnar ættkvíslar. Dæmi um útlitseinkennabreytingar eru einkenni allt frá svampslegum jurtaþyrpingum að einssprota plöntu. Einnig mætti nefna mismunandi blómamyndun, en einkenni eru allt frá endastæðum blómmyndunum eða öxul brumum og að blómmyndun eins blóms eða þá samansafn margra blóma í einni þyrpingu (Vargas, 2000).



**Mynd 1.2** Útlitsmunur á *S. granulata* og *S. cernua* (Lindman, 1997).

Það telst sem tYPískur íslenskur steinbrjótur, fimmdeild planta með allmörgum blómum saman í hnapp efst á stöngli. Stöngull er loðinn og blaðlaus fyrir neðan blómskipunina. Blaðkan er nær kringlótt og gróftentt. Hæð þess er 8-16cm. Kjörlendi steinbrjóts eru klettur og gljúfur á láglandi en hún er einnig algeng til fjalla (Kristinsson, 2010). Litningatala milli steinbrjótstegunda er mjög breytileg og getur verið allt frá  $2n=20$  og upp í  $2n=210$  (Vargas, 2000). Eftirfarandi upptalning er af steinbrjótstegundum sem unnið var með:

#### *Saxifraga rosacea* (Toppsteinbrjótur)

Blómin eru 10-15mm í þvermáli, krónublöð hvít eða rjómagul. Blöðin í gisnum, lausþýfðum hvirfingum, niðurmjó og frambreið, klofin upp í 3-5 tennur. Stöngull og bikarblöð eru hærð. *S. rosacea* vex utan á klettahjöllum og móum, hann er nokkuð algengur um allt Ísland en er mest að finna á láglandi.

*S. Nivalis (Snæsteinbrjótur)*

Blómin standa allmörg saman í hnapp efst á stöngli, plantan er fimmdeild með hvítum blómum sem geta stundum verið grænleit eða bleikleit. Bikar er klofinn nær til miðju og er grænn eða rauður. Fræflar eru tíu, frævan klofin í toppinn með tvo stíla og frænin eru útstæð. Blöðin eru í stofnhvirfingu og vængstilkud. Blaðkan er nær kringlótt og gróftennt. Heimkynni *S. nivalis* er til fjalla og á klettasvæðum Íslands. Á láglandi finnst hann í gljúfrum og klettum. Hann nokkuð algengur og finnst víðast hvar á landinu.

*S. cernua (Laukasteinbrjótur)*

Blómin eru 10-18mm í þvermáli. Krónublöð eru hvít , fræflar tíu og frævan klofin í toppinn með tveimur stílum. Blöðin eru nýrnalaga með þrístrendum, 5-7 separ að framan og efstu stöngulblöðin eru þrípótta eða heil. *S. cernua* er ekki algengur á Íslandi en heimkynni hans er á fjallasvæðum norðurlands í gljúfrum og gilum. Hann er mest að finna yfir 1300m hæð. Suð-Vestan til á landinu má finna afmörkuð útbreiðslusvæði einnig.

*S. granulata (Kornasteinbrjótur )*

Kornasteinbrjótur líkist laukasteinbrjóti en hefur æxlilauka neðst við sinn stofn og blöðin eru kringlóttari og minna skert. *S. granulata* er óalgengur að finna. Heimkynni hans er að finna á Suð-Vestan horni Íslands í bergóttu graslandi. (Kristinsson, 2010).

### **1.3 Einkímblöðungar og tvíkímblöðungar**

Einkímblöðungur er planta sem hefur grunntöluna þrjú í blómhluta þess, frjókorn þess hafa eina rák og frá þess hefur eitt kímblað. Æðastrengjalögun laufblaða einkímblöðungs er samhliða og æðastrengir eru dreifðir í stöngli í frumvexti, síðvöxtur er fágætt meðal einkímblöðunga og eru þeir að mestu jurtir.

Tvíkímblöðungur er planta sem hefur grunntöluna fjögur eða fimm, frjókorn þess hafa þrjár rákir og frá þess hefur tvö kímblöð. Æðastrengjalögun er netlaga og þeir mynda hring í stöngli í frumvexti, síðvöxtur með síðvaxtarlagi tíðkast meðal tvíkímblöðunga (Raven, et al., 2005).

### **1.4 GISH & FISH**

Aðferðir sem notaðar eru til aðgreiningar litningamengja heitir GISH (Genome in situ hybridization) og FISH (fluorescence in situ hybridization). Með þessum aðferðum eru fljúrmerktir einþátta-genabútar af eftirsóttu genamengi (þreifarar) látnir samþáttast genamengi sem verið er að rannsaka. Genamengi þess er eðlissvipt til að kljúfa tengi samsetta erfðaefnisins, við klofnun þess komast þreifarar að erfðaefninu sem verið er að rannsaka, en þegar eðlissviptingu er lokið rennur það aftur saman í tvíþátta helix. Þegar erfðaefnið rennur saman hefur það bundist þreifara sem gerir okkur kleift að sjá staðsetningu gena innan litnings með fljúrlyómandi merki. Þannig má gera sér grein fyrir hvort einstök gen eða jafnvel heil genamengi séu til staðar (Anamthawat-Jónsson, 2013).

## **2. Markmið**

### **2.1 Fyrri hluti**

Markmið fyrri hlutar þessarar rannsóknar er að þekkja krossvíxl melgresis og hveitis betur með því að beita frumu erfðafræðilegum aðferðum. Með þessum aðferðum er hægt að fá betri skilning á erfðamengi melgresis og hveitis ásamt því að skilja hvað verður eftir af erfðamengi melgresis þegar melhveiti er bakvíglað við hveiti. Með þessum upplýsingum má fá betri skýringu á hlutverk einstakra gena melgresis og hvar þær eru að finna í genamengi hreinræktaðra melgresisplöntu.

