

Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií

Jan Suda

Průtoková cytometrie (anglicky *flow cytometry*, FCM) patří mezi moderní a perspektivní metody používané v současnosti v základním i aplikovaném výzkumu mnoha biologických oborů. Celkový rozsah jejich aplikací je značně široký a pokrývá například stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, analýzu buněčného cyklu, studium genové exprese, počítání a určení typu krevních buněk, detekci a charakterizaci mikroorganismů, třídění požadovaných částic, atd. Zde se proto omezíme pouze na malou ukázkou možností a budeme sledovat přínos FCM pro taxonomické studie cévnatých rostlin.

Princip průtokové cytometrie

Název průtoková cytometrie dobře odráží dvě základní charakteristiky metody: veškerá měření se uskutečňují v pohybu a zaznamenávají jsou vybrané optické vlastnosti jednotlivých částic (např. buněk), z nichž nejčastější bývá intenzita fluorescence. Teoretický základ cytometrických analýz je poměrně jednoduchý. Před vlastním měřením se na dvoušroubovici DNA studovaného objektu naváže fluorescenční barvivo (fluorochrom). Je nutné, aby se zvolená látka vážala specificky (nebarvila i jiné orgány) a kvantitativně (množství navázaného fluorochromu bylo přímo úměrné množství DNA). Ozáříme-li fluorescenční barvivo světlem vhodné vlnové délky, dojde k jeho excitaci, neboli k přechodu elektronů na vyšší energetickou hladinu. Excitovaný stav je však nestabilní a elektrony se vzápětí vrací zpět do původního, základního stavu. Tento přechod bývá doprovázen uvolněním tepelné a světelné (= fluorescence) energie. Protože část energie se ztrácí ve formě tepla, má vyzářené světlo jinou (delší) vlnovou délku než původní excitační záření. Vhodně zvolenou kombinací filtrů lze pak obě záření oddělit a fluorescenci pomocí průtokového cytometru měřit.

Mezi základní součásti každého cytometru patří průtoková komůrka, zdroj excitačního světla, optická soustava, soubor fotonásobičů a zesilovačů a část počítačová.

Jádro přístroje tvoří průtoková komůrka, jejímž úkolem je vyrovnat a seřadit analyzované částice tak, aby se pohybovaly jedna za druhou v úzkém středovém svazku. Elegantní způsob, jak tento požadavek splnit, představuje tzv. hydrodynamická fokusace: suspenze částic je přiváděna tenkou kapilárou do komůrky o relativně velkém průměru, kterou proudí unášecí kapalina (nejčastěji destilovaná voda nebo slabý roztok solí). Unášecí tekutina bývá do komůrky přiváděna pod větším tlakem než vlastní suspenze částic, které jsou tak udržovány jen v úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při výstupu vodního paprsku z komůrky nutí částice pohybovat se uspořádaně jedna za druhou a jejich proud prochází značnou rychlostí (několik metrů za sekundu) ohniskem zdroje excitačního záření.

V průtokové cytometrii nachází využití dva zdroje excitačního světla: lasery a vysokotlaké rtuťové výbojky, přičemž přístroj může být vybaven oběma z nich. K přednostem laserů patří vysoký výkon a monochromaticnost vyzářovaného světla, díky čemuž není nutné používat regulační optické filtry. Hlavní nevýhodou představuje jejich vysoká pořizovací cena. Rtuťové výbojky bývají výrazně levnější, jednodušší na obsluhu a poskytují záření v poměrně širokém rozsahu vlnových délek. Trpí však relativně krátkou životností a při jejich používání je nutné nastavit správnou vlnovou délku a intenzitu excitačního světla pomocí regulačních optických prvků.

Fluorescence částic vyzářená po jejich projití světelným paprskem je sbírána optickou

soustavou (sada filtrů a zrcadel) a převáděna na pulsy elektrického proudu pomocí fotonásobičů. Po zesílení signálu a dalším zpracování dochází k jeho digitalizaci a následnému uchování v počítači ve formě histogramu zobrazujícího relativní intenzitu fluorescence jednotlivých izolovaných částic.

