

Tisíc a jedno využití průtokové cytometrie v biologii rostlin

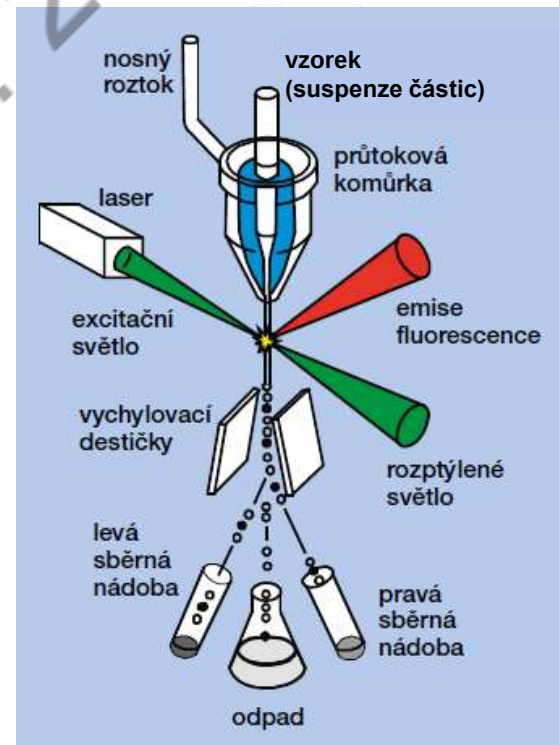
Jaroslav Doležel

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Olomouc

Průtoková cytometrie

Princip

- Vyvinuta pro analýzu velkých populací krevních buněk
- Mikroskopické částice se pohybují velkou rychlostí v úzkém vodním paprsku
- Jsou analyzovány optické parametry (rozptyl světla a fluorescence)
- Vzorek musí mít formu vodní suspenze jednotlivých částic



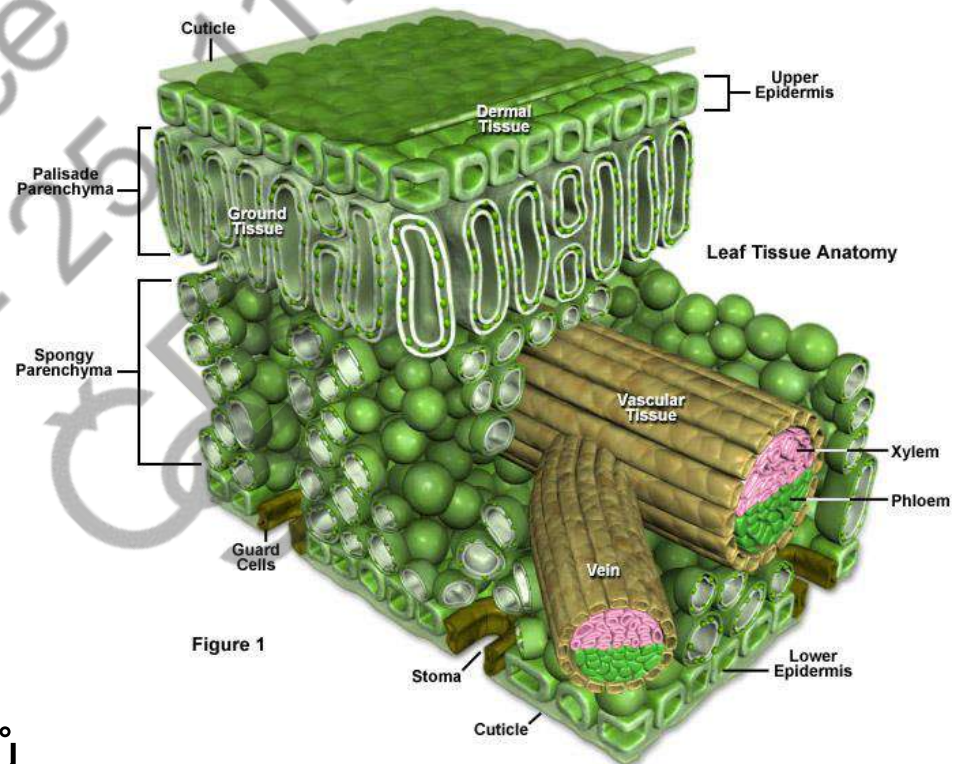
Výhody

- Velká rychlost měření (velké populace částic)
- Identifikace subpopulací
- Možnost třídit vybrané subpopulace

Rostliny nejsou „zelení živočichové“

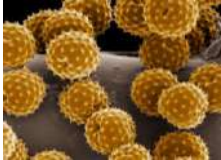
Odlišnosti rostlin

- Vyšší rostliny se vyznačují složitou trojrozměrnou strukturou pletiv s navzájem propojenými buňkami
- Pevná buněčná stěna je autofluorescenční a udržuje nepravidelný tvar buněk
- Buňky rostlin obsahují škálu sekundárních metabolitů, které mohou interferovat s přípravou a analýzou vzorků