### **2.2 Seinni hluti**

Markmið seinni hlutar rannsóknarinnar er að skrá niður upplýsingar um litningatölu, litnun og genamengi mismundandi tegunda steinbrjóts til að þekkja ættkvíslina *Saxifraga L.* betur. Markmiðin eru að flokka tegundir steinbrjóts með tilliti til litningatölu þeirra og rekja breytileika með því.

## 3. Efni og aðferðir

### 3.1 Plöntur

Tafla 1: Tegundir plantna sem notaðar voru í rannsókninni ásamt litningatölu þeirra.

Tegund	Litningatala	Stofn	Fundarstaður	Upprunastaður
<b>Fyrri hluti</b>	---			
<i>Triticum</i> L.	2n=6x=42		---	---
<i>L. arenarius</i>	2n=8x=56		Ísland	Ísland
<i>xTriticoleymus</i>	2n=6x=42		---	---
<b>Seinni hluti</b>	---			
<i>S. rosacea</i>	2n=64*	ISL 03 1967 59	Ísland (óþekktur fundarstaður)	Fjöllum í NV- og mið Evrópu
<i>S. nivalis</i>	2n=60*	ISL 03 1967 57	Ísland (óþekktur fundarstaður)	Ísland (óþekktur fundarstaður)
<i>S. cernua</i>	2n= 36-72*	ISL 03 2008 26	Ísland, Gjåtindur, Eldgjá	---
<i>S. granulata</i>	2n=52**	ISL 03 1988 25	Ísland, Fossvogur	Frá Evrópu eða N-Afríku

\*(Löve & Löve, 1975)

\*\* (Löve, 1983)

### 3.2 Litningaeinangrun *xTriticoleymus*

#### 3.2.1 Plöntusýni

Rótarendar úr tveggja til þriggja daga gömlum spírandi fræjum hveitis (hveiti með melgresislitningum). Rótarendar úr hveiti úr potti. Notast er við ósnortnar rætur þar sem leitast er við að heimta merisem frumur úr rótarendum, því þurfa ræturnar að vera heilar og ósnortnar.

### 3.2.2 Búnaður og áhöld

Búnaður sem notast er við: víðsjá, smásjá, flúrsmásjá sem greinir DAPI blár, 37°C hitaskápur og ræktunarklefi.

Áhöld sem notuð voru: Petri skálar, 9cm síupappír, glerglös/túpur, smásjágler, þekjugler, pinsettur, krufningarpinnar, rakvélablöð, linsupappír, 1,5ml smelliglös, dropateljaraglös, rekkar fyrir smelliglös, demantspenni, bakkar fyrir smásjágler og geymslubox.

### 3.3 Aðferðafræði litningaeinangrunar *xTriticoleymus*.

Notast var við *chromosome squash* aðferð með frumum úr rótarendum.

Framkvæmd einangrunarinnar var að mestu leyti eins og er lýst í Selected Methods in Plant cytogenetics (2010). Aðferðin byggist á því að rætur nýsprotinna fræja eru söfnuð saman þegar þær ná 1-2cm að lengd. Þær eru settar í glös með vatni og klaka og hitastigi er haldið í 0-4°C í 28klst. til að samstillast frumuhring allra frumnanna og ná sem flestum frumum í metafasa. Kuldi hægir á frumuhringnum sem veldur því að flestar frumurnar samstillast. Tíminn sem þarf til að samstillast frumur er yfirleitt á bilinu 24-29klst. (Best er að prófa mismunandi tíma til að fá bestu niðurstöðurnar, því kælitíminn er breytilegur eftir plöntutegundum). Að 28klst. liðnum eru ræturnar þurrkaðar á síupappír og fluttar í festivökva (e. fixer) við stofuhita í að minnsta kosti 2klst. Festivökvi er lausn sem notuð er, til að geyma sýni og gera það stöðugt svo hægt sé að meðhöndla það án þess að sýnið fari til spillis, einnig brýtur festivökvinn niður umfrymi (e. cytoplasm) í frumunum sem leiðir til þess að litningar verða „hreinni“ þegar það er komið á smásjágler. Eftir festun eru ræturnar fluttar í ensímdúa (e. enzyme buffer) í 10mín til að hreinsa sýnin, skipt er um dúa og auka 10 mín eru látnar líða. Næsta skref er að leggja ræturnar á sýruhreinsað gler og þekja þær með 18µl af ensímmeltu, glerið er lokað í petriskál til að koma í veg fyrir uppgufun og loks er það hitað við 37°C í 15mín. Meltitími róta getur verið mismunandi eða frá 15-35mín. Því ferskari og yngri sem ræturnar eru, því minni tíma þarf í meltu. Við lok meltutímans er meltuensíminu skipt út fyrir ensímdúa, skipt er um dúa tvisvar sinnum til að tryggja að ekkert ensím verði eftir á sýninu. Þegar sýnið er laust við



ensímið er dúinn skiptur út fyrir 45% Ediksýru, það er látið verka í 5 mín. Að þessum tíma liðnum eru meristem frumur sem eru að finna í rótarenda dregnar eða stappaðar út úr rötunum með nál og pinsettu. Þegar meristem frumurnar hafa verið heimtaðar er þekjugleri þrýst varlega ofan á. (Ath; sóst er eftir meristem frumum þar sem að þær eru ósérhæfðar og því betri til litningagreiningar og litunar). Þrýstingur veldur því að litningar úr meristem frumum dreifast um glerið. Einnig er gott að banka á þekjuglerið til að mynda titring á sýninu sem veldur oftast jafnri dreifingu. Að litninga- dreifingu lokinni er sýnið skoðað og ákvarðað er hvort sýnið sé hæft til áframhaldandi meðhöndlunar. Þegar fullnægjandi sýni hefur náðst er því gleri varlega dýft í fljótandi köfnunarefni til að ná þekjugleri af. Þegar sýnið hefur þornað, er glerið rispað þar sem sýnið er að finna til að tryggja að áframhaldandi meðhöndlun fari fram þar sem oft getur verið erfitt að sjá staðsetningu þess.

