

Čtvrtek 6.11.1997

Cytologické a obecně fyziologické přístupy ke studiu rostlinné buňky

Albrechtová, J.	Užití fluorescenčních sond pro in vivo stanovení fyziologických charakteristik rostlinných buněk (přesunuta na středu)
Bačkor, M. <i>et al.</i>	Metody izolácie eukaryotických fotobiontov z lišajníkov
Beneš, K.	Metody cytochemie <i>in situ</i>
Budíková, S.	Histochemical localization of aluminium and cell wall substances in maize roots
Hanáčková, Z.	Sample preparation for microsporogenesis observation in <i>Karwinskia parvifolia</i> (<i>Rhamnaceae</i>), plant with a high content of secondary metabolites, in TEM
Hanáčková, B., <i>et al.</i>	Studium průduchového aparátu listů analýzou obrazu
Kadleček, P. <i>et al.</i>	Studium fotosyntézy kyslíkovou elektrodou a PAM fluorometrem
Kutík, J.	Stereologické hodnocení ultrastruktury rostlinných buněk
Opatrná, J.	Analýza obrazu v rostlinné fyziologii (přesunuto na pondělí)
Opatrný, Z.	Rostlinné HeLa buňky? Buněčné linie jako alternativa klasických rostlinných modelů
Prášil, I., Prášilová, P.	Testy životnosti a poškození rostlinných pletiv po působení mrazů
Sadloňová, K. <i>et al.</i>	Biotest na pôsobenie galaktoglukomanánových oligosacharidov v predlžovacom raste indukovanom rastovou látkou
Soukup, A., Votrubová, O.	Histochemické metody při charakterizaci materiálu výplní vodivých pletiv rákosu obecného
Soukup, A., Votrubová, O.	Aplikace konfokální mikroskopie při studiu prostorového uspořádání rostlinného pletiva
Široký, J.	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
Široký, J. <i>et al.</i>	Studium struktury chromatinu <i>Gagea lutea</i> pomocí konfokální laserové mikroskopie
Tichá, I.	Nový typ víček pro fotoautotrofní <i>in vitro</i> kultury rostlin
Überall, I. <i>et al.</i>	Synchronizace buněčného cyklu u smrku ztepilého <i>Picea abies</i> (L.) Karst./
Vyskot, B.	Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů
Vyskot, B. <i>et al.</i>	Studium struktury a funkce pohlavních chromozómů <i>Melandrium album</i> pomocí imunocytologických metod

Přednášky jsou vyznačeny tučným písmem.

Užití fluorescenčních sond pro *in vivo* stanovení fyziologických charakteristik rostlinných buněk

Albrechtová, J. T. P.

Albert-Ludwigs-Universität, Biologie II./Botanik, Schänzlestr. 1, D-79104, Freiburg, Deutschland
tel: (049) 761/203 26 37, fax: (049) 761/203 28 40, e-mail: jolana@ruf.uni-freiburg.de
Adresa českého pracoviště: ÚEB AVČR, Ke dvoru 16, 16630, Praha 6-Vokovice

Fluorescenční sondy jsou fluorescenční barviva, která mění své fluorescenční vlastnosti (intenzitu, excitační a/nebo emisní vlnovou délku) v závislosti na okolí. Detekovat lze tímto způsobem koncentrace iontů (pH, vápník, hořčík, železo, apod. - spektrum indikátorů se neustále rozšiřuje), membránový potenciál a průchodnost membrán - např. jako test vitality buněk. V dalším textu se zaměřím především na stanovení pH, vápníku a membránového potenciálu, což jsou jednak nejčastěji užívané aplikace, jednak s nimi sama pracuji.

Sondy lze do buněk injikovat, což omezuje použití na dostatečně velké a stabilní buňky. Kromě toho je nutno počítat s ranovou reakcí, která ovlivní aktivitu iontových kanálů. Podle toho, zda injikujeme do cytoplasmy či do vakuoly, dostaneme různou distribuci sondy v buňce. Druhá možnost (popsána dále v tomto textu) je použití modifikované sondy, vybavené transportní skupinou (nejčastěji acetoxymethylester). V buňce je tato skupina buněčnými esterázami odštěpena, a teprve potom sonda reaguje na daný iont. Pro sondy indikující vlastnosti membrán a membránový potenciál problém transportu odpadá.

U sond vykazujících posun spektra při vazbě na iont lze určit kvantitativně koncentraci iontu, pokud dělíme vzájemně obrázky (mapy intenzity fluorescence) snímané při dvou nastaveních filtru. Vyloučíme tak vliv distribuce sondy v buňce a koncentrace sondy v dané buňce na výslednou mapu intenzity. Nejlépe je k tomu účelu použít konfokální mikroskop s možností současného snímání ve dvou kanálech. U konfokálního mikroskopu rovněž odpadá vliv tloušťky objektu. Pokud sonda nemění vlnovou délku, lze aplikovat současně druhou sondu s opačnou reakcí na daný iont v dostatečně odlišné vlnové délce, nebo sondu na daný iont nereagující a použít její mapu fluorescence jako konstantní "referenční" obrázek.

Prakticky všechny použitelné pH-indikátory jsou deriváty fluoresceinu, pro detekci vápníku existuje celá řada barviv na nejrůznější bázi. Pro měření membránového potenciálu jsou v podstatě dvě možnosti: jednak "pomalé" distributivní sondy (např. na bázi oxonolu), distribuující se na obou stranách plasmalemy v závislosti na gradientu náboje přes membránu. Je ovšem značný problém kvantifikovat výsledky. Jednak "rychlé" sondy (např. ANEPPS), jejichž molekuly jsou pomocí lipofilního konce zakotveny v membráně a v závislosti na elektrickém náboji v okolí mění konformaci opačného, fluorescenčního, konce, a tím i intenzitu fluorescence. Tyto sondy ale po určité době prostupují membránou, čímž se mění jejich koncentrace na plasmalemě. Lze je tedy použít jen pro krátkodobé experimenty.

Chceme-li používat fluorescenční sondy, potřebujeme:

1: Vybrat vhodnou sondu. Prakticky jediná firma, která se cíleně zabývá vývojem nových sond a jejich uváděním na trh, je Molecular Probes se sídlem v Eugene (USA) a evropskou pobočkou Molecular Probes Europe Inc. v Leidenu v Holandsku. Sondy se liší citlivostí k danému iontu, dále citlivostí k dalším faktorům v buňce (jiným iontům, apod.), fluorescenčními vlastnostmi (excitační a emisní vlnové délky, typ změny v reakci na daný iont - např. jen změna intenzity, či zároveň i posun spektra, atd.), podmínkami transportu přes membránu, distribuci v buňce (např. jinou sondu potřebujete pro detekci v cytoplasmě, jinou pro chloroplasty, jinou pro mitochondrie...), toxicitou, a mnoha dalšími parametry. Výběr tedy závisí např. na tom, zda chcete detekovat rychle výrazné změny (signály), nebo spíše malé změny v distribuci (změny v rámci steady state). Dále na pokusném materiálu, a technických možnostech

(zda máte možnost použít UV, jaké filtry máte k dispozici, kvalita mikroskopu...), a zda případně chcete aplikovat více sond současně či barvit nějaké struktury pro lepší orientaci v materiálu. V neposlední řadě, jak dlouho má pokus trvat - některé sondy jsou vhodné jen pro okamžité použití, jiné reagují pomaleji, ale je možno sledovat změny v průběhu několika hodin. Autofluorescence chloroplastu je detekovatelná už od cca 600nm. Spektrum sondy pro měření v zeleném pletivu tedy nesmí překročit tuto hranici. Autofluorescence buněčných stěn (v modré oblasti) je relativně slabá a tudíž při měření neruší. Často je nutno vyzkoušet více sond, zvláště pokud pro daný materiál či danou problematiku není dost údajů v literatuře. Citace k jednotlivým sondám jsou uvedeny v katalogu Molecular Probes.

2: Dobrý fluorescenční mikroskop. Nejlépe konfokální, s možností vícekanálového snímání - zejména pokud chcete kvantitativní data (viz výše).

3: Analýzu obrazu. U konfokálního mikroskopu obvykle součást vybavení, bývá však výhodnější neblokovat mikroskop, a zpracovávat na samostatné analýze. Někdy je třeba případně speciální vybavení analýzy (konkrétně aritmetické dělení dvou obrázků vzájemně musí mít nadprůměrnou úroveň). Poněkud problematické bývá použití analýz zaměřených původně na použití v průmyslu či na nerosty. Je lépe vybrat firmu specializovanou na biologické aplikace. Z tuzemských lze akceptovat Laboratory Imaging, je však nutno přizpůsobit základní program konkrétním požadavkům, případně části doprogramovat. Cenově srovnatelná, kvalitou nejlepší ze všech (mně známých) produktů je obrazová analýza německé firmy Visitron Systems. O něco dražší a téměř stejně kvalitní je BioRad, rovněž velmi kvalitní (ale velmi drahá) je firma Zeiss. Je však možno (po přizpůsobení programu) použít i některý z mnoha dalších systémů. Pro déletrvajících pokusy s nutností kontinuální detekce znám jen analýzu Visitron Systems v On-line verzi.

Postup práce:

Objekt používáme zásadně nefixovaný. Připravíme pracovní roztok sondy v pufru (viz pozn.), objekt inkubujeme v tomto roztoku asi dvacet minut. U některých objektů nutno barvit déle. Po barvení objekt přeneseme do čistého pufru, a ihned snímáme obrázky (viz dále).

Pozn.: Koncentraci sondy a druh pufru je nutno vyzkoušet, přičemž lze vycházet z návodu pro jednotlivé sondy, dodávány Molecular Probes při zásilce. Je nutno dodržet popsané zásady práce (např. zmrazit, či nechat v pokojové teplotě, jak dlouho lze uchovávat pracovní roztoky, apod.), jinak sonda ztrácí požadované vlastnosti. Zpravidla se připravuje zásobní roztok sondy v DMSO, který lze zmražený uchovávat několik měsíců. Pracovní roztok v pufru se připravuje až těsně před použitím, nechává v pokojové teplotě, a je stabilní několik hodin. Doporučuje se použít pufr, který dobře uchovává strukturu membrán. Užívá se fosfátový pufr, MES, pro basičtější pH HEPES. Pufr má mít před přípravou pracovního roztoku pokojovou teplotu, při jiné teplotě má jiné pH! Obvykle se používá pH pracovního roztoku v rozmezí 6.0-7.0.

Příklad protokolu pro měření pH:

Materiál: merlík červený (*Chenopodium rubrum* L.)

Roztoky: MES pufr (25mM, pH 6) - uchovávat v chladničce
 carboxy SNARF-1 (zásobní roztok: 50mg SNARF v 100ml DMSO - lze uchovávat několik dní v chladničce, nejlépe je nechat asi den rozpustit a pak zmrazit v alikvótech po 1ml)

Postup práce:

Nejméně den před měřením připravíme pufr a zásobní roztok sondy. Před začátkem práce necháme oba roztoky vytemperovat na pokojovou teplotu. Připravíme pracovní roztok sondy (1ml zásobního roztoku v 500ml pufru). Na vibratomu zhotovíme čerstvé podélné řezy apikálního meristému. Řezy přeneseme na podložní sklíčko do pracovního roztoku sondy, inkubujeme 20 minut. Pak překryjeme krycím sklíčkem a ihned snímáme obrázky. Snímáme simultánně ve dvou kanálech. Nastavení filtru např.: excitace 488nm, detekce v prvním kanálu 520-600 nm, ve druhém kanálu 610-660nm. Ve druhém kanálu lze detekovat od 610nm bez horního omezení, účelem uvedené horní hranice je odstínit

autofluorescenci chloroplastů v zelených pletivech sousedících s apikálním meristémem. Obrázky z obou kanálů zkorigujeme na všechny nepřesnosti a artefakty (viz dále - “Vyhodnocení výsledků” a “Tipy”). Obrázky pak vzájemně vydělíme a podle kalibrace určíme pH v jednotlivých buňkách.

Časová náročnost: po získání zběhlosti lze jeden výše popsáný experiment zvládnout asi za dvě hodiny. Při jednom experimentu můžete zpracovat až čtyři objekty. Při následném zpracování obrázků záleží na kvalitě obrázků získaných při experimentu, množství nutných korekcí, a požadavcích na kvalitu výsledků. Záleží také na kvalitě a rychlosti vaší obrazové analýzy.

Vyhodnocení výsledků:

Tato část práce je nejnáročnější (na čas i zkušenosti), a prakticky rozhoduje o kvalitě výsledků. V podstatě lze použít pro měření i horší mikroskop, pokud získané obrázky korigujete na všechny artefakty zanesené použitím daného mikroskopu a daného postupu (viz dále - “Tipy”). K analýze obrazu viz výše. Obecně se obrázky musí korigovat na hladinu šumu (intenzita fluorescence prázdného obrázku), výsledky se přepočítávají podle kalibrační křivky. Kalibraci lze provádět *in vitro* nebo *in vivo*, u některých sond jen *in vivo*. Je nutno provést kalibraci pro každý mikroskop, a pro každé nastavení filtru. Při práci na konfokálním mikroskopu bývá problém fotonásobič - zesiluje lineárně obvykle jen v určitém úseku. Buď musíte kalibrovat při nastavení citlivosti fotonásobičů, které používáte při experimentech, nebo lze zvláště “zkalibrovat” fotonásobič v celém rozsahu, a výsledné obrázky pak korigovat na nelineárnost fotonásobiče. Při dvoukanálovém snímání je poměr nastavení citlivosti fotonásobiče pro oba kanály závislý na použitých filtrech, musí však zůstat konstantní pro danou kalibraci i experimenty.

Dalsí zpracování výsledku - statistika, vytisknutí obrázku apod. - záleží na vašich požadavcích. Pokud potřebujete zvláště kvalitní obrázky, např. pro prezentaci, je nejlepší ofotografovat obrázky přímo z obrazovky. I pro běžné použití však potřebujete velmi kvalitní tiskárnu. Při nekvalitní reprodukci jsou obrázky “necitelné”. Pro prezentaci je vhodné převést obrázky do pseudobarev - tj. na základě kalibrace si vytvořit kontrastní barevnou škálu, aby rozdíly pH v rozsahu očekávaných hodnot co nejlepe vynikly.

Tipy:

K přípravě zásobních roztoků: Doporučuji zmrazit zásobní roztok rozdělený do eppendorfků na alikvoty nutné vždy k přípravě jedné dávky pracovního roztoku. Vyhněte se tím nutnosti zásobní roztok mnohokrát rozmrazovat a znovu zmrazovat. Zásobní roztok skladovat v exikatoru. K přípravě použít raději bezvodý DMSO. Přítomnost molekul vody snižuje stabilitu roztoku.