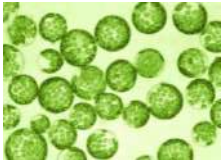


Průtoková cytometrie a rostliny

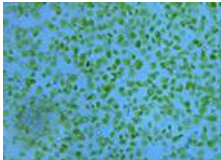
Různé typy vzorků použité pro průtokovou cytometrii



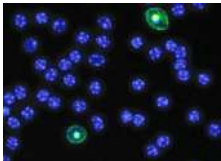
Pyl: Obsah DNA, genotypování jednotlivých pylových zrn; třídění embryogenních samčích pohlavních buněk



Protoplasty: Tkáňově-specifická exprese a metabolomika; třídění produktů somatické hybridizace



Chloroplasty and mitochondrie: Studium fotosyntézy; dýchací řetězec mitochondrií



Buněčná jádra: Obsah jaderné DNA; třídění jader pro přípravu vysokomolekulární DNA; proteomika

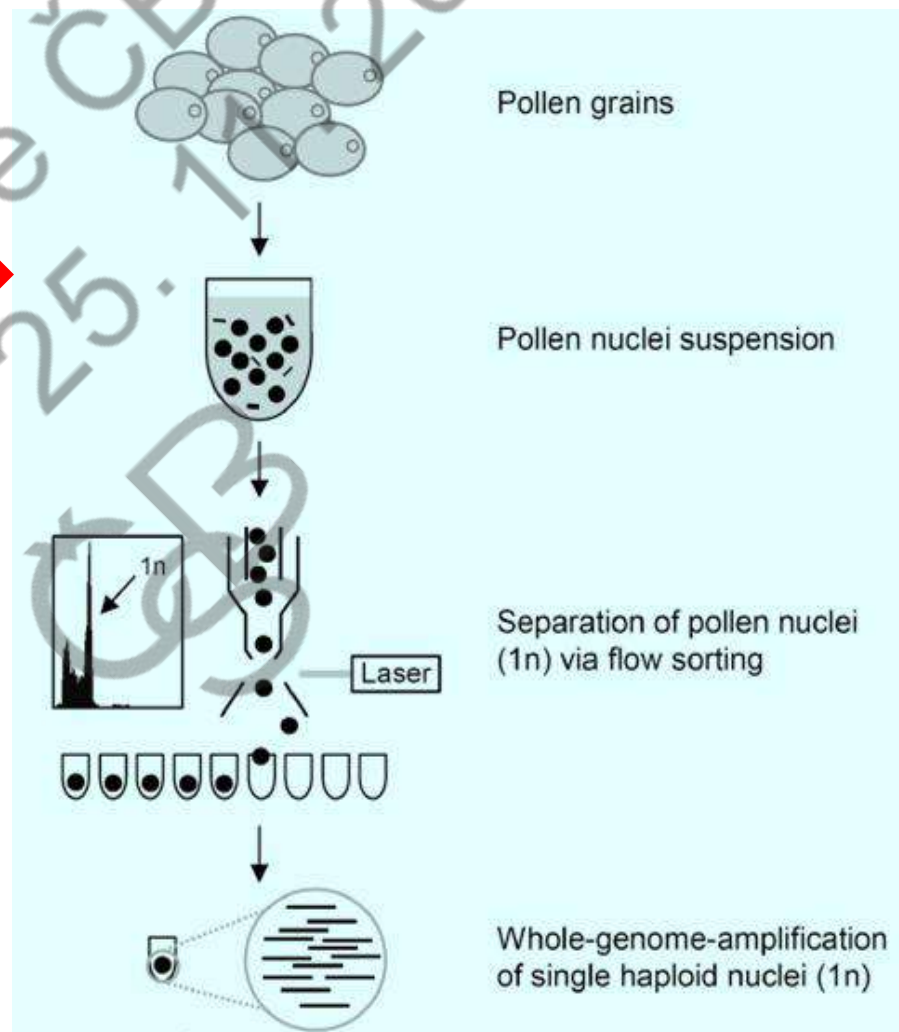


Chromozómy: Třídění chromozómů pro molekulárně-biologické analýzy a sekvenování genomů

