



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Analýza Plantain banánovníků pomocí
průtokové cytometrie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

..

Autor:	Ludvík Urda
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ludvík Urda
Název práce	Analýza 'Plantain' banánovníků pomocí průtokové cytometrie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.
Vedoucí práce	Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Klíčová slova	plantain, banánovník, ploidie, průtoková cytometrie
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Ludvík Urda
Title of thesis	Analysis of 'Plantain' bananas using flow cytometry
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.
The year of presentation	2016

Keywords	plantain, bananas, ploidy, flow cytometry
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury a s pomocí mé vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Evy Hřibové, Ph.D. a Mgr. Jany Čížkové, Ph.D.

V Olomouci dne: 1. 8. 2016

Souhrn

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou týkající se klasifikace Plantain banánovníků (*Musa ssp.*). Plantain banánovníky jsou triploidní jedlé typy banánů s genomovým složením AAB. Vznikly přirozenou hybridizací dvou planě rostoucích diploidních druhů *M. acuminata* a *M. balbisiana*. Plantainy se vyskytují převážně v Africe, kde jsou považovány za jednu z nejdůležitějších plodin pro místní obyvatelstvo. Mimo Afriku se vyskytují také v Indii, či na severu Filipín. Příbuznost Plantain banánovníků se tradičně dělí podle základních květních morfotypů do tří skupin: 1) 'French', 2) 'French Horn' a 'False Horn' a 3) 'Horn'. Pro charakterizaci banánovníků se do nedávna používaly výhradně morfo-taxonomické znaky, které však nejsou dostatečně robustní pro identifikaci některých planých druhů nebo jednotlivých jedlých typů banánovníku.

Průtoková cytometrie je velmi rychlá metoda využívaná v rostlinné taxonomii. Je založena na analýze fluorescenčně obarvených částic (buněčných jader izolovaných v příslušném pufru), kdy za použití tzv. standardu, druhu o známé ploidii nebo velikosti genomu, lze rychle a snadno stanovit ploidii (nebo velikost genomu) analyzovaných druhů. Metody průtokové cytometrie bylo využito také v předkládané bakalářské práci, v jejíž praktické části byla stanovena ploidie u 102 položek banánovníků zaslaných z genové banky (ITC kolekce, Lovaň, Belgie).

Summary

Presented bachelor thesis deals with problems relating to the classification of Plantain bananas (*Musa ssp.*). Plantains are triploid edible bananas with genomic composition AAB. Plantains originated by natural hybridization of two wild diploid species *M. acuminata* and *M. balbisiana*. Plantains are widespread mainly in Africa, where they are considered as one of the most important crop for the local population. Outside Africa, they are growing in India, and the northern Philippines. Plantain bananas are traditionally classified into three groups, according basic floral morphotypes: 1) 'French', 2) 'French Horn' and 'False Horn' and 3) 'Horn'. Traditional classification of bananas is based on basic chromosome number and morpho-taxonomic descriptor. However, this classification system suffers by limited accuracy. Recently, a different types of molecular markers have been introduced into the classification of *Musa* species.

Flow cytometry is fast and efficient method used in plant taxonomy. Flow cytometry is based on analysis of fluorescently labeled particles - plant nuclei isolated in respected buffer. This method enables estimation of ploidy level as well as estimation of genome size. In the present bachelor thesis, flow cytometry was used for ploidy level estimation in 102 banana accessions sent from the Musa Genebank – ITC collection, Leuven, Belgium.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Evě Hřibové, Ph.D za trpělivost, se kterou mě vedla a za znalosti a rady, které mi při psaní bakalářské práce poskytla. Děkuji také Mgr. Janě Čížkové, PhD. za rady při tvorbě praktické části a teoretické části o průtokové cytometrii v mé práci.

Obsah

1	Teoretický úvod	11
1.1	Charakterizace banánovníků, význam a použití banánů	11
1.1.1	Morfologie a taxonomie banánovníku	11
1.1.2	Hospodářský význam banánů.....	14
1.1.3	Plantain banánovníky	16
1.2	Genetická diverzita banánovníku.....	18
1.2.1	Uchování genetické diverzity banánovníku – ITC kolekce.....	19
1.3	Průtoková cytometrie	21
1.3.1	Průtoková cytometrie	21
1.3.2	Výhody a nevýhody průtokové cytometrie	23
1.3.3	Užití průtokové cytometrie pro stanovení ploidie u rodu <i>Musa</i>	24
2	Praktická část	26
2.1	Použitý rostlinný materiál	26
2.2	Použité roztoky a pufry	29
2.3	Použité přístroje a pomůcky	30
2.4	Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii.....	30
2.5	Stanovení ploidie průtokovým cytometrem	31
3	Výsledky	33
4	Diskuze	41
5	Závěr.....	43
6	Seznam zkratk	44
7	Seznam použité literatury	45

Úvod

Banánovníky jsou krytosemenné, jednoděložné rostliny z čeledi *Musaceae*. Čeleď *Musaceae* obsahuje tři rody a to *Musa*, *Ensete* a *Musella*. Nejpočetnější rod je *Musa*, který obsahuje více než 70 druhů. Na základě morfo-taxonomických znaků byl rod *Musa* členěn na na sekce *Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa*, *Rhodochlamys* a v minulosti i *Ingentimusa*. V roce 2013 byly sloučeny sekce *Eumusa* a *Rhodochlamys*, stejně jako *Australimusa* a *Callimusa*, do jedné sekce (Häkkinen, 2013) (Obr. 2). Do rodu *Musa* patří i nejpočetnější skupina škrobových banánovníků s označením Plantain banánovníky. Tato skupina obsahuje více než sto různých kultivarů vyskytující se převážně v Africe. Dříve se jednotlivé druhy banánovníků rozdělovaly do svých skupin podle morfologických znaků. V dnešní době se do taxonomického výzkumu hojně zavádějí nejrůznější molekulární metody. Tyto metody jsou schopny doplnit tradiční morfo-taxonomické pojetí klasifikace, či zcela opravit taxonomické údaje o banánovnících. Jelikož se jedná o plodinu, která je v mnohých zemích jednou z nejdůležitějších potravních komodit pro tamní obyvatelstvo, je nutné porozumět její evoluci a příbuzenským vztahům jednotlivých druhů. Tyto údaje jsou rozhodující pro budoucí šlechtitelské programy, pro nalézání rezistencí proti škůdcům a nemocem a to na základě genetických informací.

Jednou ze základních charakteristik každého rostlinného druhu je velikost genomu a stupeň ploidie. Tyto základní charakteristiky se dají velmi rychle a relativně snadno stanovit pomocí metody průtokové cytometrie. Za použití tzv. interního standardu, druhu o známé ploidii (velikosti genomu), lze stanovit ploidie (velikost genomu) také u nově analyzované rostlinné položky.

Cíle práce

- 1. Vypracovat literární přehled o problematice týkající se banánovníků ze skupiny Plantain.**
- 2. Stanovit ploidii položek Plantain banánovníků zaslaných z genové banky.**

1 Teoretický úvod

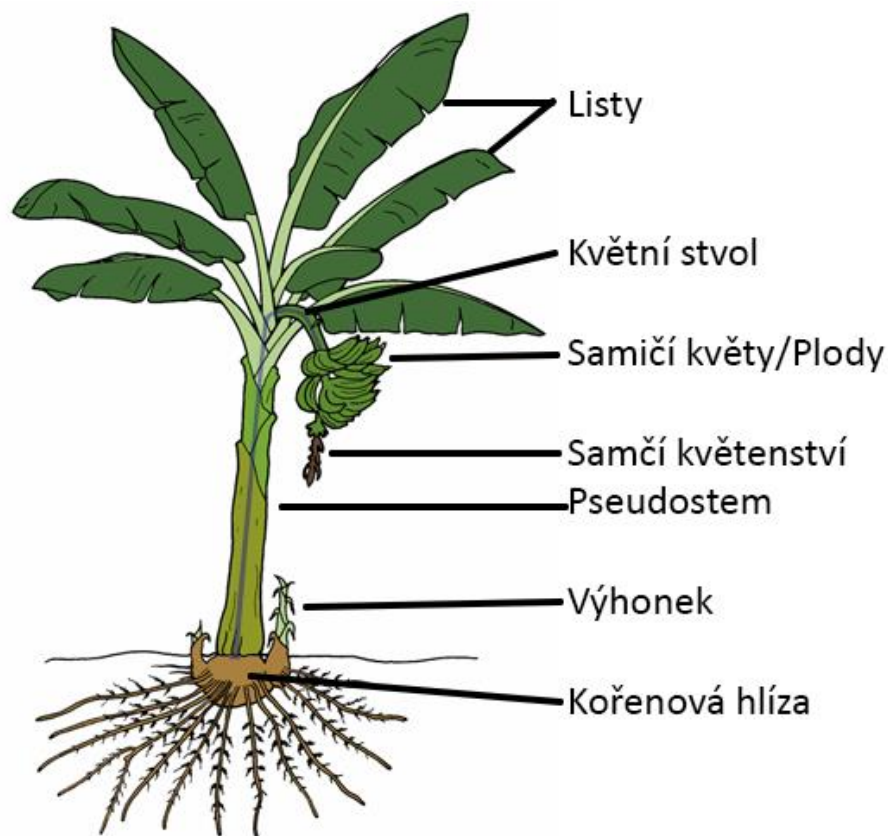
1.1 Charakterizace banánovníků, význam a použití banánů

1.1.1 Morfologie a taxonomie banánovníku

Banánovníky jsou krytosemenné a jednoděložné rostliny, které dosahují velmi vysokého vzrůstu, u některých planě rostoucích druhů až 15 metrů. Rostlina se skládá z podzemního radiálního kořenového systému, který se skládá převážně z adventivních kořenů. Hlavní kořen totiž brzy po vyklíčení zaniká (Simmonds, Stover, 1987). Nadzemní část rostliny tvoří tzv. pseudostem (nepravý kmen), listy a květenství (Obr.1). Tato bylina má obrovské listy, někdy s čepelí dlouhou až 4 m, které se skládají z řapíku, čepele a pochvy. Listy mívají zelenou, či až červenou barvu a někdy i skvrny různých barev a tvarů. Tvar jednotlivých částí listů a jejich barva patří ke znakům, které se používají v tradiční taxonomii této rostliny.

Banánovníky tvoří nepravý stonek – pseudostem. Tento pseudostem je tvořen ze svinutých listů a z jeho středu po čase vyrůstá stvol, na jehož konci se tvoří květenství. Nepravý stonek je tvořen převážně vodou, ale i přesto dokáže udržet trs plodů o hmotnosti až 50 kg. (ProMusa, 2015). Listy vyrůstají postupně ve dvoušroubovici ze zakrslého stonku, který je pod úrovní země. Jednotlivé listy vyrůstají ze středu nepravého kmenu a to v podobě stočeného listového válce připomínající tvar „doutníku“.