### **3.4 FISH (fluorescent in situ hybridization) meðhöndlun á *Triticoleymus*.**

#### **3.4.1 Búnaður og áhöld**

Búnaður sem er notaður: Flúrsmásjá með síum til að greina DAPI, FITC, Cy3 og Cy5, hitaskápar eða hituð vatnsböð við 55-60°C og PCR tæki (lotuhitari).

Áhöld: coplin glös, loftþétt plastbox, þekjugler, pinsettur og bakkar undir smásjágler.

#### **3.4.2 Preifarar**

Dapi (blár) grunnlitur sem litar allt litni, Cy3; Ta-spectrum red frá Vysis (rauður) sem litar hveitilitninga og FITX; Lm Roch (grænn) sem litar melgreslitninga.

## 3.5 Litun litninga með FISH & GISH

### 3.5.1 Formeðhöndlun litninga

Þekjugler með dapi er fjarlægt og sýnið er skolað með 2xSSC sáþulausn tvisvar sinnum, eftir skolun er sýnið fært í 4% paraformaldehýð við stofuhita í 5 mín, sýnið er svo skolað aftur með 2XSSC. Loks er sýnið afvatnað með 70%, 90% og 96% etanóli í 2 mín hvert. Eftir að sýnið er látið loftþorna er það tilbúið til eðlissviptingar með þreifarablöndu.

### 3.5.2 Undirbúiningur þreifarablöndu, eðlissvipting og skolun.

Þegar litningarnar eru tilbúnar til meðhöndlunar er þreifarablanda útbúin. Fyrir hvert sýni eru blanda af 4µl af Dextrani, 11µl af Formamíði, 2µl af 20xSSC, 0.5µl 10% SDS, 1µl H<sub>2</sub>O, 1µl Lm Roch (grænn þreifari) og 0.5µl af Ta spectrum red (rauður þreifari). Efnin í þessari blöndu sem stjórna tengingu þreifara eru formamíð og 20x SSC. Dextranið seigir lausnina á meðan SDS minnkar yfirborðsspennu. Þegar blandan er tilbúin er hún sett í sjóðandi vatnsbað í 6 mín og svo kæld í 5 mín. Blandan er sett á sýnið og þekjugler er varlega sett yfir sýnið og svo er það innsiglað með naglalakki. Sýninu er komið fyrir í lotuhitara og viðeigandi prógram sett af stað: 88°C í 10 mín. Eftir eðlissviptingu er sýnið sett í loftþétt rakabox sem inniheldur 2xSSC og það geymt í hitaskáp yfir nótt. Eftir geymslu er þekjuglerið fjarlægt og sýnið skolað vel í 2xSSC við 37°C. Til að fjarlægja lauslega- eða óbundna þreifara er sýnið því næst skolað í 0.1xSSC við 55-60°C þrisvar sinnum, 5 mín í senn. Eftir skolunina er sýninu komið fyrir í coplin glasi sem inniheldur 2xSSC og það látið standa við stofuhita. Næst er sýnið skolað í 4xSSC-Tween við stofuhita í 5 mín. 10µl af DAPI er sett á blautt sýnið og því skolað léttilega af. Eftir þetta ferli er sýnið tilbúið til skoðunar í smásjá. Til að viðhalda flúrljóminum sem lengst, er dropa af antifade sett í DAPI-ið, þetta kemur í veg fyrir að flúrljómurinn dofni of fljótt. Þekjugler er sett á sýnið og hægt er að skoða það í flúrsmásjá. Eftir skoðun sýnisins er það endurlitað með sömu aðferð til að ná fram staðsetningu ríbósóm gena í erfðamenginu.

## 3.6 Einangrun steinbrjót slitninga.

### 3.6.1 Plöntusýni

Toppsprotabrumum var safnað úr *S. rosacea*, *S. nivalis*, *S. cernua* og *S. granulata*. Sýnin voru tekin í enda júní þegar plönturnar voru í fullum vexti og frumuvöxtur mikill.

### 3.6.2 Búnaður og áhöld

Flúrmásjá, skilvinda og pípettur. Hrein smásjágler, glerglös, Petriskálar, þekjugler, pinsettur og nálar, nælon sía, 1.5ml smelluglös, pípettuoddar, rekkar, bakkar undir smásjágler og geymslubox.

