

# Průtoková cytometrie a její využití ve šlechtění rostlin

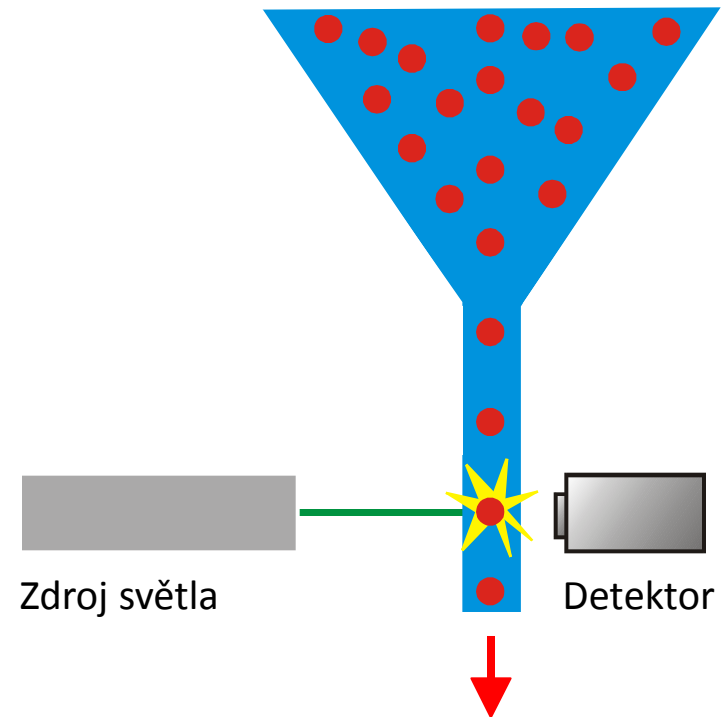
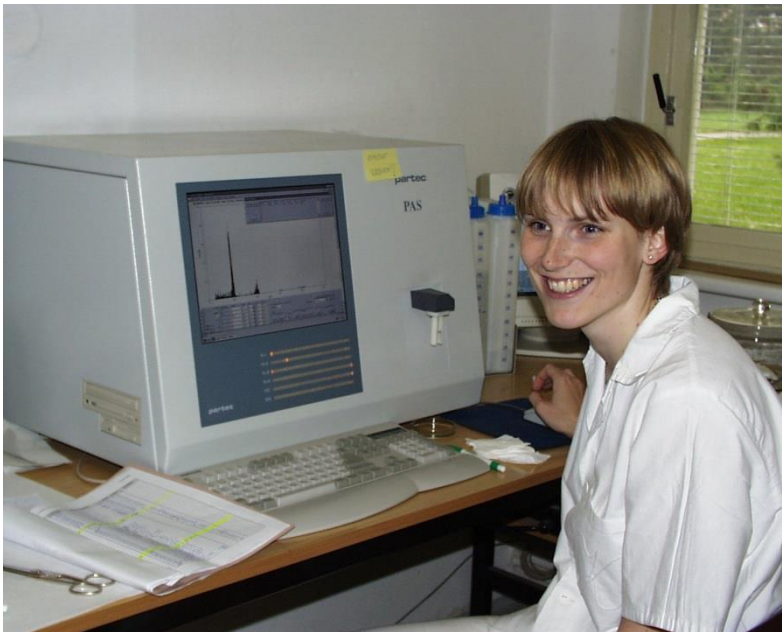
---

- Základní principy
- Metodika přípravy vzorků a analýzy
- Využití ve šlechtění
- Praktická ukázka