Kořenový systém je pro život celého banánovníku velice důležitý, Lassoudiere (1978) dokázal, že existuje souvislost mezi velikostí trsu plodů a rozvětvením a velikostí kořenového systému. U báze stonku banánovníku se zakládá kořenová hlíza, ze které vyrůstají nové rostliny banánovníku.



Obr. 1 – Morfologie banánovníku, převzato a upraveno z Promusa.com, dostupné z: <http://www.promusa.org/Morphology+of+banana+plant>

Rostlina banánovníku za svůj život vyprodukuje asi 50 listů a začne kvést až v době, kdy jí vyrostou asi 30 – 40 listů. Květenství je vrcholkové, na jehož bazální části se nachází samičí květy. Květy obsahují 5 tyčinek, spodní semeník, 5 srostlých a jeden volný okvětní list. Plody jedlých typů banánovníku vznikají ze samičích květů partenokarpicky. Trsy plodů jsou uspořádány na jednotlivá patra - „ruce“. Zralé plody banánovníků jsou zbarveny nejčastěji do žluta, ale mohou mít i nejrůznější odstíny fialové a červené.

Plod jedlých typů banánovníku je vyplněn dužinou a neobsahuje žádná semena. Planě rostoucí druhy tvoří v samčích květech pyl a jejich plody tak obsahují semena. Plané typy banánovníků se tak mohou rozmnožovat i pohlavně – semeny, která však mají velmi nízkou klíčivost.

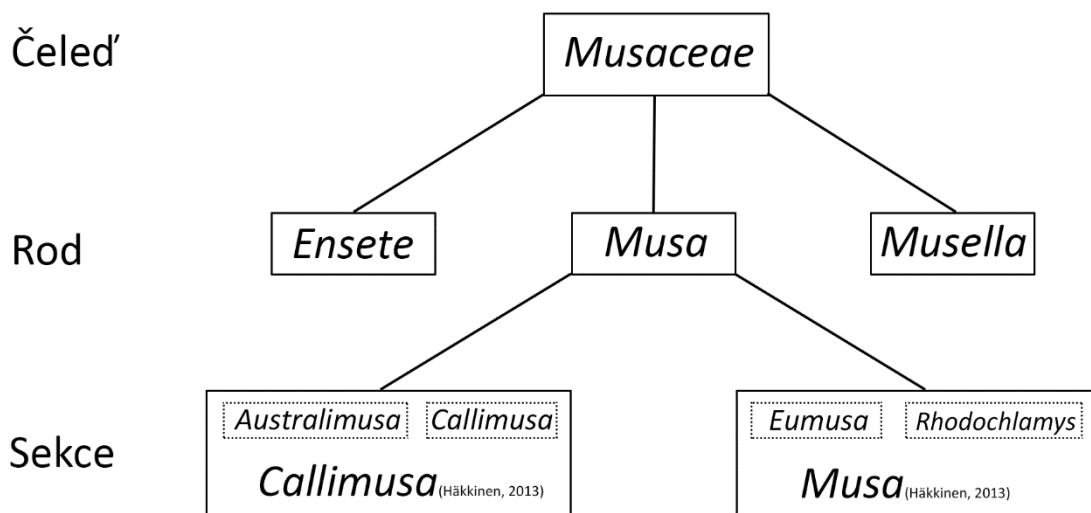
Banánovníky patří do čeledi banánovníkovité (*Musaceae*) a do řádu zázvorníkotvaré (*Zingiberales*). Čeleď *Musaceae* obsahuje tři rody a to *Musa*, *Ensete* a *Musella*. Nejpočetnější rod je *Musa*, který obsahuje více než 70 druhů. Tento rod se dříve tradičně dělil na sekce *Australimusa* ($x = 10$), *Callimusa* ($x = 10$), *Eumusa* ($x = 11$) a *Rhodochlamys* ($x = 11$) (Simmonds, Stover, 1987)(Cheesman,

1947). V minulosti byla popsána ještě pátá sekce *Igentimusa*, která je zastoupena jediným druhem a to *M. igens* ($x=14$) (Simmonds, Stover 1987). Tato tradiční klasifikace čeledi *Musaceae*, je založena na morfotaxonomických znacích (IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996). Rostliny se rozdělovaly podle délky pseudostemu, barvy a velikosti listů, či podle počtu, tvarů a barvy plodů. Analýza genetické diverzity a fylogenetických vztahů v čeledi *Musaceae* pomocí molekulárních markerů např. SSR markerů (Christelová, 2011) přispěla k přehodnocení tradiční klasifikace čeledi *Musaceae* (Häkkinen, 2013). V roce 2013 byly sloučeny sekce *Eumusa* a *Rhodochlamys* do jedné sekce *Musa*, stejně jako *Australimusa* a *Callimusa*, do jedné sekce *Callimusa* (Häkkinen, 2013) (Obr. 2).

Největší počet jedlých typů banánovníku se vyskytuje v rodu *Musa* a to konkrétněji v sekci *Musa* (původně *Eumusa*). Tyto banánovníky vznikly přirozenou vnitrodruhovou nebo mezidruhovou hybridizací dvou diploidních planých druhů *M. acuminata* (genom AA) a *M. balbisiana* (genom BB) a v některých případech i hybridizací s dalšími druhy např. *M. schizocarpa* (d'Hont, et al., 2000). Jedlé typy banánovníků ze sekce *Musa* jsou převážně diploidní a triploidní partenokarpické rostliny, jejichž plody neobsahují semena, proto se množí výhradně vegetativně. Další jedlé typy banánovníků se vyskytují také v sekci *Callimusa* (původně *Australimusa*). Jedná se o tzv. Fe'i banánovníky, které vznikly nezávisle na jedlých banánech ze sekce *Musa* (Promusa, 2011).

Rod *Ensete* tvoří monokarpické rostliny, které nikdy nevytváří jedlé plody. I přesto je *E. ventricosum* ekonomicky významný pro obyvatele východní Afriky, jelikož se z něj vyrábí vlákna a jeho mladé květenství se konzumuje (Simmonds, Stover, 1987).

Do rodu *Musella* patří jen jeden druh a to *Musella lasiocarpa*. Tento rod je označován v mnoha zdrojích jako ekvivalent rodu *Ensete*. Vyskytuje se v oblastech jihovýchodní Asie.



Obr. 2 – Taxonomie čeledi *Musaceae* podle Häkkinen, 2013.

1.1.2 Hospodářský význam banánů

Pro mnohé tropické a subtropické země jsou banány jednou z nejdůležitějších obchodních komodit. Podle Biodiversity international banány tvoří finanční příjem a zdroj jídla pro více než 400 milionů lidí po celém světě (<http://www.biodiversityinternational.org/research-portfolio/conservation-use-of-bananas-tree-crops/banana/>). Jedná se o jednu z nejdůležitějších obchodních položek i přesto, že velká část z vnitrostátní produkce zůstává v zemi původu. Celkově se jedlé banány produkují v asi 130 zemích světa s celkovou produkcí 104,3 miliónů tun ročně (Gibert, et al., 2009).

Původní plané rostliny banánovníků se vyskytují v oblasti od severu Nepálu a jižní hornaté Číny (Simmonds, Stover, 1987) až po jižní ostrovy v Indonésii a Nové Guinei. V západní Asii tyto plané rostliny zasahují až do Indie (De Langhe, et al., 2009). Tyto plané rostliny se původně nevyskytovali na africkém ani americkém kontinentu. Proces domestikace začal zhruba před 7 000 lety a to právě v oblasti jihovýchodní Asie, kdy došlo k selekci přirozených hybridních klonů banánovníků, které produkovaly chutné a bezsemenné plody. K šíření jedlých typů banánovníku pravděpodobně pomohli migrující lidé a následně obchodníci.

Jak již bylo zmíněno, jedlé typy banánovníků vznikly přirozenou hybridizací dvou planě rostoucích druhů banánovníku a to *Musa balbisiana* (genom BB) a *Musa acuminata* (genom AA). Mezi další druhy, které se podílely na vzniku jedlých typů

banánovníků, patří *M. textilis* (genom T) ze sekce *Callimusa*, která dala vzniknout tzv. Fei banánovníkům (Li, et al. 2013). Převážná většina jedlých typů banánovníků jsou diploidní nebo triploidní hybridní klony, s genomy AA, AB, AAA, AAB, a ABB náležících do sekce *Musa* (původně *Eumusa*). Jedlé typy banánovníku lze rozdělit do dvou skupin – dezertní (sladké) banány a banány škrobové (Obr. 3), které je před konzumací potřeba tepelně zpracovat. Mezi dezertní banány patří mimo jiné např. i známý Cavendish banánovník (genom AAA), který je zároveň jediným sladkým typem banánovníku určeným pro export. Mezi škrobové banány patří banánovníky africké vysočiny („East African highland bananas“, genom AAA) nebo známé Plantainy (genom AAB). Kromě potravy se také banány dají využít i jinými cestami, například banánové listy mohou posloužit jako střešní krytina.



Obr. 3 – Rozdíl mezi banány typu Plantain (vlevo) a dezertní (vpravo), převzato z foodandremedy.com, Dostupné z: <http://foodandremedy.com/blog/plantain-vs-banana/>

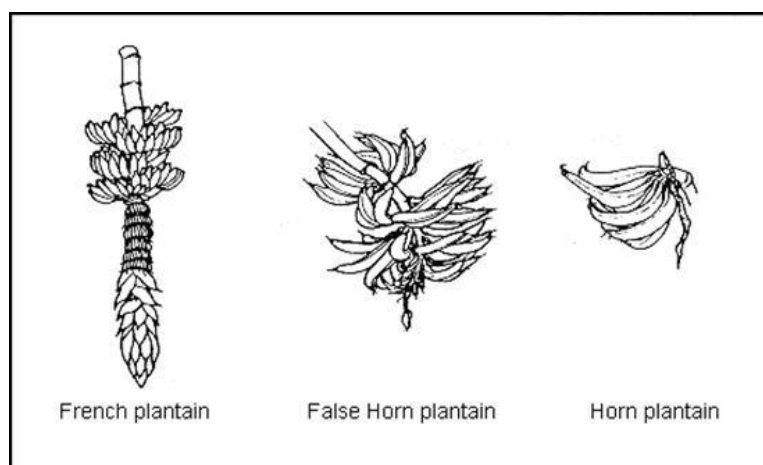
Sladké banány jsou odrůdy banánovníků, které je možné konzumovat bez předchozí tepelné, či jakékoliv jiné úpravy. Jedná se o lehce stravitelné a nutričně velmi vhodné ovoce, jehož způsoby zpracování jsou téměř neomezené. Škrobové banány se oproti sladkým banánům pojídají vařené, pečené, smažené nebo je možné je umlít na mouku.