## 3.7 Aðferðafræði Steinbrjót slitningaeinangrunar.

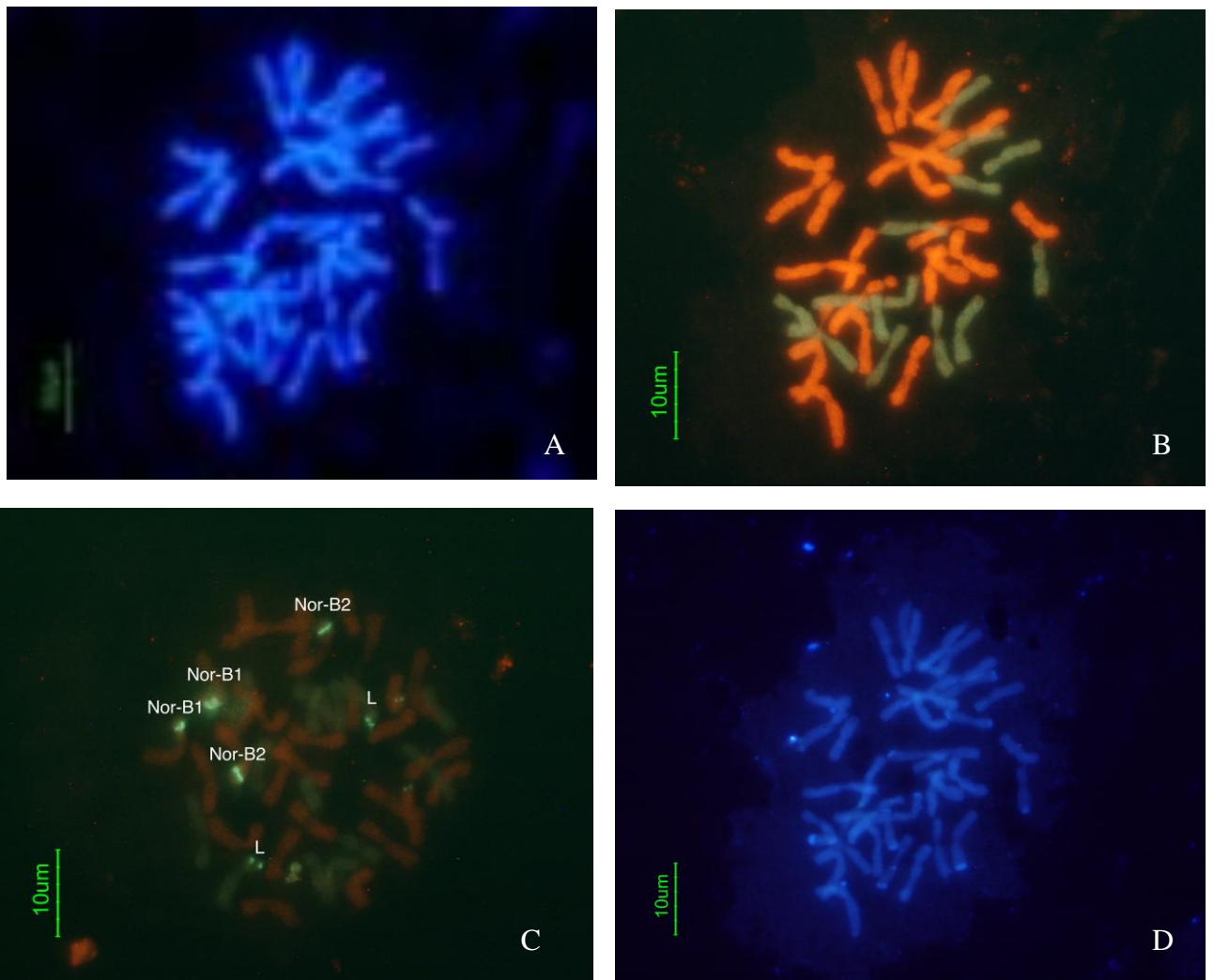
Toppsprotabrumum var safnað og geymt í ísvatni (0-4°C) í 24-27klst til að stöðva frumuhring sýnanna eins og lýst er í hluta 3.3. Eftir ísvatnsmeðhöndlun voru sýnin þurrkuð og fixeruð (festuð) við stofuhita í a.m.k. 2klst. Á meðan á þessu ferli stendur er skipt um festivökva einu sinni. Næst eru sýnin færð í Petriskálar sem innihalda eimað vatn til að skola festivökvann af. Að því loknu eru sýnin „hreinsuð“ með því að fjarlægja ytri laufar og þess háttar þar til brumið sjálft stendur eftir sem inniheldur meristem frumur. Eftir „hreinsunina“ eru sýnin látin standa í hreinu eimuðu vatni í a.m.k. 30 mín, skipt er um vatnið einu sinni á meðan á þessu stendur. Loks eru sýnin færð yfir í 100µl af meltingarensími og þau hituð í hitaskáp yfir nótt. Þegar sýnin eru tilbúin eru þau stöppuð með pípettuoddi og síuð í smelluglösin. Sýnin eru svo sett í hýpótóníska lausn í 10 mín til að sprengja frumurnar. Á meðan á biði stendur eru smelluglösin hrist til að tryggja einsleitni. Að þessu loknu eru sýnin spunnin niður í skilvindu við 7000rpm í 5 mín. Flotið er fjarlægt og 1ml af festivökva er bætt við, öðru hvoru er varlega hrist uppí sýninunum með pípettuoddi. Þegar þau hafa legið í festivökva í u.þ.b. 5 mín eru þau spunnin aftur niður og flotið er fjarlægt. Skipt er um festivökvann á þennan hátt þrisvar sinnum til að tryggja að sem mest af umfrymi frumnanna fjarlægist og að sýnin verði hrein. Þegar skipt hefur verið um

festivökvann þrisvar er hann bættur við smá saman þar til sýnið virðist perlugruggugt. Því næst er dropi af sýninu látið detta á blautt smásjágler. Glerið er látið þorna og svo er það afvatnað í etanóli í nokkrar sekúndur. 10 $\mu$ l af DAPI er sett ofan á sýnið og loks er þekjugler sett yfir og það skoðað í flúrsmásjá.

## 4 Niðurstöður

Niðurstöður verða kynntar í tveimur hlutum. Í fyrri hluta eru niðurstöður litningafjölda melhveitis og staðsetning ríbósómgena kynntar. Í seinni hluta koma fram niðurstöður litningatölu steinbrjótstegunda.

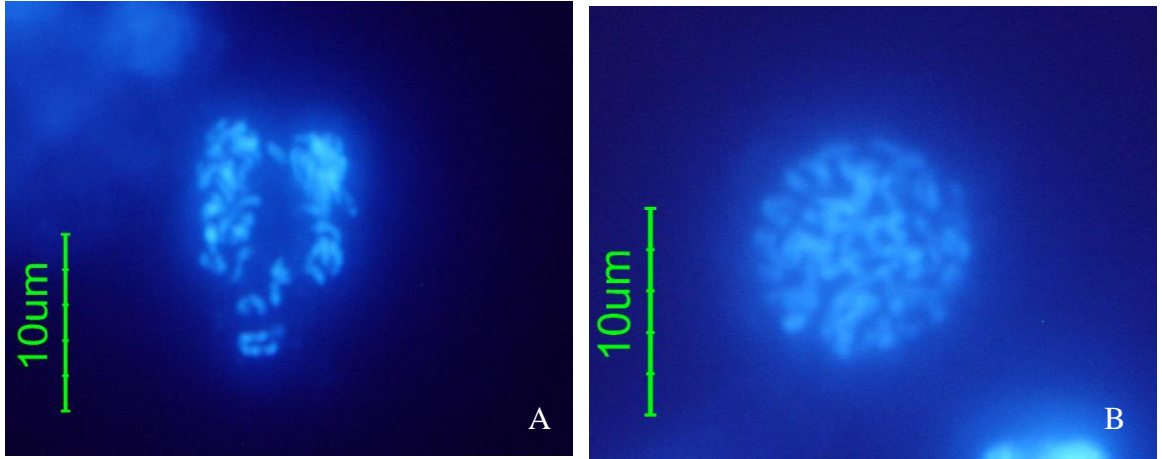
### 4.1 Erfðamengjagreining *xTriticoleymus*.