Pylová zrna

Ploidie a genotypování

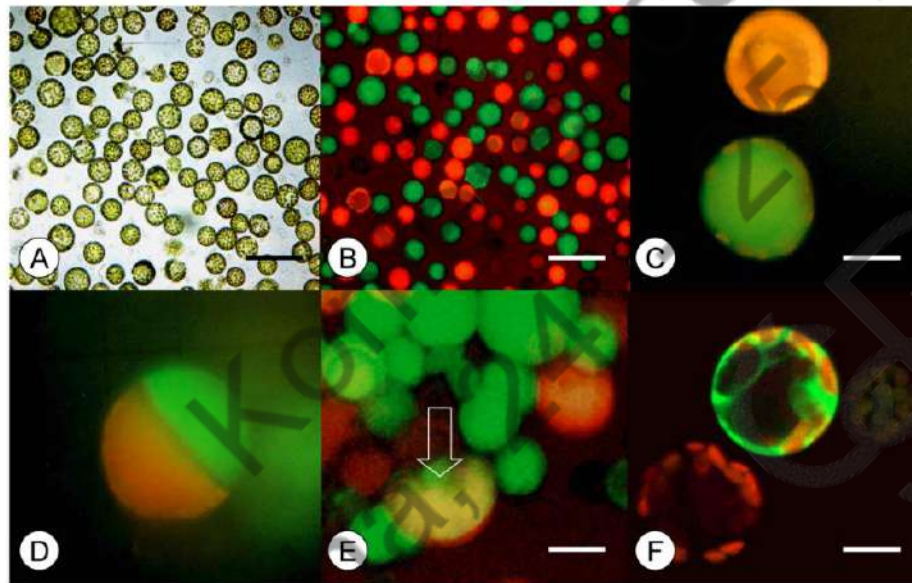
- Měření ploidie
- Amplifikace DNA pylových jader a jejich genotypování →
 - Identifikace meiotických crossing-overů
 - Konstrukce genetických map



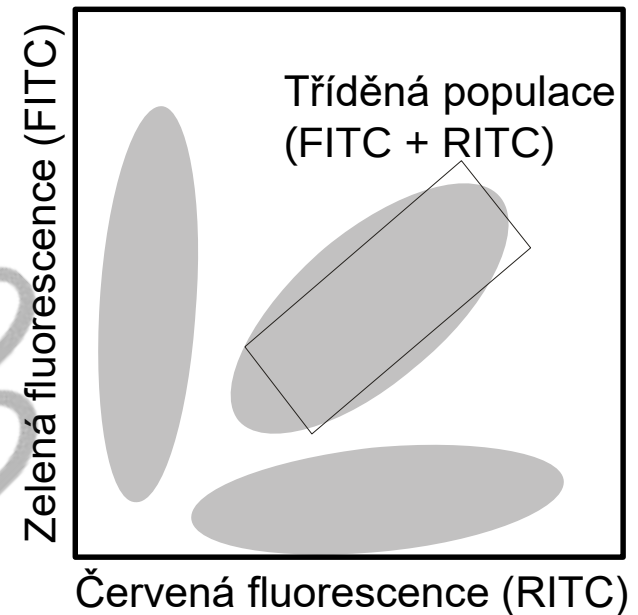
Protoplasty

Identifikace a třídění produktů somatické hybridizace

- Rodičovské protoplasty jsou barveny různými fluorochromy



Fúze protoplastů *Nicotiana tabacum* a *N. nesophila* značených pomocí fluorescein izothiokyanát (FITC) a rhodamin izothiokyanátu (RITC)