Během života buňky dochází k cyklickým změnám obsahu její DNA, což se pochopitelně odrazí ve výstupech cytometrických analýz. Období mezi dvěma buněčnými děleními lze rozčlenit do třech základních fází: 1) perioda růstu (tzv. G1 fáze), kdy buňka obsahuje základní množství DNA označované jako 2C (hodnota C určuje obsah DNA haploidní chromozómové sádky); 2) období, kdy dochází k duplikaci genetické informace (tzv. S fáze), na jehož konci mají buňky dvounásobné (tedy 4C) množství DNA; 3) další perioda růstu, kdy je hladina DNA udržována na dvounásobné hodnotě (tzv. G2 fáze). Následuje mitóza, při níž z mateřské buňky vznikají dvě buňky dceřinné a obsah DNA každé z nich se vrací na výchozí (2C) úroveň. Typický histogram tedy bude obsahovat nápadný pík (=vrchol Gaussovy křivky) odpovídající buňkám v G1 fázi a ve dvounásobné vzdálenosti pak zpravidla výrazně nižší pík, jež odráží fluorescenci buněk v G2 fázi. Stále je třeba mít na paměti, že x-ová osa popisující intenzitu fluorescence je relativní, a polohu píku lze měnit nastavením přístroje. Mezi vrcholy G1 a G2 se nacházejí buňky v různých fázích syntézy genetického materiálu. Kromě popsanych signálů lze v oblasti nízké fluorescence (poblíž levého okraje grafu) zaznamenat ještě nespecifické signály (šum, pozadí) odpovídající porušeným částicím nebo drobným partikulám vykazujícím autofluorescenci (např. molekuly chlorofylu).

Jedním z klíčových parametrů cytometrických analýz bývá jejich přesnost. V ideálním případě by fluorescence všech jader ve stejné růstové fázi byla zcela shodná. Ve skutečnosti však dochází k určitému rozptylu hodnot z důvodu rozdílné barvitelnosti částic, ne zcela identických podmínek či přístrojové chyby a tuto variabilitu nejčastěji popisuje tzv. variační koeficient (CV) vypočítaný jako podíl směrodatné odchylky a průměrné pozice píku. Obvykle se pohybuje v rozmezí 1 – 10 procent, nicméně pro kritické analýzy je třeba držet se na dolní hranici uvedeného rozpětí (maximálně 3 %). Daný koeficient totiž vypovídá o rozlišovací schopnosti konkrétního měření a platí, že za předpokladu stejné velikosti píků lze odlišit takové objekty, jejichž rozdíl v obsahu DNA odpovídá dvounásobku CV. Samozřejmě je vždy nutno přihlížet ke konkrétnímu studovanému materiálu a použitému fluorescenčnímu barvivu. U druhů s vysokým obsahem sekundárních metabolitů mohou být akceptovatelné analýzy s koeficientem kolem 5 % a určitou toleranci je třeba zachovávat také u taxonů s velmi malým množstvím DNA (např. hranice přesnosti u známého huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) leží někde kolem 7 %). Nejlepší měření prezentovaná v literatuře dosahovaly CV slabě přes 0,5 %, hodnoty pohybující se okolo 1 % již v současnosti nebývají při pečlivé přípravě vzorků a správném seřízení přístroje nijak ojedinělé.

Pro správnou funkci cytometru je nutné v pravidelných intervalech provádět optimalizaci jeho nastavení vedoucí k co nejnižšímu CV a potlačení nespecifických signálů pozadí. Důležitá je i kontrola linearit měření, tj. zajištění, aby částice s dvounásobným obsahem DNA oproti standardu skutečně ležela na lineární ose ve dvounásobné vzdálenosti. K těmto účelům slouží kalibrační částice, jejichž fluorescence vykazuje velmi nízké hodnoty rozptylu a navíc mají tendenci k tvoření shluků (dvojic, trojic, atd.). Mezi nejoblíbenější patří fixované obarvené pstruží nebo kuřecí erythrocyty, fluorescenčně značené mikrokuličky, v některých případech i lidské leukocyty.

Jak již bylo naznačeno, kvalitu analýz ovlivňuje i zvolené fluorescenční barvivo. Fluorochromy používané v cytometrické praxi lze rozdělit do třech základních skupin podle způsobu, jakým se vážou k nukleové kyselině. První z nich tvoří látky neselektivně se vmezeřující do dvoušroubovice DNA (jejich vazba tedy není ovlivněna konkrétním sledem bází), což dovoluje stanovit celkové množství nukleové kyseliny. Do této kategorie patří

zejména propidium jodid a ethidium bromid, které jsou excitovány v modro-zelené oblasti spektra a emitují červené záření. První doznal většího rozšíření, neboť produkuje histogramy s trochu nižšími koeficienty variance a bývá méně toxický. Protože se obě barviva vážou také k dvouřetězcové RNA, je třeba k analyzovaným vzorkům přidávat ještě dostatečné množství ribonukleázy. Druhá skupina zahrnuje barviva, jež se přednostně vážou k oblastem DNA bohatým na A-T báze (DAPI, DIPI, Hoechst). Největší popularity se dočkal 4',6-diamidino-2-fenylindol běžně známý pod zkratkou DAPI (excitován bývá v UV oblasti, emituje modré světlo). Histogramy získané pomocí tohoto fluorochromu se obecně vyznačují velmi vysokou rozlišovací schopností a umožňují tak detekovat částice lišící se jen nepatrně v množství či složení DNA. Určitou limitaci - vzhledem ke způsobu vazby – však představuje nemožnost jeho použití pro studie zabývající se zjišťováním absolutního množství DNA. Poslední typ fluorescenčních barviv (např. antibiotika mitramycin, chromomycin a olivomycin) se vyznačují preferencí vazby k úsekům bohatým na G-C báze. V taxonomických studiích však nedosáhly takového rozšíření jako předchozí dvě skupiny, neboť vyžadují jinou kombinaci filtrů a navíc jejich rozlišení nedosahuje kvality A-T specifických fluorochromů.