**Mynd 4.1** Fish (Fluorescent in situ hybridization) kortlögnun gena í metafasa. A) 37 af 42 litningum DAPI litun litninga í metafasa af öllu genamengi sýnis. B) Flúrljómun hveitilítninga í rauðu og flúrljómun melgresislitninga í grænu. C) 42 litningar. Endurlitun 18S ríbósómgena. D) 37 af 42 litningum í DAPI litun, sjá má þéttlitni greinilega við telomer svæði. Einnig má sjá satellite svæði.

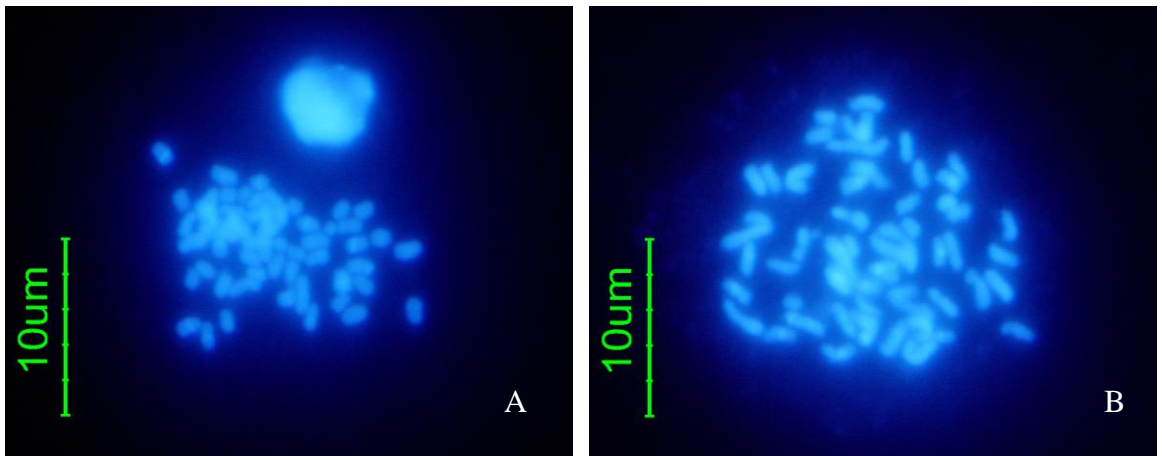
Út frá niðurstöðum FISH litunarinnar má sjá 14 melgresislitninga á móti 28 hveitilitningum. Engar vísbendingar eru um tilfærslur eða brottföll í litningunum, litir litningana eru sterkir og dreifðir í samræmi og því er gert ráð fyrir að litningavíxl milli stofna hafi ekki orðið. Út frá útreikningum samkvæmt skiptingu meiósu má áætla að það hafi þurft að bakvíxla F1-Melhveiti að minnsta kosti 4 sinnum við hveiti til að fá F5 einstakling með litningafjöldann 42 (Griffiths, et al., 2012). Borin voru kennsl á litningunum með vitneskju um staðsetningu á 5S, 18S og 25S ríbósómgenum. Í heild fundust 8 rDNA svæði í öllu genamenginu, alls 6 í hveiti og 2 í melgresislitningunum. Genapörin B-1 og B-2 inná mynd 4.1C eru ríbósómgen *Triticum* L., L genaparið eru ríbósómgen *L. arenarius*. Samkvæmt styrk merkjanna má sjá að B-1 og B-2 tilheyra genamengi BB í *Triticum* L. (Anamthawat-Jónsson, 1999). Litastyrkur þreifara gefur til kynna fjölda rDNA endurtektaraða. Þau eru einkar varðveitt og því má greina úr hvaða genamengi merkin koma. Þau flokkast 6Bs>1Bs>5Ds>1As>7Dl>5Al>1Bl (Jiming og Bikram, 1994). Staðsetning allra rDNA genanna eru að finna á p armi og er staðsetning genanna 1 að finna nálægt þéttlitni á litningsenda, staðsetning 1 og 2 á hveitilitningum eru nær miðju en þó alltaf í átt að litningsenda. 4 hefur sína staðsetningu á sama stað og í melgresinu, vert er að athuga að stærð litninga með 4 eru minni en 1 og 2. Stærð litninga með 4 og 3 eru svipaðir og gera má fastlega ráð fyrir því að þeir eru því í sama karíótýpu-flokki. Mörg þéttlitnisbönd sjást á litningsendum sem gefur til kynna langar endurtekningar basaraða.