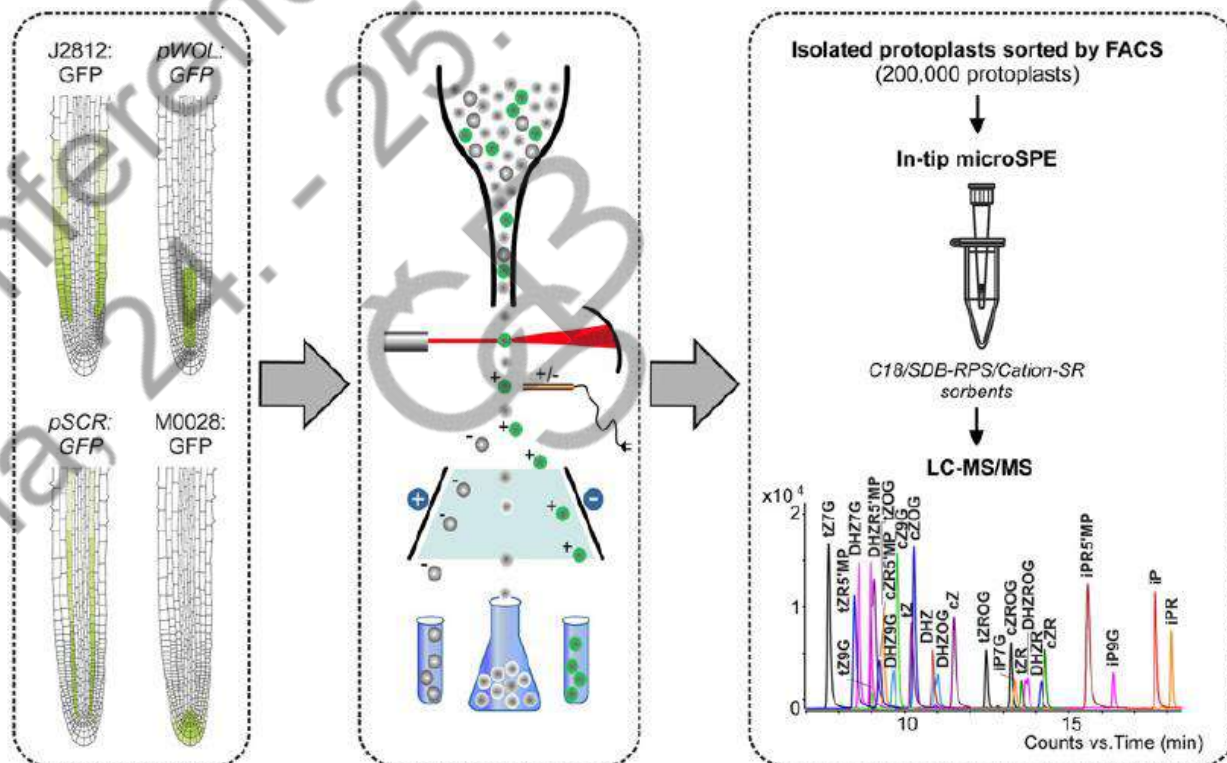


Analýza populace protoplastů po indukované fúzi pomocí průtokové cytometrie (produkty fúze obsahují obě barviva)

Protoplasty

Distribuce cytokininů v buňkách kořenové špičky

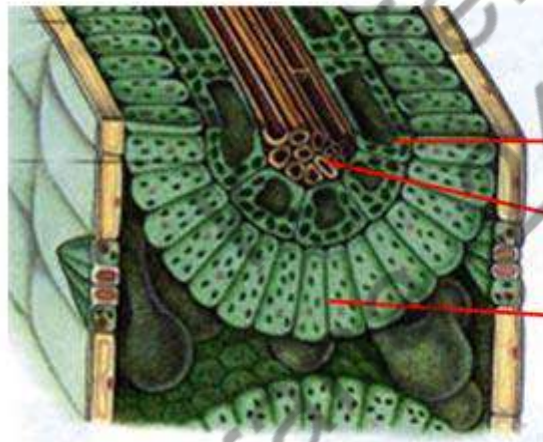
- Linie *Arabidopsis thaliana* exprimující GFP v určitých pletivech
- Tříděná protoplastů s fluorescencí GFP
- Hmotnostní spektrometrie a stanovení 26 cytokininových metabolitů



Chloroplasty

Studium fotosyntézy

- Autofluorescence (PSI = 730 nm, PSII = 680 nm)
- Identifikace a třídění intaktních chloroplastů
- Charakterizace chloroplastů v různých buněčných typech

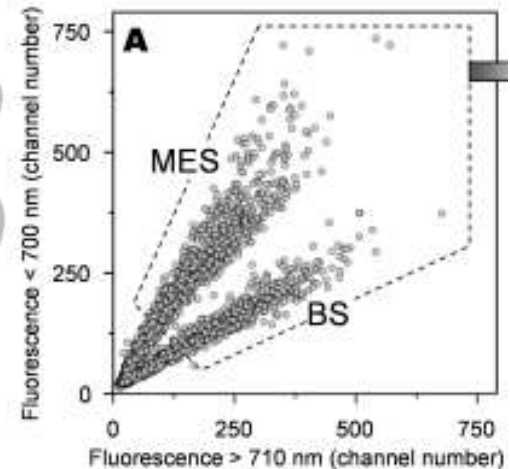


Kranz Anatomy (Diagrammatic)

Bundle sheath with
chloroplasts

Vascular Bundle

Concentrically arranged
Mesophyll Cells (Wreath
like)



Rozlišení chloroplastů listového mezofylu a buněk cévních svazků kukuřice pomocí průtokové cytometrie (fluorescence PSI I a PSI II)