Původně byla průtoková cytometrie vyvinuta pro rychlé počítání a analýzu krevních buněk. Na konci 70. let 20. století zaujala pevné místo v lékařských oborech a dodnes zde funguje největší počet přístrojů. Postupně však docházelo k pronikání cytometrie i do dalších oblastí biologie a od počátku 80. let je stále častěji využívána ke studiu rostlin (zcela první studie pracující s rostlinným materiálem se objevila již v roce 1973). Důvod opožděného rutinního zapojení FCM v biologii rostlin oproti analýzám živočišných či lidských buněk spočívá v nutnosti získat suspenzi izolovaných částic (buňky, protoplasty, jádra). U živočichů tuto podmínku dobře splňují krevní buňky, naprostá většina rostlinných buněk je však vázána do pevných pletiv. Nezbytné proto bylo najít postup, který by umožnil jejich převedení do formy použitelné pro průtokovou cytometrii. Jednu z možností představuje rozpuštění buněčných stěn působením enzymů, čímž bylo skutečně docíleno souboru protoplastů. Jak se však ukázalo, rostlinné buňky obsahují četné zásobní částice (např. škrob) a nezřídka i velmi vysoký obsah přírodních fluorochromů (např. chlorofylu), které negativně ovlivňují kvalitu analýz; problémy působí i přítomnost cytoplazmatické DNA. Navíc, prostupnost fluorescenčních barviv přes plazmatickou membránu je velice nízká a nezbytným krokem při studiu protoplastů bývá fixace odstraňující toto omezení. Pozornost se tedy soustředila na rostlinná jádra, která lze získat např. osmotickým lyzováním protoplastů. Pravý zlom však nastal v roce 1983, kdy byla poprvé představena rychlá metoda mechanické izolace jader v hypotonickém roztoku, která dodnes zůstává jednoznačně nejpoužívanějším postupem.

Pro správné stanovení ploidie studovaného druhu či odhad jeho absolutního množství DNA je nezbytné používat standardy (= materiál se známým počtem chromozómů nebo určenou velikostí genomu). Na základě poměru intenzity fluorescence zkoumaného materiálu a standardu tak můžeme usuzovat na vlastnosti neznámého objektu. Ve starších studiích se nezřídka objevovala tzv. externí standardizace, kdy analyzovaný vzorek i standard byly připraveny a měřeny nezávisle a poté docházelo k porovnání intenzity jejich fluorescence. Uvedený postup však může lehce být zdrojem chyb kvůli přístrojové odchylce mezi oběma analýzami nebo rozdílu v barvitelnosti vzorku a standardu. Z tohoto důvodů se v současnosti výhradně doporučuje používání tzv. interního standardizace; analyzovaný materiál je v odpovídajícím poměru smíchán se standardem a oba vzorky bývají homogenizovány, barveny a měřeny současně. Přesnost měření ovlivňuje také poměr mezi fluorescencí standardu a vzorku - pokud tento rozdíl bývá příliš velký, spolehlivost výsledků se snižuje. Vzhledem k tomu, že velikost jaderného genomu dosahuje u cévnatých rostlin více než tisícínásobného rozpětí, je nasnadě, že výběr většího počtu různých standardů se stává nezbytností.

Přednosti FCM

Hlavní přednosti průtokové cytometrie zahrnují jednoduchou přípravu vzorků, velkou rychlost analýz, nedestruktivnost, možnost analyzovat širokou škálu pletiv, nezávislost na dělicích se buňkách, snadnou detekci subpopulací částic a v neposlední řadě i nízké finanční náklady analýz.

