

Chloroplasty řas v konfokálním mikroskopu

Pavel Škaloud

Autor věnuje honorář Nadaci Živa

Chloroplasty představují specializované orgány rostlinných buněk vybavené vlastní DNA i ribozomy. Předpokládá se, že chloroplasty dnešních rostlin jsou potomky volně žijících fotosyntetických sinic, které byly v dávné minulosti pohlceny mnohem většími heterotrofními organismy, s nimiž posléze vytvořily těsný symbiotický vztah (viz též Živa 2006, 1: 2–5). V těchto organelách obsahujících fotosyntetické pigmenty, z nichž nejdůležitější je zelené barvivo chlorofyl, probíhá přeměna sluneční energie na energii chemických vazeb — fotosyntéza. Vnitřní prostor chloroplastu, tzv. stroma, je dějištěm Calvinova cyklu, série enzymatických reakcí produkujících cukry z oxidu uhličitého a vody. Tímto vnitřním prostorem chloroplastu prostupují tenké váčky nazývané thylakoidy, na jejichž membránách probíhá výše zmíněný proces fotosyntézy.

Chloroplasty vyšších rostlin (včetně mechorostů) mají jednoduchou strukturu — většinou jde o ploché váčky o průměru 4–8 μm . Jedna rostlinná buňka obsahuje zpravidla asi 10–50 chloroplastů. Chlorofyl je v nich nerovnoměrně rozptýlen, takže při bližším studiu je možné uvnitř chloroplastů rozpoznat oblasti s vyšším a nižším obsahem chlorofylu. Tento rozdíl je způsoben vnitřní organizací chloroplastů, které obsahují tzv. grana, což jsou místa s hustě nahluočenými thylakoidy, na jejichž membránách jsou přítomny fotosyntetické pigmenty. Jednotnost tohoto uspořádání chloroplastů u všech vyšších rostlin poukazuje na nalezení optimální formy této organely v raných stádiích evoluce, která již nebyla po dlouhou dobu změněna.

Zcela odlišná situace panuje u zelených řas — autotrofních jednobuněčných či mnohobuněčných mikroorganismů žijících převážně ve sladkovodních či terestrických biotopech. Jednobuněčné kokální řasy jsou tvarově velmi uniformní (většinou jsou to jednoduché kuličky); jejich chloroplasty na rozdíl od chloroplastů vyšších rostlin neobsahují grana, zato se však vyznačují až nepředstavitelnou rozmanitostí tvarů. Kvůli jednoduchému tvaru buněk a stejné pravděpodobnosti osvětlení buňky takřka z jakékoli strany je pro zelené kokální řasy výhodné vyplnit částmi chloroplastu rovnoměrně

celý vnitřek buňky. Zdá se, že při hledání způsobu nejefektivnějšího vyplnění buněk chloroplastem se různé skupiny řas vydaly dvěma různými cestami. Zástupci některých rodů mají ve svých buňkách mnoho jednoduchých chloroplastů, vyplňujících rovnoměrně buď celý vnitřek, nebo periferní vrstvu buňky. U jiných rodů nalezneme v buňce pouze jediný chloroplast, jehož části pak zaplňují téměř celý obsah buňky. Z centrální části chloroplastu vybíhají k periférii buňky laloky různých tvarů a velikostí, nebo je celá buňka prostoupena chloroplastem síťovité struktury. Detailní pozorování takto složitě strukturovaných organel pouze pomocí světelného mikroskopu je ovšem velmi náročné, ne-li nemožné.

Ke konci 80. let 20. stol. se v biologii objevila nová zobrazovací metoda konfokální mikroskopie, která zásadním způsobem rozšířila možnosti pozorování živých objektů (viz Živa 2006, 6: 245–248). Její princip byl patentován již v r. 1957, širší uplatnění však tato technika našla až o tři desetiletí později. V čem spočívají její hlavní přednosti? Pomocí speciální konfokální clonky je skryto zobrazení oblastí nad a pod rovinou zaostření a tím je odstraněno „rozmazání“ obrazu, které vzniká při pohledu na silnější vzorky v klasickém optickém mikroskopu. Trojrozměrný objekt zobrazený