1.1.3 Plantain banánovníky

Plantainy (*Musa ssp.*) jsou triploidní banánovníky s genomovým složením AAB. Plantainy se pokládají za nejobsáhlejší podskupinu triploidních banánovníků s rozšířením hlavně v Africe, kde jsou považovány za mnohdy nejdůležitější plodinu pro obživu místních obyvatel. Mnoho genotypů Plantainů se nevyskytuje jinde ve světě kromě Afriky (De Langhe, et al., 2005). Mimo Afriku je diverzita plantain banánovníků menší. Kromě Afriky se Plantainy vyskytují například v Indii (Simmonds, 1966) a v horách na severu Filipín (De Langhe, Valmayor, 1980). Předpokládá se, že první Plantainy se do Afriky dostaly před více než 2 500 lety (De Langhe, et al. 2005).

Na základě morfologie květenství se v současné době rozlišují tři skupiny plantain banánovníků: 1) skupina 'French'; 2) skupina 'French Horn' a 'False Horn' a 3) skupina 'Horn' (Simmonds, 1966; Tézenas du Montcel, et al. 1983; Swennen, 1990). (Obr. 4)

Plantain banánovníky typu 'French' obsahují samčí květy, zatímco u zástupců typu 'Horn' samčí květy v květenství zcela chybí nebo jsou degradovány (Obr. 4). Plantain banánovníky typu 'French Horn' a 'False Horn' byly popsány o něco později a vyznačují se tím, že samčí květy jsou degenerované až v dospělosti.



Obr. 4 – Typy Plantainů podle typu květenství a tvaru plodů. Převzato z International Tropical Fruits Network, dostupné z: http://www.itfnet.org/index_archive.jsp?page=1&process=11&mid=1&fid=13

V rámci jednotlivých skupin Plantainů, se vyskytují zástupci s různým množstvím vytvořených listů, což je další ukazatel používaný v základní taxonomii Plantainů (De Langhe, et al., 2005). Sekundární taxonomické určování se provádí pro přesnější určování a to na základě sekundárních určujících znaků, jako je

morfologie plodů, velikosti trsu nebo barvě plodů, či květů (De Langhe, et al., 2005). I při vytvoření těchto pravidel existují výjimky a ne všechny Plantainy se dají zařadit do skupin podle typů květenství a velikosti rostliny. Pro tyto účely se v dnešní době využívá určování příbuznosti na základě genetické informace jednotlivých zástupců.

Plantain banánovníky produkují plody, které jsou škrobovité a musí se před použitím tepelně zpracovat. Oproti sladkým banánům mají vyšší obsah sacharidů, a to až o 30 %, což je činí jedním z nejdůležitějších zdrojů sacharidů, pro obyvatelstvo některých zemí hlavně v Africe (spolu s East African Highlands Bananas – EAHB). Ze všech typů jedlých banánů tvoří EAHB až 17% všech vypěstovaných banánů na světě a plantainy obecně ~ 19% (International Institute of Tropical Agriculture). Plantainy tvoří potravu a příjem pro farmáře velkého množství rozvojových zemí hlavně v Africe, v Latinské Americe a Asii.

1.2 Genetická diverzita banánovníku

Primárním centrem diverzity banánovníku je jihovýchodní Asie, odkud se tento druh v minulosti rozšířil do západní a střední Afriky a jižní Ameriky. V Africe se vyselektovaly jedlé typy banánovníků, které se v současné době nevyskytují v jihovýchodní Asii a proto je oblast Afriky považována za sekundární centrum diverzity banánovníku (Swennen, Rosales, 1994).

Plantainy se vyskytují na velkém množství lokalit v různých zemích Afriky, Asie či Latinské Ameriky díky čemuž existuje mnoho různých označení, jmen a synonym pro stejné odrůdy. Podobně i farmáři z různých částí Afriky mají různá jména pro stejné klony Plantainů. Tyto odchylky byly způsobeny například různorodostí různě mluvících jazykových skupin, nářečími aj. (Ude, et al., 2003). Používání různých jmen pro stejné pěstované klony v dnešní době znesnadňuje rychlou a přesnou identifikaci rozdílných klonů a uchování jejich genetické diverzity v genových bankách.

Jak již bylo řečeno, tradiční taxonomie založená na morfologických znacích a základním chromozomovém čísle (Cheesman, 1947) je velmi nepřesná a neumožňuje jednoznačnou identifikaci jedlých klonů banánovníku. Navíc, fenotyp jedinců se může měnit i vlivem prostředí a proto může docházet k morfologickým a tedy i taxonomickým odchylkám. V dnešní době se pro podrobnou charakterizaci jednotlivých genotypů banánovníku (planých i jedlých typů) využívá metod molekulární biologie (Manzo-Sánchez, 2015), především využití různých typů molekulárních markerů např. RFLP markery (Raboin, 2005), SSR markery (Christelová, et al., 2011).

1.2.1 Uchovávání genetické diverzity banánovníku – ITC kolekce

Charakterizace a uchování genetické diverzity banánovníku je jedním z hlavních cílů mezinárodní organizace Bioversity International, která se mimo jiné zabývá dalšími ekonomicky významnými plodinami oblastí tropů a subtropů. Dobře charakterizované genotypy banánovníků mohou být využity ve šlechtitelských programech, jejichž cílem je vytvořit odolnější typy jedlých banánovníku křížením s rezistentnějšími planými druhy.

Genové banky rostlin uchovávají jednotlivé položky nejčastěji ve formě semen. Vzhledem ke skutečnosti, že jedlé typy banánovníků jsou sterilní, je třeba je uchovávat ve formě *in vitro* rostlin nebo polních sbírek. Tato skutečnost však přináší celou řadu komplikací spojených především se záměnou položek při pasážování *in vitro* kultur nebo dokonce ztráta položek uchovávaných v polních sbírkách vlivem nepříznivého počasí (např. v nedávné době byla zcela zdecimována polní sbírka na Filipínách vlivem tajfunu). Další komplikací je také nedostatečná charakterizace jednotlivých položek uchovávaných v genové bance banánovníku.

ITC genová banka, celým názvem International Transit Centre (původně INIBAP Transit Centre) je genová banka se sídlem v Katolické univerzitě v Lovani, v Belgii. Byla založena roku 1985 jakožto jeden z prvních úkonů začínající instituce INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain). Zakladatelem INIBAP je prof. Edmond de Langhe, jedna z nejvýznamnějších osobností ve výzkumu banánovníků. Jedná se o největší sbírku banánovníků na světě, a jak již bylo zmíněno, jednotlivé položky banánovníků se v této bance udržují ve formě *in vitro* rostlin (Obr. 5). Genová banka (ITC kolekce) udržuje kolem 1 500 položek, které obsahují jak jedlé typy banánovníků, tak i původní plané druhy banánovníků. Všechny položky z této genové banky si lze vyžádat online. Cílem genové banky je nejen uchování genetické diverzity čeledi *Musaceae*, ale slouží i jako zdroj genotypů využívaných ve šlechtitelských programech. Genová banka distribuuje jednotlivé zástupce banánovníků jak výzkumným centřům, tak šlechtitelským stanicím, a to bezplatně (Vézina, Van den Bergh, 2016). Vzhledem k této funkci genové banky, je nezbytné, aby jednotlivé položky banánovníku, uchovávané v ITC kolekci, byly správně a podrobně popsány. Jak již bylo uvedeno, všechny položky v genové bance jsou charakterizovány pomocí morfo-taxonomických znaků, které se však ukázaly jako nedostatečné pro určení nových druhů nebo popis jednotlivých skupin hybridních klonů. Proto je v současné době

celá genová banka charakterizována i pomocí molekulárních markerů s cílem identifikovat špatně popsané položky nebo pravděpodobně duplikované položky.



Obr. 5 – Uchovávání genetického materiálu v genové bance ITC ve formě *in vitro* rostlin, převzato a upraveno od Cristián Samper, Twitter, Dostupné z:

<https://twitter.com/cristiansamper/status/585819077681278976>

Pro charakterizaci genetické diverzity banánovníku se využilo např. DArT markerů, markerů založených na identifikaci jednonukleotidových polymorfismů s využitím tzv. sekvenování nové generace a stále aktuální je také používání mikrosatelitových (SSR) markerů. V rámci spolupráce s Bioversity international, byla v roce 2011 vyvinuta standardizovaná SSR genotypovací platforma vhodná pro charakterizaci genetické diverzity banánovníků uchovávaných v genové bance (Christelová et al. 2011). Tato genotypovací platforma je založena na využití 19 mikrosatelitových markerů. Christelová et al. (2011 a 2016-nepublikováno) ukázala, že pomocí SSR genotypování je možné charakterizovat i neznámé vzorky banánovníku. Tato univerzální metoda spolu s průtokovou cytometrií (Kapitola 1.3) umožňuje rychlou a přesnou analýzu vzorků, které jsou zaslány právě z genové banky v Lovani a zjistit případné chyby v označení jejich položek, či odhalit přítomnost duplikátů.

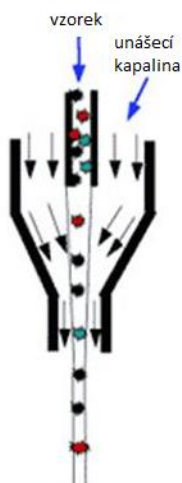
1.3 Průtoková cytometrie

1.3.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie patří mezi moderní a rychle se rozšiřující metody, které se využívají v široké škále biologických oborů a to od rostlinného po lékařský. V rostlinném výzkumu se nejčastěji používá pro stanovení obsahu jaderné DNA, určení stupně ploidie a analýzu buněčného cyklu.

Základní princip průtokové cytometrie spočívá v usměrnění proudu částic tak, aby byly unášeny jednotlivé částice po jedné za sebou. Částice procházejí proudem světla (laser), který je, podle změny po průchodu částicí, detekován a elektronicky vyhodnocován. Před měřením je třeba analyzované částice specificky a kvantitativně (Suda, 2005) nabarvit chromoforem, který je poté možné specificky detekovat. Je nutné, aby analyzované částice byly nabarveny specificky, jinak dochází k detekci i jiných částic, které by mohly ovlivnit vyhodnocení.