Buněčná jádra

Rastrovací mikrosektrofotometrie

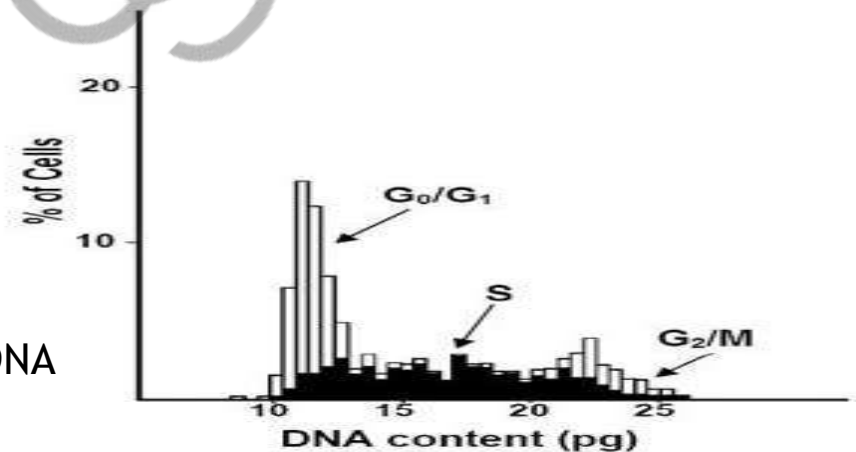


Vickers M85 Microdensitometer

50,000 bodových měření absorbance
(0,2 μm) v každém jádře během 5 sec

Buněčná jádra v S fázi
značena radioaktivně

Histogram obsahu DNA



Buněčná jádra

Měření obsahu jaderné DNA - první pokus

- Jak izolovat buněčná jádra?

DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie

Friedrich Otto Heller

Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn
Vorgetragen auf der Botaniker-Tagung in Hannover an
21. September 1972

Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86:437-441, 1973

- Suspenzi intaktních buněčných jader autor připravil lyzí protoplastů získaných enzymatickým natrávením kořenových špiček

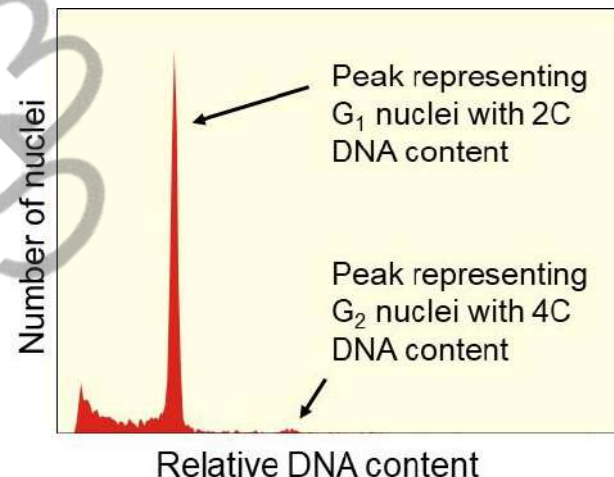
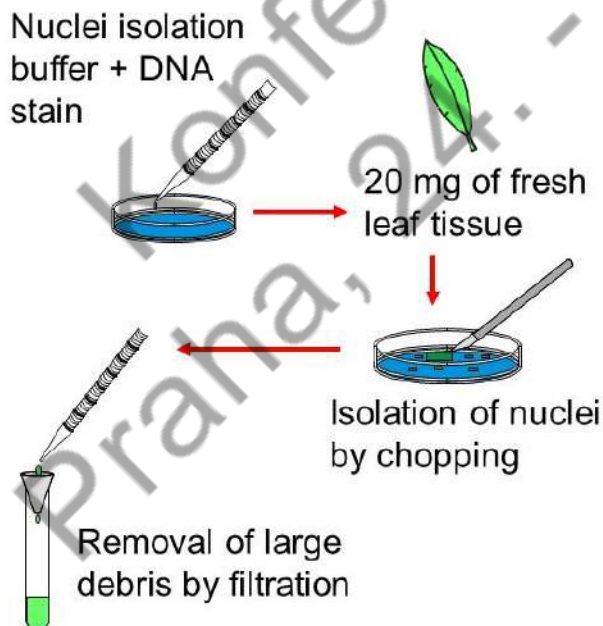


Buněčná jádra - univerzální metoda

Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues

Galbraith et al.,
Science 220: 1049, 1983

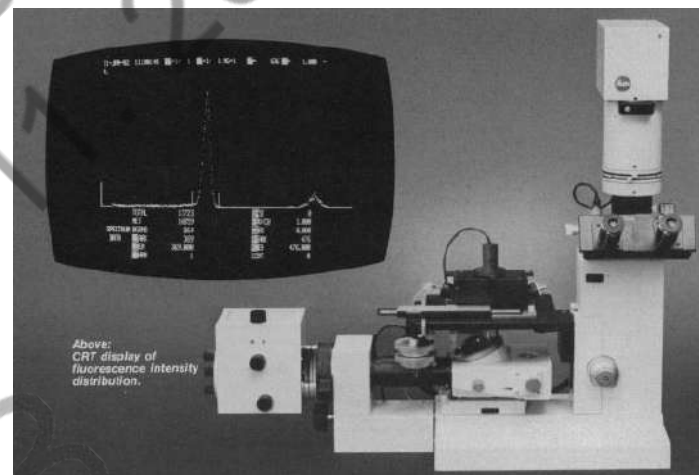
Abstract. *Mechanical chopping of plant tissues in the presence of mithramycin released intact nuclei representative of the cells within the tissues. The amount of nuclear DNA in the homogenates of monocotyledonous and dicotyledonous plants was accurately and rapidly determined by flow microfluorometry, and the distribution of nuclei involved in the cell cycle was charted for tissues selected from different physical locations or developmental stages.*