Ke koncentraci: Koncentrace sondy v DMSO je určena co nejmenší konečnou koncentrací DMSO v pracovním roztoku (DMSO je pro buňky toxické). Sondy je nejlépe objednat ve formě “special packaging”, tj. 20 balení po 50 mg (=jedna dávka pro přípravu zásobního roztoku). Je o něco dražší, ale lze pracovat daleko přesněji, a vyhněte se plýtvání sondou. Minimální koncentrace sondy v pracovním roztoku je určena dostatečnou viditelností fluorescence v buňce, maximální koncentrace je omezena zhášením fluorescence molekul sondy při jejich častém kontaktu a toxicitou pro buňku - je lépe volit poněkud nižší při déletrvajících experimentech.

K transportu do buněk: Při transportu přes membránu pomocí AM-skupin zejména u rostlinných buněk je častá komplikace s extracelulárními esterázami. Jejich vlastnosti se liší u různého materiálu. Pomocí může změna pH pracovního roztoku - lze ovšem jen v rozsahu akceptovatelném buňkou. Může být použito vakuum (nebezpečí poškození buněk), nebo krájení pletiv na menší části (esterázy často nejaktivnější v epidermis, a stačí pak obnažit další b. vrstvy). Ranová reakce je v případě šetrného krájení minimální. Potřebujeme čerstvé řezy. Nejvhodnější pro krájení je vibratom (speciální mikrotom, určený původně k řezání mozkové tkáně), a krájet pletivo přímo v pufru. Krájet pletivo je třeba rovněž v případě, že chcete monitorovat i buňky umístěné v pletivu ve větších odstupech. Limit hloubky detekce je u různých typů konfokálních mikroskopů různý. V rámci tohoto limitu zjistíte potřebné parametry pomocí 3D-rekonstrukcí.

K pozorování pod mikroskopem: Příliš velký leakage sondy z buněk, tj. intenzita fluorescence v buňkách slabne a v pozadí se zvyšuje: pozorovat objekt přímo v pracovním roztoku (nepřenesený do čistého pufru). Obvykle se ustaví rovnováha mezi sondou v buňce a v roztoku. Nevýhoda je silnější pozadí, a nebezpečí postupného zvyšování koncentrace sondy v buňkách. Dále lze leakage omezit např. změnou koncentrace DMSO v pracovním roztoku (DMSO ovlivňuje propustnost membrán a různé objekty jsou různě citlivé na jeho působení), změnou koncentrace sondy, změnou pH, změnou typu pufru. Pokud žádný způsob nepomáhá: provést korekci na slábnutí fluorescence, tj. snímat změnu fluorescence v čase a spočítat křivku snižování intenzity fluorescence v buňce. Touto křivkou pak korigovat všechny výsledky.

Pokud se snižuje intenzita fluorescence v buňkách, ale v pozadí se nemění, jde spíše o zhášení - v tom případě je třeba volit nižší koncentraci sondy, nebo blednutí preparátu - pak je třeba snížit intenzitu excitačního světla.

Nerovnoměrně osvětlené obrázky (často světelný gradient nebo rozdílné osvětlení středu a okrajů zejména při použití klasického fluorescenčního mikroskopu a snímání obrázků přes kameru, ale může se objevit i u méně kvalitních konfokálních mikroskopů): nutno sejmout "slepý" obrázek, a tím pak všechny získané obrázky korigovat.

Pro tlustší objekty je lépe používat objektivy s delší pracovní vzdáleností ("long distance" objektivy) a podložní sklička s komůrkou. Objekty při pozorování překrýt krycím skličkem, omezíte tím vysychání roztoku a pohyblivost objektu. Pokud povrch objektu není rovný, lze sejmout sérii obrázků a složit maximální hodnoty intenzit těchto obrázků - získáte tím zaostřený obrázek po celé ploše objektu.

K vyhodnocování obrázků: Obrázky nesmí být příliš slabé, musí se dostatečně odlišovat od pozadí, a nesmí být přesvětlené. Zpravidla je k dispozici na konfokálním mikroskopu i na obrazové analýze 255 stupňů šedi, a tuto škálu má obrázek optimálně využít. Kontroluje se na histogramu. V optimálním případě nemá křivka rozložení intenzity fluorescence začínat už na nule (je pak nebezpečí ztráty bodů pod hranici detekovatelnosti), lépe je spektrum posunout o několik jednotek. Toho lze docílit u klasických mikroskopu zesílením intenzity excitačního světla, u konfokálního mikroskopu lze přímo nastavit. Před dalším zpracováním pak každý obrázek posuneme na nulu. Stejně tak má končit níž, než u 255 - u přesvětlených bodů už nelze rozlišit rozdíly intenzity. Jinak má křivka optimálně vyplňovat celé spektrum. Je výhodné, liší-li se obrázky z obou kanálů v umístění maxim (tj., je-li obrázek z jednoho kanálu vždy trochu slabší než ze druhého). Dá se pak po jejich vzájemném vydělení přesněji určit výsledné pH.

Alternativní metody

Jediná alternativní metoda jsou mikroelektrody. Vždy přitom buňku poraníte (při srovnání relativní velikosti buňky a špičky vaší elektrody, nemůžete očekávat od buňky žádné nadšení). Ranová reakce je v tomto případě lokální - právě v místě, kde je vaše elektroda. Kromě toho nemůžete měřit distribuci, tj. váš výsledek je závislý na tom, kam právě mikroelektrodu umístíte. Prave vnitřní distribuce daného iontu může být pro daný stav klíčová. Nelze také měřit v celém pletivu, ani v malých buňkách.

Pro měření vápníku se slibně rozvíjí metoda užívající genetickou transformaci materiálu a detekci pomoci fluorescenčního proteinu aquaporinu.

Literatura:

Albrechtová J.T.P., Slavík J., Wagner E.: Confocal pH-topography in the shoot apex of *Chenopodium rubrum* in relation to photoperiodic flower induction. *Endocyt. Cell Res.* 12: 83-94, 1997.

Haugland R.P. (ed.): Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes, Leiden, 1996.

Pawley J.B. (ed.): Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York, 1995.

Slavík J. (ed.): Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton, 1994.

Slavík J. (ed.): Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. Plenum Press, New York, 1996.

Další literatura: viz citace k jednotlivým sondám v katalogu Molecular Probes (Haugland 1996)

Web site: <http://www.probes.com>.

Metódy izolácie eukaryotických fotobiontov z lišajníkov

Bačkor, M.^{1,2}, Hudák J.¹, Bačkorová, M.¹

¹Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, SK- 842 15 Bratislava, Slovak republic

e-mail: Backor@fns.uniba.sk

²Department of Experimental Botany and Genetics, Faculty of Natural Sciences, Šafárik University, Mánesova 28, SK- 041 67 Košice, Slovak republic

e-mail: Mbackor@kosice.upjs.sk

Predložená práca sumarizuje viaceré protokoly, ktoré boli použité pri izolácii fotobiontov z lišajníkov (symbiotických eukaryotických rias), pri štúdiu ich fyziológie a biochémie, mimo interakcií s mykobiontom (hubová zložka lišajníka). Keďže pri všetkých protokoloch sa dodržiava viac-menej rovnaký sled logicky jednoznačných krokov, autori tohto príspevku ich spojili do jednej “metódy” s alternáciami čiastkových krokov, podľa možností jednotlivých pracovísk. Izolačná metóda je nenáročná na materiálne vybavenie.

Výber materiálu a jeho príprava

Na izoláciu fotobiontov z lišajníkov nepotrebujeme často ani čerstvo nazbieraný materiál. Pri izolácii fotobiontov *Trebouxia* sp. (symbiont väčšiny Európskych druhov lišajníkov) sa použili viac ako jeden rok staré herbárové položky lišajníkov *Cetraria islandica* a *Cladina mitis* (Bačkor, nepublikované údaje).

Pri vizuálnom pozorovaní odstránime všetky nečistoty zachytené na povrchu stielky (odumreté zbytky organizmov, pôdu, iné druhy lišajníkov ...) jemným štetcom, alebo preparačnou ihlou. Veľa mikroorganizmov a spór húb môžeme odstrániť energickým premytím destilovanou vodou, alebo tečúcou vodou. Pri izolácii je tiež výhodné nastrihať stielku lišajníka (v prípade tzv. makrolišajníkov) na menšie kusy. Yamamoto a kol. (1993) na izoláciu použili približne 1 cm² stielky lišajníkov s lupeňovitou morfológiou stielky, resp. 1 cm stielky odobratej s koncovej časti lišajníkov s kričkovitou morfológiou stielky. Ascaso (1980) použil približne 2 g vlhkej stielky.

Homogenizácia

Pripravená stielka lišajníka sa musí (okrem tzv. “thallus fragment method”, kde sa malé fragmenty navlhčenej stielky priamo prenesú na minerálne agarové médium) mechanicky rozrušiť. Jedna z možností je homogenizácia stielky v trecej miske, so sterilným morským pieskom (napr. Yamamoto a kol., 1993). Ascaso (1980) stielku následne homogenizoval niekoľkými ťahmi v Elvehjem-Potterovom homogenizátore. Prikláňame sa k tejto alternatíve homogenizácie, pretože je mimoriadne jednoduchá, pričom veľmi ľahko dosiahneme sterilitu prostredia (pri práci v očkovacích boxe) a tak významne znížime kontamináciu cudzorodými mikroorganizmami. Vo všetkých nasledujúcich krokoch pracujeme v sterilnom prostredí!

Pri použití tzv. “micropipette method” (Ahmadjian, 1967; Ahmadjian, 1993) sa kúsok odobratej vrstvy fotobiontov zo stielky lišajníka jemne rozťlačia medzi mikroskopickými sklíčkami. Pri tejto metóde sa zo zelenej suspenzie dajú izolovať jednotlivé bunky fotobiontov mikropipetou.

Čistenie homogenátov a selekcia fotobiontov

Homogenát obsahuje zmes rôznych buniek (bunky fotobiontu ako aj hýfy mykobiontu). V prípade použitia Elvehjem-Potterovho homogenizátora odporúčame hrubý homogenát filtrovať cez niekoľko vrstiev naskladanej sterilnej gázy. Následná selekcia fotobiontov závisí od úvahy experimentátora.

a) Yamamotova metoda

Táto metóda (Yamamoto, 1993) využíva filtráciu homogenátu cez filter, s veľkosťou pórov 500 mm a následne cez druhý filter, s veľkosťou pórov 150 mm. Zvyšok, na druhom filtri, sa 3 krát premýva sterilnou vodou. Po následnej selekcii (kontrola mikroskopicky) sa riasy prenású do kvapalného, resp. ešte lepšie na pevné, agarové minerálne médium.

b) Mikropipetová metóda

Pomocou mikropipety (ideálna veľkosť otvoru je 50-75 mm) sa bunky prenášajú cez sterilné kvapky na podložnom mikroskopickom sklíčku dovtedy, pokiaľ nezískame zriedenú suspenziu jednotlivých buniek fotobiontov, ktoré prenášame na agarové médium. Táto metóda je náročná na manuálnu zručnosť. Detaily uvádza Ahmadjian (1967; 1993).

c) Centrifugačné metódy

Z centrifugačných metód sa najčastejšie využívajú techniky diferenciačnej centrifugácie a gradientovej centrifugácie. Pre väčšinu fotobiontov sa využívajú empiricky získané poznatky. Napr. malé fotobionty, tak ako *Coccomyxa* sp. sa centrifugujú pri nízkych otáčkach (menej než 500 rpm), ale veľa buniek zostáva v supernatante. Pri izolácii rias *Trebouxia* sp. sa testovali viaceré kombinácie. Nižšie otáčky (okolo 100 x g) sa využívajú na odstránenie veľkých fragmentov stielky, vyššie zase na zber neporušených buniek z bunkových fragmentov pletiva. Často sa centrifugácia kombinuje s filtráciou cez rôzne filtre s definovanou veľkosťou pórov.

Gradientová centrifugácia je osvedčená metóda na izoláciu buniek fotobiontov. Ascaso (1980) po následnej homogenizácii stielky lišajníkov bunky resuspendoval v 0,25 M sacharóze (2 ml) a opatrne ich navrstvil na roztok CsCl_2 (densita 1,550 g.cm⁻³, ml). Po 10 min. centrifugácie pri 4 500 rpm (g nie je udané) zbieral bunky fotobiontov v interfáze. Rovnako úspešne sa dá použiť aj roztok KI, hoci pri dlhšej aplikácii môže byť škodlivý.

Množstvo inokula sa vo väčšine prác neudáva. Pri mikropipetovej metóde sa do jednej banky umiestňuje asi 15 buniek. Pri použití centrifugačných techník odporúčame výt'ažok fotobiontov postupne riediť v pomeroch 1: 10 a automatickou pipetou preniesť niekoľko ml na pevné agarové médium. Infikované banky vyradíme obzvlášť v prvých dňoch kultivácie. Niektoré fotobionty (napr. *Trebouxia*) rastú veľmi pomaly a možno ich vizuálne pozorovať po 4 až 6 týždňoch po úspešnej inokulácii. Pri izolácii fotobiontov sa vyžaduje zvládnutie základov rutinných mikrobiologických techník. Podmienky kultivácie (teplota, svetlo, zloženie a pH používaných médií) z priestorových dôvodov neuvádzame, ale možno ich nájsť vo viacerých prácach (Ahmadjian, 1967; Ahmadjian a Hale, 1973; Ahmadjian, 1993).

Literatúra:

- Ahmadjian, V. 1967:** A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6: 127-160.
- Ahmadjian, V. 1993:** The lichen symbiosis. John Wiley & Sons, inc.
- Ahmadjian, V., Hale, M. E. 1973:** The lichens. Academia Press, New York.
- Ascaso, C. 1980:** A rapid method for the quantitative isolation of green algae from lichens. *Ann. Bot.* 45: 483.
- Yamamoto, Y., Miura, Y., Higuchi, M., Kinoshita, Y., Yoshimura, I. 1993:** Using lichen tissue cultures in modern biology. *Bryologist* 96: 384-393.

Metody cytochemie *in situ*

Beneš, K.

Biologická fakulta Jihočeské university, Branišovská 31, Č. Budějovice,
tel: 038/777 55 04, fax: 038/459 85

V tomto referátě bych rád splnil dva záměry. 1. Nejprve bych chtěl charakterizovat cytochemické metody vcelku a pak 2. bych chtěl podrobněji pojednat o jednom jejich typu - průkazu enzymů na řezech pomocí barevných reakcí.

Pokud jde o první téma, máme zde na mysli sledování lokalizace látek, metabolických dějů a odpovídajících regulačních systémů na úrovni buněčné, ale i subcelulární a supracelulární. Jistě je si třeba uvědomit, na jaké úrovni hierarchie biologických systémů pracujeme. Za podstatnější však zde považují jiný aspekt - lokalizaci.