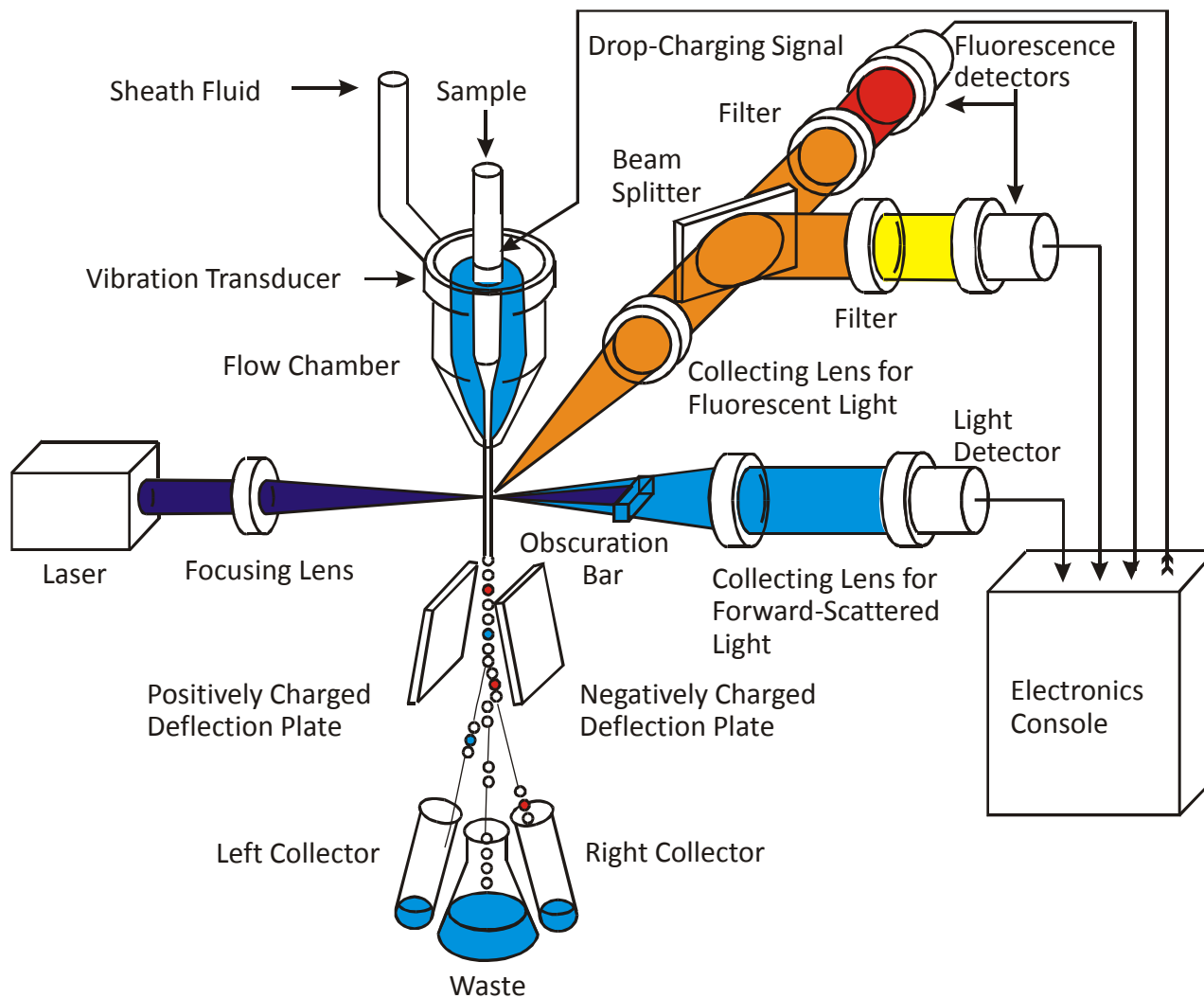
# Jak průtoková cytometrie funguje?

Mikroskopické částice procházejí světelným paprskem a jsou detekovány jejich optické vlastnosti, na jejichž základě mohou být částice od sebe rozlišeny.



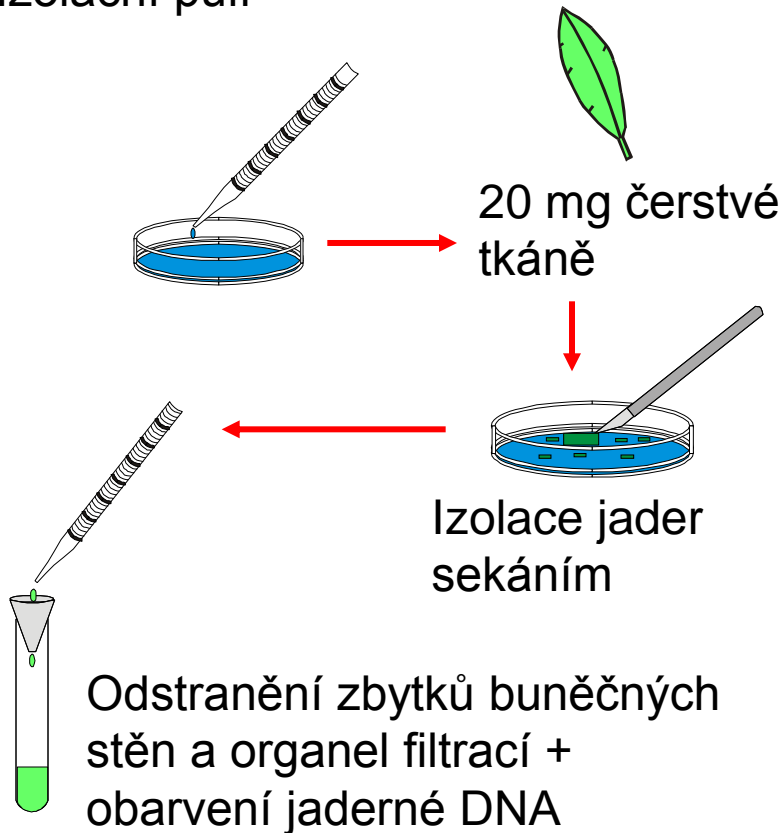
Vzorek musí být suspenze jednotlivých částic (ne shluky).