Průtokový cytometr je velmi komplexní přístroj a nejčastěji se dělí na tyto základní komponenty – průtoková komůrka, zdroj excitačního světla, optická soustava, fotonásobiče a zesilovače a část elektronická (Suda, 2005). Nejdůležitější součástí cytometru je průtoková komůrka. Zde dochází k analýze proudu částic, které jsou právě v této komůrce seřazeny a srovnány do souvislého proudu a zde se setkává unášecí kapalina a vzorek (Robinson, Grégori, 2007), (Obr. 6). Způsob, jakým se toho dá dosáhnout, se nazývá hydrodynamická fokusace (Suda, 2005). Z jedné kapiláry je přiváděna kapalina vzorku obsahující částice a druhou širší kapilárou je přiváděna unášecí kapalina, která je vstřikována pod vyšším tlakem. Konstantní proud vysokotlaké unášecí kapaliny způsobí, že se částice posunují spořádaně a jedna za druhou.



Obr. 6 – Schéma průtoku unášecí kapaliny a vzorku s částicemi a tvorby konstantního proudu pro měření na FCM, převzato a upraveno od: Brzová Petra, Průtoková cytometrie, Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3368276/>

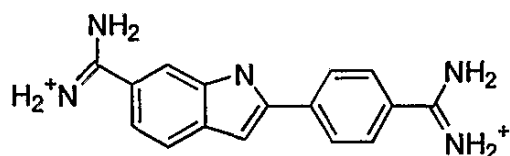
Takto vycentrované a konstantně se pohybující částice procházejí v průtokové komůrce ohniskem excitačního světla (Suda, 2005).

Většina moderních přístrojů používá jako zdroj excitačního světla monochromatické světlo (lasery nebo LED diody). Výhodou laserů je jejich monochromaticnost, což eliminuje používání světelných filtrů a nevýhodou je vysoká pořizovací cena (Suda, 2005). Jako druhý používaný zdroj v FCM jsou využívány rtuťové výbojky, které pracují ve vyšším rozsahu vlnových délek a jsou levnější, ale mají relativně krátkou životnost.

Při průchodu částice ohniskem excitačního světla, dojde k excitaci barviva, kterým je nabarvená. Po excitaci barviva a jeho návratu do klidového stavu dochází k emisi fluorescence, která je snímána optickou soustavou. Vyzářená fluorescence dále prochází různými filtry, fotonásobiči a detektory. Pomocí fotonásobičů je světelný signál převeden na pulzy elektrického proudu, které jsou dále zpracovány a digitalizovány. Data jsou nakonec analyzována pomocí specifického softwaru a uchována ve formě histogramu zobrazujícího relativní intenzitu fluorescence.

Jeden z nejdůležitějších parametrů průtokové cytometrie je její přesnost. Ve vlastním měření dochází k tvorbě řady nepřesností, způsobených například nerovnoměrným nabarvením částic, přístrojovými chybami či rozdílnými podmínkami při měření (Suda, 2005). Tyto odchylky a variability popisuje tzv. variační koeficient – CV, který se počítá jako podíl směrodatné odchylky a průměrné pozice peaku (Suda, 2005). Variační koeficient se vyjadřuje v procentech a pro přesná měření by jeho hodnota měla dosahovat maximálně 3%.

Při analýze rostlinných materiálů (např. rodu *Musa*) pomocí průtokové cytometrie se používají buněčná jádra rostlinného pletiva. Rostlinné vzorky pro průtokovou cytometrii někdy může být obtížné získat, protože rostlina sama o sobě obsahuje velké množství látek ovlivňujících měření, jako jsou například škrobová zrna, či přírodní fluorochromy (Suda, 2005). Každé jádro prochází určitými cyklickými změnami a u jader měřených průtokovou cytometrií je důležité, zda je jádro ve fázi G1 nebo G2. Fáze G1 označuje fázi, při které je v jádře základní množství DNA. V G2 fázi už došlo k duplikaci DNA a tedy množství genetické informace v těchto jádrech je dvojnásobné. Analyzujeme-li jádra rostlin, sledujeme intenzitu fluorescence jader právě v G1 fázi. Pro zbarvení buněčných jader u rostlin se používá například fluorochrom DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) (Obr.7), který se nejčastěji používá při určování stupně ploidie.



Obr. 7 – chemická struktura specifického fluorochromu DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) pro měření ploidie u rodu *Musa*, převzato a upraveno z: Synthesis and evaluation of new cyanine dyes as minor groove of [poly(da-dt)]₂ binders, dostupné z: <http://www.google.com/patents/WO2002090443A1?cl=en>

Barvivo DAPI se přednostně váže na DNA strukturu, konkrétně na sekvence bohaté na adenin a thymin. Pro detekci buněčných jader obarvených fluorochromem DAPI se používá světelný zdroj s vlnovým rozhraním v UV oblasti. Dalším barvivem, které se využívá v průtokové cytometrii je například propidium jodid. Toto barvivo se vážně specificky na nukleové kyseliny (vmezeřuje se do dvoušroubovice DNA po celé její délce) a proto lze využít například při měření celkového obsahu DNA v rostlinných vzorcích.

1.3.2 Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je velmi perspektivní a velmi rychle se rozšiřující metoda analýzy velkého množství částic za velmi krátkou dobu. Hlavní výhody průtokové cytometrie spočívají v rychlosti analýzy a v malých finančních nárocích (Suda, 2005). Ke kompletní analýze pomocí této metody stačí obecně jen velmi malé

množství pletiva. Příprava rostlinného materiálu je velmi jednoduchá a časově nenáročná, postačí jen ruční homogenizace pletiv. Dohromady zpracování vzorků a jeho analýza zabere řádově minuty. Pomocí této metody je tedy možné někdy zanalyzovat i celé rostlinné populace během velmi krátké doby. Pro analýzu pomocí průtokové cytometrie lze také použít i vzorky z jiných rostlinných pletiv jako jsou kořeny, květy nebo třeba semena. Nespornou výhodou analýz pomocí průtokové cytometrie je její finanční nenáročnost, cenové rozmezí pro analýzu jednoho vzorku se pohybuje řádově v desítkách korun (Suda, 2005).

Jako každá metoda i tato má svá omezení a některé nevýhody. Podle charakteru analýzy je největší nevýhodou nutnost pracovat s čerstvým a čistým materiálem. Udržet rostlinný materiál čerstvý a čistý může být, například při transportu, obtížné. Každá nečistota a každá vada na pletivu, například hniloba, způsobí zhoršení kvality výsledné analýzy a získaných výsledků (CV). V některých výjimečných případech lze analyzovat i vysušené rostlinné položky. Běžně se ale sušené položky neanalyzují a dochází ke zhoršení CV. Každý druh rostliny je odlišný a někdy je třeba značně modifikovat postup, pro zdárnou analýzu. V některých případech se také stává, že analyzovaná rostlina má tolik sekundárních metabolitů, že samotná analýza není možná nebo je třeba provést další kroky k odstranění těchto sekundárních metabolitů nebo k zamezení jejich negativního účinku na průběh analýzy. Do některých pufrů se například přidává β -merkapt ethanol nebo jiná redukční činidla, která potlačují interferenci fenolických látek s fluorescenčním barvením DNA (Doležel, Bartoš, 2005).

1.3.3 Užití průtokové cytometrie pro stanovení ploidie u rodu

Musa

Stanovení ploidie je jednou z nejčastějších aplikací průtokové cytometrie při studiu rostlin. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1.2, jednotlivé kultivary banánovníku mohou být diploidní, triploidní nebo tetraploidní a s pomocí průtokové cytometrie a interních standardů dokážeme s přesností určit stupeň ploidie dané rostliny banánovníku.

Pro izolaci buněčných jader rodu *Musa* se nejčastěji používají pufrы OTTO (Bartoš, 2005; Čížková, et al., 2013) a LB01 (Lysák, et al., 1999). Vzorky se připravují z nejmladších listů, ve kterých je nejmenší podíl sekundárních metabolitů,

které by mohly negativně ovlivnit analýzu. V případě banánovníku se jedná především o fenolické látky a do izolačních pufrů se proto často přidává β -merkapt ethanol (viz. kapitola 1.3.2.)

Pomocí průtokové cytometrie je možné stanovit ploidii rostlin rodu *Musa* na základě porovnání relativní intenzity fluorescence G1 jader banánovníku a interního standardu, v tomto případě fixovaných kuřecích erytrocytů. Tento standard má známý obsah DNA – 2,5 pg (De Vita, et al., 1994). Množství jaderné DNA diploidních banánovníků *M. acuminata* a *M. balbisiana* se pohybuje v rozmezí 1,11 - 1,34 pg (Lysák, et al. 1999; Bartoš, et al., 2005; Čížková, et al. 2013). Podíl relativní intenzity fluorescence diploidních banánovníků a kuřecích erytrocytů je tedy $\sim 0,5$, u triploidních banánovníků se zvyšuje na $\sim 0,75$ a u tetraploidních banánovníků je roven 1.

2 Praktická část

Cílem praktické části práce byla analýza ploidie rostlin banánovníku zaslaných z genové banky – ITC kolekce v Lovani, Belgii (Tab. 1) Každý genotyp (položka) banánovníku určený pro analýzu genetické diverzity je z genové banky zaslán ve formě zakořeněných rostlin, přičemž každá položka je reprezentována pěti jednotlivými rostlinami. Praktická část předkládané práce si kladla za cíl stanovit ploidii u všech jednotlivých rostlin Plantain banánovníků s využitím průtokové cytometrie a porovnat získané výsledky s daty uveřejněnými v databázi MGIS, respektive odhalit položky u kterých došlo k případným záměnám nebo smícháním jednotlivých položek.

2.1 Použitý rostlinný materiál

K vlastnímu měření pomocí průtokové cytometrie je potřeba čerstvé rostlinné pletivo. K mému měření jsem používal nejmladší listy banánovníků, které byly zaslány z genové banky – International Transit Centre (Lovaň, Belgie) kolekce ve formě *in vitro* rostlin. Každá položka byla reprezentována pěti rostlinami. Pro přípravu vzorků bylo použito cca 1 cm² plochy banánového listu (asi 50 mg), aby bylo dosaženo izolace dostatečného množství jader potřebného pro cytometrickou analýzu.

Tab. 1 – Seznam jednotlivých ITC položek dodaných z genové banky, jejich jména a ploidie uvedené v internetové databázi MGIS.