Mějme nějaký objekt, v němž 99% objemu příp. masy představují buňky typu A a 1% buňky typu B. Budeme sledovat aktivitu nějakého enzymu, např. v závislosti na čase. Víme, že sledovaný enzym je pouze v buňkách typu B. Třebaže v těchto buňkách dochází k dramatickým změnám v aktivitě, půjde jen o malé rozdíly, uvažujeme-li náš objekt jako celek.

Druhý příklad bude analogický. Budeme sledovat aktivitu nějakého enzymu přítomného např. v mitochondriích. Máme-li k dispozici údaje, získané studiem suspenze vyizolovaných mitochondrií, nic to nevypovídá o tom, zda jsou v buňkách daného objektu všechny mitochondrie stejné, anebo zda se v sledované aktivitě liší. Může jít přitom i o rozdílnost populací mitochondrií v jednotlivých buňkách.

V prvním i druhém případě se jedná o to, do jaké míry a jakým způsobem můžeme lokalizovat, t.j. nakolik se v našich závěrech uplatní princip zobrazení. To je kritérium, jímž rozlišíme metody *in situ* a *extra situm* (= *in vitro*). V obou případech jde o lokalizaci. Buď můžeme pracovat s řezy a strukturní hledisko aplikovat přímo, anebo musíme daný materiál nějak frakcionovat, t.j. rozlišit a izolovat jeho strukturní komponenty a ty pak analyzovat. Zde je pak strukturní hledisko - zobrazení - respektováno pouze nepřímou a opírá se o příslušné morfologické studie. Přehled o situaci v této oblasti podávají obr. 1, 2 a 3.

Tématem, kterého jsme se zde dotkli, se zabýval Beneš 1968 a nověji pak Beneš a Pilný in Prosser et al. 1989, kde lze nalézt i charakteristiky jednotlivých *in situ* metod a další literaturu. Rovněž Vitha et al. v manuálu Gartland a Davey 1995 probírají tuto problematiku.

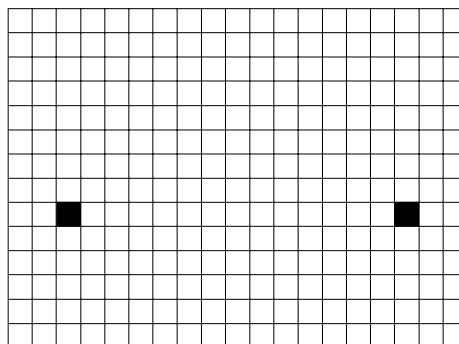
Druhým naším záměrem bylo popsat postup průkazu enzymů na řezech jako ukázkou barevné reakce *in situ*. Celý proces lze rozdělit na tři fáze:

1. fáze předinkubační, 2. vlastní inkubace a 3. postinkubační fáze.

Předinkubační fáze zahrnuje zpracování materiálu (patří sem tedy otázka fixovat: nefixovat, řezání materiálu atd.). Postinkubační fázi bývá obvykle věnována malá pozornost, i zde však jde o závažné otázky, jako je rozpustnost a krystalizace výsledného reakčního produktu. Protože předinkubační a postinkubační fázi se zde zabývat nebudeme, je třeba zdůraznit, že na výsledku se podílejí všechny tři fáze. Sebelepší inkubace nestačí, když je objekt před a po ní nevhodně zpracován.

Uvedeme zde postup při lokalizaci karboxylové esterázy (KE) v kořenové špičce.

Princip. Lokalizace KE je zde prováděna na základě její katalytické aktivity azokopulační technikou. Jako substrát je použit ester kyseliny octové a naftolu, resp. jeho derivátu - a - naftylacetát a naftol AS acetát. Inkubační fáze, kterou zde sledujeme, má dvě etapy: 1. štěpení substrátu aktivitou KE; rozštěpením esterové vazby dojde k uvolnění naftolu, 2. vizualizační reakce; azokopulací uvolněného

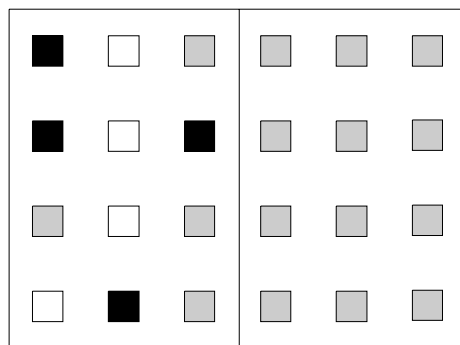


Obr.1. Organ sestávající ze dvou typů buněk. Buňky minoritního zastoupení jeví pozitivní reakci.

naftolu s diazoniovou solí vzniká nerozpustná barevná látka. Tento výsledný produkt je lokalizován v místech (buňkách), kde je aktivní KE.

V našem případě probíhají obě etapy v témže inkubačním mediu, neboť to obsahuje jak substrát, tak diazoniovou sůl. Jde tedy o tzv. simultánní azokopolaci.

Diazoniová sůl reaguje nejenom s naftolem, uvolněným aktivitou KE, ale také s fenolickými látkami v buňkách a v pletivu. Tato nespecifická reakce může vést k falešně pozitivním nálezům. Proto výsledky porovnáváme s řezy, které byly inkubovány v kontrolním mediu bez substrátu (diazoniová sůl samotná)



Obr.2. Srovnání dvou buněk, z nichž jedna má heterogenní a druhá homogenní populaci sledovaných organel.

Bezpečnostní opatření. Substráty jsou deriváty aromatických uhlovodíků, je podezření na karcinogenní účinky. Vyvarovat se kontaktu s kůží. Diazoniová sůl má podobné a navíc dráždivé účinky. V práškovém stavu je třaskavá.

Rostlinný materiál. Kořenové špičky bobu *Vicia Paba L.* byly fixovány 1 hodinu v ledové lázni v Bakerově fixáži (1 g CaCl₂, 90 ml H₂O, 10 ml formalínu neutralizovaného pomocí CaCO₃), pak vypírány ve vyměňovaném 5% ethanolu opět v ledové lázni a uloženy v 5% ethanolu v lednici při +4°C.

Chemikálie a roztoky. Pufir fosfátový, pH 6.0 (připraven smísením 1,1 M NaH₂PO₄ a 0,1 M NaHPO₄). Substráty: a - naftyl acetát, nebo naftol AS acetát. Zásobní roztok je připraven rozpuštěním 25 mg substrátu v 5 ml ethanolu. Vydrží několik dní.

Diazoniová sůl buď Fast Blue BB salt nebo Fast Blue RR salt. Připravit vždy čerstvý roztok.

Inkubační medium: Ke 4 mg diazoniové soli přidat 3,8 ml pufiru, po rozpuštění přidat 0,2 ml zásobního roztoku substrátu. (Pokud dojde k prudké barevné změně, znamená to, že substrát je částečně rozložen - v tom případě nutno inkubační medium přefiltrovat).

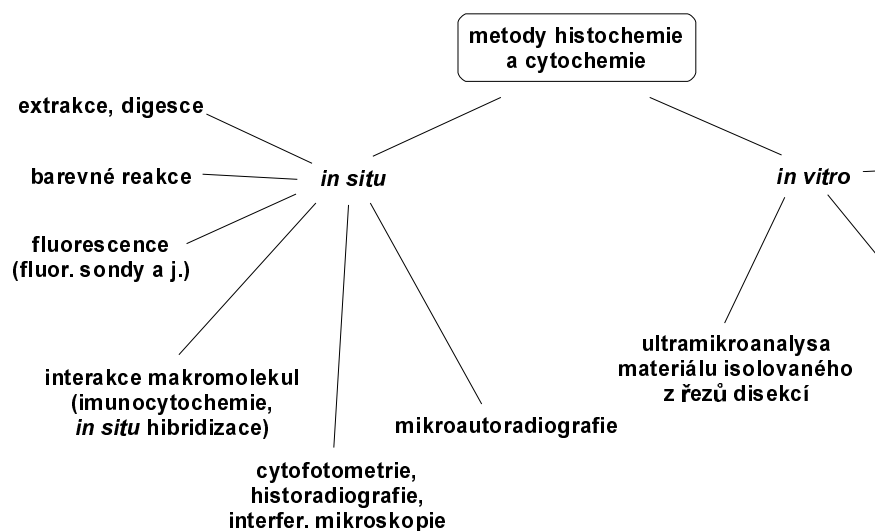
Kontrolní medium (bez substrátu): Ke 4 mg diazoniové soli přidat 3,8 ml pufiru, po rozpuštění přidat 0,2 ml ethanolu.

- Postup.**
1. Na zmrazovacím mikrotomu zhotovit příčné řezy kořenovou špičkou. Lze použít i ručních řezů z nefixovaných objektů. Ruční řezy pak fixovat a vyprat jak uvedeno. Řezy přenášet do epruvet opatřených na jednom konci gázou, které jsou umístěny ve vychlazeném 5% ethanolu.
 2. Některé epruvety s řezy inkubovat v plném inkubačním mediu, jiné (z téhož objektu) v inkubačním mediu bez substrátu. Obě media se připravují čerstvá. Po několika minutách se na řezech v plném mediu začnou projevovat barevné změny. Nechat reakci probíhat tak dlouho, až je zbarvení řezů dostatečně intenzivní.
 3. Vypírat ve vodě asi 5 minut.
 4. Řezy montovat do vody, mikroskopovat. Srovnat řezy inkubované v plném mediu a v mediu bez substrátu.

Vyhodnocení. V případě použití a- naftylacetátu je výsledné zbarvení černé a je pozitivní celý řez. U naftol AS acetátu je výsledný produkt modrý, je pozitivní periferie řezu, t.j. čepička (pokud je ještě řezem zasažena) a zejména pak střední válec, hlavně jeho lýkové póly.

K průkazu daného enzymu, v našem případě KE, lze použít rovněž metody jiných typů. Takovéto - různé - metody lze pak použít k lokalizaci řady dalších hydroláz. Samozřejmě lze na řezech lokalizovat i enzymy jiných tříd. Zde se pak ovšem používá příslušných jiných technik. Protože enzymy jsou proteiny, lze je také lokalizovat imunocytochemicky. Jsou k dispozici metody pro průkaz enzymů na úrovni elektronmikroskopické.

Pro naše účely bohatě postačí přehled metod k průkazu hydroláz Beneš 1972, kde je citována další literatura, dostupná dnes většinou v nových vydáních.



Obr.3. Tabelární přehled cytochemických metod *in situ* a *in vitro*

Literatura:

Beneš, K.: Biol.listy 33: 324, 1968

Beneš, K.: Biol. listy 37: 113, 1972

Gartland, K.M.A., Davey, M.R. eds.: Agrobacterium protocols, Humana Press, Totowa N.J., 1995

Prosser, V. et al.: Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha, 1989

Histochemical localization of aluminium and cell wall substances in maize roots

Budíková, S.

Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, 842 23 Bratislava, SK
fax: (0421) 07/37 19 48, e-mail: botubud@savba.savba.sk

Solutions:

- * morin (2',3',4',5,7-pentahydroxyflavonone), Sigma: 0.0015 g dissolved in a little amount of DMSO and final volume made up to 50 ml with distilled water; should be stored in the darkness at the room temperature
- * 0.05% aqueous solution of aniline blue, Sanitas Bratislava
- * hematoxylin stain: 200 mg hematoxylin + 20 mg sodium iodate NaIO₃ dissolved in 100 ml of deionized water
- * 100 mM DDG (2-deoxy-D-glucose), Sigma
- * 0.1 M DMSO (dimethyl sulfoxide)

Devices:

- * fluorescence microscope with UV filter combination for callose (excitation 398 nm, emission 495 nm) and aluminium (excitation 440 nm, emission 515 nm) detection
- * light microscope for Al dye hematoxylin

Methods:

Seeds of maize *Zea mays* L., cv. TO 360 were germinated for 72 h in darkness at 25 °C. Seedlings with mean root length 4.5 cm were grown in 0.1 mM CaCl₂ (control solution), 50 mM AlCl₃, 100 mM DDG or 50 mM AlCl₃ + 100 mM DDG in control solution (pH 4.5) for 24 h.

For callose detection free-hand sections of fresh roots were stained in aniline blue and immediately observed.

Various methods from Al indicators - hematoxylin (Polle et al. 1978, Rincón and Gonzales 1992, de Andrade et al. 1997, Moon et al. 1997), morin (Tice et al. 1992, Larsen et al. 1996, Vitorello and Haug 1996) and aluminon (Haridasan et al. 1986) - to more sophisticated techniques including EDX-analysis (Marienfeld et al. 1995), atomic absorption spectrophotometry (Rincón and Gonzales 1992) and pyrocatechol violet colorimetry (Ishikawa et al. 1996) have been used for Al detection in plant material. The fluorescence staining for Al was performed according to modified technique of Vitorello and Haug (1996). Intact roots were stained in 100 mM morin, rinsed in 0.1 M DMSO and cut with a razor blade. Aluminium localization with hematoxylin which serves as a mordant for Al³⁺ ions was performed as previously described by Polle et al. (1978). Roots incubated with hematoxylin for 40 minutes were rinsed in distilled water for 10 minutes and sectioned for light microscopic examinations. The method is based on the colorimetric property of hematoxylin to give a blue-purple stain when complexed with Al³⁺ and has been commonly used to screen Al-tolerant cultivars of wheat.

Results:

Treatment with 50 mM Al³⁺ for 24 h induced occurrence of cracks in peripheral root cell layers within the distances of 2 to 15 mm behind the root tip and swelling of proximal 5 mm to this region.

The primary maize root that was not exposed to Al but stained with hematoxylin showed a lack of staining in all tissues along the whole axis. The hematoxylin staining result of Al-treated roots revealed Al³⁺ accumulation in the 1/ apical region including outer cap cells and rhizodermis of meristem, 2/ cracked region (all peripheral tissues up to the fifth cortical layer) and 3/ rhizodermis of the transition

zone between the cracked and swollen regions. The negative results were obtained in more proximal root parts.

Hand sections from control roots stained in morin solution revealed only weak blue autofluorescence. In Al-treated roots the intensive green fluorescence confirming the positive Al localization was observed in outer root cap cells and rhizodermal cells of meristem and in epidermis, hypodermis and outer cortical cells of the cracked region. The rhizodermis of the transition zone fluoresced also intensively green. More basal root parts including the swollen region showed no positive staining for Al. It can be concluded that the staining pattern of both dyes is very similar. When free hand sections were stained for Al detection, many artifacts, such as intensive fluorescence of central cylinder, were observed.

In control roots, fluorescent callose deposits were present in cell walls of sieve elements. After 24 h of Al-treatment callose could be found also in rhizodermal cell walls and all cortical layers including endodermis in apical 2 cm. Recently, the callose deposits were observed after staining with Sirofluor in root cap, rhizodermis and outer cortical walls of soybean (Wissemeier et al. 1987) and a sensitive wheat line (Schreiner et al. 1994), the regions which are considered to have a close association with stress perception. Using DDG (callose synthase inhibitor) fewer deposits of callose and almost no deposits with callose degrading enzyme were detected (Schreiner et al. 1994). In our work, the DDG treatment alone caused the diminished callose fluorescence in sieve elements. The pattern of staining for callose was similar also for roots treated with both DDG and Al.