# Schéma průtokového cytometru

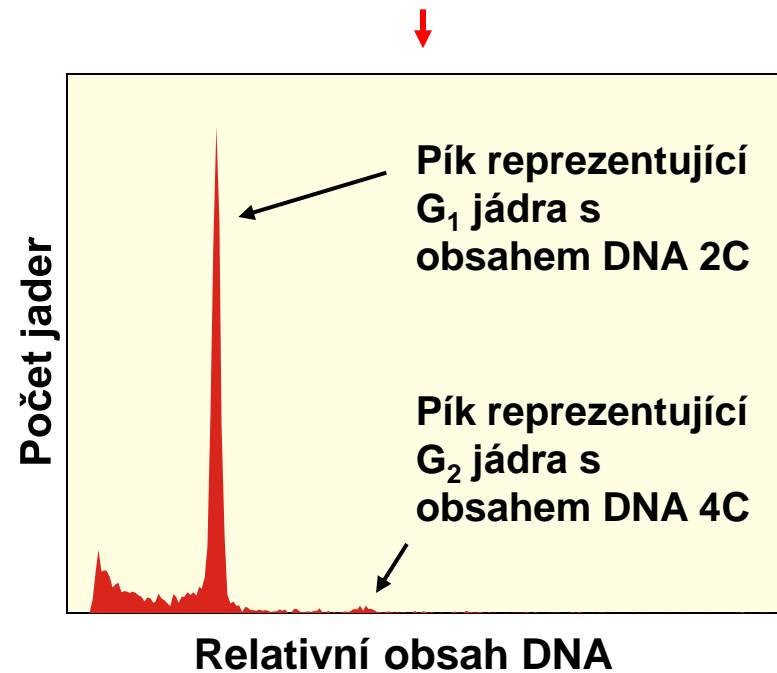


# Měření obsahu jaderné DNA pomocí průtokové cytometrie

Izolační pufr



Cytometrická analýza relativní intenzity fluorescence jaderné DNA



# Výběr správné metody

---

- **Úspěšná cytometrická analýza je podmíněna správným výběrem:**
  - Izolačního pufu
  - Vhodného rostlinného materiálu (nejlépe čerstvé mladé tkáně)
  - DNA barviva
  - Metody standardizace

# Výběr správného izolačního pufru

---

## ▪ Hlavní funkce

- Uvolnění jader z buněk
- Zachování celistvosti izolovaných jader
- Potlačení aktivity nukleáz a sekundárních metabolitů (degradace DNA)

## ▪ Typické komponenty (výběr)

- Stabilizátory chromatinu (polyaminy, kationty  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ )
- Chelátory kovů (EDTA, EGTA)
- Redukční činidla (mercaptoethanol, DTT, PVP)
- Detergenty (Triton X-100, Tween 20)

## ▪ Neexistence univerzálního izolačního pufru

- Výběr stylem „pokus a omyl“ pro daný rostl. druh / tkáň

# Fluorescenční DNA barviva

---

| Fluorescent Dye    | Primary Binding Mode | Wavelength (nm)* |          |
|--------------------|----------------------|------------------|----------|
|                    |                      | Excitation       | Emission |
| Ethidium bromide** | Intercalation        | 530              | 605      |
| Propidium iodide** | Intercalation        | 540              | 615      |
| Hoechst 33258      | AT-binding           | 365              | 465      |
| Hoechst 33342      | AT-binding           | 360              | 460      |
| DAPI               | AT-binding           | 365              | 450      |
| DIPI               | AT-binding           | 365              | 450      |
| Chromomycin A3     | GC-binding           | 445              | 570      |
| Mihtramycin        | GC-binding           | 445              | 575      |
| Olivomycin         | GC-binding           | 440              | 560      |

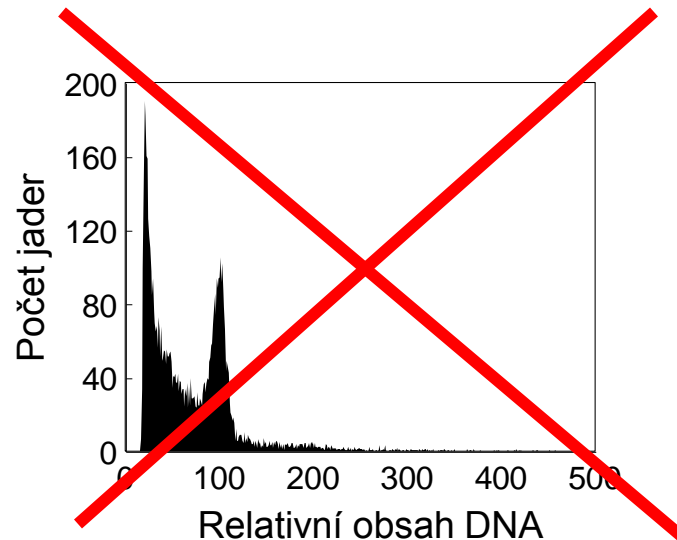
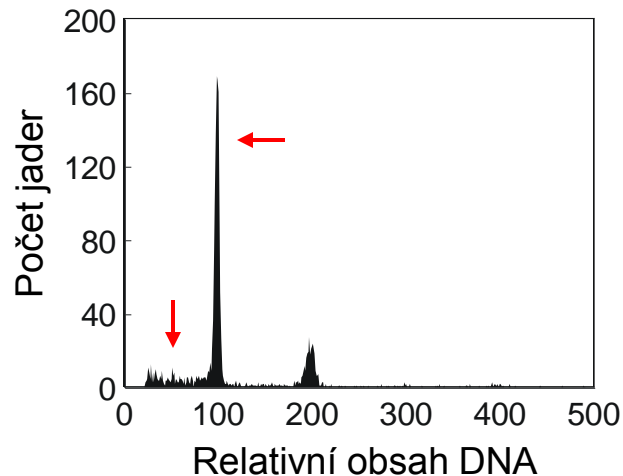
\*Dye-DNA complex

\*\*Binds also to double stranded RNA!