Jméno položky	ITC kód	Ploidie uvedená v databázi MGIS	Genomové složení
Essang	ITC0015	3x	AAB
Gabon 1	ITC0016	3x	AAB
Gabon 2	ITC0017	3x	AAB
Gabon 3	ITC0018	3x	AAB
Moufoubila	ITC0023	3x	AAB
Congo 2	ITC0027	3x	AAB
Bungaoisan	ITC0033	3x	AAB
Niangafelo	ITC0044	3x	AAB

Diby 2	ITC0054	3x	AAB
Bindi-Mossendjo	ITC0057	3x	AAB
Gabon 4	ITC0075	3x	AAB
Elar Icon	ITC0097	3x	AAB
Moutoka 1	ITC0102	3x	AAB
Moungeli	ITC0103	3x	AAB
Asamienu	ITC0122	3x	AAB
Tshambunu	ITC0128	3x	AAB
Msisa	ITC0142	3x	AAB
Mushuba	ITC0146	3x	AAB
Isansi	ITC0148	3x	AAB
Nyombe no.2	ITC0193	3x	AAB
Okele	ITC0194	3x	AAB
Kar Ngou	ITC0196	3x	AAB
Moto French	ITC0197	3x	AAB
Kelong Mekintu	ITC0200	3x	AAB
Elat	ITC0201	3x	AAB
Mbeta no.1	ITC0202	3x	AAB
Niabang	ITC0203	3x	AAB
Rose d'Ekona	ITC0204	3x	AAB
French Rouge	ITC0205	3x	AAB
Apantu	ITC0223	3x	AAB
Ntanga 4	ITC0226	3x	AAB
Ntanga 6	ITC0227	3x	AAB
Ukom	ITC0230	3x	AAB
Apem Onniaba	ITC0231	3x	AAB
Egjoga	ITC0232	3x	AAB
Mbirinyong	ITC0233	3x	AAB
Ngok Egome	ITC0236	3x	AAB
Monganga	ITC0237	3x	AAB
76.22	ITC0238	3x	AAB
Banane serpent	ITC0282	3x	AAB
Dwarf French Plantain	ITC0321	3x	AAB
Purple pseudostem plantain	ITC0323	3x	AAB

Red Plantain Hembra	ITC0324	3x	AAB
Horse Plantain	ITC0326	3x	AAB
Pisang Lang	ITC0327	3x	AAB
Red Plantain Macho	ITC0328	3x	AAB
Plantain no. 3 (PX3)	ITC0350	3x	AAB
Plantain no. 17	ITC0352	3x	AAB
Corne 4	ITC0390	3x	AAB
Bamileke	ITC0391	3x	AAB
Plantain Baja 2	ITC0483	3x	AAB
Ntanga 3	ITC0487	3x	AAB
Nyiretia Apem	ITC0491	3x	AAB
Nyiretia Apantu	ITC0492	3x	AAB
Borodehene	ITC0493	3x	AAB
Borodewuio	ITC0494	3x	AAB
Osakro	ITC0495	3x	AAB
Cantebalon	ITC0496	3x	AAB
Ngomba	ITC0497	3x	AAB
Plantain no.3	ITC0498	3x	AAB
Obubit Ntanga 2	ITC0499	3x	AAB
Orishele	ITC0517	3x	AAB
Kiogo	ITC0518	3x	AAB
Mbi Egome 3	ITC0520	3x	AAB
Madre del Platanar	ITC0521	3x	AAB
Not Named Musa paradisiaca x	ITC0537	3x	AAB
Curare	ITC0558	3x	AAB
Dwarf French Plantain	ITC0561	3x	AAB
Horn Plantain	ITC0586	3x	AAB
Hartón Marqueo	ITC0628	3x	AAB
Dominico Hartón Rojo	ITC0630	3x	AAB
Hartón Tigre	ITC0642	3x	AAB
Plátano Hartón	ITC0645	3x	AAB
Diby 1	ITC0735	3x	AAB
Essong	ITC0741	3x	AAB
Corne 1	ITC0754	3x	AAB

Owang Rouge	ITC0757	3x	AAB
Yenai	ITC0774	2x	AA
Kumunamba	ITC0824	3x	AAB
3/4 Nain	ITC0959	3x	AAB
Px1/Amou	ITC0961	3x	AAB
Amou	ITC0963	3x	AAB
Ovang	ITC0964	3x	AAB
Libanga Liboelabokoi	ITC1041	3x	AAB
Libanga Lifombo	ITC1042	3x	AAB
Wangala	ITC1044	3x	AAB
Lokoka	ITC1045	3x	AAB
Litete	ITC1050	3x	AAB
Owang Vert	ITC1073	3x	AAB
Njombe No.2	ITC1124	3x	AAB
French Clair	ITC1125	3x	AAB
18 Corne Rouge	ITC1128	3x	AAB
Moto Ebanga	ITC1131	3x	AAB
French Rouge	ITC1134	3x	AAB
Messiatso	ITC1153	3x	AAB
Curare	ITC1165	3x	AAB
Mzuzu ya Kati	ITC1221	3x	AAB
Mbouroukou no.1	ITC1285	3x	AAB
Kelong Mekintu	ITC1286	3x	AAB
Kelong Mekintu	ITC1326	3x	AAB
"French Reversion, reddish pseudostem"	ITC1397	3x	AAB
Zanzebar	ITC1471	3x	AAB

2.2 Použité roztoky a pufry

Izolační roztok OTTO I (Otto, 1990):

OTTO I

Monohydrát kyseliny citrónové

na 200 ml

4,2 g

Detergent Tween 20

1,0 ml

Namíchaný roztok byl přefiltrován přes 22 µm filtr a je nutné jej uchovávat při 4 °C.

Izolační roztok OTTO II:

OTTO II

na 200 ml

0,4M Na₂HPO₄·12H₂O

28,65 g

Namíchaný roztok byl přefiltrován přes 22 µm filtr a je nutné jej uchovávat ve tmě a při pokojové teplotě. Pokud se Na₂HPO₄·12H₂O ve vodě nerozpouští, je třeba roztok mírně zahřát.

Zásobní roztok DAPI:

10 mg DAPI (Fluorofor 4',6-diamidin-2-fenylindol) je rozpuštěno ve 100 ml destilované H₂O. Výsledný roztok musí být skladován v -20 °C.

Promývací roztoky pro cytometr:

- Sysmex Cleaning Solution ®
- Sysmex Decontamination Solution ®

Roztok erytrocytů:

Roztok kuřecích erytrocytů (CRBC – Chicken Red Blood Cells) fixovaných v ethanolu, uchovávaný při -20 °C.

2.3 Použité přístroje a pomůcky

Přístrojová technika: průtokový cytometr Sysmex CyFlow Space ®

Materiál: žiletky, Petriho misky, nylonové filtry (velikost pórů 50 µm), automatická pipeta 2 – 20 µl, automatická pipeta 20 - 200 µl, automatická pipeta 100 - 1000 µl, špičky, speciální zkumavky na vzorky

2.4 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

Pro zdárné měření ploidie u rostlin banánovníků je třeba izolovat buněčná jádra z listového pletiva banánovníku. Část listu o velikosti cca 1 cm² je umístěna do 500 µl izolačního roztoku OTTO I a homogenizována nasekáním žiletkou. Výsledná suspenze je poté přefiltrována přes 50 µm nylonový filtr do čisté zkumavky. Vzorek se v roztoku OTTO I uchovává na ledu. K roztoku ve zkumavce obsahujícímu izolovaná buněčná jádra v pufru OTTO I se přidá dvojnásobné množství izolačního roztoku OTTO II (1000 µl), a 30 µl zásobního roztoku DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). Vzorek ve zkumavce se dostatečně, ale jemně promíchá a je připraven pro použití na průtokovém cytometru. Ke každému vzorku suspenze jader banánovníku bylo přidáno 7 µl předem připraveného pracovního roztoku kuřecích erytrocytů.

2.5 Stanovení ploidie průtokovým cytometrem

Při stanovování a vyhodnocování ploidie pomocí průtokového cytometru je třeba analyzovat alespoň 2000 jednotlivých částic, tedy buněčných jader.

Před analýzou vzorků banánovníku byl průtokový cytometr kalibrován pomocí kuřecích erytrocytů. Pracovní roztok erytrocytů byl připraven smícháním 500 µl roztoku OTTO I a 30 µl zásobního roztoku CRBC fixovaných v ethanolu. CRBC tvoří shluky, které by mohly ucpat průtokovou komůrku, proto byl kalibrační roztok CRBC homogenizován inzulinovou injekční stříkačkou. Homogenizace injekční stříkačkou se provádí hlavně z důvodu rozdělení erytrocytů na jednotlivé buňky, popřípadě dvojice nebo trojice buněk, které průtokový cytometr detekuje a pomocí kterých kalibrujeme. Z pracovního roztoku se připraví kalibrační roztok, který obsahuje 500 µl roztoku OTTO I, 1000 µl roztoku OTTO II, 7 µl pracovního roztoku kuřecích erytrocytů a 30 µl zásobního roztoku DAPI. Kalibrace je hotova, když jsou píky erytrocytů na ose lineární a mají co nejnížší CV. Peak erytrocytů se poté nejvýhodněji nastaví na kanál 100 na horizontální ose. Podle takto nastaveného peaku lze poté odvodit ploidii neznámého vzorku.

Ploidie jednotlivých vzorků banánovníku je stanovena na základě pozic peaků měřeného vzorku a kuřecích erytrocytů, které slouží jako interní standard. Při analýze průtokovým cytometrem měří přístroj hodnoty vyzářené fluorescence jednotlivých částic, které projdou průtokovou komůrkou cytometru. Na základě těchto hodnot poté příslušný software vytváří peaky, které označují množství jader,

která se vyznačují specifickou hladinou vyzařování fluorescence. V softwaru se vytváří peak interního standardu CRBC, který má předem určenou pozici na kanále 100 a peak představující buněčná jádra analyzovaných rostlinných vzorků. Poměr relativní intenzity fluorescence G1 jader banánovníku a CRBC se počítá jako poměr hodnoty „mean“ (střední pozice peaku) analyzovaného vzorku a hodnoty „mean“ interního standardu.

3 Výsledky

V praktické části bylo analyzováno celkem 102 genotypů rodu *Musa* (Tab. 1) zaslaných jako in vitro rostliny z genové banky v Lovani. Každý genotyp byl reprezentován pěti rostlinami a měření ploidie na průtokovém cytometru bylo provedeno u každé rostliny zvlášť. V tabulce 2 jsou uvedeny vždy vypočítané průměrné hodnoty měření peaků všech pěti rostlin v rámci každého analyzovaného genotypu.

V první části vyhodnocení byla provedena kontrola zaslaných genotypů podle internetové databáze MGIS (Tab. 1). Podle seznamu zaslaných rostlin by se ve všech případech mělo jednat o triploidní AAB genotypy – Plantain banánovníky s genomem AAB a jednoho diploidního zástupce banánovníku.