Acknowledgement:

This work was supported with grant N. 1180, Grant Agency Vega, Slovak Republic.

References:

- de Andrade, L.R.M., Ikeda, M., Ishizuka, J., 1997. - *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 41: 151 - 156.
Haridasan, M., Paviani, T.I., Schiavini, I., 1986. - *Plant and Soil* 94: 435 - 437.
Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Ikarashi, T., 1996. - *Soil Sci. Plant Nutr.* 42: 613 - 625.
Larsen, P.B., Tai, C.Y., Kochian, L.V., Howell, S.H., 1996. - *Plant. Physiol.* 110: 743 - 751.
Marienfeld, S., Lehmann, H., Stelzer, R., 1995. - *Plant and Soil* 171: 167 - 173.
Moon, D.H., Ottoboni, L.M.M., Souza, A.P., Sibov, S.T., Gaspar, M., Arruda, P., 1997 - *Plant Cell Reports* 16: 686 - 691.
Polle, E., Konzak, C.F., Kittrick, J.A., 1978. - *Crop Sci.* 18: 823 - 827.
Rincón, M., Gonzales, R.A., 1992. - *Plant Physiol.* 99, 1021 - 1028.
Schreiner, K.A., Hoddinott, J., Taylor, G.J., 1994. - *Plant and Soil* 162: 273 - 280.
Tice, K.R., Parker, D.R., DeMason, D.A., 1992. - *Plant Physiol.* 100: 309 - 318.
Vitorello, V.A., Haug, A., 1996. - *Phys. Plant.* 97: 536 - 544.
Wissemeier, A.H., Klotz, F., Horst, W.J., 1987. - *J. Plant Physiol.* 129: 487 - 492.

Sample preparation for microsporogenesis observation in *Karwinskia parvifolia* (*Rhamnaceae*), plant with a high content of secondary metabolites, in TEM

Hanáčková, Z.

Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, 842 23 Bratislava, SK
fax: (421) 07/37 19 48, e-mail: botuhan@savba.savba.sk

Solutions:

fixation

- 1: 2.8% glutaraldehyde (v/v) in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.2) and 0.02% (v/v) Triton X-100
- 2: 2% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde, 0.2% tannic acid, 0.5mg/ml saponin in 10 mM PIPES/ 3 mM EGTA buffer, pH 7.4
- 3: 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 0.2% tannic acid (w/v) and 0.05% Triton X-100 (v/v) in 10 mM Hepes/ 3 mM EGTA buffer, pH 7.4.

post-fixation

- 1: 1% aqueous OsO₄
- 2: 2% aqueous OsO₄
- 3: 1.5% aqueous OsO₄

dehydration

1. acetone series (10% increments)
2. graded ethanol series (10% increments)

- propylene oxide (PO)
- Spurr's embedding medium
- 2% collodion in amyl acetate

staining:

1. 0.5% aqueous uranyl acetate and lead citrate
2. saturated solution of uranyl acetate in 50% ethanol and 2% aqueous lead citrate
3. 2% uranyl acetate in 50% ethanol and 2% aqueous lead citrate

Devices:

rotator, ultramicrotome, vacuum pump, thermostat, TEM

Methods:

1. Method according to Owen, Makaroff (1995)

Whole buds of *Arabidopsis thaliana* were fixed overnight in fixative solution 1. Buds were rinsed twice in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.2) for 15 min each wash and post-fixed in solution 2 overnight. Tissue was dehydrated in a graded acetone series and embedded in Spurr's resin (Spurr 1969). Ultrathin sections were stained with 0.5% aqueous uranyl acetate and lead citrate.

2. Method according to Pérez-Muñoz et al. (1993)

Anthers of *Vigna vexillata* were fixed overnight at room temperature in buffered aldehydes (fixative solution 2), postfixed for up to 12 hr in post-fixative solution 2, dehydrated through an acetone series,

infiltrated for about 1 week in Spurr's resin and embedded. Silver sections were stained with staining solution 2.

3. Modified method

Whole buds of *Karwinskia parvifolia* were fixed 18 hours at the room temperature in fixative solution 3. Buds were rinsed several times in buffer and postfixed for 24 hr in post-fixative 3. Tissue was dehydrated (2 days) in a graded ethanol series, infiltrated in ethanol/ propylene oxide mixture (3:1, 1:1, 1:3 and pure PO, 45 min. each) and then for 10 days in Spurr's resin (PO: resin 7:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, pure resin, 24 hr each), embedded and polymerized 8 hr at 69-70°C. For transmission electron microscopy, silver to gold sections (LKB Nova ultramicrotome) were mounted on collodion-coated copper grids, stained with solution 3, and observed with Zeiss transmission electron microscope operating at 60 kV mode.

Results:

1. Many artifacts occurred in our specimens elaborated according to Owen and Makaroff (1995) because of poor infiltration of both fixatives and Spurr's resin. Although the cell walls were sufficiently preserved, the cytoplasm was degenerated. Since many artifacts were observed in tapetal and other cells, the mature pollen stage was satisfactorily preserved, the problem resulted likely from the high content of secondary metabolites which was confirmed by chemical analysis of specimens (Hanáčková, Waksman, unpublished results).

2. Fixation was effective but the specimens were not sufficiently infiltrated by embedding medium resembling the results obtained by method 1. Problems with accessibility of chemicals and financial demands occurred too.

3. From experiences with the specimen elaboration of vegetative organ of *Karwinskia parvifolia* we found out that the ethanol dehydration should be used to wash off at least a part of secondary metabolites (dissolvable in ethanol) which restrained the specimen preparation. Propylene oxide is a useful intermediate stage for the medium-infiltration. We combined this knowledge with method 2 which is advantageous for microsporogenesis of other species and prolonged the time of fixation, dehydration and infiltration. The specimens were increasingly rotated. In spite of saponin which was not accessible in our laboratory other detergent, Triton X-100, was added to improve fixative penetration. Tannic acid was used to increase the contrast. Similarly, uranyl acetate in ethanol was applied for ultrathin section staining because aqueous solution did not stain sufficiently in the case of microsporogenesis in *K. parvifolia*. Measurement of pH is important for EGTA solubility. It would be suitable not to fix whole buds but extracted anthers only. In our case it is less the technical than methodological problem because the bud size of *K. parvifolia* before anthesis is 2 mm.

References:

- Owen, H.A., Makaroff, C.A., 1995. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185: 7-21
- Pérez-Muñoz, C.A., Jernstedt, J.A., Webster, B.D., 1993. Pollen wall development in *Vigna vexillata*. I. Characterization of wall layers. *Am. J. Bot.* 80(10): 1183-1192
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26: 31-42

Studium průduchového aparátu listů analýzou obrazu

Hanáčková, B., Snopek, J., Tichá, I.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2
tel: 02/21 95 31 71, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: barbora@prfdec.natur.cuni.cz

1. Počítačová analýza obrazu je moderní metoda pro měření a hodnocení makroskopických a mikroskopických objektů. Našla široké uplatnění např. v lékařství, kriminalistice, potravinářství, materiálové analýze, ale i v rostlinné anatomii a fyziologii (Frey et al. 1996, Opatrná 1997, Tichá *et al.* 1997). Podstata metody spočívá v nahrávání obrazů pomocí televizní kamery a dalšího nezbytného HW vybavení do počítače. Obrazy se zpracovávají speciálním SW. Touto metodou lze měřit parametry objektů nebo polí.
2. Pro studium průduchového aparátu listů používáme mikroskop OLYMPUS BX 40 a systém pro analýzu obrazu LUCIA G (verze 3.51), který se skládá z TV kamery COHU, obrazového procesoru COMET RGB, řídicího počítače PENTIUM 100 (32 MB RAM) a programu LUCIA. Prvním krokem je příprava otiskových preparátů listového povrchu. Na střed čepele (mimo střední žilku) se nanese tenká vrstva bezbarvého laku, která se po zaschnutí stáhne za pomoci proužku průhledné lepící pásky. Preparát lze pozorovat téměř okamžitě. Místa vybraná v zorném poli mikroskopu se nasnímají a načtou do paměti počítače. Je třeba mít dostatečnou kapacitu paměti i HDD (na jeden barevný obraz asi 850 kB). Z barevného obrazu se vytvoří obraz binární, který se dále upravuje funkcemi matematické morfologie. Z upraveného binárního obrazu se pomocí programu LUCIA získají požadované parametry průduchů: např. délka, šířka, plocha, obvod, počet na jednotku plochy. Program LUCIA počítá i základní statistické údaje.
3. Časová náročnost metody je relativně velká, i když ve srovnání s proměřováním průduchů mikroskopem má značné přednosti. Z finančního hlediska je systém LUCIA nákladná investice.
4. Problémem při měření průduchů analýzou obrazu je skutečnost, že systém označuje objekty podle zvolené typické barvy, která je u epidermálních a průduchových buněk na otiskových preparátech stejná, tzn. označí se nejen průduchy, ale i epidermální buňky. Ty však lze z měření vyloučit vhodně zvoleným omezením, tj. pro měřený parametr stanovíme rozmezí, ve kterém se objekt musí nacházet, jinak není do měření zařazen. Vyloučení epidermálních buněk lze dosáhnout díky jejich značné tvarové odlišnosti od buněk průduchů.
5. Při označování typické barvy objektů je vhodnější označit si buněčné stěny než vlastní buňky. Binární obraz buněk pak lze získat inverzí obrazu buněčných stěn. Je to vhodnější z důvodu dalších úprav binárního obrazu funkcemi matematické morfologie, neboť pouhým označením nelze získat vhodný obraz k měření.
6. Průduchové charakteristiky lze stanovovat také mikroskopem. Je to však mnohem pracnější, méně přesné a objem získaných dat je menší.

Literatura:

- Frey, B., Scheidegger, C., Günthardt-Goerg, M. S., Matyssek, R.:** The effect of ozone and nutrient supply on stomatal response in birch (*Betula pendula*) leaves as determined by digital image-analysis and X-ray microanalysis. *New Phytol.* 132: 135-143, 1996.
- LUCIA verze 3.-** Uživatelská příručka. Laboratory Imaging.
- Opatrná, J.:** Analýza obrazu v rostlinné fyziologii. In: *Methods in Plant Sciences*: in press. Vranovská Ves u Znojma 1997.
- Tichá, I., Obermajer, P., Snopek, J.:** Stomata density and sizes in vitro grown tobacco plantlets. *Acta Fac. Rer. Nat. Univ. Comen. - Physiol. Plant.* : in press, 1997.
- Shotton, D. (ed.):** *Electronic Light Microscopy: Techniques in Modern Biomedical Microscopy.* Wiley-Liss, New York 1993.

Studium fotosyntézy kyslíkovou elektrodou a PAM fluorometrem

Kadleček, P., Kubelková, M., Tichá, I.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2,
tel: 02/21 95 31 71, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: iticha@prfdec.natur.cuni.cz

Po dopadu záření na list se část záření odrazí, část listem projde a část se absorbuje. Energie záření absorbovaného fotosyntetickými strukturami se může využívat ve fotosyntetických procesech nebo vydávat ve formě fluorescence či tepla. Pro studium energetických přeměn absorbovaného záření v intaktních tylakoidních membránách chloroplastů se v dnešní době často používá aparatura, kterou lze současně měřit fotosyntézu jako výdej kyslíku a fluorescenci chlorofylu *a* ve fotosystému II (PS II) využitím tzv. metody saturačních pulzů. Princip metody spočívá v tom, že se na list aplikují velmi silné světelné pulzy, kterými se nasatí fotochemická konverze energie v PS II. Tím se přechodně kvantový výtěžek PS II potlačí na nulovou hodnotu a kvantové výtěžky fluorescence a nezářivé disipace energie vzrostou na maximální hodnoty. Tento přístup umožňuje získat údaje o fotosyntetické účinnosti a fotosyntetické kapacitě, o kvantovém výtěžku PS II a kvantovém výtěžku fluorescence, o rychlosti transportu elektronů, o stupni fotoinhibice apod. (např. WALKER 1990, KRAUSE a WEIS 1991, SCHREIBER et al. 1995).

Pro měření produkce kyslíku během fotosyntézy a spotřeby kyslíku během temnotního dýchání používáme na PŘF UK kyslíkovou elektrodu Clarkova typu (LD2/2, Hansatech, Kings Lynn, UK). Tato elektroda je tvořena platinovou katodou a stříbrnou anodou, které jsou zasazeny do disku z epoxidové pryskyřice. Jako elektrolyt se používá nasycený roztok KCl. Po připojení ke zdroji napětí se elektroda polarizuje. Jestliže elektrický potenciál na katodě dosáhne 600-700 mV, začne se na jejím povrchu redukovat kyslík. Na anodě současně probíhá oxidace stříbra a vznikající chlorid stříbrný se zde usazuje. Proud, který v tomto okamžiku prochází obvodem, je stechiometricky přímo úměrný množství kyslíku spotřebovaného na katodě. Tento proud se převádí na výstupní signál a zaznamenává připojeným zapisovačem (WALKER 1990).

Elektroda Clarkova typu tvoří střední část měřicí komory temperované vodou na 25 °C. Nad elektrodu se vkládá listový terčík o maximální ploše 10 cm² a vložka ze savého materiálu napuštěná 200 ml 2M roztoku KHCO₃ a 20 ml roztoku enzymu karboanhydrázy. Tento enzym zajišťuje saturační koncentraci oxidu uhličitého pro fotosyntézu v měřicí komoře rozkladem KHCO₃. Nad měřicí komoru se upevňuje Björkmanova halogenová lampa (LS2H, Hansatech, Kings Lynn, UK) jako zdroj aktinického záření pro fotosyntézu, jehož intenzita se reguluje neutrálními šedými filtry.

K měření fluorescence používáme PAM fluorometr (Walz, Effeltrich, SRN). V naší aparatuře je tvořen dvěma jednotkami, PAM 101 a PAM 103, a světlovodnými vlákny. Jednotka PAM 101 obsahuje emitor a detektor záření, jednotka PAM 103 řídí spuštění a dobu trvání saturačního pulzu světelného záření (zdroj KL 1500, Schott, SRN).

Princip PAM fluorometru je možné vysvětlit následujícím způsobem (SCHREIBER et al. 1986): Fluorescence v listovém terčíku se budí pulzy světelného záření o délce jedné mikrosekundy, které jsou emitovány LED diodami ("light emitting diode") s frekvencí 1,6 nebo 100 kHz. Tyto pulzy světelného záření s maximem ve vlnové délce 650 nm procházejí cestou k povrchu listu přes optický filtr, který nepropouští záření delších vlnových délek než 680 nm. Fluorescenční signál emitovaný listem jako odpověď na každý budící pulz se monitoruje fotodiodovým detektorem. Cestou k tomuto detektoru však ještě prochází přes ochranný filtr, který propouští pouze záření delší než 700 nm. Z tohoto rozmištění optických filtrů vyplývá, že nemůže dojít k chybné detekci budícího pulzu či rozptýleného záření místo záření fluorescenčního. Zachycený fluorescenční signál, který má vzhledem k pulzní povaze budícího záření rovněž nespojitý charakter, je selektivně zesilován výkonným dvoustupňovým zesilovačem.