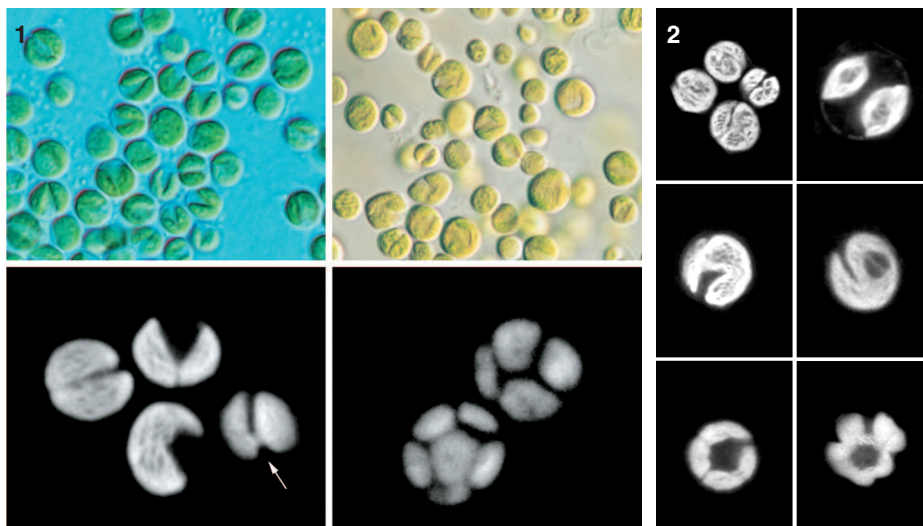
pomocí konfokálního mikroskopu je pak možné virtuálně nařezat na mnoho optických rovin a ty pak dále počítačově zpracovávat. Konfokální mikroskopie se tak stala ideálním nástrojem i pro studium strukturně složitých chloroplastů.

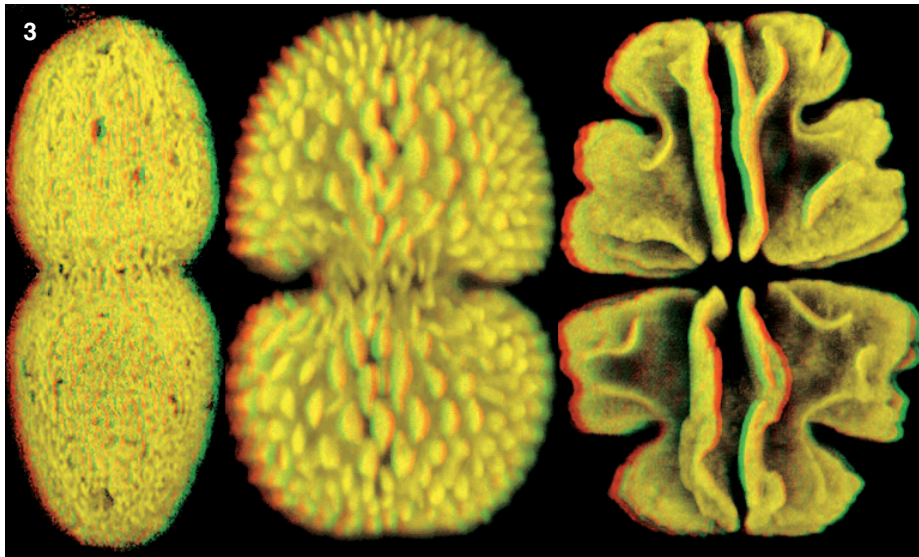
První pozorování rostlinných buněk konfokálním mikroskopem uskutečnili v r. 1989 američtí vědci z University of California. Jednoduše vložili celé listy rostlin mezi podložní a krycí sklo a pozorovali počet a rozložení jednotlivých gran chloroplastu. Jednou z prvních rostlin, které byly takto prozkoumány, byla i známá a velmi akvaristy oblíbená vodní rostlina rodu *Hygrophila*. Pozdější výzkumy chloroplastů u všech vyšších rostlin pak odhalily nenáhodné uspořádání gran do spirálovitých struktur. V současné době se konfokální mikroskopie zcela běžně využívá při studiu chloroplastů vyšších rostlin, při studiu chloroplastů řas — velké a velmi diverzifikované skupiny autotrofních organismů — se však využívá zatím jen velmi sporadicky. K průkopníkům použití této metody pro studium řas patří australský profesor botaniky Brian Gunning, který na základě konfokální mikroskopie poukázal na zásadní rozdíly v ultrastruktuře chloroplastů zástupců dvou fylogenetických větví *Chlorophyta* (zahrnující většinu zelených řas) a *Streptophyta* (do této skupiny patří všechny vyšší rostliny, z řas pak např. parožitky — třída *Charophyceae* a krásivky — řád *Desmidiiales*). Zjevné výhody a možnosti využití konfokální mikroskopie pro studium chloroplastů u řas jsou uvedeny v tomto příspěvku.