# Požadavky na spolehlivou analýzu

---

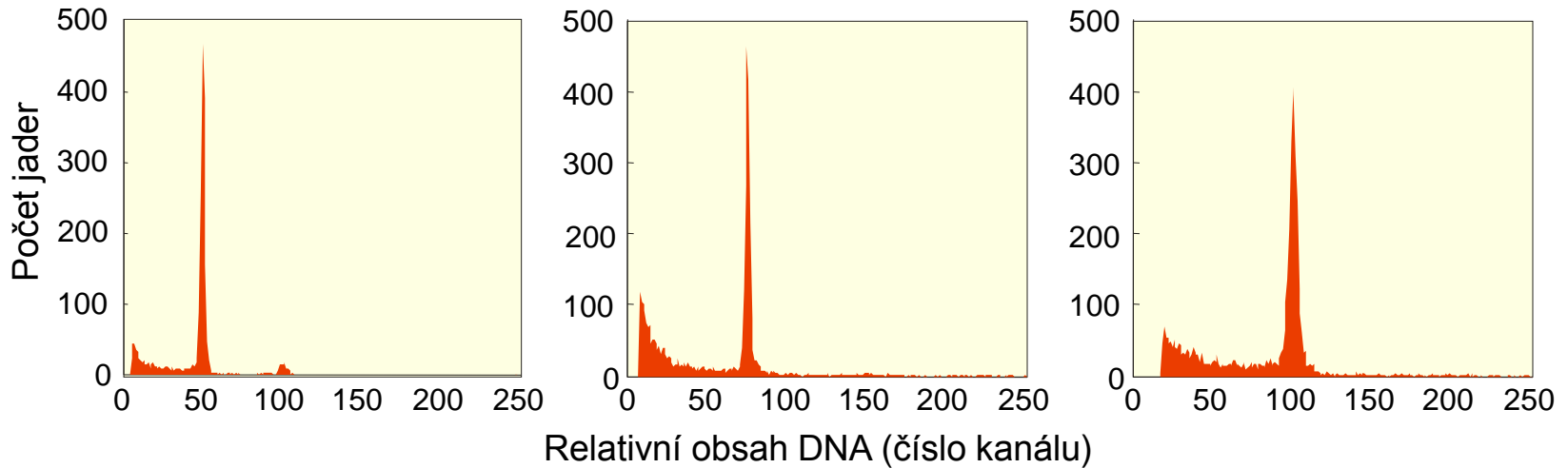
- „fajne a pěkne“ histogramy relativního obsahu DNA
  - úzké píky (nízké koeficienty variace, CV)
  - zanedbatelné pozadí buněčných zbytků





# Správná interpretace výsledků - kvíz

---



# Používání standardů - nezbytné!

---

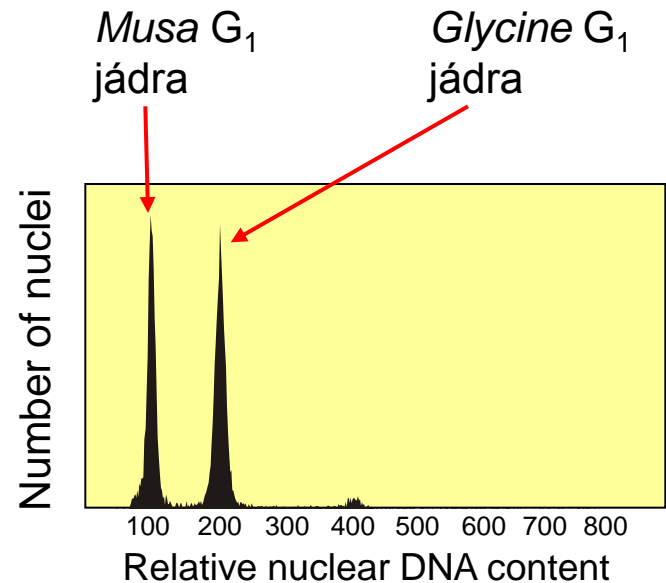
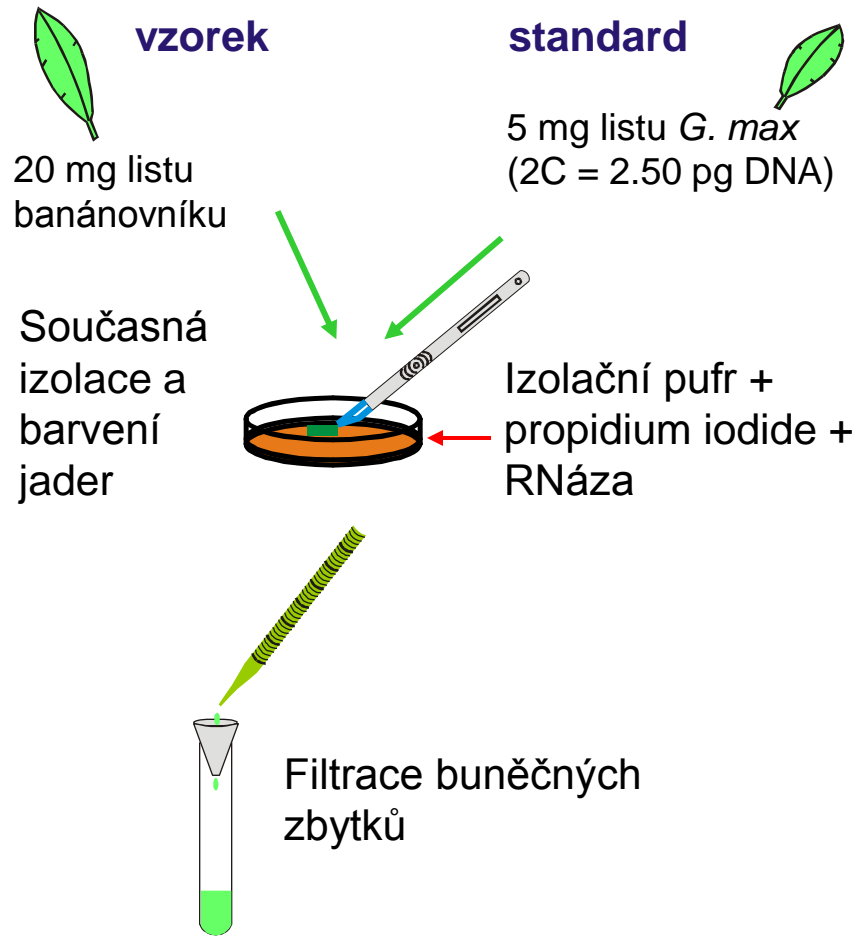
- **Průtoková cytometrie určuje obsah DNA v relativních jednotkách (čísla kanálů) na základě porovnání pozic píků standardu a vzorku**
- **Pozice DNA píků se může měnit kvůli**
  - náhodným odchylkám způsobeným přístrojem
  - rozdílům v přípravě vzorků a jejich barvení
- **Standardizace**
  - Externí
    - Rychlý skrínig DNA ploidie
  - Interní
    - Přesné určení DNA ploidie, vč. aneuploidie
    - Měření velikosti genomů