Nejproblematictější fází při práci s aparaturou je čištění a potahování kyslíkové elektrody. Před začátkem vlastního měření je nutné z elektrody velmi pečlivě odstranit usazený chlorid stříbrný, k čemuž

používáme kancelářskou pryž (lze použít také zubní pastu). Katoda a anoda se spojí cigaretovým papírkem, který je napuštěn elektrolytem. Přes cigaretový papírek se přetáhne tenká teflonová membrána, která je propustná pouze pro molekuly plynů (WALKER 1990). Je třeba dávat pozor, aby pod teflonovou membránou nezůstaly bublinky vzduchu a aby nedošlo k jejímu protržení. Elektroda se nechá polarizovat. Měřicí komora se propláchne dusíkem. Kyslíková elektroda se kalibruje 0,5 ml vzduchu o teplotě 25 °C.

Vlastní měření probíhá např. podle schematu: pokusnou rostlinu zatemníme na 20 - 30 minut (úplné zoxidování neboli "otevření" všech reakčních center PS II). Vykrojíme listový terčík a umístíme ho do měřicí komory. Ve tmě současně s rychlostí temnotního dýchání (R_D) měříme F_0 (základní fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem) a F_M (maximální fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem po aplikaci saturačního pulzu). Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) měříme při dvou hladinách (velmi nízké a saturační) ozáření současně s F_s (ustálená hladina fluorescence emitovaná listem při dané ozáření) a F_M' (maximální fluorescence emitovaná fotosyntetizujícím listem při dané ozáření po aplikaci saturačního pulzu). Po každém měření P_N následuje měření R_D , F_0 a F_M . Změření jednoho listu trvá zhruba jednu hodinu. Po odečtení hodnot z grafického záznamu slouží tato data k výpočtům dalších parametrů (např. maximální fotochemické účinnosti PS II, aktuální fotochemické účinnosti PS II či stupně redukce primárního chinonového akceptoru elektronů - viz GENTY et al. 1989, KRAUSE a WEIS 1991). Velkou výhodou pro vyhodnocování experimentálních dat je připojení počítače přímo k aparatuře.

Pořízení této aparatury vyžaduje velkou investici (ca 33.000,- DM), ale provozní náklady jsou relativně nízké. Aparatura je prostorově nenáročná a její obsluha je po zapracování poměrně jednoduchá.

Aparatura byla PŘF UK darována nadací Volkswagen (grant č. I/68918).

Literatura:

- GENTY, B., BRIANTAIS, J.-M., BAKER, N. R.: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. - *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87 - 92, 1989.
- KRAUSE, G. H., WEIS, E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant molec. Biol.* 42: 313 - 349, 1991.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C.: Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: SCHULZE, E.-D., CALDWELL, M. M. (ed.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Pp 49 - 70. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1995.
- SCHREIBER, U., SCHLIWA, U., BILGER, W.: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. - *Photosynth. Res.* 10: 51 - 62, 1986.
- WALKER, D. A.: The Use of Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis (2nd impression). Oxygraphics, Sheffield 1990.

Stereologické hodnocení ultrastruktury rostlinných buněk

Kutík, J.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2
tel: 02/21 95-31 71, fax: 02/21 95-33 06

1. Ultrastruktura rostlinných buněk je pozorována a fotografována v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) a získané snímky jsou stereologicky hodnoceny.
2. A/ Je třeba TEM, ultramikrotom, knifemaker pro přípravu nožů a běžné laboratorní vybavení.
B/ Používám standardního postupu přípravy preparátů pro TEM (Kutík et al. 1984, 1993): fixace (např. kousků listové čepele) glutaraldehydem ve fosfátovém pufru, vyprání pufrům, postfixace kyselinou osmičelou v téže pufru, odvodnění ve vzestupné alkoholové řadě, zalití (přes propylénoxid) do epoxidové pryskyřice (Spurrova nízkoviskozitního média), kontrastování ultratenkých řezů (skleněné nože) uranylacetátem a citrátem olova. Na pozitivních snímků z TEM stanovuji objemové hustoty (relativní parciální objemy) buněčných struktur (např. složek chloroplastů) pomocí bodových rastrů (Gundersen a Jensen 1987) a skutečné rozměry organel.
C/ K vyhodnocení získaných dat postačí jednoduchý počítačový program: výpočet základních statistických parametrů doplněný například Studentovým t-testem.
3. TEM, ultramikrotom a knifemaker jsou nákladné investice (dohromady nejméně 2,5 mil. Kč). Příprava preparátů pro TEM trvá v zásadě čtyři dny. Časově náročné a pracné je stereologické hodnocení - zatím se je nedaří (alespoň pro chloroplasty) převést na automatickou analýzu obrazu.
- 4., 5., 6. Pro stereologické hodnocení musí být ultratenké řezy dobře orientované a kontrastní. Metoda dává poměrně komplexní obraz o ultrastruktuře studovaných objektů.

Literatura:

- Gundersen, H. J. G., Jensen, E. B.: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. - *Journal of Microscopy* 147: 229 - 263, 1987. Kutík, J., Šesták, Z., Volfová, A.: Ontogenetic changes in the internal limitations to bean- leaf photosynthesis 8. Primary leaf blade characteristics and chloroplast number, size and ultrastructure. - *Photosynthetica* 18: 1 - 8, 1984. Kutík, J., Činčerová, A., Dvořák, M.: Chloroplast ultrastructural development during the ontogeny of the second leaf of wheat under nitrogen deficiency. - *Photosynthetica* 28: 447 - 453, 1993.
- Hall, J. L., Hawes, C. (ed.): *Electron Microscopy of Plant Cells*. - Academic Press (Harcourt, Brace Jovanovich Publishers), London - San Diego - New York - Boston - Sydney - Tokyo - Toronto 1991.

Analýza obrazu v rostlinné fyziologii

Opatrná, J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 160 00 Praha 6,
tel: 02/36 08 56, fax: 02/36 52 28, 02/36 52 29

Nejvýznamnější přínos obrazové analýzy pro rostlinnou fyziologii souvisí s vývojem metod pro získání kvantitativních údajů a z nich odvozených morfologických charakteristik umožňujících popis, porovnání a hodnocení rostlinných orgánů, pletiv a buněk, ale i barevných reakcí, fluorescence, elektroforeogramů, autoradiogramů, a pod. Principy metod obrazové analýzy budou podrobně uvedeny na tomto semináři v prezentaci firmy Laboratory Imaging. Zde tedy stručně uvedu jen základní údaje týkající se metody.

Prvním předpokladem práce je získání kvalitního digitálního obrazu studovaného objektu. K tomu účelu může být použit scanner nebo TV kamera s příslušným objektivem nebo připojením na mikroskop. Obraz barevný nebo černobílý dostatečně vysokého rozlišení, může být pořízen při svrchním osvětlení objektu nebo při prosvícení světlem bílým, UV, atd.. Podobně lze snímat i fotografie, diapositivy nebo xerokopie rostlinných objektů. Ve stejném uspořádání jako snímáme objekty je třeba sejmout i reálné měřítko, které nám umožní kalibraci systému a tím měření v reálných jednotkách. Druhou částí práce je zpracování obrazu, kalibrace a měření zvolených charakteristik studovaných objektů. Je otázkou kvality obrazového procesoru, počítačového vybavení a použitého softwaru jaká měření nám umožní. Archivace získaných obrazů a dat a jejich zpracování podle požadavků následné prezentace (protokol, zpráva, publikace, plakátové sdělení) záleží na výběru příslušenství a možnostech každého uživatele. V další části uvedu příklady a zkušenosti s použitím obrazové analýzy systémů LUCIA M a LUCIA D (Laboratory Imaging, s.r.o.) ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, kde toto zařízení pracuje 3 roky.

ARCHIVACE OBRAZU je používána pro uchování obrazu pro dokumentaci výsledků pozorování, charakteristických objektů a pod. Kvalitu ukládaného obrazu lze zvýšit úpravou kontrastu, barevného tónu, výřezem, doplnit textem, šipkami, měřítkem a pod. Zároveň lze uložit legendu a popis. Archivace je používána také jako součást experimentální práce pro průběžné ukládání souborů během pokusu či pozorování. To umožňuje jejich měření a hodnocení jedním standardním postupem až v době po ukončení experimentu.

Úskalím archivace je poměrně značná potřeba paměti. Je tedy nutné zvážit jak veliký soubor lze uložit na hard disk nebo zda je třeba použít komprese dat nebo některý z dostupných vnějších paměťových systémů (na př. Syquest s výměnnými disky na 270MB).

PŘÍKLADY POUŽITÍ:

V našem ústavu byly připraveny archivy obrazů do různého stupně poškozených listů, hlíz, plodů, semen rostlinným škůdcem doplněné kvantitativním údajem % zasažené plochy. Jsou významnou pomůckou pro vyškolení personálu na hodnocení projevů choroby v porostech v polních podmínkách nebo pro práci inspekčních pracovníků.

Na několika vysokých školách jsou připravovány soubory obrazů pro didaktické účely, obsahují grafy, ilustrace, ale i originálně nasnímané obrázky makroskopické i mikroskopické vztahující se k předmětu výuky. Mohou být použity při výuce, opakování i zkoušení studentů. .

Významné urychlení práce při studiu vlivu chladového stresu na frekvenci mitos v kořenových špičkách přineslo uložení souboru obrazů jednotlivých zorných polí roztlakových preparátů na externí disk Syquest. Frekvence mitos a velikost jader byla hodnocena automaticky vždy pro všechna zorná pole jednoho roztlaku pomocí makra (viz dále).

Hodnocení in vitro probíhajících selekčních testů na kanamycinovou resistenci u transgenních brambor je náročné na rychlost provedení (rychlé zavádání nodálních segmentů) a přesnost měření délky úžlabních

pupenů (0,5 - 30mm). Nasnímání souboru jednotlivých vzorků a následné interaktivní měření pupenů (viz dále) při odpovídající kalibraci systému značně zjednoduší a zpřesní práci.

MĚŘENÍ lze rozdělit na interaktivní a automatické.

Měření interaktivní spočívá v měření délek nebo profilů po trajektorii (nejčastěji přímce), kterou si sám uživatel zvolí. Soubory naměřených hodnot lze exportovat do statistického programu (Excel, Quatro Pro) k dalšímu zpracování.

PŘÍKLADY POUŽITÍ:

Měření délky stonku, výšky rostlin (stromů), rozměrů listů, plodů, růstové analýzy. Pro orientační a rychlou dokumentaci přůběhu densit v elektroforeogramu lze použít funkci "Profil". Densita je měřena v místech kudy prochází proložená přímka. Tento způsob byl postačující na př. pro dokumentaci odchylných spekter zásobních proteinů při testování čistoty osiv (ÚKZÚZ). Pro přesné vyhodnocení densit v celé šířce proužku, včetně korekcí na tvar a délku stopy, jsou distribuovány speciální programy (na př. Elfo, Gel Manager).

Měření automatické předpokládá v prvním kroku vytvoření binárního obrazu - uživatel pomocí kursoru označí struktury, které mají být měřeny. Po odkliknutí jsou označena umělou barvou (overlay) všechna místa stejné intensity, resp., barvy (prahování, segmentace, threshold). Pokud pracujeme s černobílým systémem je prahování založeno na kontrastu požadovaného objektu vůči pozadí, u barevného systému pak probíhá prahování na základě barevné odlišnosti hodnocených struktur vůči okolí. Informace je tím redukována na dva stupně: ano - ne. Vytvořený binární obraz je pak v dalším kroku měřen.

Úskali: V mnoha případech je však kontrast požadovaných struktur málo zřetelný, při prahování v celé ploše obrazu se označují i nežádoucí objekty nebo nerovnoměrnosti pozadí. Zde pak nastupuje celý systém úprav, které umožní vytvoření binárního obrazu co nejvěrnějšího požadované skutečnosti. Systémy LUCIA mají k dispozici rozsáhlou škálu úprav kontrastu, zaostření, barevných charakteristik reálného obrazu, způsoby prahování na základě odvozených programů z matematické morfologie a konečně škálu úprav binárního obrazu (erose, dilatace, close, open, fill holes...) a možnost aritmetických operací mezi jednotlivými obrazy. Optimalizovaný sled příkazů (makra) lze uložit a použít jako program pro zcela automatické, na experimentátoru nezávislé, měření rozsáhlých souborů obrazů.

Nicméně, při rozhodování co a jakým způsobem chceme měřit by v prvně řadě měla být věnována velká pozornost optimalizaci způsobu snímání obrazu (osvětlení svrchní či prosvícení, zaclonění, barevný filtr, obarvení objektu, kvalita preparátu, nastavení mikroskopického obrazu a pod.) tak, aby požadovaný objekt, struktura, byla zobrazena jasně, a kontrastně. Kvalitní obraz ušetří mnoho práce programátorské a umožňuje rychlé zpracování.

Před vlastním měřením je třeba nejprve zvolit parametry (na př. plocha, délka, šířka, cirkularita, densita,...) které budou měřeny a zvolit způsob měření (celé pole, objekty, označené jednotlivé objekty). Dále je třeba vytvořit kalibraci systému tak, aby měření probíhalo v reálných jednotkách.

PŘÍKLADY POUŽITÍ:

Měření délky kořenového systému a počtu postranních kořenů je jednou z nejběžnějších úloh. U jednoduchých kořenů (na př. kořenový systém 2 týdních rostlin pšenice) se provádí měření přímo na rozprostřených kořenech při prosvícení. U větších lze použít na př. metodu rozřezání kořenů na segmenty konstattní délky a rychlé stanovení jejich počtu na obrazové analýze nebo kombinaci s metodami stereologickými na př. stanovení počtu průsečíků se sítí rovnoběžných přímek.

Stanovení listové plochy je úloha jednoduchá, nicméně konvenčními metodami zejména při členitých tvarech, časově náročná. Určení plochy jehlic smrku na letorostech dává další možnosti při posuzování fyziologických charakteristik poškození lesů (na př. referenční hodnota k měření fotosyntézy). V posledních letech byly publikovány práce zabývající se využitím obrazové analýzy pro získání tvarových charakteristik listu. Zpravidla se jedná o vytvoření matematického vzorce sestaveného z naměřených parametrů (na př. délka, šířka, obvod, poloměr kružnice vepsané a pod.), který co nejlépe vystihuje ten který morfologický typ.