Počet a vnitřní struktura chloroplastů

I když se většina řas vyskytuje převážně ve vodním prostředí, nezanedbatelné množství druhů je také možno najít v aerofytických biotopech (tj. na skalách, na kmenech stromů, na zdech budov) či v půdě. Jen půdních řas již bylo nalezeno více než 1 000 druhů a stále se ve vědeckých studiích objevují popisy nových druhů či dokonce rodů žijících v tomto prostředí. Typický představitel půdních řas má velmi prostou strukturu: vypadá jako jednoduchá zelená kulička o průměru pouhých 10 μm , uvnitř s jedním či několika chloroplasty. Organismů této charakteristiky se v půdě vyskytuje velké množství, být malou kuličkou je v půdním

*Obr. 1 Dvě populace půdních řas zobrazené ve světelném (nahore) a konfokálním (dole) mikroskopu. V levé části obrázku buňky rodu *Chlorella*, které obsahují pouze jeden chloroplast. Ten je rozdělen na dva laloky přibližně stejné velikosti. (Spojení laloků můstkem je dobře zřetelné na buňce dole, označené šipkou.) V pravé části obrázku je zobrazena řasa rodu *Muriella*, v jejichž buňkách je přítomno mnoho jednoduchých chloroplastů. Obr. 2 V levém sloupci rozdily ve vnitřní struktuře chloroplastů zelených řas. Shora: *Muriella* sp. — chloroplast s výrazným rozdílem v rozložení chlorofylu, *Chlorella* sp. — síťovitá struktura chloroplastu, *Bracteacoccus minor* — homogenní chloroplast s rovnoměrným rozložením chlorofylu. V pravém sloupci struktura bílkovinného tělíska pyrenoidu u různých druhů řas. Shora: *Chlorella lobophora* — thylakoidy se vyskytují ve více oblastech pyrenoidu, *Lobosphaeropsis pyrenoidosa* — thylakoidy prostupují pouze centrální oblastí pyrenoidu, *Trebouxia* sp. — pyrenoid bez viditelné vnitřní struktury, blíže v textu*





Obr. 3 Rozdíly v povrchové struktuře chloroplastů řas krásivek (*Desmidiaceae*). Vlevo rod *Euastrum* s hrubým povrchem chloroplastu. Uprostřed a napravo krásivky rodu *Cosmarium* s povrchem chloroplastu rozděleným do mnoha malých hrbolek (uprostřed) či několika velkých laloků (vpravo). Foto B. Gunning

prostředí totiž pravděpodobně velmi výhodné. Problém však nastává při ekologických či floristických studiích půdních mikroorganismů, kdy je potřeba rozlišit jednotlivé morfologicky velmi podobné taxony.

Jedním z nejdůležitějších znaků používaných pro determinaci takových druhů řas je počet a tvar chloroplastů. Vzhledem k malým rozměrům buněk jsou však ve světelném mikroskopu tyto charakteristiky velmi špatně postihnutečné. Východiskem je pak

