

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 např. 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. Omezíme se proto pouze na malou ukázkou možnosti a budeme sledovat přínos FCM pro biosystematické studie cévnatých rostlin.

Princip průtokové cytometrie

Název průtoková cytometrie dobře odráží dvě základní charakteristiky metody: veškerá měření se uskutečňují v pohybu a zaznamenávají bývají vybrané optické vlastnosti jednotlivých částic (např. buněk), z nichž nejčastější bývá intenzita fluorescence. Teoretický základ cytome-

trických analýz je poměrně jednoduchý. Před vlastním měřením (např. obsahu jaderné DNA) se na dvoušroubovici nukleové kyseliny naváže fluorescenční barvivo (fluorochrom). Ozáříme-li toto 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 vzá-

pětí vracejí 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 záření. Vhodně zvolenou kombinací filtrů lze pak obě záření oddělit a fluorescence pomocí průtokového cytometru měřit.

Mezi základní součásti každého cytometru patří průtoková komůrka, zdroj excitačního světla, optická soustava, soubor fotonásobičů a zesilovačů a část počítačová. Jádrem přístroje tvoří průtoková komůrka, jejímž úkolem je vyrovnat a seřadit analyzované částice tak, aby se pohybovaly jedna za druhou v úzkém středovém svazku přes ohnisko excitačního záření. V průtokové cytometrii se setkáváme se dvěma základními zdroji excitačního světla: lasery a vysokotlakými rtuťovými výbojkami, přičemž přístroj může být vybaven oběma z nich. Výsledná fluorescence částic je snímána optickou soustavou (sada filtrů a zrcadel) a převáděna na pulzy 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.

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 %, nicméně pro kritické analýzy je třeba držet se na dolní hranici uvedeného rozpětí (kolem 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 dvojnásobku CV.

Kvalitu analýz ovlivňuje i zvolené fluorescenční barvivo. Fluorochromy používané v cytometrické praxi lze rozdělit do tří základních skupin podle způsobu, jakým se vážou k nukleové kyselině. První z nich tvoří látky neselektivně se vmezeřující do dvoušroubovice DNA, což dovoluje stanovit celkové množství nukleové kyseliny (sem patří zejména propidium jodid a ethidium bromid). Druhá skupina zahrnuje barviva, jež se přednostně vážou k oblastem DNA bohatým na A-T báze (např. DAPI, DIPI, Hoechst). Největší popularity se dočkal první z nich, neboť jeho histogramy se obecně vyznačují velmi vysokou rozlišovací schopností. Poslední typ fluorescenčních barviv (mj. 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 především z důvodu snížené kvality analýz.

Původně byla průtoková cytometrie vyvinuta pro rychlé počítání a analýzu

Huseníček rolní (Arabidopsis thaliana) patří mezi kvetoucí rostliny s nejmenším genomem (množstvím jaderné DNA)



Zcela na opačném konci spektra než buseníček rolní stojí rebčičky — na snímku *Fritillaria hispanica*. Vyznačují se velkým množstvím jaderné DNA, vlevo ♦ Průtoková cytometrie otevírá možnost pro detailní studie karyologické variability i u kriticky ohrožených druhů, k nimž se řadí např. prstnatec plamatý (*Dactylorhiza maculata*), vpravo. Snímky J. Sudy

krečních buněk. Na konci 70. let 20. stol. 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 se stále častěji využívá ke studiu rostlin (zcela první studie pracující s rostlinným materiálem se objevila již v r. 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. Bylo proto nezbytné najít postup, který by umožnil jejich převedení do formy použitelné pro průtokovou cytometrii. Průlom nastal v r. 1983, kdy byla poprvé představena rychlá metoda mechanické izolace jader jednoduchým rozsekáním pletiv v hypotonickém roztoku.

Přednosti FCM

Hlavními přednostmi průtokové cytometrie jsou jednoduchá příprava vzorků, vysoká rychlost analýz, nedestruktivnost, možnost analyzovat širokou škálu pletiv, nezávislost na dělicích se buňkách, snadná detekce 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 cm², ta se vloží do Petriho misky obsahující vychlazený hypotonický izolační roztok obohacený fluorescenčním barvivem a pomocí ostré žiletky nebo skalpelu se pečlivě rozseká.