Analýza relativní intenzity
fluorescence izolovaných
buněčných jader v suspenzi

Základy cytometrie na ÚEB (1986-1989)

- Nákup rastrovacího cytometru Leitz MPV3 a průtokového cytometru Leitz MPV-Flow
- Optimalizace metody mikrospektrofotometrie DNA
- **ALE** jasná preference průtokové cytometrie - vývoj metod izolace buněčných jader (pufr LB01)



J. Plant Physiol. Vol. 133, pp. 561–566 (1988)

Alfalfa Embryogenic Cell Suspension Culture: Growth and Ploidy Level Stability

PAVLA BINAROVÁ and JAROSLAV DOLEŽEL*

Institute of Experimental Botany, Department of Plant Biotechnology, Sokolovská 6, CS-77200 Olomouc, Czechoslovakia

31 (2) : 113–120, 1989

Analysis of Nuclear DNA Content in Plant Cells by Flow Cytometry

J. DOLEŽEL*, PAVLA BINAROVÁ* and S. LUCRETTI**

* Institute of Experimental Botany, Sokolovská 6, CS-77200 Olomouc, Czechoslovakia, and

** ENEA – C. R. E. Casaccia, Roma, Italy



Etablování průtokové cytometrie

- Volba správného barviva (flexibilita Compact Flow)
- Standardizace - volba primárních standardů a jejich kalibrace
- Distribuce standardů (dodnes!)
- Terminologie velikosti genomu
- Přepočet pg DNA na bp



Zapůjčeno fy Partec r. 1993
(odvoz autobusem z Münsteru)

PHYSIOLOGIA PLANTARUM 85: 625–631. Copenhagen 1992

Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants

Jaroslav Doležel, Sergio Sgorbati and Sergio Lucretti

Annals of Botany 82 (Supplement A): 17–26, 1998
Article No. bo980730



Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison*

J. DOLEŽEL†‡, J. GREILHUBER§, S. LUCRETTI||, A. MEISTER¶, M. A. LYSÁK†**, L. NARDI||, and R. OBERMAYER§

† De Montfort University Norman Borlaug Centre for Plant Science, Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic, § Institute of Botany, University of Vienna, Vienna, Austria, || ENEA, Casaccia Research Centre, INN Department, Plant Biotechnology Division, Rome, Italy, ¶ Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany and ** Department of Botany, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

Cytometry Part A 51A:127–128 (2003)

Letter to the Editor

NUCLEAR DNA CONTENT AND GENOME SIZE OF TROUT AND HUMAN

one phosphodiester linkage involves a loss of one H₂O molecule. Further, phosphates of nucleotides in the DNA

Annals of Botany 95: 255–260, 2005

doi:10.1093/aob/mci019, available online at www.aob.oupjournals.org

The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to Describe Nuclear DNA Contents

JOHANN GREILHUBER^{1,*}, JAROSLAV DOLEŽEL², MARTIN A. LYSÁK³ and MICHAEL D. BENNETT³

¹Institute of Botany and Botanical Garden of the University of Vienna, Austria, ²Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic and ³Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK



Analýza obsahu jaderné DNA

Velmi informativní parametr a nejpoužívanější aplikace

- **Velikost genomu** je známa u méně než 3% krytosemenných
- **Změny ploidie** rostliny tolerují a endopolyploidie je velmi častá
- **Rychlé stanovování ploidie** pomocí průtokové cytometrie důležité pro:
 - Taxonomii and biosystematiku
 - Evoluční a populační biologii
 - Ekologii
 - Konzervační biologii
 - Biotechnologii
 - Šlechtění a produkci osiv



David Galbraith

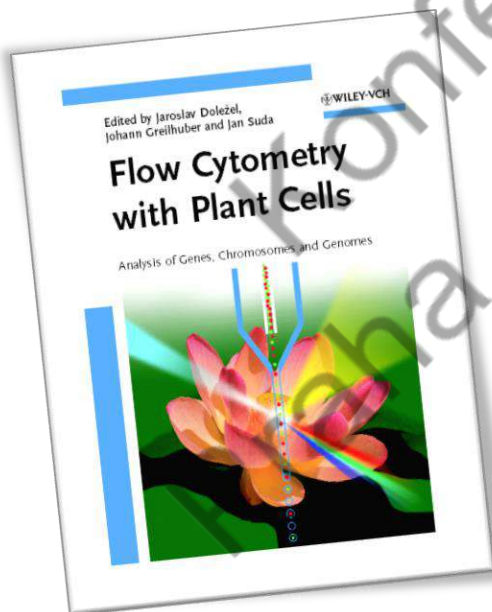


Jan Suda

Folia Geobotanica 36: 303–320, 2001

A TAXONOMIC STUDY OF THE *VACCINIUM* SECT. *OXYCOCCUS* (HILL) W.D.J. KOCH (*ERICACEAE*) IN THE CZECH REPUBLIC AND ADJACENT TERRITORIES