# Aplikace průtokové cytometrie

---

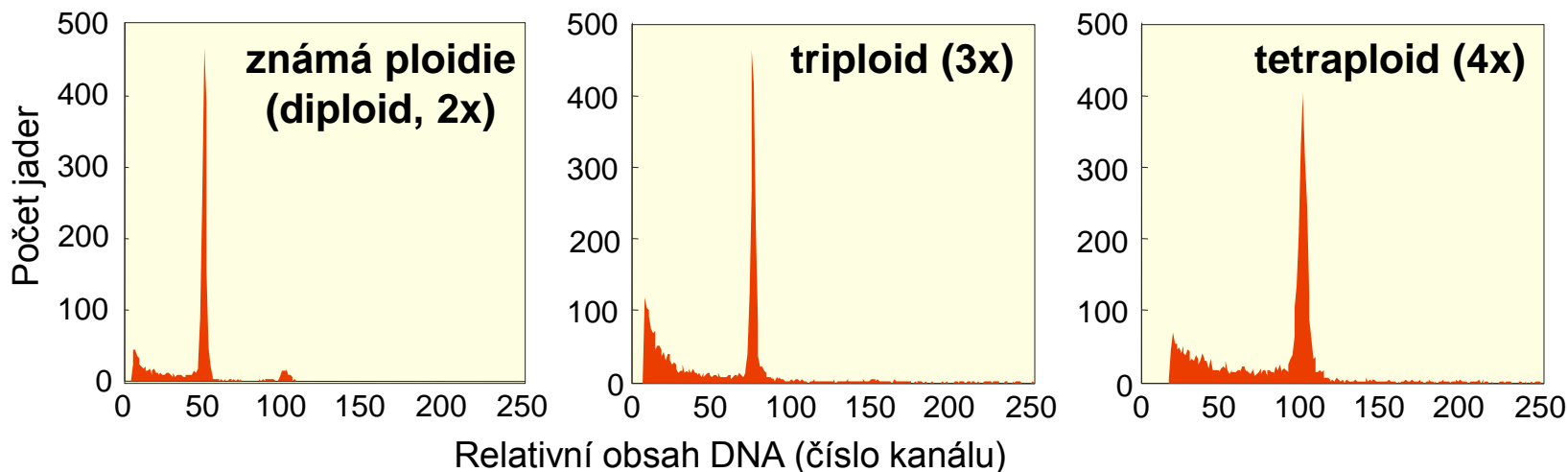
- **Obsah DNA v absolutních jednotkách**
  - Velikost jaderného genomu (pg DNA, bp)
- **Relativní obsah jaderné DNA**
  - Ploidie ( $x$ )
  - Aneuploidie
  - Mixoploidie
  - Identifikace inter/intraspecifických hybridů
  - Endopolyploidie
  - Určování pohlaví

# Velikost jaderného genomu



Poměr pozic G<sub>1</sub> píků *Glycine* k *Musa* je 1.984 => 2C hodnota *M. acuminata errans* je  $2.50 / 1.984 = 1.26$  pg DNA