Vlastní 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 chromozomů 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 např. 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. Nicméně pro průtokovou cytometrii lze využít prakticky všech rostlinných orgánů — od kořenů přes lodyhy, kališní a korunní lístky až po semena a snad jen dužnaté plody neumožňují 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 chromozomů klasickými karyologickými postupy a ve svých preparátech marně hledal jádra v metafázi, jež jako jediná počítání chromozomů dovolují.

Vzhledem k tomu, že intenzita fluorescence každé jednotlivé částice bývá snímána samostatně, lze lehce odhalit směsné vzorky, endoreduplikaci (zmmoženi 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.

Mezi nesporné přednosti cytometrie patří i nízké finanční náklady analýzy, které se pohybují v rozmezí několika desítek korun za vzorek. I s nízkým 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 této metody.

Omezení

Žádná metoda není úplně dokonalá a také průtoková cytometrie má své slabé stránky. Asi největší omezení představuje

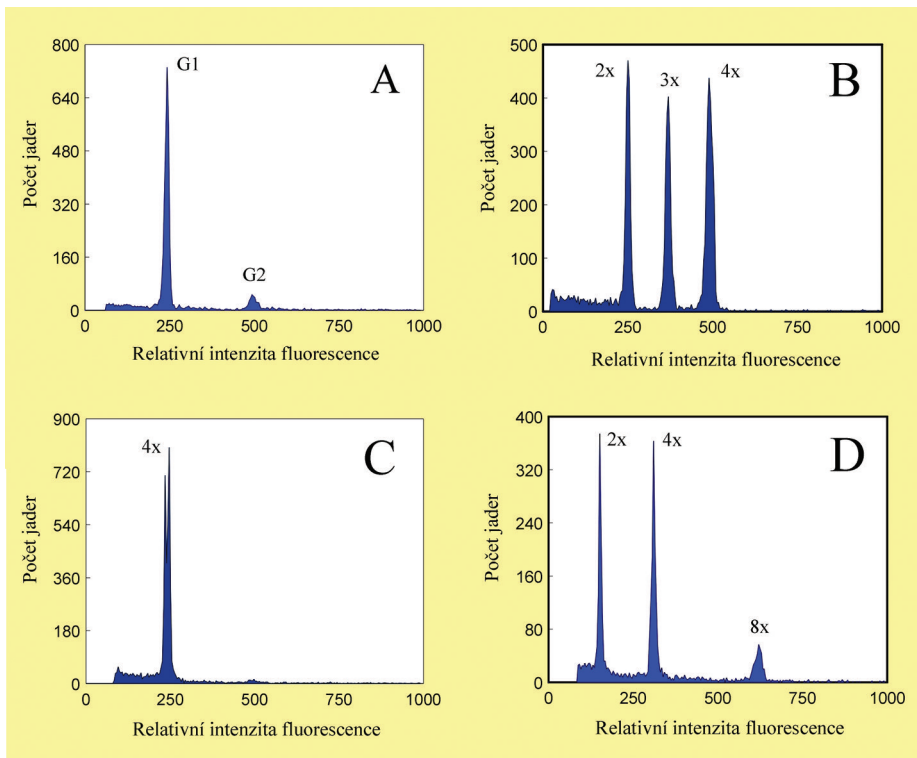
nutnost pracovat ve většině případů s čerstvým, živým materiálem. Tato skutečnost do značné míry snižuje využití FCM v terénní botanické praxi, neboť analýzy musí být provedeny v krátké době po odběru rostlinného materiálu a většinou tedy nezbyvá nic jiného, než podstoupit pravidelné přesuny z terénu do laboratoře.

Klasické počítání chromozomů v roztokových preparátech vítězí nad cytometrií v citlivosti detekovat aneuploidní jedince (tj. jedince lišící se o několik málo chromozomů), přídatné (= B) chromozomy a v možnosti sledovat přítomnost satelitů či nápadných (= marker) chromozomů. Schopnost odlišit jeden přebývajícím nebo naopak jeden chybějícím chromozom pomocí cytometrie většinou končí u druhů se somatickým počtem asi $2n = 30$. U vyšších počtů je již podíl hmoty připadající na jeden chromozom 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 znepříjemnit studium např. kakostovitých (*Geraniaceae*), růžovitých (*Rosaceae*), četných jehličnanů, některých kapradorostů atd. Podobné organické kyseliny přítomné v pletivech tučnolistých (*Crassulaceae*) či dalších rostlin s CAM metabolismem silně snižují pH vzniklé jaderné suspenze, což se také nepříznivě odráží v kvalitě histogramů.