Příprava suspenze jader pro měření průtokovým cytometrem je v současnosti otázkou několika málo minut. Nejjednodušší postup vypadá zhruba následovně: ze studované rostliny se oddělí část čerstvého neporušeného pletiva o velikosti zhruba $0,5 - 1 \text{ cm}^2$, ta se vloží do Petriho misky obsahující vychlazený hypotonický izolační roztok obohacený fluorescenčním barvivem a pomocí ostré žiletky nebo skalpelu je pečlivě rozsekána. Složení izolačního roztoku sleduje dva základní požadavky, jimiž jsou omezují činnost nukleáz a zajištění ochrany a neporušenosti jader. Po určité době potřebné k dokonalému obarvení jaderné DNA stačí vzniklou suspenzi přefiltrovat, čímž dojde k odstranění zbytků pletiv a roztok izolovaných jader je připraven k měření. Existuje samozřejmě celá řada modifikací popsaného základního postupu; mezi hlavní patří dvoukroková příprava vzorků, kdy fluorochrom bývá přidáván až k izolovaným jádrům, nebo zahrnutí centrifugace, čímž dojde k „pročištění“ suspenze díky snížení počtu poškozených jader a zbytků buněčných organel.

Vlastní cytometrické měření fluorescence probíhá za velkých rychlostí a analyzovat lze i několik stovek jader za jedinou sekundu. Během okamžiku tak snadno a pohodlně získáme informaci o množství DNA, stupni ploidie nebo dalších charakteristikách zkoumaného jedince. Rychlost vynikne zejména při srovnání s jinými postupy: cytometrická analýza 10 000 jader netrvá obvykle déle než tři a půl minuty, získání podobných dat by však při klasickém počítání chromozómů zabralo dobrých 50 dnů nepřetržité práce. Díky nastíněnému „bleskovému“ hodnocení je možné v průběhu jediného dne studovat desítky až stovky vzorků. Zpracování rozsáhlých populačních sběrů, jež by před zavedením cytometrie mohlo znít dosti utopicky, se tak v současné době stává běžnou součástí biosystematických prací.

Vzhledem k potřebě nepatrného množství pletiva je průtoková cytometrie velmi ohleduplná ke studovaným objektům a tentýž jedinec může být analyzován i opakovaně bez nebezpečí, že tím bude odsouzen k zániku. Tato skutečnost otevírá možnost studia rostlin v časných fázích ontogenetického vývoje nebo podrobná sledování vzácných, ohrožených a mizejících taxonů. Realitou se tak stává například určení stupně ploidie u všech jedinců z ustupující populace, aniž bychom byli poslední, kdo daný druh na lokalitě uvidí živý.

Jádra bývají ve valné většině případů získávána z listových pletiv, přičemž nejlepší výsledky poskytují listy mladé, které obsahují jen nízkou hladinu sekundárních metabolitů. Pozor je však třeba dávat na velmi mladá pletiva, která nezřídka vykazují vysokou mitotickou aktivitu a značný podíl jader tak bývá v G2 nebo S fázi, čímž vzrůstá riziko případné chybné interpretace výsledků. Nicméně pro průtokovou cytometrii lze využít prakticky všech rostlinných orgánů – od kořenů přes lodyhy, kališní a korunní listky až po semena a snad jen dužnaté plody nedovolují získat uspokojivé histogramy. K nesporným výhodám cytometrie jistě patří i skutečnost, že metoda dovoluje pracovat s mitoticky neaktivními buňkami, které v diferencovaných pletivech jasně převažují. Uvedenou přednost nepochybně ocení každý, kdo někdy určoval počet chromozómů klasickými karyologickými postupy a ve svých preparátech marně hledal metafázová jádra, jež jako jediná počítání chromozómů dovolují.

Vzhledem k tomu, že intenzita fluorescence každé jednotlivé částice bývá snímána samostatně, lze lehce odhalit směsné vzorky, endoreduplikaci (zmnožení obsahu DNA dosti často se vyskytující v zásobních orgánech) nebo mixoploidii (přítomnost buněk dvou nebo více ploidních úrovní). Pro studium uvedených jevů představuje FCM v současnosti

jednoznačně tu nejlepší a nejspolehlivější volbu. Citlivost detekovat minoritní cytotypy je obecně značná a při rutinním ověřování ploidie tak lze bez problémů analyzovat 5 – 10 jedinců současně.

Mezi nesporné přednosti cytometrie patří i nízká finanční nákladnost analýz, která se pohybuje v rozmezí několika málo desítek korun za vzorek. I s relativně omezeným rozpočtem lze tedy získat velmi cenné a často překvapující výsledky. Bohužel cena vlastního přístroje již tolik povzbudivá není a zůstává asi hlavní překážkou většího rozšíření cytometrie. Náklady na pořízení nejjednoduššího typu vybaveného rtuťovou výbojkou přesahují milión korun, při pořizování cytometru s laserem je třeba počítat s rozpočtem ještě o dobrou polovinu vyšším.