# Stanovení ploidie

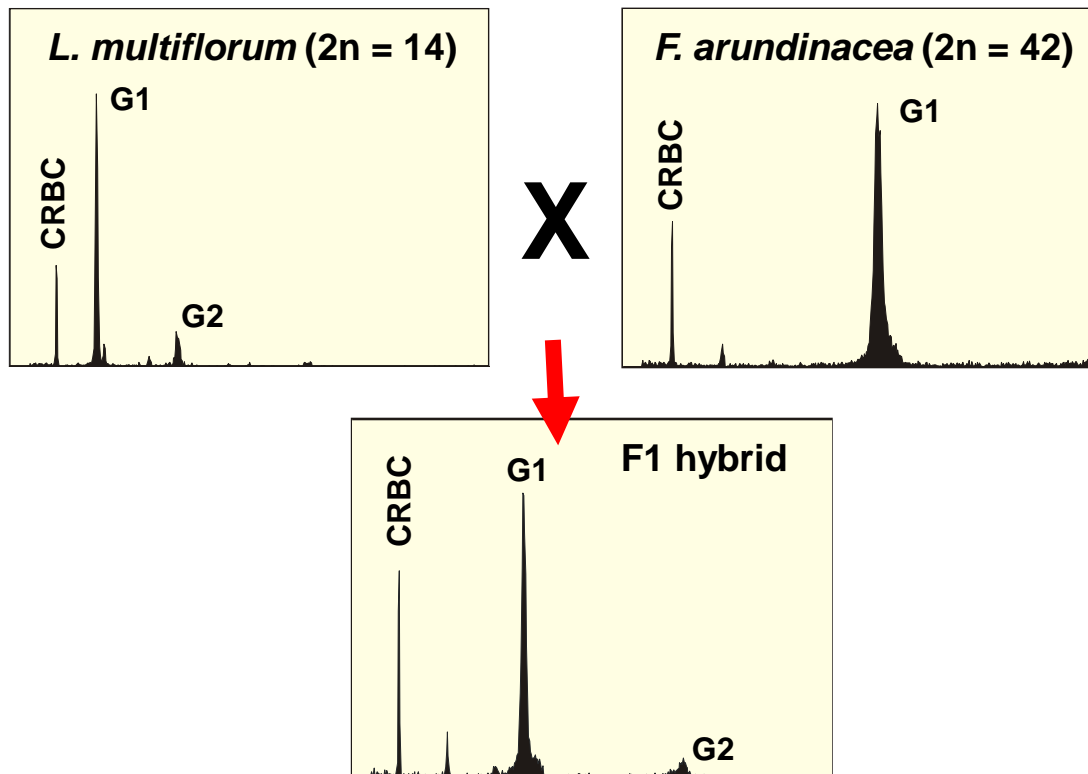


## Výhody:

- Jednoduchost a rychlost (>100 vzorků za den)
- Přesnost a reprodukovatelnost
- Nevyžaduje dělicí se buňky
- Nedestruktivní (pouze miligramová množství rostlinných tkání)