## 4.2 Litnun mismunandi tegunda *Saxifraga* L. og hugsanleg tengsl þeirra.



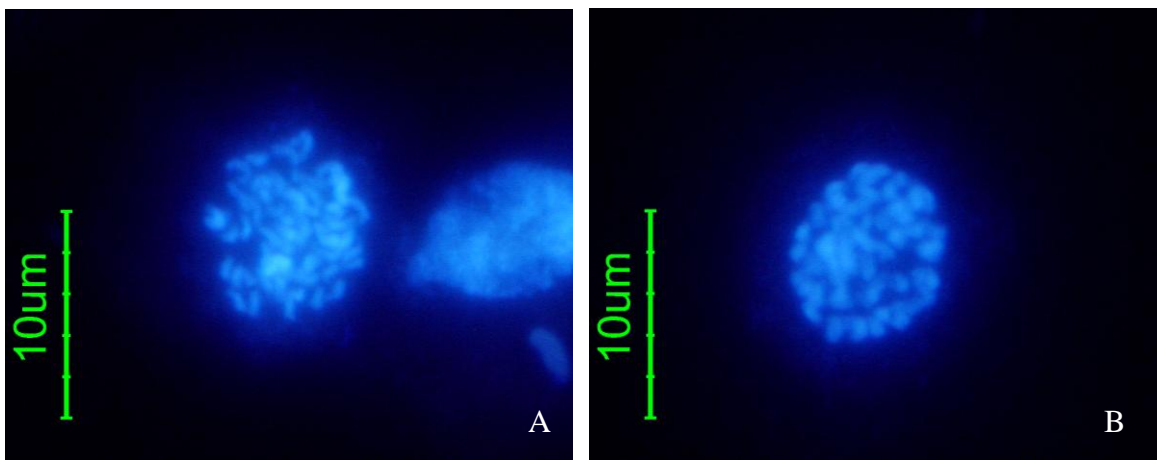
**Mynd 4.3.1** Genamengi *Saxifraga rosacea*. Talið er  $2n > 30$  úr þessum myndum.

Vitað er að genamengi *S. rosacea* er  $2n=64$  (Löve & Löve, 1975). Út frá þessari mynd má sjá  $2n > 30$  og því getur það vel staðist, erfitt er að staðfesta litningafjöldann með vissu. Aðrar heimildir staðfesta að að genamengi *S. rosacea* er mjög fjölbreitt, með litningatalningu frá 28 upp í 52 (Tropicos, 2014)



**Mynd 4.3.2** Genamengi *Saxifraga nivalis*. Talning frá myndum gefur niðurstöðuna  $2n=60$ .

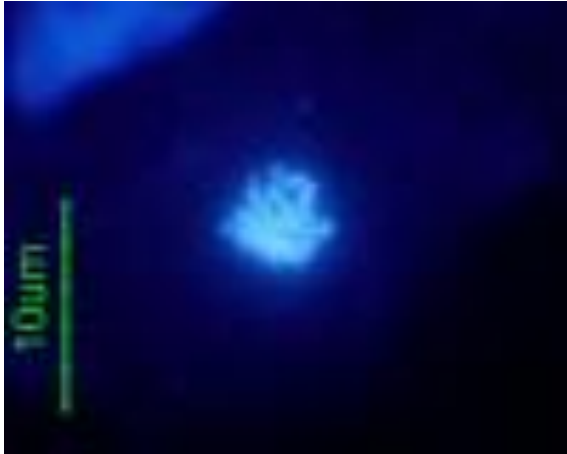
Áætla má út frá niðurstöðum litningaeinangrunarinnar að litningafjöldi *S.nivalis* sé  $2n=60$ . Litningarnir eru stuttir og klesstir í mynd a og því er erfitt að greina með vissu litningafjöldann. Á mynd b sjást litningarnir vel og talning gefur heildarfjöldann 60. Raun-litningafjöldi *S.nivalis* er  $2n=60$  (Löve & Löve, 1975). Heimildir annara vísindamanna hafa staðfest niðurstöðu talningarinnar. Þrátt fyrir að  $2n=60$  sé algengasta niðurstaðan meðal vísindamanna hafa litningatölurnar  $2n=70$  og  $2n=40$  einnig fengist (Tropicos, 2014).



**Mynd 4.3.3** Genamengi *Saxifraga cernua*. Talning gefur til kynna  $2n=>60$

Mynd af genamengi *S. cernua* sýna að litningarnir eru lengri en í mynd 4.3.2. Hinsvegar eru þeir þéttari og því erfitt að ákvarða litningatölu. Út frá myndinni má þó sjá að litningarnir eru  $>60$ . Raun-litningafjöldi *S.cernua* er  $2n=36-72$  (Löve & Löve, 1975). Aðrar rannsóknir hafa fengið svipaðar niðurstöður, talningar hafa verið allt frá 24 til 60 (Tropicos, 2014).





**Mynd 4.3.4** Genamengi *Saxifraga granulata*.

Myndin af genamengi *S. granulata* gefur til kynna litningatölu  $>32-44$ . Samkvæmt heimildum stenst það en ákvörðuð litningatala Kornasteinbrjóts er  $2n= 20-56$  (Löve & Löve, 1975). Genamengi *S. granulata* er einkum fjölbreitt, fjöldi annara rannsókna hafa leitt í ljós margar mismunandi litningatölur, eða allt frá 22 upp í 56 sem staðfestir fyrri heimild. Einnig staðfestir þetta niðurstöður þessarar rannsóknar (Tropicos, 2014).

## 5 Umræður

### 5.1 *xTriticoleymus*

Aðferðirnar notaðar reyndust hentugar til grunn-aðgreiningar litningastofna.

Með þessum aðferðum mátti rekja byggingarleg einkenni plöntunnar miðað við hreinræktað hveiti. Þannig má rannsaka enn frekar hvert einkenni fyrir sig með tilliti til litningatölu plöntunnar, hlutföll milli melgresis og hveitilitninga og síðast en ekki síst tilfærslur innan litninga. Skýra má þannig hugsanlega tjáningu gena sem ekki eru tjáð af hreinu hveiti. Staðsetja mátti fleiri gen til frekari rakningar á útlits og byggingareinkennum plöntunarinnar. Aðeins var notast við rDNA gen til auðkenningar einstakra litninga. Með þessum aðferðum er hægt að komast langt í rannsóknum á byggingu og gerð plantna með tilliti til genaþekkingu á plöntum og kortlagningu þeirra.

Hægt væri einnig að nota þessa aðferð með tilliti til flokkunarfræðinnar. Nálágast má upplýsingar um heil erfðamengi og hvort vanti eitthvað í þau. Hægt er að skoða litningafjölda plantna með þessari aðferð, þó er ekki hægt að fá miklar flokkunarfræðilegar upplýsingar út frá litningatölu einni og sér þótt litningatala sé alltaf byrjunarstig.