Stanovení ploidie pomocí průtokové cytometrie potvrdilo, že 98 zaslaných genotypů bylo triploidních, což se shodovalo také s údaji v databázi MGIS – databáze, kterou spravuje genová banka (Tab. 2)

U dvou položek popsaných jako triploidní, ITC0517 – Orishele a ITC0735 – Diby 1, bylo zjištěno, že jsou diploidní a jedna položka ITC0537 - Not Named Musa paradisiaca x, byla identifikována jako tetraploidní. (Tab. 3) Položka ITC0774 byla pomocí průtokové cytometrie vyhodnocena jako triploidní, ačkoliv byla v databázi MGIS uvedena jako diploidní. (Tab. 2)

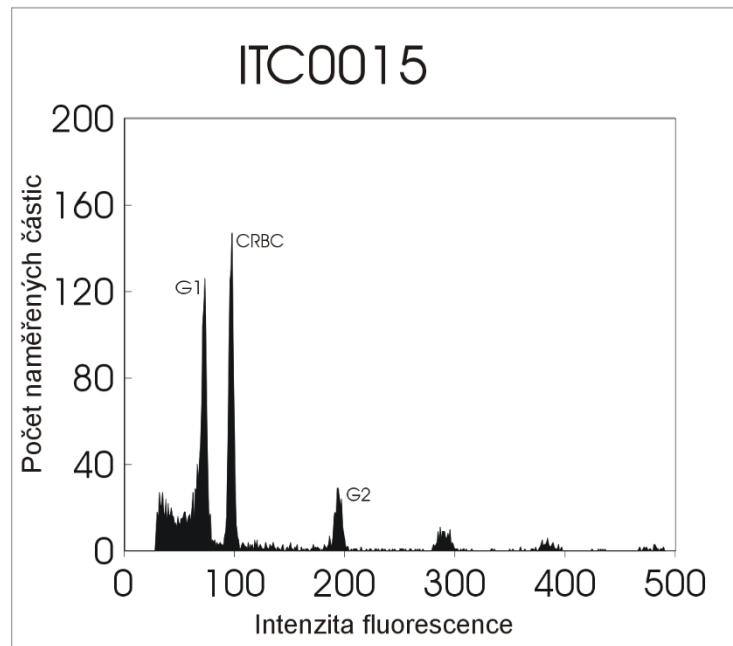
Tab. 2 – Výsledky stanovení ploidie banánovníků.

Jméno položky podle MGIS	Uvedená ploidie	Skupina	ITC kód	Průměrná hodnota poměrů peaků	Naměřená ploidie
Essang	3x	AAB	ITC0015	0,738	3x
Gabon 1	3x	AAB	ITC0016	0,743	3x
Gabon 2	3x	AAB	ITC0017	0,761	3x
Gabon 3	3x	AAB	ITC0018	0,732	3x
Moufoubila	3x	AAB	ITC0023	0,736	3x
Congo 2	3x	AAB	ITC0027	0,758	3x
Bungaoisan	3x	AAB	ITC0033	0,764	3x
Niangafelo	3x	AAB	ITC0044	0,749	3x
Diby 2	3x	AAB	ITC0054	0,786	3x

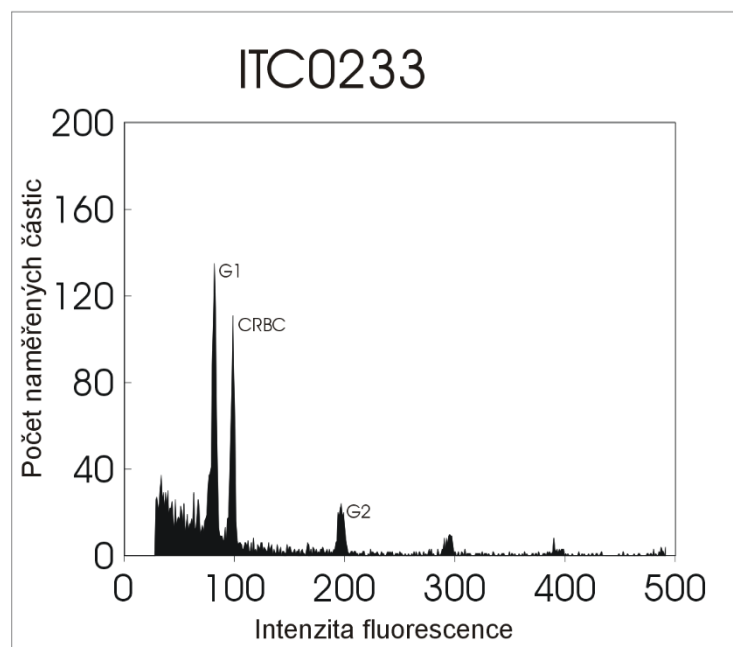
Bindi-Mossendjo	3x	AAB	ITC0057	0,765	3x
Gabon 4	3x	AAB	ITC0075	0,726	3x
Elar Icon	3x	AAB	ITC0097	0,731	3x
Moutoka 1	3x	AAB	ITC0102	0,745	3x
Moungeli	3x	AAB	ITC0103	0,751	3x
Asamienu	3x	AAB	ITC0122	0,775	3x
Tshambunu	3x	AAB	ITC0128	0,723	3x
Msisia	3x	AAB	ITC0142	0,724	3x
Mushuba	3x	AAB	ITC0146	0,783	3x
Isansi	3x	AAB	ITC0148	0,751	3x
Nyombe no.2	3x	AAB	ITC0193	0,736	3x
Okele	3x	AAB	ITC0194	0,738	3x
Kar Ngou	3x	AAB	ITC0196	0,740	3x
Moto French	3x	AAB	ITC0197	0,736	3x
Kelong Mekintu	3x	AAB	ITC0200	0,736	3x
Elat	3x	AAB	ITC0201	0,767	3x
Mbeta no.1	3x	AAB	ITC0202	0,753	3x
Niabang	3x	AAB	ITC0203	0,743	3x
Rose d'Ekona	3x	AAB	ITC0204	0,775	3x
French Rouge	3x	AAB	ITC0205	0,722	3x
Apantu	3x	AAB	ITC0223	0,728	3x
Ntanga 4	3x	AAB	ITC0226	0,783	3x
Ntanga 6	3x	AAB	ITC0227	0,734	3x
Ukom	3x	AAB	ITC0230	0,806	3x
Apem Onniaba	3x	AAB	ITC0231	0,773	3x
Egjoga	3x	AAB	ITC0232	0,724	3x
Mbirinyong	3x	AAB	ITC0233	0,738	3x
Ngok Egome	3x	AAB	ITC0236	0,787	3x
Monganga	3x	AAB	ITC0237	0,733	3x
76.22	3x	AAB	ITC0238	0,700	3x
Banane serpent	3x	AAB	ITC0282	0,744	3x
Dwarf French Plantain	3x	AAB	ITC0321	0,752	3x
Purple pseudostem plantain	3x	AAB	ITC0323	0,774	3x

Red Plantain Hembra	3x	AAB	ITC0324	0,731	3x
Horse Plantain	3x	AAB	ITC0326	0,725	3x
Pisang Lang	3x	AAB	ITC0327	0,733	3x
Red Plantain Macho	3x	AAB	ITC0328	0,776	3x
Plantain no. 3 (PX3)	3x	AAB	ITC0350	0,740	3x
Plantain no. 17	3x	AAB	ITC0352	0,752	3x
Corne 4	3x	AAB	ITC0390	0,713	3x
Bamileke	3x	AAB	ITC0391	0,735	3x
Plantain Baja 2	3x	AAB	ITC0483	0,733	3x
Ntanga 3	3x	AAB	ITC0487	0,776	3x
Nyiretia Apem	3x	AAB	ITC0491	0,740	3x
Nyiretia Apantu	3x	AAB	ITC0492	0,728	3x
Borodehene	3x	AAB	ITC0493	0,739	3x
Borodewuio	3x	AAB	ITC0494	0,717	3x
Osakro	3x	AAB	ITC0495	0,745	3x
Cantebalon	3x	AAB	ITC0496	0,709	3x
Ngomba	3x	AAB	ITC0497	0,768	3x
Plantain no.3	3x	AAB	ITC0498	0,783	3x
Obubit Ntanga 2	3x	AAB	ITC0499	0,738	3x
Orishele	3x	AAB	ITC0517	0,506	2x
Kiogo	3x	AAB	ITC0518	0,741	3x
Mbi Egome 3	3x	AAB	ITC0520	0,731	3x
Madre del Platanar	3x	AAB	ITC0521	0,738	3x
Not Named	3x	AAB	ITC0537	1	4x
Musa paradisiaca x					
Curare	3x	AAB	ITC0558	0,785	3x
Dwarf French Plantain	3x	AAB	ITC0561	0,781	3x
Horn Plantain	3x	AAB	ITC0586	0,721	3x
Hartón Marqueo	3x	AAB	ITC0628	0,718	3x
Dominico Hartón Rojo	3x	AAB	ITC0630	0,768	3x
Hartón Tigre	3x	AAB	ITC0642	0,743	3x
Plátano Hartón	3x	AAB	ITC0645	0,765	3x
Diby 1	3x	AAB	ITC0735	0,536	2x
Essong	3x	AAB	ITC0741	0,752	3x

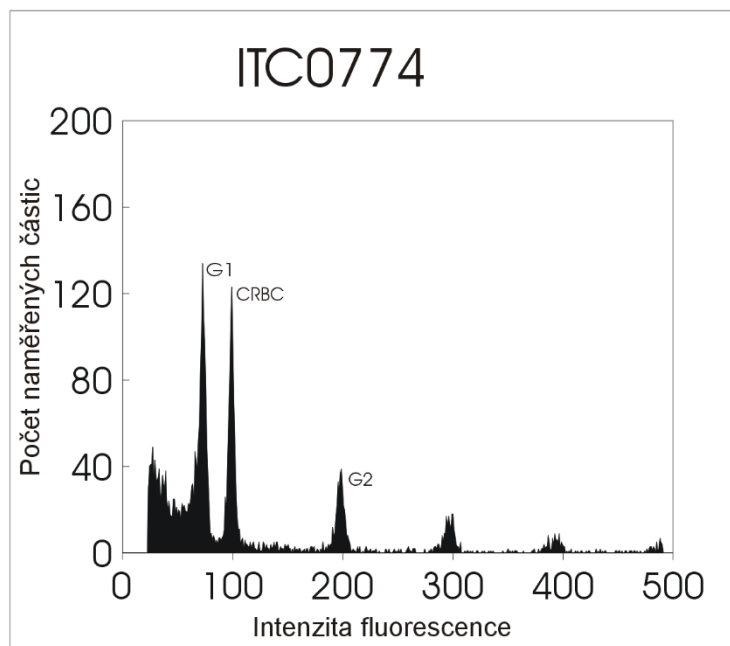
Corne 1	3x	AAB	ITC0754	0,745	3x
Owang Rouge	3x	AAB	ITC0757	0,743	3x
Yenai	2x	AA	ITC0774	0,728	3x
Kumunamba	3x	AAB	ITC0824	0,756	3x
3/4 Nain	3x	AAB	ITC0959	0,782	3x
Px1/Amou	3x	AAB	ITC0961	0,720	3x
Amou	3x	AAB	ITC0963	0,773	3x
Ovang	3x	AAB	ITC0964	0,778	3x
Libanga Liboelabokoi	3x	AAB	ITC1041	0,763	3x
Libanga Lifombo	3x	AAB	ITC1042	0,744	3x
Wangala	3x	AAB	ITC1044	0,768	3x
Lokoka	3x	AAB	ITC1045	0,777	3x
Litete	3x	AAB	ITC1050	0,741	3x
Owang Vert	3x	AAB	ITC1073	0,792	3x
Njombe No.2	3x	AAB	ITC1124	0,760	3x
French Clair	3x	AAB	ITC1125	0,789	3x
18 Corne Rouge	3x	AAB	ITC1128	0,743	3x
Moto Ebanga	3x	AAB	ITC1131	0,764	3x
French Rouge	3x	AAB	ITC1134	0,731	3x
Messiatso	3x	AAB	ITC1153	0,730	3x
Curare	3x	AAB	ITC1165	0,720	3x
Mzuzu ya Kati	3x	AAB	ITC1221	0,775	3x
Mbouroukou no.1	3x	AAB	ITC1285	0,767	3x
Kelong Mekintu	3x	AAB	ITC1286	0,777	3x
Kelong Mekintu	3x	AAB	ITC1326	0,728	3x
"French Reversion, red-dish pseudostem"	3x	AAB	ITC1397	0,755	3x
Zanzebar	3x	AAB	ITC1471	0,771	3x