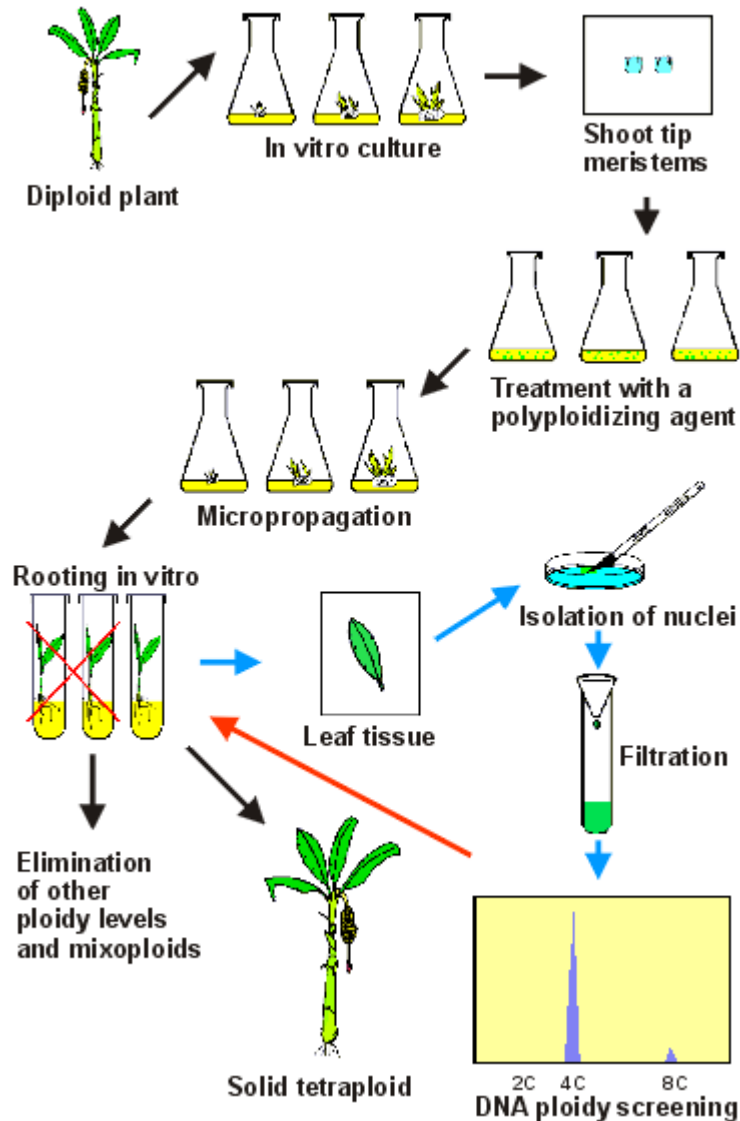
# Identifikace hybridů

- F1 hybridy mohou být časně detekovány na základě středních obsahů DNA



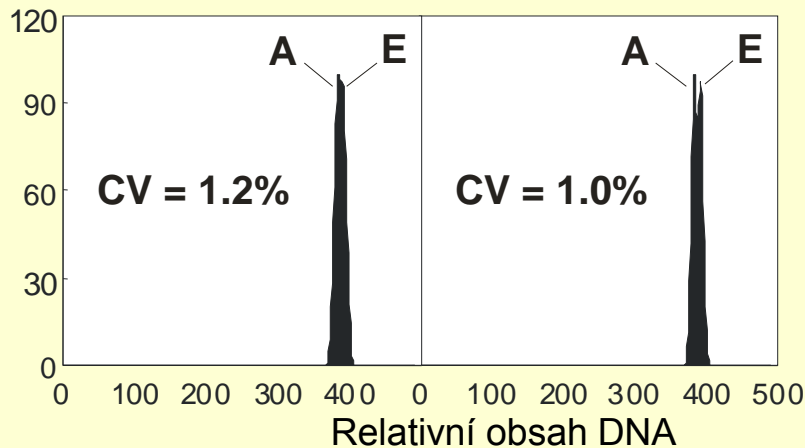
- Výhody:
  - skrining v raných fázích růstu

# Detekce polyploidů



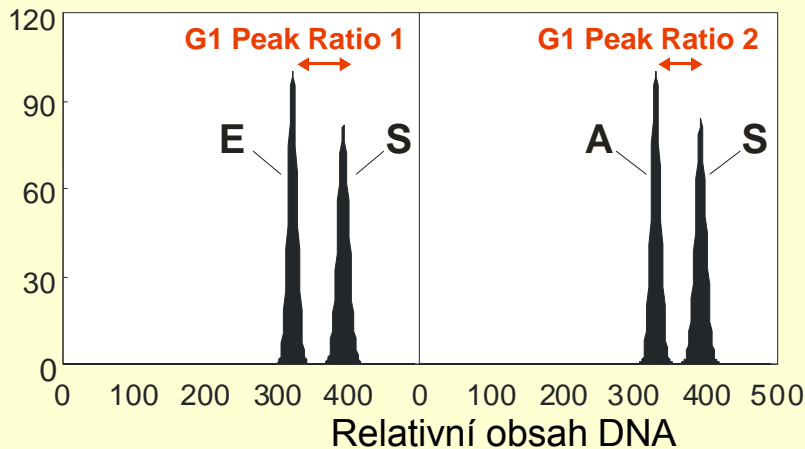
- rychlá a časná detekce produktů *in vitro* manipulací s počtem chromozómových sad (dihaploidizace, polyploidizace)

# Identifikace aneuploidie



**Přímá metoda: Použití euploidní rostliny stejného druhu jako interního standardu**

Rozlišení je možné pouze když CV obou píků jsou nižší než polovina rozdílu obsahu DNA (2,4% v tomto případě)



**Nepřímá metoda: Použití rostliny jiného druhu jako interního standardu**

Relativní rozdíl v obsahu DNA (D):

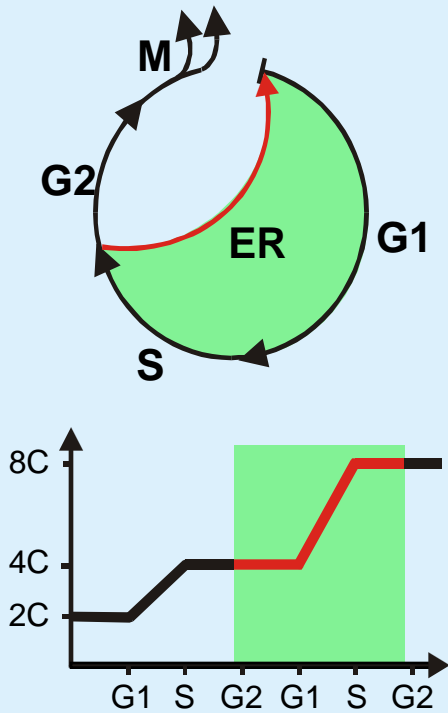
$$D = \frac{\text{G1 Peak Ratio 2} - \text{G1 Peak Ratio 1}}{\text{G1 Peak Ratio 1}} * 100 [\%]$$