Með meiri vitneskju um melgresi væri hægt að greina enn frekar hlutverk genanna í melgresislitningunum sem eftir eru. Þannig má svo einangra eftirsótt gen úr og samþætta þá við hveiti til að fá þórnari og ávaxtameiri plöntu til uppskeru á norðlægum slóðum.

Út frá litningatölunni einni telst vitað að plantan er frjó. Út frá útreikningum meiósu hefur þurft að minnsta kosti 4 bakvíxlanir til að fá litningafjöldann 42. *L. arenarius* hefur litningatöluna 56 og því 28 í meiósu. *Triticum* L. hefur litningatöluna 42 og því 21 í meiósu. Afkvæmi þess yrði því með litningatöluna 49. Bakvíxl afkvæmisins við *Triticum* L. myndi því gefa litningatöluna 42 eftir

a.m.k 4 víxlanir. Þetta sýnir hversu flokkun plantna er grunn ef stuðst er einungis við talningu litninga í genamengi.

## 5.2 Umræður ríbósómgen *L. arenarius* og *Triticum L.*

Ríbósómgen (rDNA) eru einkar nytsamleg í flokkunarfræði þar sem mismunandi endurtektarsvæði rDNA þróast mishratt. Sérstök svæði finnast innan rDNA genanna og eru þau sérlega vernduð og því mjög nytsamleg í gerð alhliða þreifara (Sveinsson, 2009). Þessir þreifarar nýtast í aflestur rRNA eða rDNA úr mörgum tegundum lífsflórunnar. 16-18S rRNA genið er mest rannsakað af ríbósóm genunum og upplýsingar liggja fyrir að genaröð þess hefur þróast hægst innan genaraða lífsflórunnar. Vegna þessa er það mjög nytsamlegt í rannsóknir á fornum þróunarviðburða. 23-28S rRNA genið er stærra en fyrrnefnda og sýnir meiri fjölbreytileika í þróunarhraða. Þetta tiltekna gen hefur mörg og margbreytileg svæði innan þess og er því margbreytilegra milli lífvera. 5S rRNA genið er að vissu leyti svipað 16-18S geninu þegar kemur að flokkunarfræði og ályktun skyldleika fornrar þróunarviðburða. Það er þó töluvert minna í basaröðum talið og því ekki eins mikill upplýsingagjafi. Sýnt hefur fram að þessi gen þróast ekki ein og sér heldur helst þróun þeirra í hendur. En hvernig gerist þessi hópþróun? Margt bendir til þess að ójöfn litningavíxl, genaturnun, systurlitningavíxl og skrið á eftirmyndun valdi þessu (Dixon og Hillis, 1991). Sem dæmi um hversu vel ríbósóm gen eru varðveitt, má nota 18S-25S rDNA þreifara sem einangraðir hafa verið úr mönnum til að kortleggja ríbósómgen á korntegundum, krókódílum og öðrum lífveruhópum (Sveinsson, 2009) Vitandi þessar upplýsingar er hægt að staðsetja ríbósómgen með merktum þreifara. Út frá staðsetningu genanna má flokka litninga í hópa og þekkja þá í sundur. Út frá einmitt staðsetningu ríbósómgena á systra-melgresislitningunum og genanna á systra-hveitilítningunum má sjá samræmi sem bendir til þess að melgresi og hveiti séu skyld innbyrðis að einhverju leyti (Jiming og Bikram, 1994). Notast var við rDNA þreifara í núverandi tilfelli til að para systralitninga saman. Út frá niðurstöðum ríbósómlitunarinnar má sjá að einungis er hægt að greina eitt sett af systralitningum í melgresislitningunum sem eru staðsettir eins og ríbósómgen hveitilítningana. Að því gefnu að tvö sett af sömu rDNA pörum eru að finna í sama genamenginu má áætla að genin sem eru að finna á þeim litningum séu

mismunandi milli tegundanna. Það veldur því að oftjáníng verði ekki á sömu genum, eða þá að genin sem eru að finna í þessum litningum séu nógu lítil eða nógu fá og þannig raski ekki genatjáníngu lífverunnar. Staðsetning þessa tiltöluðu ríbósómgens gefur til kynna að forfaðir *L.arenarius* og *T.aestivum* hafi hugsanlega verið sá sami og að tegundirnar hafi skilist að vegna hugsanlegrar fjöllitnunar (Abd El-Twab, 2006). Vert væri að ríbósóm-merkja erfðamengi hreins melgresis og hveitis og gera samanburð á öllum fíanlegum merkjum þar sem að litningarnir sem bera stærstu ríbósómgengin í erfðamengi melgresis eru ekki til staðar í núverandi plöntusýni.

### 5.3 Umræður *Saxifraga*

Ættkvíslin *Saxifraga* er margbreytileg. Það kemur ekki einungis fram í byggingu, lífsháttum og fleiru, heldur sést það á litningatölu mismunandi tegunda þess. Eins og fyrrnefnt, þá er flokkun lífvera einungis eftir litningatölu mjög gróf og ber því að hafa aðgát að *S. nivalis* sem vex í harðgerðari umhverfi verða yfirleitt styttri og veikbyggðari en þegar það vex í mýkra umhverfi. Í skuggamiklu umhverfi hefur *S.nivalis* tilhneigingu til að verða hærri og með hlutfallslega grennri stöngul vegna sólarshorts. (Healy og Gillespie, 2004). Út frá þessum breytileika frá ytri áhrifum er erfitt að úrskurða hvort breytileiki stafi einungis af erfðafræðilegum ástæðum. Dæmi um fjölbreytileika milli tegunda er stærð laufa og fjöldi- og stærð „tanna“ á laufum, fjöldi, litur- og stærð blóma (DeChaine, et al., 2013). Óvíst er að erfðafræðilegur munur milli þessara tegunda sé svo mikill að útlitseinkenni þeirra stafi einungis af erfðapáttum eða með öðrum orðum litningatölu. Margbreytileiki ættbálksins *Saxifraga* L. er einnig að sjá í grunntölu þess. Samkvæmt heimildum er grunntalan  $x=6,7,8,9,10,11$  og 13 og er hann því fjöllitna (Löve & löve, 1975). Þetta gerir plöntuna mjög áhugaverða til rannsóknar, hún vex villt og æxlast eðlilega, eða m.ö.o. hefur eðlilega meiósu þrátt fyrir ýmsa fjöllitnun. Þar sem að breytileiki er á litnun og grunntölum milli sumra tegunda gerir það þá að hugsanlegum upplýsingabanka. Dýpka mætti því vitneskju um litnun og grunntölu tegunda *Saxifraga* L til áframhaldandi rannsókna á tegundavíxlun og samræmi í meiósu. Einnig mætti rannsaka