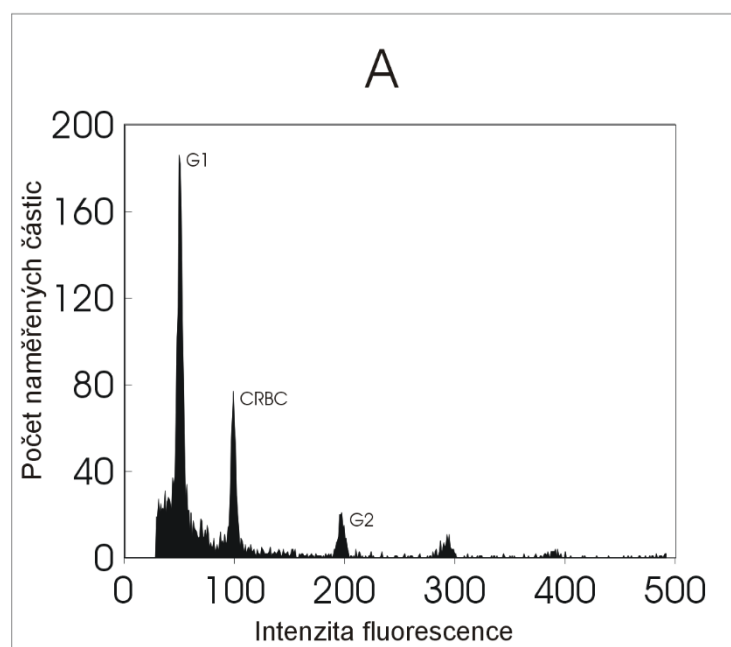
Obr. 8 – Histogram znázorňující relativní intenzitu fluorescence kuřecích erytrocytů (kanál 100) a jader banánovníků ITC0015 – Essang v G1 fázi buněčného cyklu. Poměr mezi relativní intenzitou fluorescence jader banánovníku a kuřecích erytrocytů byl v pěti měřeních 0,723; 0,735; 0,755; 0738; 0,750, jedná se tedy ve všech pěti případech o triploidní genotyp.

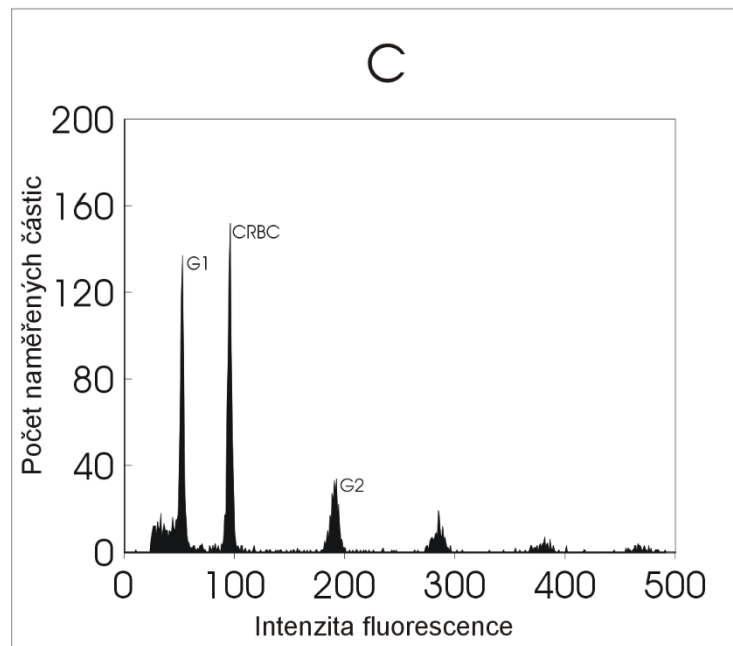
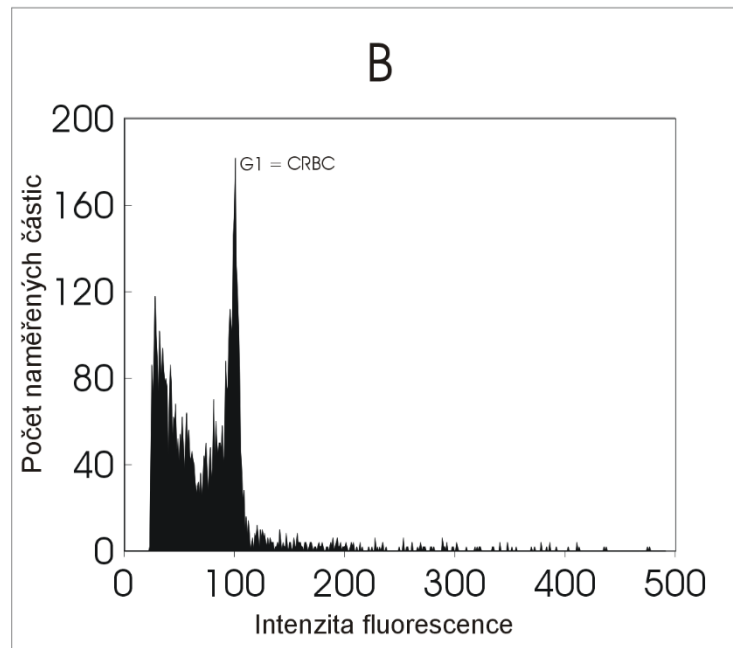


Obr. 9 – Histogram znázorňující relativní intenzitu fluorescence kuřecích erytrocytů (kanál 100) a jader banánovníku ITC0233 - Mbirinyong v G1 fázi buněčného cyklu. Poměr mezi relativní intenzitou banánovníku ITC0233 a kuřecích erytrocytů byl v pěti měřeních 0,737; 0,743; 0,745; 0723; 0,744, jedná se tedy ve všech pěti případech o triploidní genotyp.



Obr. 10 – Histogram znázorňující relativní intenzitu fluorescence kuřecích erytrocytů (kanál 100) a jader banánovníku ITC0774 – Yenai, v G1 fázi buněčného cyklu. Poměr mezi relativní intenzitou fluorescence jader banánovníku a kuřecích erytrocytů byl v pěti měřeních 0,722; 0,733; 0,710; 0735; 0,741, jedná se tedy ve všech pěti případech o triploidní genotyp.





Obr. 11 – Histogramy znázorňující relativní intenzitu fluorescence kuřecích erytrocytů (kanál 100) a jader banánovníků u genotypů: A. ITC0517 – Orishele, B. ITC0537 - Not Named *Musa paradisiaca* x, C. ITC0735 - Diby 1 v G1 fázi buněčného cyklu.

Tab. 3 – Přesné výsledky cytometrické analýzy položek, u kterých se stanovená ploidy neshoduje s databází MGIS.

Genotyp	<i>Musa</i> (channel)	CRBC (channel)	Poměr	
			(<i>Musa</i>/CRBC)	Stupeň ploidy
ITC517_1	50,93	99,39	0,512	2x
ITC517_2	50,86	99,72	0,510	2x
ITC517_3	48,86	97,81	0,500	2x
ITC517_4	50,62	99,95	0,506	2x
ITC517_5	50,28	99,72	0,504	2x
ITC0537_1	100,06	100,06	1	4x
ITC0537_2	101,97	101,97	1	4x
ITC0537_3	103,03	103,03	1	4x
ITC0537_4	101,08	101,08	1	4x
ITC0537_5	105,65	105,65	1	4x
ITC735_1	52,01	99,62	0,522	2x
ITC735_2	54,5	100,83	0,541	2x
ITC735_3	53,16	97,94	0,543	2x
ITC735_4	51,56	97,01	0,531	2x
ITC735_5	52,45	96,47	0,544	2x

4 Diskuze

Plantainy, triploidní zástupci škrobových banánovníků, představují jednu ze základních potravin lidí v oblastech Afriky. Stejně jako i další jedlé typy banánovníků, jsou i Plantainy náchylné vůči různým chorobám a škůdcům, kteří velmi významně snižují jejich úrodu. V dřívější době se Plantainy rozlišovaly jen na základě jejich morfologie, což se ukázalo jako nepřesné a je třeba taxonomii upravit na základě genetických informací a díky molekulárním metodám. U mnoha genotypů se také stalo, že byly v různých oblastech označeny pod různými názvy, tedy pro jeden genotyp banánovníku existuje více jmen, a proto je třeba taxonomii sjednotit. Objasnování příbuznosti u Plantainů může vést k nacházení genetických podstat různých rezistencí a k pochopení jejich evoluce. Tyto poznatky mohou být užitečné např. ve šlechtitelských programech.

Identifikace a uchovávání planých i jedlých typů banánovníku je důležité pro záchranu genofondu této důležité plodiny. Uchování genetické diverzity rostlin je jednou ze základních činností Bioversity International. Cílem genové banky banánovníku je uchovávání cenných jedlých typů banánovníků ale také rozmanitých planých druhů, které se dají využít pro šlechtění odolnějších odrůd. V současné době uchovává genová banka banánovníku (International Transit Centre, Lovaň, Belgie) přes 1500 položek. Zároveň jsou do banky zasílány stále nové, především plané typy banánovníku (www.bioversityinternational.org).