Řada aplikací byla vyvinuta pro posuzování velikosti, tvaru a povrchu semen. Ty byly použity na př. pro posuzování projevů genetické příbuznosti jednotlivých genotypů, ale též pro určení čistoty, vyrovnanosti osiva nebo potravinářských kontrolách kvality potravin.

Široké použití má obrazová analýza v oblasti fytopatologie. Jako příklady uvedme alespoň : stanovení rozsahu lézí na listech po napadení listů brambor fuzariem, stanovení počtu sklerocií rzí na listech trav, stanovení procenta plochy listu poničené požerem hmyzím škůdcem, stanovení rozsahu poškození povrchu hlíz houbovou chorobou, atd.

Na mikroskopické úrovni uvedeme příklady několika typických úloh: při dostatečně kontrastním obarvení preparátu lze prahovat protoplasty (resp. stěny buněk + invertovat binární obraz) a pak stanovit počet, velikost a tvarové charakteristiky buněk. S výhodou lze použít nastavení "masky", kterou můžeme vymezit měřenou oblast či funkce "restrikci", kdy měřené parametry můžeme rozřadit na několik kategorií a na obrazovce je zpětně vizualizovat (na př. tři velikostní skupiny). Úskalím jsou materiály, které se obtížně barví nebo se navzájem překrývají, jako na př. preparáty buněčných suspenzí. Při stanovení počtu buněk může být řešením na př. obarvení jader na př. DAPI a v odpovídající fluorescenci stanovit počet zářících objektů, které se snadno naprahují a minimálně překrývají.

Zcela nové možnosti dává obrazová analýza pro histochemické studie. Při prahování na barevný odstín výsledného produktu reakce, je možné určit plochu pozitivně reagujícího pletiva a při vhodné kalibraci a respektování příslušných kontrol, získat i kvantitativní údaje o intenzitě histochemické reakce. Podobně lze i počítat množství partikulí zlata (imnocytochemické metody) nebo stříbra (autoradiografie).

Záměrně vynechám použití obrazové analýzy pro cytogenetická studia, protože jim budou věnovány samostatné referáty a také použití obrazové analýzy pro gelové elektroforézy je otázka speciálních programů.

PREZENTACE. Digitální obraz pořízený obrazovou analýzou a upravený pro prezentaci (kontrast, popis textem, šípkami a pod.) lze vytisknout na tiskárně. Velmi se nám osvědčil termoprinter Mitsubishi P66 D, který tiskne ve velmi dobré kvalitě levné obrázky (cena asi 2Kč), takže je dostupný i jako protokolová dokumentace. Obrázky lze exportovat přímo do textu psaném na př. ve Wordu a podle našich zkušeností jsou akceptovány i redakcemi časopisů. Je třeba upozornit, že tisky z černobílého termoprintu na ostrém světle časem blednou (xerokopie, nový tisk). Pro tisk barevných obrázků lze použít na př. barevný printer Mitsubishi CP 52E. Při správném nastavení je kvalita zcela srovnatelná s barevnou fotografií a je stabilní.

Obrazová analýza je významným metodickým přínosem pro řešení mnoha fyziologických problémů. Nejen, že práci významně zrychluje, ale v mnoha aplikacích získává údaje dosud nedostupné. Metoda je ve velkém progresu. Před třemi lety na konferenci FESPP byla prezentována sdělení ze tří pracovišť. V tomto roce bylo již do podzimu publikováno několik desítek prací používajících obrazovou analýzu. Troufám si odhadnout, že do dvou let mohou být kvantitativní údaje získané objektivním měřením na obrazové analýze podmínkou pro publikovatelnost výsledků.

Rostlinné HeLa buňky? Buněčné linie jako alternativa klasických rostlinných modelů.

Opatrný, Z.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2
tel: 02/21 95 32 79, fax: 02/ 21 95 33 06, e-mail : opat@mail.natur.cuni.cz

Linie *in vitro* pěstovaných buněk vyšších organizmů patří již neodmyslitelně mezi biologické materiály významné a nezastupitelné jak z hlediska aplikace v experimentálním výzkumu, tak v medicínské praxi. Navzdory srovnatelné historii existence výzkumných oblastí rostlinných (*Haberlandt 1902*) a živočišných (*Roux 1892*) *in vitro* kultur je prozatím nejen praktické, ale též experimentální využití rostlinných buněčných linií výrazně omezenější. Není to způsobeno jen tradičně menším obecným impaktem rostlinných věd oproti živočišným, důvodem je i řada technických či metodických nevýhod, které většinou rostlinné buněčné linie oproti živočišným mají. Prvým problémem je již sama možnost jejich cílené přípravy a standardisace, dalšími jejich nízká cytologická a fyziologická homogenita, stabilita, růstová rychlost, omezené možnosti jejich konservace a j. Srovnatelnost s parametry obecně používaného modelu živočišných HeLa buněk (“nesmrtelná” buněčná linie, odvozená v 60-tých letech z cervikálního tumoru Heleny Langové, U.S.A.) je, navzdory reklamnímu titulku publikace *Nagata et al. 1992*, samozřejmě pouze částečná. Rostlinná linie tabákových buněk BY-2 je sice též “nesmrtelná” *sensu lato*, vyznačuje se vysokou růstovou rychlostí a viabilitou, je fenotypově stabilní za standardních kultivačních podmínek. Není však samozřejmě nadána kontaktní inhibicí, neadheruje k podkladům srovnatelně s příslušnými kmeny HeLa, neroste na nich v podobě monolayeru, není totálně a spontánně disociovatelná na jednotlivé buňky, má podstatně nižší plotnovací efektivitu atd. V řadě parametrů však podstatně převyšuje dosud používané rostlinné buněčné kultury, vyjma snad jediné, t.j. linie VBI-0 (*Opatrný 1971, Opatrný a Opatrná 1976*). Proč je tomu tak, je to dáno jen malou pílí či zájmem badatelů či odlišnostmi rostlinného materiálu oproti živočišnému?

Příspěvek si klade za cíl seznámit posluchače v první řadě se základními technickými úskalími přípravy různých typů rostlinných buněčných kultur, možnostmi selekce vhodných buněčných populací, způsoby klonování jednotlivých somatických buněk. Budou posouzeny účinky různých faktorů na takové vlastnosti buněčných kultur, jež bezprostředně ovlivňují jejich experimentální využitelnost, zejména pak na rozpadavost (friabilitu), odolnost k různým typům stresu, celkovou růstovou rychlost a výtěžnost, životaschopnost a stárnutí, cytologickou i genetickou homogenitu, synchronnost jednotlivých fází buněčného i růstového cyklu.

Typy buněčných kultur, kultivace jednotlivých buněk, kultivace buněčných populací

V podmínkách *in vitro* lze pěstovat jak tělní (somatické) buňky, tak buňky podílející se v generativním rozmnožování, zejména mikro- případně megasporu. Zvláštní typ kultur pak představují buňky dočasně zbavené buněčné stěny, t.j. izolované protoplasty. Ve všech těchto případech je možné pěstovat buňky buď jednotlivě (mikrokultury) nebo v podobě buněčných populací nejrozličnějšího objemu. Každá z technik má samozřejmě své nároky a limity, úspěšnost pěstování jednotlivých buněk je mj. podmíněna dodržением vhodného poměru mezi objemem kultivačního media a objemem biomasy. Densita inokulí nižší než 10^4 buněk na ml media je většinou kritická nejen pro jejich další dělení, ale též přežití. Pro klonování buněk (přípravu “single cell clones” fyziologicky a geneticky potenciálně homogenních) je tak nutno aplikovat techniku t.zv. nanokultur (pěstování jednotlivých buněk resp. protoplastů v kapkách objemu desítek nl). Alternativu představuje použití t.zv. kondiciovaných (conditioned) medií, t.j. půd, v nichž krátkodobě rostla vhodná kultura či různé techniky “chůvy” (nurse culture), při nichž tato pomocná kultura produkuje esenciální látky difundující ke klonovaným buňkám. Fenomén “conditioningu” je blíže studován i v souvislosti s výzkumem chemické signalisace u rostlin v různých fázích vývoje (ku př. v rané embryogenezi, zygotické i somatické).

Rozpadavost a růstová rychlost

Předpokladem vzniku buněčných kultur je dostatečná spontánní rozpadavost pěstovaných pletiv, t.j. odlučitelnost životaschopných dceřinných buněk následných generací. V přírodě se takový jev vyskytuje jen zřídka (tekuté endospermy, zrání plodů a p.), v podmínkách *in vitro* kultury je podpořen složením kultivačního media a úměrným mechanickým pohybem tekuté půdy (třepání či probublávání na třepáčkách, rollerech, ve fermentorech). Odvození vysoce rozpadavých buněčných linií je až na výjimky výsledkem dlouhodobé (i víceleté) selekce buněčných subpopulací s pravděpodobným defektem syntézy mezibuněčné centrální lamely. Techniky analogické trypsinisaci živočišných tkání (ku př. aplikace pektinázy, celulózy, hemicelulózy), právě tak jako mechanická frakcionisace kultur nevedou k úspěchu: výsledkem je většinou opakovaná tvorba kompaktních buněčných agregátů. Takové kultury lze jen s rozpaky nazývat “buněčnými liniemi” - v mikroprostředí velkých agregátů se diferencují buňky fyziologicky i morfologicky velmi různorodé, výrazně se lišící průběhem buněčného cyklu, biologickou odpovědí na vnější faktory a p. Nízce rozpadavé kultury jsou nevhodné pro cytologické práce a mimoto mají většinou jen nízkou růstovou rychlost. Získání vysoce rozpadavé buněčné linie od konkrétního rostlinného materiálu může mít tedy pro daný typ pokusů klíčový význam.

Taxonomická / genotypová/ orgánová specifita rozpadavosti linií

Mechanismus fenoménu rozpadavosti buněčných linií nebyl dosud hlouběji studován. Je nicméně zřejmé, že kromě níže uvedených faktorů (medium, zejména jeho hormonální složení, kultivační režim) hraje podstatnou roli sám původ materiálu. Existují taxony, od nichž navzdory soustavnému úsilí nebyly dosud vhodné buněčné linie odvozeny (ku př. některé hospodářsky významné druhy čel. bobovitých - jako hrách či koňský bob). Dělicí čarou přitom není ku př. původ bylinný či dřevinný, kultury typu “Paul’s Scarlet Rose” (růže - viz ku př. *Weinstein et al. 1962*) či “sycamore cell line” (*Acer pseudoplatanus* - viz ku př. *Gould et al. 1974*) patřily již před řadou let k oblíbeným modelovým materiálům.

Vliv kultivačních podmínek: medium, kultivační režim

Klíčovou roli v navození a udržení rozpadavosti, právě tak jako růstové rychlosti a fenotypové stability kultur hrají (zřejmě) růstové látky. Dosud známé, obecněji využívané buněčné linie (viz níže) byly vesměs pěstovány v mediích s poměrně vysokým obsahem (10^{-5} M) syntetických auxinů typu 2,4-D či NAA, při současné absenci cytokininů. Přídavek cytokininů má obecně za následek zvýšení kompaktnosti i rozměrů buněčných agregátů. Snad proto téměř neexistují kvalitní cytokinin - dependentní buněčné linie.

Spontánní rozpadavost materiálu se většinou mění v průběhu subkultivačního intervalu (SBI). Je nejnižší v průběhu exponenciální fáze růstu kultur, během níž se buňky původního inokula do různé míry synchronně dělí a vytvářejí řetízkovité či sférické agregáty, stoupá s nástupem stationární fáze, během níž se buňky dluží resp. rostou. Buněčná linie během obvyklého SBI tak do jisté míry imituje chování buněk a pletiv *in vivo*: stárnutí některých orgánů může být následováno abscisí či autolysou pletiv. Vhodným subkultivačním režimem - zvolenou délkou SBI, densitou inokula atd. můžeme tyto procesy do jisté míry ovlivnit. Velmi nízká densita inokula tak v příp. modelových linií (VBI-0, BY-2, HBY-2) má za následek tvorbu kompaktních, mnohabuněčných, většinou sferisujících agregátů. Při subkultivaci pomocí vysoce densitních inokulí (až 10^5 buněk / ml) lze naopak průběžně udržovat linii v podobě velkých, často volných buněk, jež jsou vhodné pro cytologické či cytochemické analýzy.

Genotyp, stabilita

Dosud existuje jen velmi málo údajů o genetické vyrovnanosti modelových dlouholetých linií typu SCL, BY-2, VBI-0. Jejich karyologický obraz by bylo možno definovat jako “dynamickou nestabilitu” v níž jsou extrémní odchylky průběžně spontánně eliminovány. V případě linie VBI-0 přetrvává tetraploidie (cca $4n = 48$ chromosomů) s občasnými výkyvy $\pm 2-4$ chromosomů, tedy stav blízký zřejmě situaci somatických pletiv tabáku. Pro práce fyziologického charakteru takové kultury tedy představují velice vyrovnaný pokusný model.

Buněčný cyklus, synchronisace

I z těchto důvodů vykazují kvalitní buněčné linie poměrně značnou spontánní synchronnost buněčného dělení v průběhu standardního SBI. V případě linie VBI-0 (a také BY-2, za určitých kultivačních podmínek) může tato hodnota aktuálního mitotického indexu dosahovat úrovně až 12-15%, tedy srovnatelné s hodnotami kořenových meristémů. Výsledky biochemických analýz lze tak poměrně dobře korelovat s určitou fází životního až buněčného cyklu buněk (přinejmenším s porovnáním mitotické buňky: interfázní buňky, viz *Začimalová et al. 1995, 1996*) a naměřené hodnoty (enzymových aktivit/ hladin hormonů, cukrů, škrobu/ kapacity vazebných míst/ posttranslačních modifikací proteinů/ inkorporovaných těžkých kovů atd.) vztahovat nikoliv na jednotku biomasy či proteinu, ale na jedinou buňku. Informace běžně skryté v “šumu” průměrných výsledků tak náhle poskytují zcela nový logický pohled na zkoumaný děj (viz příklady uvedené v přednášce).

Významný metodický pokrok samozřejmě představují práce s buněčnými liniemi dočasně cíleně synchronizovanými. V případě linie BY-2 byla již úspěšně vypracována technika kombinované synchronizace pomocí aphidicolinu (inhibitor DNA polymerázy alfa) a některých mikrotubulárních jedů, blokujících funkci dělicího vřeténka (oryzalin či propizamid) - blíže viz *Nagata et al. 1992, Shibaoka 1993*. Výsledkem může být až 90-95% kumulace buněk v metafázi, již lze zrušit odstraněním inhibitorů a navodit další, podstatně však již nižší “mitotickou vlnu”. Takto synchronizované linie slouží k nejrůznějším typům analýz strukturálních (ku př. stav cytoskeletu - *Shibaoka 1993*) či biochemických (histony - *Reichheld et al. 1995*, růstové látky - *Redig et al. 1996*, cAMP - *van Onckelen et al., unpublished* a j.) v různých fázích buněčného cyklu. Výsledkem pak mohou být zjištění zásadního významu: tak ku př. analýza asynchronní populace buněk rostlinných orgánů doposud poskytovala zcela rozporné či spíše negativní údaje o roli cAMP. Výsledky týmu prof. van Onckelena dosažené s pomocí synchronizované linie BY-2 vykazují zásadní rozdíly hladin cAMP v různých fázích cyklu, jež by při “zprůměrování” materiálu samozřejmě unikly pozornosti.