E = euploid, A = aneuploid

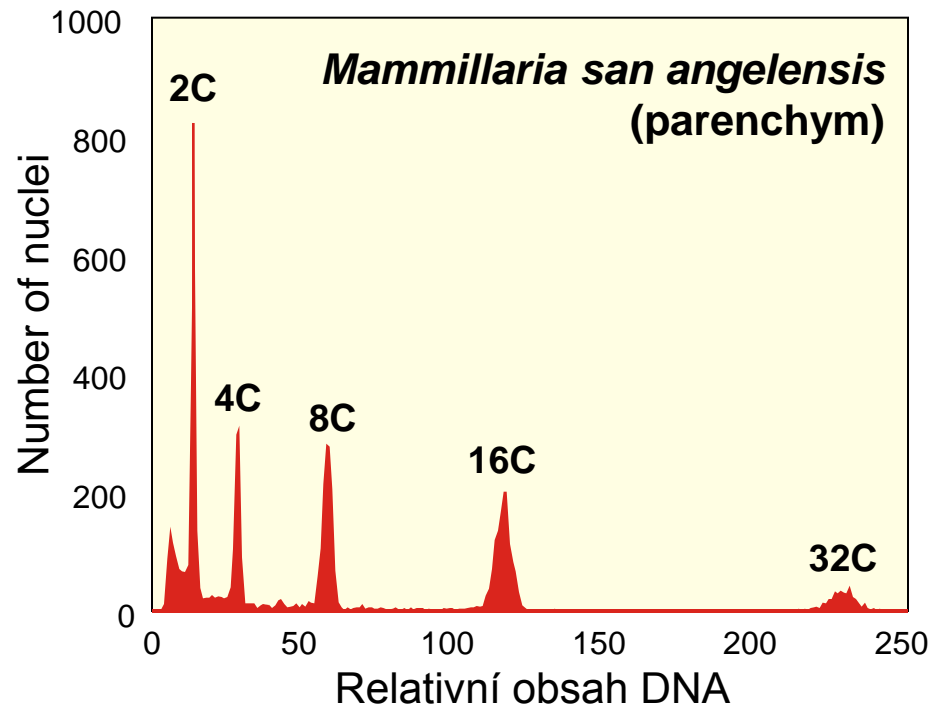


# Detekce endoreduplikace (endopolyploidie)

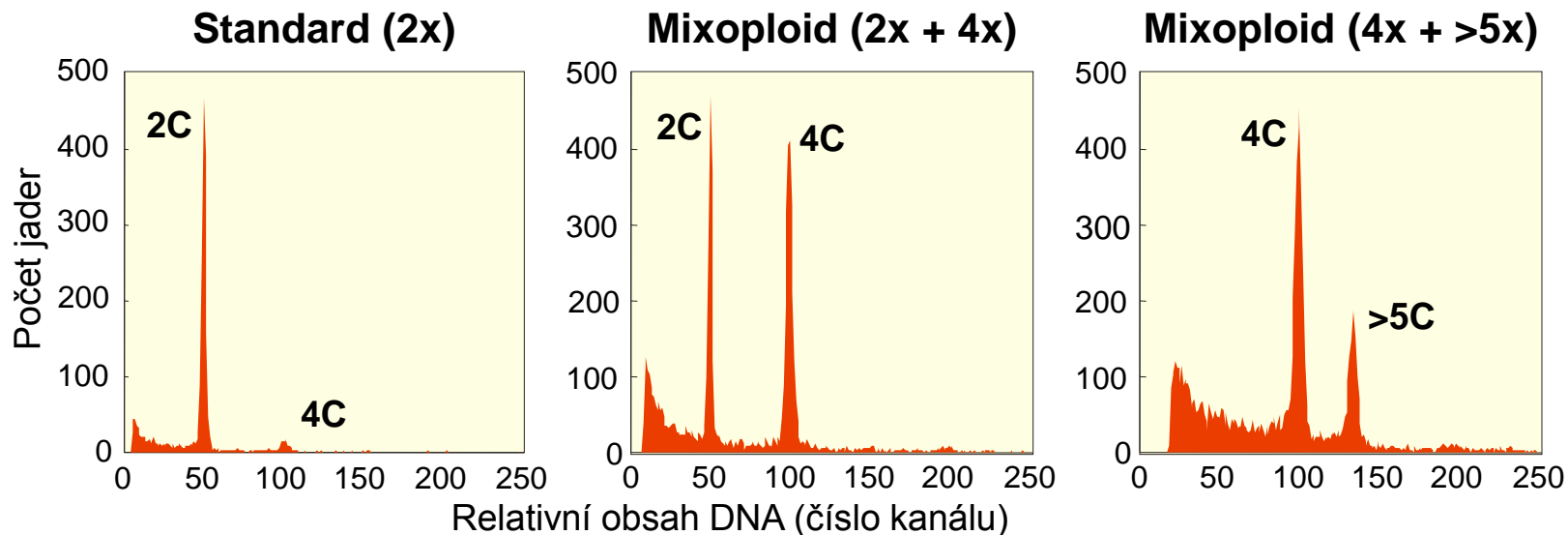
## ENDOREDUPLIKACE



Průtoková cytometrie umožňuje analyzovat stupeň endopolyploidie a frekvenci endopolyploidních buněk



# Identifikace mixoploidů



- Rostlinné tělo se skládá ze tří histologických vrstev (L1, L2 and L3), které se mohou lišit v ploidii (= chimérismus, mixoploidie)
- Počítání chromozómů v kořenových meristémeh (pouze L3 vrstva) nemůže spolehlivě identifikovat mixoploidní jedince, zatímco průtoková cytometrie ano

# Další potenciální aplikace průtokové cytometrie ve šlechtění rostlin

---

- **Určení pohlaví jedinců**
- **Identifikace přítomnosti B chromozómů**
- **Analýza produktů fúze protoplastů**
- **Detekce somaklonální variability**
- **Skríning reprodukčních způsobů (např. apomixie)**
- **Třídění chromozómů**

# Závěry

---

- Průtoková cytometrie je velmi užitečná metoda, nacházející četná uplatnění při šlechtění rostlin
- Avšak její jednoduchost může navádět k „sekání“ chyb (metodologických, interpretačních)
- Pouze správná metodika vede k získání spolehlivých výsledků