Jan Suda^{1,2)} & Martin A. Lysák³⁾



NATURE PROTOCOLS | VOL.2 NO.9 | 2007 | 2233

PROTOCOL

Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry

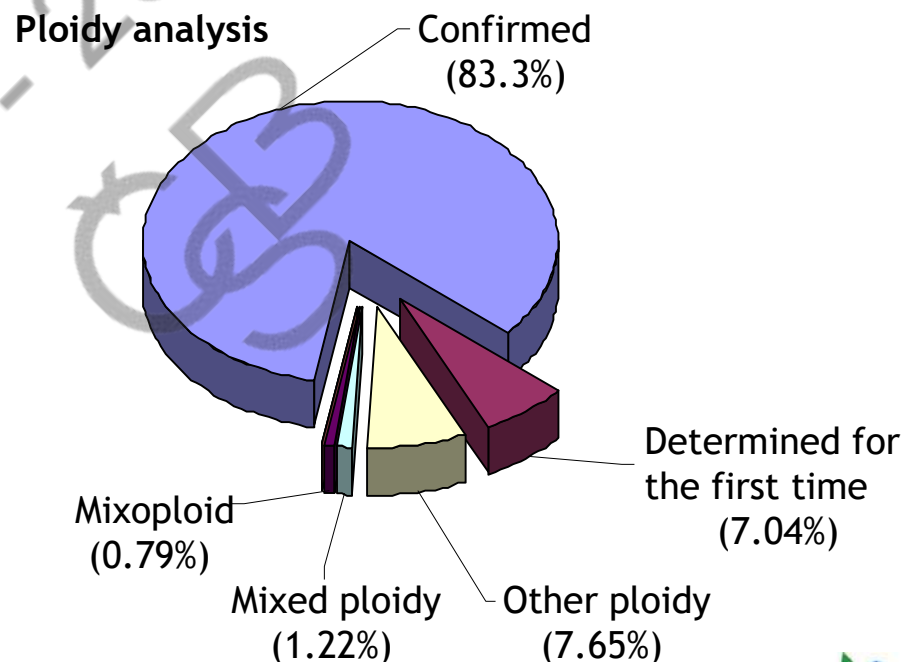
Jaroslav Doležel^{1,2)}, Johann Greilhuber³⁾ & Jan Suda^{4,5)}



Charakterizace položek v genových bankách

Klasifikace of genové banky banánovníku (*Musa spp.*)

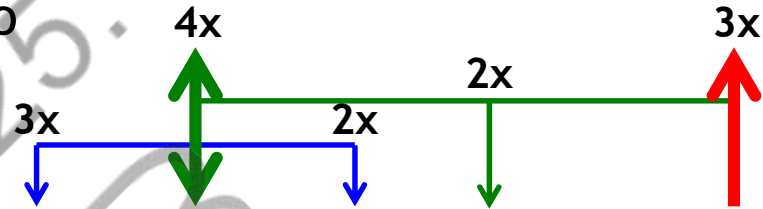
- International Transit Centre (KU Leuven, Belgium)
- Ploidie je důležitá charakteristika pěstovaných odrůd banánovníku, které jsou diploidní, triploidní, nebo tetraploidní



Šlechtění

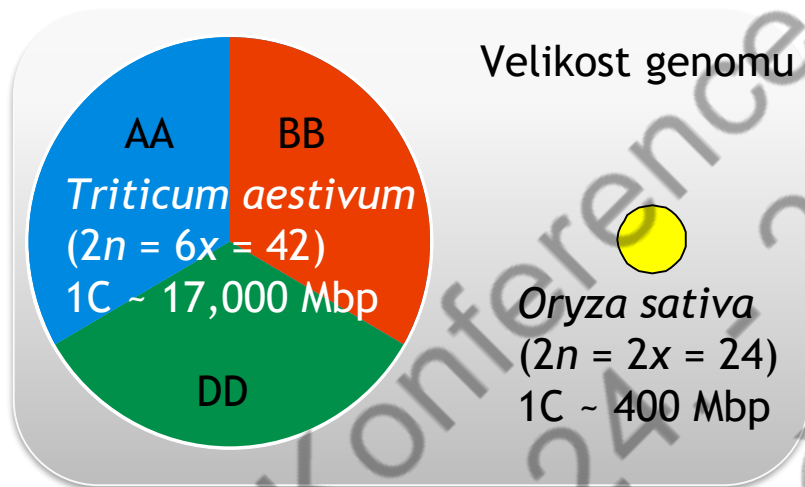
Banánovníky Východoafrické vysočiny jsou sterilní triploidní klony