steinbrjót slitninga betur til að fá útskýringu á mismunandi litningatölu milli plantna af sömu steinbrjótstegund.

## 5.4 Lokaorð

Í þessari rannsókn hafa grunnþættir í erfðarannsóknum plantna verið sýnd, sýnt hefur verið fram á notagildi litningaeinangrunar í flokkunarfræði plantna ásamt notagildi fluorescence in situ hybridization í staðsetningu gena. Aukin þekking á erfðafræði plantna getur stóraukið notkunarmöguleika manna á plöntuauðlindir, með þessari tækni má erfðabæta plöntustofna og styrkja þá enn fremur til manneldis og þannig bæta framboð matarauðlinda svo um munar. Með eflingu á landbúnaði má stórauka afköst og uppskeru. Samfélög manna fer ört vaxandi og því er mikilvægt að auka framleiðslugetu afurða samkvæmt eftirspurn. Með þessum aðferðum er ekki einungis hægt að auka afkastagetu plantna heldur gera þau þolnari fyrir erfiðum aðstæðum. Í vaxandi samfélagi fara frjósamar náttúruauðlindir fækkandi og því er þörf á betri úrræði á staðsetningu ræktunar.

## 6 Heimildaskrá

Abd El-Twab M. H. (2006). *Physical mapping of the 45S rDNA on the chromosomes Triticum trugidum and T. Aestivum using fluorescence in situ hybridization for chromosome ancestors. Arab J. Biotech*, 10(1): 69-80.

Anamthawat-Jónsson K. (1999). *Variable genome composition in Triticum×Leymus amphiploids. Theor Appl Genet*, 99:1087-1093.

Anamthawat-Jónsson K. Böðvarsdóttir Sigríður Klara. (1998). *Meiosis of Wheat x Lyme grass hybrids. Chromosome research*, 6: 339-343.

Anamthawat-Jónsson K. (2013). *Selected Methods in Plant Cytogenetics*. Reykjavík. University of Iceland.

DeChaine. E.G, Anderson. S. A, McNew. J. M og Wendling. B. M. (2013). *On the Evolutionary and Biogeographic History of Saxifraga sect. Trachyphyllum (Gaud.) Koch (Saxifragaceae Juss.). PloS One*, 8(7): e69814.

Dixon M T. Hills D M. (1991). *Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Chicago journals*. 66(4): 441-453.

Griffiths. A. J. F, Wessler. S. R, Caroll. S. B, Doebley. J. (2012). *Introduction to Genetic Analysis*. New York. W. H. Freeman and Company.

Griffiths S, Sharp R, Foote T N, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, og Moore G. (2006). *Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. Nature*. (439): .

Healy C. Gillespie L. (2004). *A systematic analysis of the alpine saxifrage*

*complex (saxifragaceae) in the canadian arctic islands using morphology and chloroplast DNA data. Canadian field naturalist. 118(3): 325-340.*

Jiming J. Bikram S. G. (1994). *New 18S – 26S ribosomal RNA loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. Chromosoma 103: 179-188.*

Kristinsson H. (2010). *Íslenska Plöntuhandbókin, blómplöntur og birkningar. Reykjavík. Mál og menning.*

Lindman C. A. M. (1997). *Bilder ur Nordens flora. Projekt Runeberg. Sótt þann: 25 nóvember 2013. Frá: <http://runeberg.org/nordflor/275.html>.*

Löve Áskell. Löve Doris. (1975). *Cytotaxonomical Atlas of the Arctic Flora. Vaduz. J Cramer.*

Löve, Á. (1983). *Flora of Iceland. Reykjavík. Almenna bókafélagið.*

Raven P H. Evert R F. Eichhorn S E. (2005). *Biology of Plants. New York: W.H Freeman and Company.*

Sveinsson S. (2009). *Greining erfðamengja í fjöllum meltegundum (Leymus) með frumuerfðafraðilegum aðferðum. Meistararitgerð. Reykjavík. University of Iceland.*

Vargas P. (2000). *A phylogenetic study of Saxifraga sect. Saxifraga (Saxifragaceae) on nrDNA ITS sequences. Plant systematics and Evolution. 223: 59-70.*

Tropicos. (2014). *Saxifraga rosacea var. sponhemica. Sótt þann: 06 janúar 2014. Frá: <http://tropicos.org/Name/29101473?tab=chromosomecounts>.*

Tropicos. (2014). *Saxifraga nivalis L.. Sótt þann: 06 janúar 2014. Frá: <http://tropicos.org/Name/29100778?tab=chromosomecounts>.*

Tropicos. (2014). *Saxifraga cernua* L.. Sótt þann: 06 janúar 2014. Frá:  
<http://tropicos.org/Name/29100068?tab=chromosomecounts>.

Tropicos. (2014). *Saxifraga granulata* L.. Sótt þann: 06 janúar 2014. Frá:  
<http://tropicos.org/Name/29100077?tab=chromosomecounts>.

Willcox George. (2013). *The roots of Cultivation in Southwestern Asia*. Science  
341: 39.