Omezení

Žádná metoda není úplně dokonalá a také průtoková cytometrie má své slabé stránky. Asi největší omezení představuje nutnost pracovat ve valné většině případů s čerstvým, živým materiálem. Často již pouhé vadnutí rostlin mívá za následek zhoršení kvality výsledných histogramů. Tato skutečnost do značné míry snižuje využití FCM v terénní botanické praxi, neboť analýzy musí být provedeny v krátké době po odběru rostlinného materiálu a většinou tedy nezbývá nic jiného, nežli podstupovat pravidelné přesuny mezi zájmovou oblastí a laboratoří. Bohužel ne vždy lze přepravu rostlin v krátké době uskutečnit a tak například analýzy vzorků z odlehlých oblastí tropů zůstávají dosti tvrdým oříškem. U většiny druhů se doba možného skladování sběrů (nejlépe v chladu) pohybuje jen po několik málo dnů, u těch nejodolnějších rostlin s tuhými listy se může prodloužit až zhruba na jeden měsíc. Občas se používají různé fixační roztoky (nejčastěji formaldehyd), které by měly překonat nastíněný problém, bohužel znalosti v této oblasti jsou zatím dosti sporé. Nicméně, ukazuje se, že u některých skupin rostlin lze materiál pro cytometrické analýzy uchovat pouhým vysušením a nabízí se tak možnost studovat recentní herbářové položky. Tento postup byl dosud úspěšně použit pro vybrané zástupce čeledi vřesovcovitých (*Ericaceae*), lipnicovitých (*Poaceae*) a šáchorovitých (*Cyperaceae*), přičemž věk nejstarších hodnocených sběrů přesahoval šest let.

Klasické počítání chromozómů v roztlakových preparátech vítězí nad cytometrií v citlivosti detekovat aneuploidní jedince, akcesorické (=B) chromozómy a v možnosti sledovat přítomnost satelitů či nápadných (=marker) chromozómů. Schopnost odlišit jeden přebývajícím nebo naopak jeden chybějícím chromozóm pomocí cytometrie většinou končí u druhů se somatickým počtem asi $2n = 30$. U vyšších počtů je již podíl hmoty připadající na jeden chromozóm v porovnání s celkovým obsahem DNA zanedbatelný, proto se ani případný rozdíl fluorescence neprojeví dostatečně na výsledném histogramu.

Některé rostlinné skupiny obsahují sekundární metabolity, které negativně ovlivňují vazbu fluorescenčního barviva na dvoušroubovici DNA. Touto vlastností bývají proslulé především taniny, které dokáží značně znepríjemnit studium např. kakovitých (*Geraniaceae*), růžovitých (*Rosaceae*), četných jehličnanů, některých kaprad'orostů, atd. Podobně organické kyseliny přítomné v pletivech tučnolistých (*Crassulaceae*) či dalších rostlin s CAM metabolismem silně snižují pH vzniklé jaderné suspenze, což se také nepříznivě odrazí v kvalitě histogramů. K obtížně hodnotitelným typům je nutno připočítat i druhy vykazující vysoký obsah slizovitých látek v listech. U nich se problémy projeví hned v počátečních fázích přípravy vzorků (při jejich sekání a filtraci), kdy vzniká velice viskózní směs věznicí jádra, která jen obtížně procházejí póry filtru a navíc vykazují silný sklon k tvoření vzájemných shluků. Zatím ne zcela jasné povahy jsou obtíže pozorované při studiu zástupců čeledi brutnákovitých (*Boraginaceae*).

Nicméně, celkově lze konstatovat, že prakticky žádný z výše uvedených problémů není nepřekonatelný a různé modifikace postupů dovolí ve většině případů pokořit vzdorující materiál. Řešením může být přidání různých chemických látek vázajících sekundární metabolity do izolačního roztoku, použití kořenů, lodyh, semen nebo korunních lístků místo obvyklých listů, zaměření se na mladé klíčící rostlinky nebo analýzy etiolovaného materiálu získaného dlouhodobějším zastíněním zkoumaných jedinců.

Využití

Bezpochyby nejčastější aplikací průtokové cytometrie v taxonomických studiích bývá stanovení ploidního stupně analyzovaného materiálu. Polyploidní typy narozdíl od svých diploidních příbuzných, jež v buňkách nesou dvě kopie každého chromozómu, mají chromozómovou sádku zmnoženou a obsahují tři až zhruba 80 (!) kopií téhož chromozómu. Polyploidizace je mezi cévnatými rostlinami velmi častým jevem a odhady hovoří, že 60 – 80 % druhů vzniklo tímto způsobem. V současné době se díky molekulárním technikám dokonce ukazuje, že mnohé taxony považované za diploidní náleží ve skutečnosti mezi „degenerované“ polyploidy, u nichž došlo k deaktivaci části genetického materiálu.