- International Institute of Tropical Agriculture (Kampala, Uganda)
- Křížení současných kultivarů s fertilními plodícími diploidy
- Získání potomstva je podmíněno aberantní meiózou triploidů
- Potomstvo může mít různou ploidii (vč. aeuploidie)

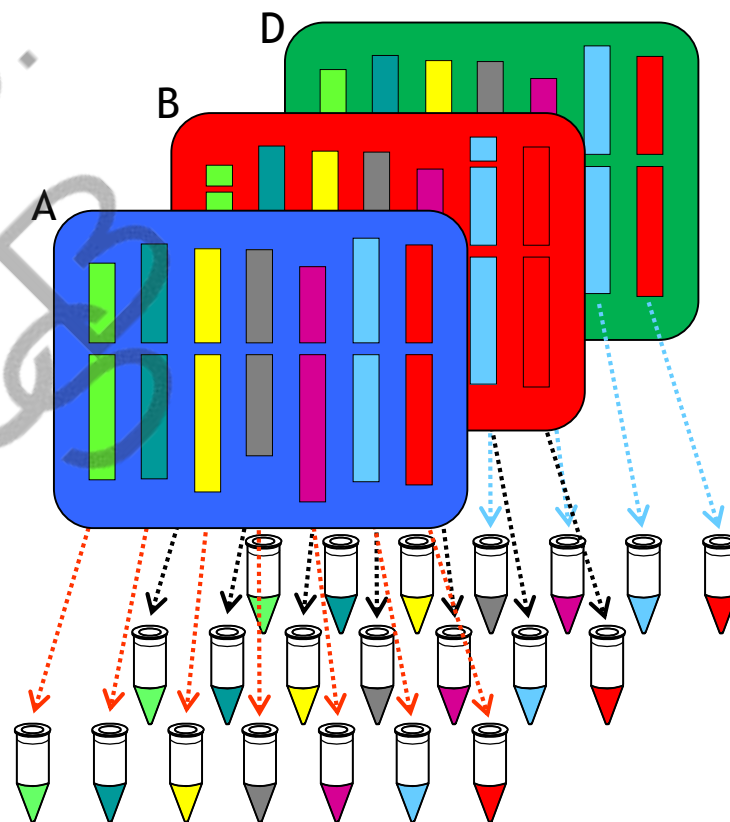


Chromozómová genomika

Aplikace metod genomiky na izolované chromozómy



Rozdělení genomu pšenice na jednotlivé chromozómy



- Chromozómy: 605 - 995 Mbp
(3.6 - 5.9% velikosti genomu)
- Ramena chromozómů: 225 - 585 Mbp
(1.3 - 3.4% velikosti genomu)



„Krájení“ genomu pšenice

- Sekvenováním izolovaných chromozómů byla získána pracovní verze genomu pšenice seté
- Byla popsána strukturní a funkční diferenciacce chromozómu 3B
- Bylo zjištěno dávné křížení mezi ancestrálními genomy rodičovských druhů pšenice
- Byla analyzována „spolupráce“ mezi rodičovskými genomy pšenice při vývoji obilky



Česká společnost pro analytickou cytometrii

- Web stránky: <http://www.csac.cz/>
- Konference Analytická cytometrie 2019
- 21.9. - 24.9. 2019, hotel Jezerka, Ústupky, Seč



vyhledávání



domů

členství

Jobs

Vzdělávání

Odkazy

kontakt

CZ

NOVINKY

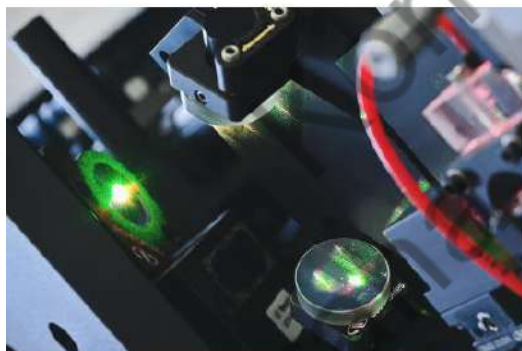
KALENDÁŘ AKCÍ

REPORTÁŽE

GRANTY

SOUTĚŽE

O SPOLEČNOSTI



Minikurz cytometrie

04. 02 - 05. 02. 2019

Praha

www.csac.cz

+ VLOŽIT DO KALENDÁŘE



Konference Analytická cytometrie 2019

21. 09 - 24. 09. 2019

Místo konání bude upřesněno

<http://www.conference.csac.cz>

+ VLOŽIT DO KALENDÁŘE



Děkuji vám za pozornost!