U linie VBI-0 nebyla zatím tato synchronizační technika aplikována: částečného zvýšení MI bylo dosaženo aplikací hydroxymočoviny, veškeré další doporučené postupy (hladovění, teplotní stres aj.) byly téměř neúčinné.

Fenotyp, stabilita

Významným, experimentálně využitelným znakem buněčných linií mohou být vedle biochemických charakteristik i jejich morfologie. Rostlinné kultury se samozřejmě nevyznačují takovou mírou morfologické stability jako některé buněčné linie živočišné, jejich fenotyp není *a priori* určen histogenetickým původem. Buněčné linie odvozené z nejrůznějších orgánů resp. pletiv mohou mít takřka totožný vzhled, naopak z téhož výchozího explantátu lze cíleně či nahodile odvodit linie kontrastního fenotypu. Za standardních kultivačních podmínek však mohou být růstové schopnosti, tvar a velikost buněk, stavba buněčných agregátů dané linie velmi stabilní - a naopak vysoce citlivé k různým vnějším faktorům. Buněčná linie tak slouží jako spolehlivý biotest účinku ku př. stresových faktorů, xenobiotik, růstových látek aj. (příklady). Na buněčné úrovni lze tak studovat fenomény polarity, regulace buněčného dělení a růstu, primitivní stadia organogeneze či embryogeneze, projevy a mechanismy mezibuněčné komunikace, interakce rostlinných buněk s mikroorganismy, mechanismy programované buněčné smrti (apoptosy) ap.

Buněčné linie jako alternativa komplexních modelů: výhody, omezení, perspektivy

Není jistě sporu o tom, že v podmínkách *in vitro* kultury lze simulovat jen část “normálního chování” intaktních rostlin žijících v přirozených společenstvech a pomocí buněčných linií jen zlomek životních procesů komplexní rostliny. Přesto již nyní představují unikátní doplňkový pokusný model. Vedle běžně uváděných předností (přesně definované kultivační podmínky, vysoce fyziologicky (?) a morfologicky homogenní materiál, snadná a synchronní aplikace studovaného regulačního faktoru) poskytují možnost simultánní analytické práce na řadě úrovní (biochemie, standardní cytologie, cytochemie, *in situ* hybridizace), bezprostředního sledování široké buněčné populace, studia jejich adaptačních reakcí. Použitelné je spektrum mikrotechnik (mikroinjekce či jiné mikromanipulace) a technik obrazové dokumentace (časoběrná fotografie, mikrokinematografie, videozáznam, pulsní záznam pomocí analýzy obrazu, včetně uplatnění konfokální mikroskopie - příklady).

Prozatím neúspěšné byly pokusy o dlouhodobější udržení synchronně se dělících (a vyvíjejících) buněčných populací - i při vysoké úrovni první vlny mitotických buněk již následná klesá nejméně na polovinu, synchronizační účinek dále rychle odeznívá. Lze si tedy zatím klást otázku, nakolik "normální" metabolické děje stanovujeme v buňkách oné první, umělé vlny.

Možná bezvýhodné je i úsilí o vyvolání buněčného (či opakovaně jaderného) dělení v izolovaných protoplastech, tedy bezbuněčných buňkách vyšších rostlin, tuto schopnost zatím vykazuje pouze jeden mutantní kmen *Chlamydomonas*.

Velmi obtížná je i nadále kultivace fenotypově vyrovnaných buněčných linií za extrémních podmínek - a to jak v podobě "single cells", tak ve velkých objemech, potřebných pro preparativní analýzu. Teprve další úsilí ukáže, zda příčinou je sama podstata rostlinného materiálu, či pouze naše dosavadní neznalost zákonitostí, řídících chování rostlinných buněk.

Literatura:

- Gould, A. R., Bayliss, M. W., Street, H. E.: J. Exptl. Bot. 25: 468 (1974)
Opatrný, Z.: Kand. dis. práce ÚEB ČSAV (1971)
Opatrný, Z., Opatrná, J.: Biol. Plant. 18: 381 (1976)
Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S.: Intern. Rev. Cytol. 132: 1-30 (1992)
Redig, P., Shaul, O., Inzé, D., van Montagu, M., van Onckelen, H.: FEBS Lett. 391: 175 (1996)
Reichheld, J.-P., Sonobe, S., Clément, B., Chaubet, N., Gigot, C.: Plant J. 7: 245 (1995)
Weinstein, L. H., Tulecke, W., Nickell, L. G., Laurencot, H. J.: Contrib. Boyce Thompson Inst. 21: 371 (1976)
Zažímalová, E., Březinová, A., Holík, J., Opatrný, Z.: Plant Cell Rep. 16: 76 (1996)
Zažímalová, E., Opatrný, Z., Březinová, A., Eder, J.: J. Exptl. Botany 46: 1205 (1995)

Testy životnosti a poškození rostlinných pletiv po působení mrazů.

Prášil, I.T., Prášilová, P.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 16106 Praha,
tel: 02/36 08 51, e-mail: prasil@hb.vurv.cz

Metody určení odolnosti rostlin vůči mrazu lze rozdělit na přímé a nepřímé (Prášil et al. 1994, upraveno):

Typ	Otužování	Působení mrazů	Testy životi
Přímý	v přirozených nebo regulovaných podmínkách	přirozené nebo navozené v laboratoři	- růstový - vodivostní - stanovení Rd - chl. fluoresce - TTC
Typ	Otužování	- Markery -	
Nepřímý	v přirozených nebo regulovaných podmínkách nebo bez otužení	morfologické fyziologické biofyzikální ... genetické	- tvar růstu... - obsah vody... - permitivita pl - gliadiny

Při nepřímém stanovení odolnosti nejsou rostliny vystaveny mrazu, nemusí ani projít fází otužování rostlin, která je spojena s indukci odolnosti. Přímé metody jsou založeny na přímém vystavení rostlin resp. jejich pletiv mrazu. Potom následuje fáze stanovení životnosti a poškození pletiv (testy životaschopnosti), na jejíž přesnosti závisí možnost kvantifikace poškození a odolnosti pletiv vůči mrazu.

V následující tabulce uvádíme nejčastější testy životnosti používané při stanovení odolnosti pletiv vůči mrazu (zpracováno podle Palta et al. 1978, Calkins et Swanson 1990 a další):

Podstata testu	Druh testu
- schopnost růst a vyvíjet se	- růstový test - tvorba kalusu - regenerace nadzemí
- funkce plazmalemy a tonoplastu - schopnost osmózy - propustnost barviv - rozdílný výtok látek - porušenost membrán - udržení turgoru	- plazmolýzový frekv - barvení vakuoly - vodivostní metoda - ninhydrínový test - měření impedance p - vizuální metoda, inf
- funkce cytoplazmy a organel - enzymatické funkce - fluorescence chlorofylu - schopnost výdeje O ₂ resp. Příjmu CO ₂ - schopnost metabolizovat látky - schopnost barvit struktury	- aktivita enzymů - TTC test - měření fluorescen - měření rychlosti d - značení látek - barvení (testy s fl

Testy lze dále dělit podle toho jestli jimi stanovíme nepoškozené či mrtvé části, nebo vratné či nevratné poškození. V naší laboratoři jsme užili nebo užíváme tyto testy: růstový (dlouživého růstu), regenerační, stanovení rychlosti dýchání, fotosyntézy, fluorescence chlorofylu, TTC, udržení turgoru, barvení cytoplazmy, impedance pletiv a vodivostní měření výtoku elektrolytů. Naměřené hodnoty jednotlivých charakteristik vyjadřujeme obvykle v procentech kontrolní varianty z 0 °C. Při užití několika odstupňovaných intenzit mrazu a vyhodnocení dat vhodnými statistickými metodami (probitová analýza nebo logistická křivka) vypočítáme pro každou charakteristiku letální nebo-li kritickou teplotu LT50 (Janáček et Prášil 1991). Ta udává teplotu mrazu, která vede k 50% poškození dané charakteristiky a slouží jako kvantitativní ukazatel její odolnosti. Z našich prací vyplývá rozdílná úroveň mrazuvzdornosti jednotlivých charakteristik v závislosti na růstu a vývoji rostlin.

Bližší uvádíme metodu měření elektrické vodivosti vyplavených iontů. Tato metoda, nazývaná také jako konduktometrická, je široce užívána při hodnocení škod způsobených různými stresovými faktory (např. chladem, horkem, suchem). Založena je na měření množství uvolněných iontů z poškozeného pletiva do vody a vychází z předpokladu, že vyteklé množství iontů je úměrné stupni poškození pletiv mrazem. Množství vyteklých iontů je ovšem ovlivněno dalšími faktory jako jsou množství a obsah iontů a vody v pletivu, velikost, tvar a struktura užitých segmentů při přípravě vzorků a doba výtoku iontů. Snaha oddělit tyto rušící faktory od přesného stanovení poškození vzorků mrazem vedla postupně k řadě modifikací vodivostní metody. Poslední úpravy jsou uvedeny v naší práci (Prášil et Zámečník 1997) a v základě spočívají na současném stanovení tzv. relativní vodivosti vzorků kontrolních (nezmrazených) R_0 a vzorků usmrčených mrazem R_f . Relativní vodivost udává množství vyplavených iontů ze vzorku v poměru k maximálnímu množství iontů vyplavených z těchto vzorků po varu. Poškození pletiv způsobené mrazem vyjadřujeme v hodnotách indexu poškození $I_t = (R_t - R_0)/(R_f - R_0)$, kde R_t = relativní vodivost vzorku vystaveného mrazu t . Index poškození nabývá hodnot 0 až 100%. Takto upravenou metodou lze porovnávat mrazové poškození různých druhů vzorků, např. listů, kořenů, jehlic, větévek, pupenů, jednotlivých šupin, vzrostných vrcholů, různých tkání, jejich kultur a podobně. Touto metodou lze hodnotit nevratnost nebo vratnost (reparaci) poškození rostlinných pletiv v poststresové době. Uvádí se, že konduktometrická metoda umožňuje měřit změny v semipermeabilitě plazmalemy.

Literatura:

- CALKINS J B, SWANSON B T, 1990. *The distinction between living and dead plant tissue - viability tests in cold hardiness research*. Cryobiology 27: 194-211.
- JANÁČEK J, PRÁŠIL I, 1991. *Quantification of plant frost injury by nonlinear fitting of an S-shaped function* Cryo-Letters 12: 42-42.
- PALTA J P, LEVITT J, STADELMANN E J, 1978. *Plant viability assay*. Cryobiology 15: 249-255.
- PRÁŠIL I, PRÁŠILOVÁ P, PAPAISIS K, VALTER J: *Evaluation of freezing injury and dynamics of freezing resistance in cereals*. In: eds. Dorffling K, Brettchneider B, Tantau H, Pithan K "Crop adaptation to cool climates", ECSP-EEC-EAEC, Brussels, Belgium, 1994, 37-48.
- PRÁŠIL I, ZÁMEČNÍK J: *The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury*. Environmental and Experimental Botany, 1997, v tisku.

Biotest na pôsobenie galaktoglukomanánových oligosacharidov v predĺžovacom raste indukovanom rastovou látkou

Sadloňová, K., Lišková, D., Kákoniová, D., Kubačková, M., Karácsonyi, Š.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, SK
tel: (0421) 07/378 26 55, fax: (421) 07/37 38 11, e-mail: chemkari@savba.sk

Metóda umožňuje sledovať predĺžovací rast rastlín ovplyvnený rôznymi rastovými regulátormi a ich vzájomné porovnanie.

Materiál a prístroje: semená hrachu (*Pisum sativum* L. cv. Tyrkys od firmy Selgen Slovakia), hrubozrnný perlit, SAVO, tlmivý roztok, roztoky galaktoglukomanánových oligosacharidov (GGMO) a rastových regulátorov (2,4-D), strojček na sekание segmentov z koleoptíl, sušiareň, autokláv, trepačka, flow box v tmavej komore, tmavá rastová komora, fotografický zväčšovací prístroj

Pracovný postup:

Semená hrachu sa pestujú v tmavej komore na jedencentimetrovej vrstve dobre navlhčeného sterilizovaného perlitu a prikryté 1-2 cm vrstvou zľahka utlačeného perlitu. Semená sa nakličujú pri teplote 23 ± 1 °C 8 dní, počas ktorých kľúčne rastliny vytvoria tri internódia a dosahujú výšku 10-15 cm.

Všetky nasledujúce kroky pokusu treba robiť pri zelenom svetle. Pokusy je potrebné robiť so všetkými roztokmi sterilnými a pracovať v sterilných podmienkach. Z približne rovnako veľkých kľúčnych rastlín sa odstrihne tretie internódium hneď za rastovým vrcholom a nasekajú sa pomocou strojčeka segmenty 6 mm dlhé, ktoré sa hneď vkladajú do základného inkubačného roztoku (10 ks/3ml roztoku). Robia sa dve paralelné vzorky, aby bolo možné porovnanie. Sleduje sa rast v kontrole, auxínovej kontrole a oligosacharidovej vzorke.

Základný inkubačný roztok (ZIR): K - fosfátový tlmivý roztok 5 mM, pH = 6,1, 1% sacharóza
látky pridávané do ZIR: 2,4-D (0,9 mM), oligosacharidy galaktoglukomanánového typu, DP 4-8 (10-5 - 10-10 M)

Kontrola obsahuje ZIR.

Auxínová kontrola obsahuje ZIR a auxín (2,4-D) pridávaný po 90 min.

Oligosacharidová vzorka obsahuje ZIR, auxín (2,4-D pridávaný po 90 min.), oligosacharidy (DP 4-8) pridávané na začiatku pokusu.

Kinetika rastu sa zaznamenáva v krátkodobých pokusoch od 2. do 6. hodiny inkubácie a pri dlhodobých pokusoch od 6. do 24. hodiny (prípadne 48. h).

Výhodnotenie pokusu:

Segmenty sa ukladajú na platňu a pomocou fotografického zväčšovacieho prístroja pri zv. 1,4 sa segmenty fotografujú. Na fotografiách sa meria dĺžka segmentov milimetrovým pravítkom.