Pouhá znalost ploidie nezřídka bývá tou nejspolehlivější informací pomáhající objasnit situaci v mnoha taxonomicky komplikovaných skupinách. Existuje totiž početný soubor rostlin, jejichž jednotlivé druhy se pouze nepatrně odlišují v morfologických znacích, jsou však zřetelně diferencovány ploidním stupněm. Z naší květeny lze jmenovat například skupinu rozrazilu břechťanolistého (*Veronica hederifolia* agg.) se třemi druhy, svízele bílého (*Galium album* agg.) se 2 druhy, šichy černé (*Empetrum nigrum* agg.) se shodným počtem taxonů, z kaprad'orostů pak skupinu kapradě samce (*Dryopteris filix-mas* agg.) nebo osladiče obecného (*Polypodium vulgare* agg.). Průtoková cytometrie u nich během velmi krátké doby dovoluje určit ploidii a tím i druhovou příslušnost. Jednoznačné určení kříženců v takových skupinách leží zcela mimo možnosti klasické morfologické systematiky a znalost ploidie (či počtu chromozómů) se stává nezbytnou podmínkou při podezření na hybridizaci. Právě díky průtokové cytometrii byli poprvé odhaleni hybridogenní jedinci v rodech klikva (*Oxycoccus*), šicha (*Empetrum*) nebo pitulník (*Galeobdolon*). Až dosud byly představeny rostliny, u nichž každý taxon je charakterizován jedinou ploidní úrovní. Existují však i druhy vytvářejí populace s několika rozdílnými ploidii. Mezi takové „víceploidní“ taxony patří například hvězdnice chlumní (*Aster amellus*), bedrník obecný (*Pimpinella saxifraga*) či některé zvonky (*Campanula*) a hvozdíky (*Dianthus*). Podařilo se dokonce objevit populace smíšené, které obsahují dva nebo více různých cytotypů zároveň. V současné době se ukazuje, že popsáný jev je nepochybně častější, než se předpokládalo a kvůli omezenému množství karyologicky ověřených jedinců tak dosud unikal pozornosti. Přesto však procesy, které v takových populacích probíhají, prostorové uspořádání, četnost jednotlivých cytotypů a jejich případné změny v čase bohužel stále zůstávají z valné části utajeny. V hledání odpovědi na tyto nesmírně atraktivní otázky leží obrovský potenciál cytometrie a lze předpokládat, že metoda přinese mnohé neočekávané a překvapivé závěry. Velmi slibným odvětvím je i detekce vzácných cytotypů, které pak slouží jako výchozí materiál pro další morfologické, populační či biochemické studie. Například existence triploidních jedinců je stále považována za velmi neobvyklý a vzácně se vyskytující fenomén. Nicméně odhalení tohoto cytotypu v rodech kyprej (*Lythrum*), hvězdnice (*Aster*), chlupáček (*Pilosella*) či brusnice (*Vaccinium*) představuje dobrou výchozí pozici pro studium role této ploidní úrovně v (mikro)evoluci dané skupiny. Neocenitelnou pomoc poskytuje průtoková cytometrie při experimentální hybridizaci či polyploidizaci, jejichž cílem je výběr vhodných cytotypů. Hlavním omezujícím faktorem takových činností bývají limitované prostorové možnosti pro pěstování velkého množství

potomstva. Díky cytometrii lze však již velmi záhy po vyšetí stanovit ploidiu semenáčků, jedince požadovaných vlastností vybrat a dále kultivovat a zbytek jednoduše odstranit. Je nasnadě, že finanční náročnost nastíněného pěstebního postupu tak bude výrazně snížena.

Cytometricky však lze detekovat i mnohem jemnější rozdíly v množství DNA nežli je obsah celé chromozómové sádky. Takovou možnost představuje například screening aneuploidních jedinců, kteří vykazují přebývání či ztrátu jednoho nebo několika chromozómů. Cytometrické analýzy slouží jako první indicie možné aneuploidie (daní jedinci vykazují určitý posun v pozici píku oproti standardu), nezbytné je však její ověření pomocí klasických karyologických metod. Přesnost metody je v optimálních podmínkách vysoká a u některých dvoudomých rostlin (např. knotovky nebo šťovíky) lze například odlišit samčí a samičí jedince díky existenci pohlavních chromozómů rozdílné velikosti. Různý počet chromozómů může někdy sloužit jako spolehlivé kritérium pro druhovou determinaci. Například jednotlivé taxony z velice komplikovaného rodu hvězdoš (*Callitriche*) se vyznačují svými jedinečnými chromozómovými počty, což při jejich obrovské morfologické variabilitě představuje asi ten nejlepší záchytný bod pro správné určení.