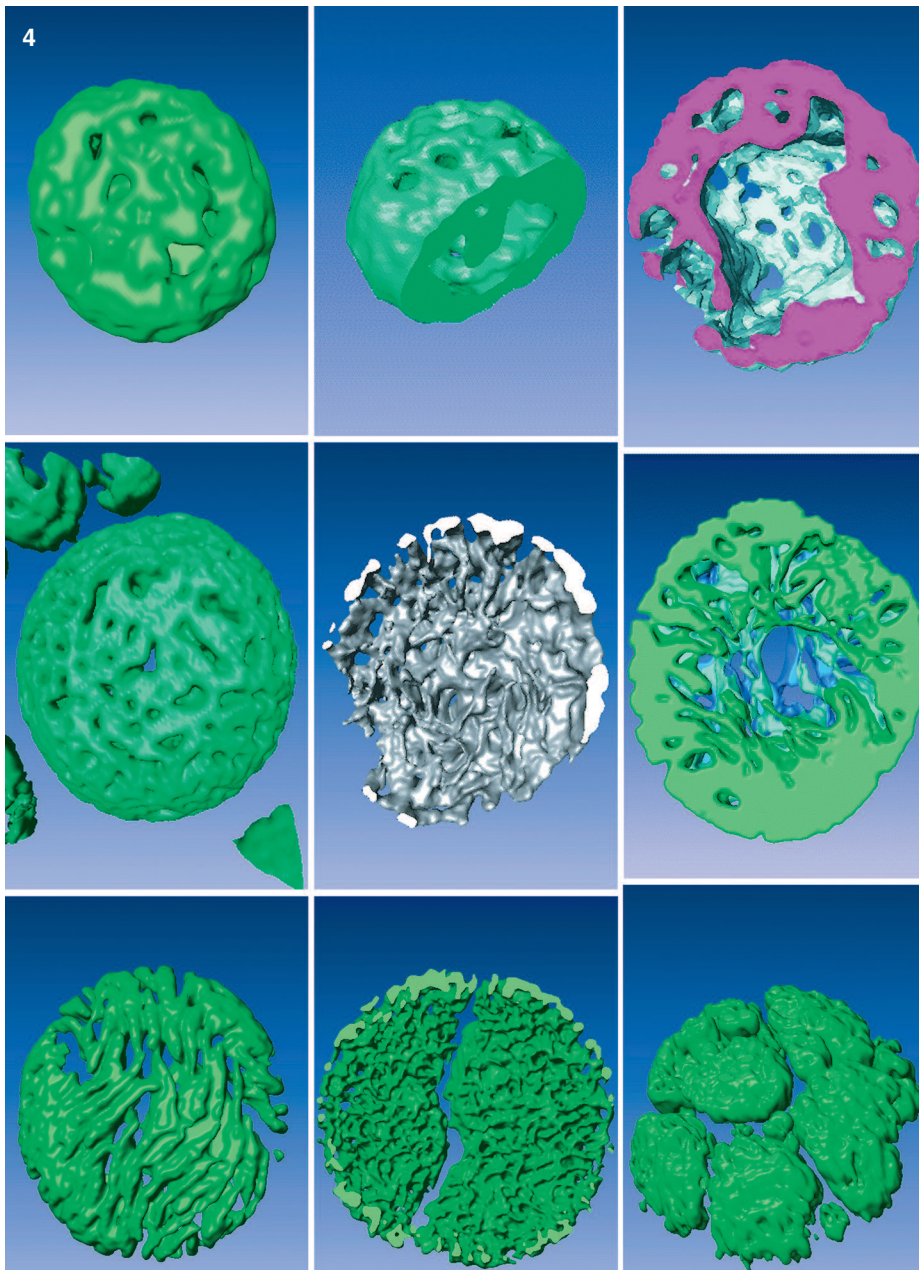
použití konfokální mikroskopie, která díky své vysoké rozlišovací schopnosti odhalí morfologii chloroplastů mnohem lépe. Na obr. 1 jsou buňky dvou populací půdních řas zobrazené ve světelném a konfokálním mikroskopu. U obou populací je velmi obtížné definovat tvar a počet chloroplastů, pokud je pozorujeme konvenčním světelným mikroskopem. Na obrázcích z konfokálního mikroskopu je však vidět výrazný rozdíl ve tvaru a počtu chloroplastů. Zatímco buňky první populace obsahují pouze jediný chloroplast rozdělený do dvou přibližně stejných laloků, buňky druhé populace obsahují několik chloroplastů jednoduché stavby. Díky sekvenčnímu snímání lze navíc u každé pozorované buňky přímo určit přesný počet jednotlivých chloroplastů.