Vzhledem k tomu, že genová banka banánovníku neslouží jen pro uchování cenných druhů, ale také pro distribuci materiálů jednotlivým šlechtitelům, je velmi důležité charakterizovat jednotlivé položky. Navíc, jak již bylo uvedeno, jedlé klony banánovníku jsou v různých místech jejich rozšíření známy pod rozdílnými názvy a díky tomu, se tyto genotypy mohou v genové bance vyskytovat opakovaně. Kromě problémů s duplikáty vzorků, může v genové bance banánovníku docházet i k záměně jednotlivých položek při jejich přepasáží a nebo ke vzniku somaklonální variability v důsledku jejich uchování in vitro.

Záměna položek vyznačujících se různým stupněm plodnosti nebo různou velikostí genomu, stejně tak jako odhalení somaklonální variability je možné pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda dokáže ve velmi krátkém čase analyzovat velký počet jednotlivých rostlin a identifikovat tak problematické položky velmi rychle.

Analýza 102 zaslaných položek pomocí průtokové cytometrie prokázala, že u převážné většiny zaslaných položek (98 položek) se jednalo skutečně o triploidní

rostliny. Cytometrická analýza s využitím kuřecích erytrocytů jako interního standartu poskytla typický poměr peaku G1 jader banánovníku a kuřecích erytrocytů. U těchto zanalyzovaných položek byl poměr mezi těmito peaky průměrně 0,75, což nám s jistotou určuje triploidní charakter dané rostliny. U některých genotypů, ale můžeme sledovat variabilitu těchto poměrů. Například u genotypu ITC0230 byl naměřený poměr mezi peaky vyšší (0,804). Poměry peaků některých položek (ITC0238) byl naopak nižší než průměr (0,700). Tyto odchylky mohou být zapříčiněny rozdílnou velikostí genomů jednotlivých genotypů Plantain banánovníků. Položky, jejichž naměřené poměry mezi peaky jsou vyšší, by mohli mít větší genom, než položky z nižšími poměry mezi peaky. Další vysvětlení by mohlo být ve funkci použitého barviva DAPI. Toto barvivo se přednostně váže na sekvence bohaté na adenin a thymin. Je tedy možné, že variabilita poměrů mezi peaky je zapříčiněná rozdílnými poměry mezi AT/GC páry bází v genomech jednotlivých položek.

Cytometrická analýza odhalila také diploidní charakter dvou analyzovaných položek - Orishele - ITC0517 a Diby 1 - ITC0735, které jsou popsány jako zástupci triploidních jedlých Plantain banánovníků. Diploidní charakter těchto položek jednoznačně vylučuje, že se jedná o Plantainy, respektive jiné triploidní klony. Na základě cytometrické analýzy budou tyto položky buďto vyřazeny z distribuce genové banky nebo po následné analýze pomocí SSR genotypovací platformy (Christelová, et al., 2011) bude upřesněna jejich taxonomická klasifikace a tyto informace budou začleněny také do databáze MGIS. Další položka, která v rámci předkládané práce poskytla rozdílné výsledky, byla Not Named Musa paradisiaca x ITC 0537. Tento klon banánovníku by dle databáze MGIS měl také náležet k triploidním Plantainům, avšak ve skutečnosti je tetraploidní. Stanovení rozdílné ploidie u zástupců popsaných jako triploidní Plantain banánovník naznačuje buďto jejich špatnou charakterizaci (nedostatečné rozlišení pomocí morfo-taxonomických znaků) nebo také případnou záměnu položek v genové bance.

Poslední položkou, která byla pomocí průtokové cytometrie identifikována jako problematická je Yenai - ITC0074, která je popsána jako diploidní zástupce *M. acuminata*, určila její triploidní charakter.

Všechny banánové položky, které po cytometrické analýze poskytly nejednoznačné nebo rozdílné výsledky (vzhledem k informacím uvedeným v databázi MGIS), budou znovu zaslány z genové banky zaslány opakovaně analyzovány, aby se jednoznačně vyloučila záměna položek při neopatrné manipulaci s in vitro rostlinami.

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo rozšířit znalosti o rostlinách rodu *Musa* a konkrétněji o jedlých triploidních Plantain banánovnících. Dalším cílem bylo osvojit si metodiku průtokové cytometrie a zaměřit se na problematiku měření ploidie u rostlin rodu *Musa*.

Hlavním cílem praktické části bakalářské práce bylo určit stupeň ploidie u vybraných rostlin banánovníků a dokázat jejich příslušnost do skupiny Plantain banánovníků. Za tímto účelem bylo zasláno 102 různých genotypů rodu *Musa*, které podle genové banky v Lovani patřily všechny do skupiny Plantain banánovníky. Každý z těchto genotypů byl reprezentován pěti *in vitro* rostlinami. Mým úkolem bylo potvrdit jejich triploidní charakter jak podle databáze MGIS, tak podle vlastní analýzy na průtokovém cytometru.

Ve vlastním měření bylo zanalyzováno všech 102 genotypů rodu *Musa* (101 triploidních klonů a 1 diploidní druh) zaslanych z genové banky v Lovani podle databáze MGIS. Cytometrická analýza prokázala triploidní charakter u 98 zástupců a potvrdila tak údaje uvedené v databázi MGIS, která mimo jiné slouží k objednávání položek banánovníku. U tří položek byla identifikována jiná ploidie, než kterou by tyto zástupci, dle jejich taxonomické klasifikace, měli mít. Veškeré odchylky, které mé měření ukázalo, by mohlo být zapříčiněno záměnou položek v databázi MGIS, i v genové bance v kolekci ITC. Výsledky získané v předkládané bakalářské práci tak potvrdily nutnost podrobné analýzy položek banánovníku uchovávaných v genové bance, aby se předešlo distribuci špatně popsanych nebo zaměněných položek.

6 Seznam zkratek

ITC - The International Transit Centre

CRBC – Chicken Red Blood Cells - Fixované kuřecí erytrocyty

CV – Coefficient of variation – variační koeficient

EAHB – East African Highland Bananas

MGIS - Musa Germplasm Information System, Dostupné z: <http://www.crop-diversity.org/mgis>

FCM – Flow Cytometry – Průtoková cytometrie.

7 Seznam použité literatury

Bartoš, J., et al. "Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (*Musaceae*): taxonomic implications." *Cytogenetic and Genome Research* 109.1-3 (2005): 50-57.

Biodiversity international [online], "Conservation and availability of banana", Dostupné z: <http://www.biodiversityinternational.org/research-portfolio/conservation-use-of-bananas-tree-crops/banana/>

Biodiversity international [online], "Diversity of the genus *Musa*" (2001), Dostupné z: http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx_news/Musalogue_704.pdf

Čížková, J., et al. "Molecular analysis and genomic organization of major DNA satellites in banana (*Musa* spp.)." *PloS one* 8.1 (2013): e54808.

De Langhe, E., et al. "Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication." *Ethnobotany Research and Applications* 7 (2009): 165-177.

De Langhe, E., et al. "Integrating morphological and molecular taxonomy in *Musa*: the African plantains (*Musa* spp. AAB group)." *Plant systematics and evolution* 255.3-4 (2005): 225-236.

De Langhe, E., and R. V. Valmayor. "French plantains in Southeast Asia." *Newsletter-Regional Committee for Southeast Asia (IBPGR)* (1980).

De Vita, R., et al. "Evaluation of interspecific DNA content variations and sex identification in Falconiformes and Strigiformes by flow cytometric analysis." *Cytometry* 16.4 (1994): 346-350.

d'Hont, A., et al. "The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization." *Theoretical and Applied Genetics* 100.2 (2000): 177-183.

- Doležel, J., and J. A. N. Bartoš. "Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size." *Annals of Botany* 95.1 (2005): 99-110.
- Gibert, O., et al. "Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 1. Morphological and compositional characterization of cultivated colombian Musaceae (*Musa sp.*) in relation to consumer preferences." *Journal of agricultural and food chemistry* 57.17 (2009): 7857-7869.
- Häkkinen, M., "Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa (Musaceae)*." *Taxon* 62.4 (2013): 809-813.
- Cheesman, E. E., "Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L." *Kew Bulletin* (1947): 106-117.
- Christelová, P., et al. "A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers." *AoB Plants* 2011 (2011): plr024.
- IITA.ogr [online], International Institute of Tropical Agriculture, "Banana & Plantain", Dostupné z: <http://www.iita.org/banana-and-plantain>
- IPGRI, INIBAP, CIRAD. "Descriptors for Banana (*Musa spp.*). " IPGRI, Rome, Italy; INIBAP, Montpellier, France; CIRAD, France. 55 pp. (1996)
- Lassoudiere, A., "Quelques aspects de la croissance et du developpement du bananier „Poyo“ en Cote d’Ivoire. 2. " Le système radical. *Fruits*, 33, (1978), 314 – 38.
- Li, L., et al. "Origins and domestication of cultivated banana inferred from chloroplast and nuclear genes." *PloS one* 8.11 (2013): e80502.
- Lysak, M. A., et al. "Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*." *Theoretical and Applied Genetics* 98.8 (1999): 1344-1350.
- Manzo-Sánchez, G., et al. "Genetic Diversity in Bananas and Plantains (*Musa spp.*) ", *Molecular Approaches to Genetic Diversity*, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.)

[online]., InTech, (2015), DOI: 10.5772/59421. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/molecular-approaches-to-genetic-diversity/genetic-diversity-in-bananas-and-plantains-musa-spp->

Otto, F., "DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA." *Methods in cell biology* 33 (1990): 105-110.

Promusa [online], "Morphology of the banana plant" (2015), Dostupné z: <http://www.promusa.org/Morphology+of+banana+plant>

Promusa [online], "Fei bananas" (2011), Dostupné z: <http://www.promusa.org/Fei+bananas>

Raboin, L., et al. "Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors." *Molecular breeding* 16.4 (2005): 333-341.

Robinson, J. P., and Grégori, G., "Principles of flow cytometry." *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes* (2007): 19-40.

Simmonds, N W, "Bananas", (1966)

Simmonds, N W, Stover, R H, "Bananas." *Bananas* (1987).

Suda, J. "Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií." *Živa* 53.1 (2005): 46-48.

Swennen R, Rosales F., "Bananas". *Encyclopedia of agricultural, science*, vol 1 (1994): 215–232

Swennen, R. "Plantain Cultivation under West Africa Conditions: A Reference Manual". IITA, 1990.

Tezenas du Montcel, H., De Langhe, E. and Swennen, R., "Essai de classification des bananiers plantains (AAB)." *Fruits* (1983).

Ude, G., et al. "Genetic diversity in an African plantain core collection using AFLP and RAPD markers." *Theoretical and Applied Genetics* 107.2 (2003): 248-255.

Vézina, A, Van den Bergh, I, International Transit Centre (ITC). ProMusa [online]. 2016 Dostupné z: <http://www.promusa.org/ITC>