Při stanovení ploidiu se zpravidla pracuje s relativními obsahy jaderné DNA. Množství DNA lze však vyjádřit i absolutně, a to buď jako počet párů bází (resp. megapárů bází) nebo jako hmotnost v pikogramech. V takových případech se jako interní standard volí druh nebo kultivar se známou velikostí genomu, často to bývají komerčně pěstované plodiny (ředkvička, rajče, sója, kukuřice nebo hrách). Obecně se cévnaté rostliny vyznačují značnou variabilitou obsahu DNA, jež se pohybuje přibližně mezi 0,1 pg (některé brukvovité) a 125 pg (řebčíky z čeledi liliovitých). Informace o velikosti jaderného genomu nacházejí uplatnění v molekulární praxi (výběr vhodných taxonů s malými genomy pro sekvenování, nutnost modifikace vybraných postupů pro druhy s velkými genomy) či při studiu fylogenetického postavení jednotlivých skupin (od úrovně rodu, čeledi až po řády). U mnoha rostlin se podařilo prokázat vztah mezi množstvím jaderné DNA a ekologickými (např. odolnost k mrazu, rychlost ontogeneze, pravděpodobnost invazního chování) či fenologickými charakteristikami (např. nástup kvetení) a tuto znalost lze pak zpětně využít při odhadu vlastností příbuzných druhů. Jsou popsány i případy, kdy na základě rozdílného obsahu DNA byly objeveny nové, dosud přehlížené druhy (např. u ladoněk nebo vikví), a teprve dodatečně u nichž byly ověřeny též rozdíly v morfologii nebo ekologii. Navíc u rostlin, které se dostatečně liší velikostí genomu (cca 5-10 %), cytometrie dokonce dovoluje rozpoznat hybridní jedince i za předpokladu, že mateřské druhy mají shodný počet chromozómů. Značně perspektivní oblastí se jeví analýza složení genomu allopolyploidních taxonů, které kombinují genomy dvou (či více) rodičovských typů. Daný postup nalézá uplatnění například v hybridogenní skupině chlupáčků (*Pilosella*), kde genom jednoho ze základních druhů (*P. officinarum*) vykazuje průkazně menší velikost oproti jiným druhům téže ploidiu a tato skutečnost se pak odráží i v obsahu DNA hybridně vzniklých polyploidních potomků.

Zcela jedinečnou aplikaci průtokové cytometrie představuje stanovení reprodukčního způsobu na základě určení ploidiu embrya a endospermu u zralých semen. Je známo, že kromě klasického pohlavního rozmnožování může potomstvo rostlin vznikat samovolně bez účasti otcovské rostliny (apomixie), svoji roli mohou hrát také neredukovaná vajíčka či pylová zrna. Celkově lze tedy zaznamenat čtyři různé ploidiu stupně u embrya a pět u endospermu a jejich porovnáním pak jednoznačně určit, jaký způsob se na vzniku semen podílel. U diploidních pohlavně se rozmnožujících krytosemenných rostlin bude například embryo diploidní a endosperm triploidní (díky dvojitému oplození), naproti tomu určité apomiktické typy se rozpoznají podle diploidního embrya a tetraploidního endospermu. Dosud se způsob reprodukce zjišťoval buď sledováním vývoje vajíček na tenkých mikroskopických řezech nebo v některých případech nepřímo pomocí genetické (např.