Tím však výhoda konfokální mikroskopie při zkoumání chloroplastů zdaleka nekončí. Pomocí této zobrazovací techniky lze totiž zachytit i vnitřní ultrastrukturu chloroplastu. Jak již bylo řečeno, na rozdíl od vyšších rostlin se u řas nevyskytují grana. Přesto však lze najít rozdíly ve vnitřní struktuře chloroplastů jak mezi jednotlivými druhy řas (obr. 2, levý sloupec), tak i během životního cyklu jedné populace. V neposlední řadě je pak možné zkoumat vnitřní strukturu pyrenoidu, bílkovinného tělíska obsahujícího enzym RuBisCo (funkcí tohoto enzymu je vázat oxid uhličitý v temnostní fázi fotosyntézy). Tato struktura, vyskytující se pouze v chloroplastech řas a mechorostů hlevíků (*Anthoceroophyta*), byla prokázána jako druhově specifická. Doposud však byla jeho ultrastruktura studována pomocí technicky obtížné a časově náročné metody ultratenkých řezů na elektronovém mikroskopu. Zdá se však, že jisté rozdíly v ultrastruktuře pyrenoidu lze postihnout pouhým pozorováním buněk v konfokálním mikroskopu (obr. 2, pravý sloupec). Rozdíl mezi přímým pozorováním živých buněk konfokálním mikroskopem a několikadenní přípravou vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii je více než zřejmý.

Morfologie a ontogeneze chloroplastů

Mnohé rody řas mají velmi jednoduchý typ stélky, hojně se však setkáváme i se skupinami řas vyznačujícími se neobyčejnými

Obr. 4 Variabilita chloroplastu řasy *Dictyochloopsis splendida*. V horní řadě jsou zobrazeny rekonstrukce jednovrstevného perforovaného chloroplastu mladých buněk. V prostřední řadě je zobrazena struktura složitého chloroplastu dospělých buněk. Na levém obrázku celkový pohled, na ostatních dvou řezy vnitřkem chloroplastu. Dolní řada ilustruje chloroplast stárnoucích buněk, u kterých nejprve dochází ke vzniku paralelních plochých laloků (obr. vlevo), které předcházejí vzniku kompaktního chloroplastu granulární struktury. Následuje dělení chloroplastu na několik částí (ostatní dva obr.) v rámci nepohlavního rozmnožování řasy. Snímky P. Škalouda, pokud není uvedeno jinak



tvary, pozoruhodnou symetrií a povrchem buněk. Učebnicovým příkladem je skupina s příznačným českým názvem krásivky (též Živa 2004, 1: 12-14). Krásné jsou nejen buněčné tvary a povrch buněk, ale i chloroplasty nacházející se uvnitř a jejich struktura (obr. 3).

Neméně krásy, která se ovšem ukáže až při bližším průzkumu, v sobě ukrývají na první pohled uniformní „zelené kuličky“ ze skupiny *Chlorococcales*. Mezi ně patří i řasa s latinským názvem *Dictyochloropsis*, která se vyznačuje poměrně velkými rozměry buněk, dosahujícími v průměru až 50 µm. Buňky tohoto organismu jsem opakovaně našel na vrchu Boreč v Českém středohoří, který je proslulý svými ventaroly, tj. místy s vývěry teplého a vlhkého vzduchu v zimním období. Jednobuněčné řasy kulovitého tvaru se složitě utvářeným chloroplastem zde rostou ukryty ve stélkách mechů a na povrchu kamenů ve ventarolech a jejich nejbližším okolí. Již první

konfokální snímky odhalily nečekaně bohatou strukturu chloroplastu s mnoha síťovitě spojenými laloky. Po několika opakovaných studiích již bylo možné načrtnout celou změnu tvaru chloroplastu od mladých buněk až po dospělé, dělicí se buňky. Ze seriálních optických řezů živými buňkami bylo posléze možno vytvořit trojrozměrné rekonstrukce chloroplastů v různých stádiích životního cyklu (obr. 4).

Konfokální mikroskopie: ideální nástroj pro studium řas

S nástupem konfokální mikroskopie výrazně narůstají možnosti studia složitých chloroplastů řas, které dosud stály stranou zájmu algologů. Pomocí této metody lze nejen detailně postihnout změny chloroplastu během životního cyklu mnoha druhů či studovat rozsáhlé přestavby chloroplastu před buněčným dělením, ale také zkoumat vliv různých abiotických faktorů (jako např.

intenzity světla) na trojrozměrné uspořádání laloků chloroplastů.