Využití

Bezpochyby nejčastější aplikací průtokové cytometrie v botanických studiích bývá stanovení ploidního stupně analyzovaného materiálu. Polyploidní typy na rozdíl od svých diploidních příbuzných mají zmmoženou chromozomovou sádku a obsahují tři až zhruba 80 (!) kopií téhož chromozomu. Polyploidizace je mezi cévnatými rostlinami velmi častým jevem a odhady hovoří, že 60–80 % druhů vzniklo tímto způsobem.



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 buněčného cyklu), ve dvojnásobné vzdálenosti se nacházejí 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) Odbalení 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), dvojnásobným (4x) a čtyřnásobným (8x) obsahem DNA. Orig. J. Suda

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 chromozomů. Značně perspektivní oblastí se jeví analýza složení genomu allopolyploidních taxonů, které kombinují genomy dvou (či více) rodičovských typů. Daný postup nalézá uplatnění např. v hybridogenní skupině chlupáčků (*Pilosella*), kde genom jednoho ze základních druhů (*P. officinarum*) vykazuje průkazně menší velikost oproti jiným druhům téže ploidy a tato skutečnost se pak odráží i v obsahu DNA hybridně vzniklých polyploidních potomků.

Zcela jedinečnou aplikací průtokové cytometrie představuje stanovení reprodukčního způsobu na základě určení ploidy 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 ploidní stupně u embrya a pět u endospermu a jejich vzájemným porovnáním pak jednoznačně určit, jaký způsob se na vzniku semen podílel. U diploidních pohlavně se rozmnožujících krytosemenných rostlin bude např. 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 nepřímou pomocí genetické (např. izozymové) variability. Žádná z uvedených 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 do budoucna nadále stoupne a četné pozoruhodné objevy a překvapení na sebe nedají dlouho čekat.

Pouhá znalost ploidy 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 např. skupinu rozrazilu břechtanolistého (*Veronica hederifolia* agg.) se třemi druhy, svízele bílého (*Galium album* agg.) se dvěma druhy, šichy černé (*Empetrum nigrum* agg.) se shodným počtem taxonů, z kapradorostů pak skupinu kapradě samce (*Dryopteris filix-mas* agg.) nebo osladiče obecného (*Polypodium vulgare* agg.). Průtoková cytometrie u nich během velmi krátké doby dovoluje určit ploidiu a tím i druhovou příslušnost. Jednoznačné určení kříženců v takových skupinách leží zcela mimo možnosti klasické morfologické systematiky a znalost ploidy (či počtu chromozomů) 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 je každý taxon charakterizován jedinou ploidní úrovní. Existují však i druhy vytvářející populace s několika rozdílnými ploidními. Mezi takové „víceploidní“ taxony patří např. 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 popsání jev je nepochybně častější, než se předpokládalo, a kvůli omezenému množství karyologicky ověřených jedinců tak dosud unikalo 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 odpovědí

na tyto 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. Neocenitelnou pomocí poskytuje průtoková cytometrie při experimentální hybridizaci či polyploidizaci, jejichž cílem je výběr vhodných cytotypů. Limitujícím faktorem takových studií často bývají omezené prostorové možnosti pro pěstování velkého množství potomstva. Díky cytometrii lze však již velmi záhy po vysetí stanovit ploidiu semenáčků, jedince požadovaných vlastností vybrat a dále kultivovat a zbytek jednoduše odstranit. Je nasnadě, že se tak výrazně sníží finanční náročnost pěstebního postupu.

Při stanovení ploidy 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 (pg). Obecně se cévnaté rostliny vyznačují značnou variabilitou obsahu DNA, jež se pohybuje přibližně mezi 0,1 pg (některé brukvovité či jahoda trávničky) až 125 pg (řebčíky z čel. 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 fylogenetické 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),