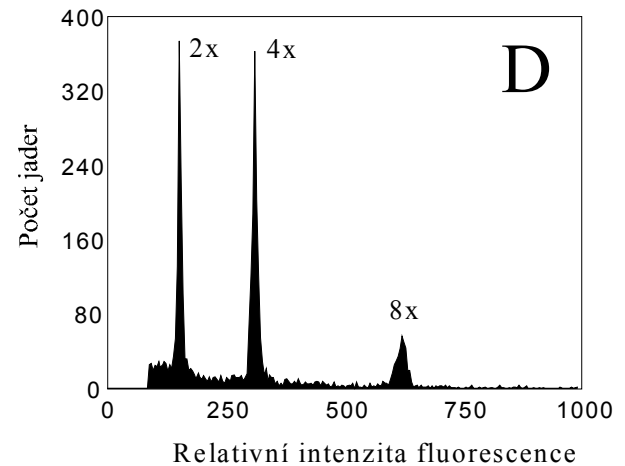
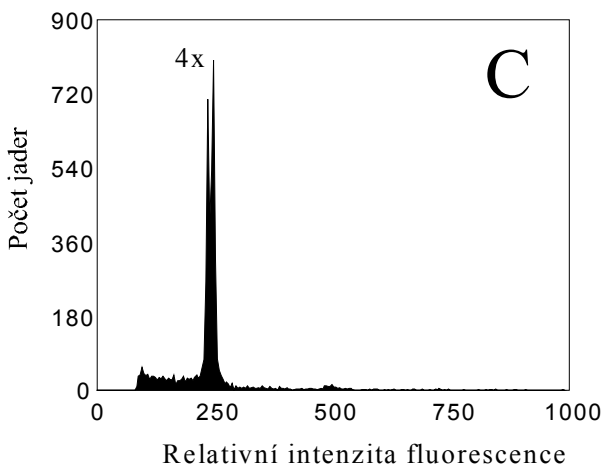
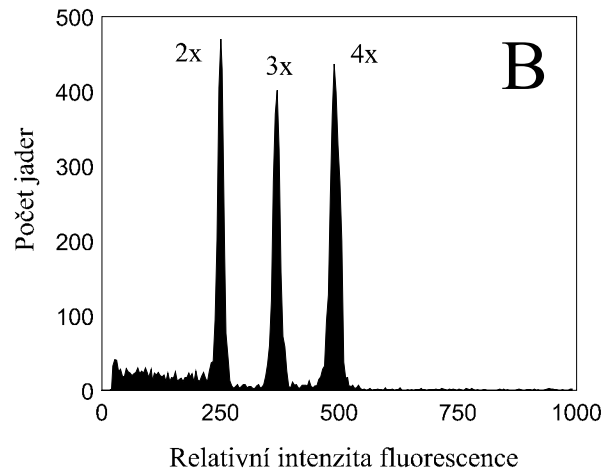
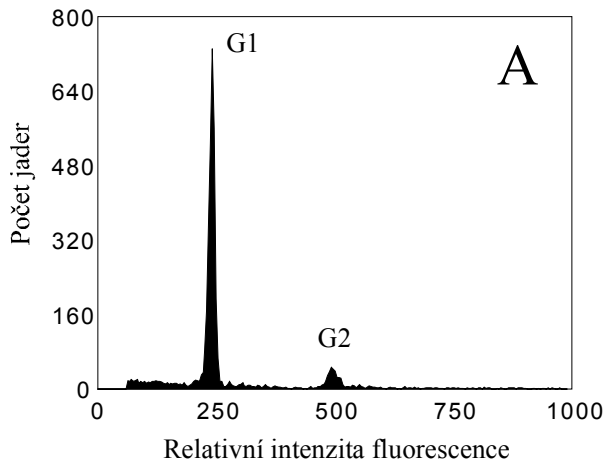
izozymové) variability. Žádná z těchto metod však nemůže s cytometrickým určováním soupeřit po stránce časové ani finanční.

Nastíněné příklady jasně ukazují, že průtoková cytometrie nabízí jedinečný způsob, jak elegantně nahlédnout do „soukromí“ rostlin a poodhalit tak roušku jejich tajemství. Prakticky s jistotou můžeme předpokládat, že zapojení metody při řešení taxonomických otázek bude do budoucna nadále stoupat a četné pozoruhodné objevy a překvapení na sebe nenechají dlouho čekat.

Dia:

1+2) Trpaslík a obr – nikoliv vzrůstem, ale množstvím jaderné DNA. Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) patří mezi kvetoucí rostliny s nejmenším genomem. Zcela na opačném konci spektra stojí řebčíky – na snímku *Fritillaria hispanica*.

3) Průtoková cytometrie otevírá možnost pro detailní studie karyologické variability i u kriticky ohrožených druhů, k nimž se řadí například prstnatec plamatý (*Dactylophiza maculata*).



Obrázek: Ukázky výsledných histogramů z průtokového cytometru: A) Analýza mladého listového pletiva tomky vonné (*Anthoxanthum odoratum*) – velký pík odpovídá jádrům se základním množstvím jaderné DNA (G1 fáze cyklu), ve dvounásobné vzdálenosti se nachází jádra s duplikovaným množstvím genetického materiálu (G2 fáze), mezi nimi leží jádra syntetizující DNA (S fáze) a signály v levé části označují nespecifickou fluorescenci („šum“ daný existencí poškozených organel, autofluorescencí, apod.); B) Společná analýza triploidního křížence šichy (*Empetrum*) s diploidním a tetraploidním rodičem; C) Odhalení drobného rozdílu (aneuploidie ?) ve velikosti genomu u tetraploidního pitulníku horského (*Galeobdolon montanum*) – levý vrchol odpovídá standardu, těsně ležící pravý pík pak odlišné rostlině. Podobné analýzy leží na samé hranici rozlišení cytometru.; D) Prokázání endopolyploidizace v listech štovíku madeirského (*Rumex maderensis*) – patrná jsou jádra se základním (2x), dvounásobným (4x) a čtyřnásobným (8x) obsahem DNA.