Rozdíl mezi uniformním tvarem chloroplastů všech vyšších rostlin a velkou variabilitou tvarů chloroplastů mnohých zelených řas je až zarážející. Zdá se, jako by jednobuněčné řasy projevovaly svou druhovou variabilitu právě ve struktuře chloroplastů, kdežto mnohobuněčné vyšší rostliny již vytvářejí pouze morfologicky velmi jednoduché a uniformní chloroplasty „fádního“ tvaru. Také vláknité řasy většinou ve svých buňkách obsahují chloroplasty jednodušších tvarů. Zelené řasy se složitější stavbou stélky, jako např. parožnatky (chary), pak ve svých buňkách hostí tvarově stejně uniformní chloroplasty jako vyšší rostliny. Je tedy možné vyslovit hypotézu, že zatímco vyšší rostliny projevují tvarovou rozmanitost na úrovni listů, květů a jiných orgánů, autotrofní organismy, kterým se v evoluci nepodařilo „vynalézt“ mnohobuněčnost, si touhu po individualitě uspokojují poněkud jinak.

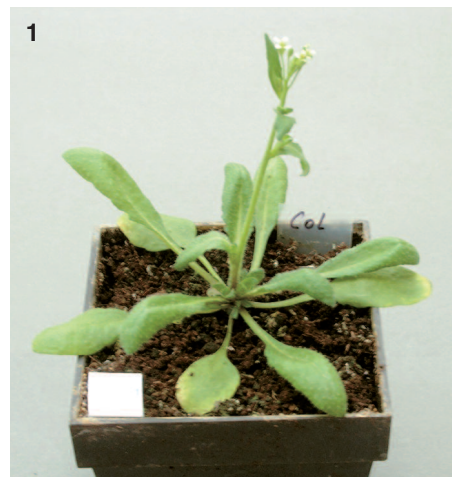
Huseníček rolní a současný výzkum rostlinného genomu

Jana Řepková

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) z čel. brukvovitých (*Brassicaceae*) je významným modelovým objektem pro molekulární genetiku rostlin. Velikost genomu tohoto druhu, nejmenšího genomu v rostlinné říši, byla rozhodujícím důvodem pro získání první kompletní sekvence rostlinné DNA a zahájení systematické funkční analýzy jednotlivých genů.

Dvouděložná rostlina huseníček rolní je malá a nenápadná jednoletá bylina (obr. 1), kterou v 16. stol. poprvé popsal Němec Johannes Thal. Tehdy ji nazval *Pilosella siliquosa*. Až v r. 1842 byl přijat její dnešní název *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Můžeme se s ní běžně setkat v přírodě a její populace se vyskytují na celé severní polokouli v Evropě, Asii a Africe, byla nalezena také v Severní Americe a Austrálii, kam byla pravděpodobně zavlečena z Evropy.

Z jakého důvodu získala tato rostlina zcela výsadní postavení v genetice a především v molekulární genetice rostlin? Je to proto, že splňuje všechny podmínky modelového organismu. K těm patří snadná kultivace v laboratorních podmínkách i v podmínkách *in vitro* a prostorová nenáročnost. Krátká generační doba, pouhých 6 až 8 týdnů od vysetí, nám umožňuje získat 6 až 8 generací do roka. Při optimálním růstu získáme z jedné rostliny až několik tisíc semen



Obr. 1 Dvouděložná rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je významným modelovým objektem v genetice. Na obr. ekotyp *Columbia*, který je výchozím genotypem pro navození mutací jak klasických tak inzerčních a jejich další analýzu zaměřenou na zjištění a charakterizaci genů

a tedy i stejný počet potomků v další generaci, což je výhodné pro genetickou analýzu. Avšak tím hlavním důvodem, proč se huseníček rolní stal skutečným reprezentantem vyšších rostlin, je velikost a struktura jeho genomu. V jádře má pět párů chromozomů a haploidní genom obsahuje 125×10^6 párů bazí (bp), tj. 125 Mb. Jeho genom je tedy asi jen 25krát větší než genom bakterie *Escherichia coli*, 10krát větší než genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, je porovnatelný s genomem živočišného modelového objektu mušky octomilky (*Drosophila melanogaster*) a asi 26krát menší než genom člověka. A právě velikost genomu byla rozhodujícím faktorem při výběru první rostliny pro kompletní sekvencování DNA.

Obr. 2 Mutant huseníčku rolního (*A. thaliana*). Mutace byla indukována ionizujícím zářením — rentgenovými paprsky. Fenotypově (fenotyp je soubor znaků, kterými se v daném prostředí projevuje genotyp) se projevuje protáhlými dělohami a listy, které jsou šedo-zelené, romboidní (ve tvaru kosočtverce), se dvěma zuby