Výhodnotenie experimentálnych dát:

Výpočet percenta inhibície sa robí pomocou vzorca:

$$\frac{L(AUX) - L(AUX + GGMO)}{L(AUX) - L(K)} \times 100$$

kde L(AUX) je dĺžka segmentu inkubovaného v auxínovej kontrole (0% inhibícia)

L(K) je dĺžka segmentu inkubovaného v kontrole bez auxínu (100% inhibícia)

L(AUX + GGMO) je dĺžka segmentu inkubovaného v oligosacharidovej vzorke sauxínom

Časová náročnost:

Délka klíčení je 8 dní, realizácia a vyhodnotenie pokusu trvá dva dni.

Úskalia metódy:

Rast klíčnych rastlín je často nerovnomerný a pri pokuse je potrebné vybrať rastliny rovnakej dĺžky, čo znižuje množstvo použiteľného materiálu. Rast nie je možné zaznamenávať kontinuálne pri uvedenom mechanickom meraní. Na meranie kontinuálneho rastu je potrebný špeciálny merací prístroj.

Tipy:

Pri sadení sa semená hrachu prikryjú 1 až 2 cm vrstvou perlitu, ktorý sa zľahka utlačí, čím sa dosiahne približne rovnaký rast klíčnych rastlín. Pokiaľ nie je k dispozícii fotografický zväčšovací prístroj, môžeme meranie robiť aj priamo pomocou milimetrového papiera.

Literatúra:

Aldington S, Fry SC: *Adv. Bot. Res.* 19, 1-101 (1993)

Auxtová O, Lišková D, Kákoniová D, Kubačková M, Karácsonyi Š, Bilisics L: *Planta* 196, 420-424 (1995)

Branca C, De Lorenzo G, Cervone F: *Physiol Plantarum* 72, 499-504 (1988)

Emmerling M, Seitz HU: *Planta* 182, 174-180 (1990)

McDougall GJ, Fry SC: *Planta* 175, 412-416 (1988)

McDougall GJ, Fry SC: *J. Exp. Bot.* 40, 233-238 (1989)

McDougall GJ, Fry SC: *Plant Physiol.* 93, 1042-1048 (1990)

McDougall GJ, Fry SC: *J. Plant Physiol.* 137, 332-336 (1991)

Priem B, Morvan H, Hafez AMA, Morvan C: *C.R. Acad. Sci. Paris Sér. III*, 311, 411-416 (1990)

York WS, Darvill AG, Albersheim P: *Plant Physiol.* 75, 295-297 (1984)

Odporúčaná literatúra:

Albersheim P, Darvill AG: *Sci. Am.* 253, 58-64 (1985)

Albersheim P, Darvill AG, Augur C, Cheong J, Eberhard S, Hahn M, Marfá V, Mohnen D, O'Neill MA, Spiro MD, York WS: *Accounts Chem. Res.* 25, 77-83 (1992)

Côté F, Hahn MG: *Plant Mol. Biology* 26, 1379-1411 (1994)

Hoson T, Masuda Y: *Plant Cell Physiol.* 32, 777-782 (1991)

Histochemické metody při charakterizaci materiálu výplní vodivých pletiv rákosu obecného

Soukup, A. a Votrubová, O.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha
tel: 02/21 95 31 48, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: votrub@prfdec.natur.cuni.cz

Při anatomickém zpracování objektu lze použitím histochemických metod získat výsledky nepostižitelné standardními biochemickými postupy. Mikroskopická histochemie používá řez pletivem, na němž jsou aplikovány a hodnoceny jednotlivé chemické reakce. Stává se tak užitečným nástrojem, poskytujícím informaci o některých kvalitativních charakteristikách a jejich lokalizaci. Tato výhoda se projeví zvláště ve chvíli, kdy je zkoumaná látka omezena pouze na minoritní část orgánu nebo pletiva (např. cévní elementy). Naopak výhodou biochemického přístupu je možnost separace jednotlivých chemických látek a jejich spolehlivá determinace, která je velmi obtížná a často i nemožná v materiálu řezu, kde je směs látek potenciálně schopných dávat stejný, nebo obdobný výsledek. Z tohoto důvodu nemusí také být postupy běžně používané v biochemii relevantní při histochemické aplikaci na pletivo,

Ve své práci jsme využili histochemické metody pro studium struktur, které uzavírají vodivé dráhy rákosu po poškození podzemních orgánů, čímž snižují riziko průniku fytotoxinů a patogenů do celé rostliny. Tyto struktury mají u rákosu charakter gum a jejich tvorba je spolehlivě indukovatelná například mechanickým poškozením. Přestože je tvorba obdobných útvarů známa u různých rostlinných taxonů, je málo prací zabývajících se podrobněji jejich látkovým složením.

S pomocí anatomických a histochemických metod byl sledován časový průběh vývoje gum a povaha materiálu jímž jsou tvořeny. Na řezy čerstvým nefixovaným pletivem byly aplikovány důkazové reakce (viz tabulka), a to buď přímo nebo po předchozí extrakci, která měla umožnit do určité míry selektivní odstranění některých složek materiálu gum (viz. níže).

	Vývojové stádium gumy	
	Časné	Pozdní
<i>Původní zbarvení</i>	Bezbarvé	Světle žluté – tmavě hněd.
<i>Použitý test:</i>		
PAS	XXX	XXX
Schiffovo činidlo	0	0
Alciánová modř	XXX	0 – X
Toluidinová modř – (metachrom.)	XXX	0 – X
Fast green	0	0 – XXX
HCl – floroglucinol	0	0 – XXX
Mäuleho reakce	0	0 – XXX
Anilin sulfát	0	0 – XXX
Reakce HNO ₂ (H-V test)	0	0 – XXX
HCl – Vanilin	0	0 – X
Sudan 7B (PEG)	0	0
Millonova reakce	0	0 – XXX
Ninhydrin – Schiffovo činidlo	0	0
Coomassie brilliant blue		0 – XXX
Amido čern B		0 – XXX
Resorcinolová modř (pH3,5)	0	0
Fluorochrom anilínové modři	0	
Autofluorescence	0	0 – XXX
Pozitivní reakce	-	xxx
Negativní reakce	-	0

Výsledky:

Bezbarvý materiál který se nachází v cévách na začátku vývoje gumy je silně chromotropní při barvení toluidinovou modří. Pozorovaná pozitivní metachromazie je způsobena přítomností volných elektronegativních povrchových nábojů (polyaniontů) o určité hustotě, v živých organismech obvykle

představovaných skupinami $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_4$ (Pearse 1968, Baker 1958). Přítomnost polyaniontů potvrzuje také dobrá barvitelnost alciánovou modří (Beneš 1968), kterou lze právě tak jako metachromazii zvrátit metylací a následně obnovit demethylací.

Vzhledem k umístění materiálu v apoplastu lze podle analogie k známým extracelulárním materiálům rostlinné buňky usuzovat, že detekované karboxylové skupiny jsou velmi pravděpodobně součástí uronových kyselin polysacharidů. Pro tento předpoklad svědčí také pozitivní PAS (Periodic acid – Schiff) reakce. Protože jsou v tomto období vývoje gum negativní testy na polyfenolické látky, je malá pravděpodobnost interference s nesacharidovými složkami (Geier 1980).

Gumy jsou na počátku svého vývoje relativně dobře extrahovatelné chelatačním činidlem (EGTA), a při barvení toluidinovou modří se nad nimi může vytvářet sraženina. pH roztoku toluidinové modří bylo v tomto případě stabilizováno citrátovým pufrům, který může také působit jako chelatační činidlo. Zdá se tedy, že molekuly vyextrahovaného materiálu byly mezi sebou vázány, alespoň do určité míry, přes Ca^{2+} ionty. Tento způsob vazby je dobře známý u pektinů buněčné stěny (Fry, 1986; Carpita & Gibeaut 1993) a lze jej tedy očekávat i zde. Zda se skutečně jedná o pektiny, popřípadě o jiný typ kyselého polysacharidu, nelze na základě zde používaných histochemických metod jednoznačně určit. Pomůžeme-li si opět modelem buněčné stěny vyšších rostlin, která je stejně jako guma extracelulárním materiálem buněk vyšších rostlin, pak lze na základě extrahovatelnosti chelatačním činidlem (EGTA) odhadovat, že by se mohlo jednat o málo větvené typy pektinů (homogalakturonan). Tuto domněnku podporuje poměrně jednotné složení frakcí získaných při tomto způsobu extrakce u buněčných stěn pocházejících z různých zdrojů a rostlinných druhů (Redgwell & Selvedran, 1986; McDougall, 1993; Chesson et al., 1995; Javris et al., 1981). Charakteru pektinů odpovídá také silná hydratace a výrazné smrštění při vyschnutí. McCann et al., (1992) spojuje toto chování s větvenými pektiny (ramnogalakturonany) a jejich konformační změnou při vyschnutí. V jeho práci jsou pektiny tohoto charakteru extrahovány působením Na_2CO_3 (0,05M), aplikovaným v sekvenci extrakční řady, která byla také použita v našich pokusech (Redgwell & Selvedran, 1986).

Interpretace výsledků a jejich srovnání s pracemi jiných autorů komplikuje příslušnost rákosu k čeledi Poaceae, u nichž se matrix buněčné stěny složením a strukturou liší od jiných rostlinných taxonů (Carpita, 1996). Pro její matrix je typický nízký obsah pektinů (zde představovaný převážně homogalakturonanem) a těsná asociace těchto pektinů s GAX (glukuronoarabinoxylany), které mají silně substituované postranní řetězce (Carpita, 1996). GAX provázejí pektiny i ve frakci polysacharidů uvolněných z buněčné stěny po chelataci Ca^{2+} iontů (Schibuya & Nakane, 1984; Carpita, 1989).

S časem mění gumy svůj charakter a jejich materiál ztrácí atributy kyselých polysacharidů. Klesá podíl gum s pozitivní metachromazií, objevuje se ortochromazie a metachromazie negativní; klesá i barvitelnost alciánovou modří. Je tedy patrné, že se snižuje množství volných karboxylů, které pravděpodobně v této fázi vývoje gum reagují s dalšími složkami tohoto extracelulárního materiálu. Současně se zvyšuje procento gum tvořených acidofilním materiálem, tj. barvitelných kyselými barvivy. Gumy se stávají obtížně hydrolyzovatelné v alkalickém prostředí a při vyschnutí u nich nedochází k patrnému smrštění a k vizuálně detekovatelnému poškození.

Tyto změny časově souvisí s kumulací fenolických látek. Lze ji pozorovat jako zvýšení autofluorescence gum, které nemizí ani po vystavení řezů PAW (phenol – acetic acid – water), SDS, 4M KOH + 0,2M NaBH_4 . Proto je vysoce pravděpodobné, že zdroj fluorescence je v materiálu gumy pevně, kovalentně, vázaný (Selvedran, 1975; Fry, 1982). Po extrakci NaClO_2 mizí pozitivní reakce na fenolické látky a gumy se stávají snadno rozpustnými v alkalickém prostředí. Je známo, že tento způsob extrakce delignifikuje pletivo a štěpí izodityrozinové “můstky“ mezi extenzinovými molekulami (Biggs & Fry, 1990, Fry, 1982) a některé další bifenylické vazby mezi složkami buněčné stěny (Fry, 1986). Silný oxidační účinek NaClO_2 může ale ovlivnit i další typy vazby (např. glykosidické, Fry, 1986). V literatuře je popsáno přímé uvolnění (Saulnier, 1995) i snazší extrahovatelnost (Carpita, 1984) polysacharidů matrix buněčné stěny po této proceduře. Tyto výsledky by mohly nasvědčovat přítomnosti kovalentní vazby polysacharidů přes fenolické látky, známé z buněčné stěny vyšších rostlin (Iiyama et al., 1994; Lam et al., 1992; Grabber et al., 1995). Autofluorescence je u rákosu zřetelná ve všech

buněčných stěnách na řezu, tedy i ve stěnách nelignifikovaných. To je typické pro buněčné stěny trav, bohaté na jednoduché aromatické látky (kys. ferulovou a kys. p-kumarovou) (Harris & Hartley, 1976; Rudall & Caddick, 1994), které tvoří vazby mezi jednotlivými složkami matrix buněčné stěny (Lam et al., 1992; Scalbert et al., 1985; Grabber et al., 1995). Uvedené práce dokumentují schopnost fenolické kyseliny tvořit mezi karboxylem jednoho z polů své molekuly a hydroxylovou skupinou polysacharidu esterickou vazbu. Fenolická část molekuly se může etericky (ev. estericky přes karboxyl) vázat k ligninu. Vznikají tak jakési "můstky" propojující jednotlivé složky matrix. Vzhledem k tomu, že tato esterická vazba je labilní v alkalickém prostředí (Hartley & Morrison, 1991; Scalbert et al., 1985; Saulnier, 1995), nelze takto vysvětlit odolnost gum vůči extrakci v 4M KOH. Přesto je patrné, že skořicové kyseliny v matrix buněčných stěn po ošetření 4M KOH zůstávají, jak o tom svědčí přetrvávající fluorescence ve složených středních lamelách nelignifikovaných buněčných stěn, která je těmto kyselinám připisovaná (Harris & Hartley, 1976).

Dalším potenciálním zdrojem autofluorescence by mohla být strukturní, kovalentně vázaná bílkovina. Poranění nebo infekce může vyvolávat zvýšenou syntézu extracelulárních strukturních proteinů - extenzinů (Schowalter, 1993; Bradley, 1992), právě tak jako jejich urychlenou vestavbu do buněčné stěny (Bradley, 1992). Při imobilizaci proteinu v buněčné stěně vznikají vazby k ostatním složkám matrix (Iiyama et al., 1994; Schowalter, 1993) a velmi pravděpodobně také vazby mezi jednotlivými molekulami proteinů (Fry, 1982; Biggs & Fry, 1990; Qui & Mort, 1995). Biggs & Fry (1990) považují právě izodityrozinové "můstky" mezi molekulami extenzinu za vazbu způsobující vysokou stabilitu těchto proteinů v buněčné stěně. Přítomnost bílkoviny by mohla vysvětlit acidofilii gumy a pozitivní Millonova reakce by pak mohla být způsobena (alespoň částečně) přítomností tyrozinu. Do jaké míry lze tuto představu aplikovat na rákos však není zcela jasné. Ačkoliv byly v buněčné stěně trav nalezeny extenzinům homologní proteiny (Kieliszewski et al., 1990; Schowalter, 1993), jejich obsah se zdá být obvykle nižší než je tomu u jiných taxonů. Zároveň se předpokládá se, že jejich funkce by měla být do značné míry nahrazena fenolickými látkami (Carpita, 1996). Přítomnost aminoskupiny, která by prokazovala přítomnost bílkovin, se v gumách histochemicky prokázat nepodařilo. Po hydrolyze extracelulárního materiálu v HCl (6M, 110°C) je však v roztoku možné detekovat aminokyseliny. Zda pocházejí z gum a zda jsou zodpovědné za jejich vlastnosti bude vyžadovat další sledování.

Materiál gum může dávat pozitivní reakci s HCl-Floroglucinolem, Anilin sulfátem a rovněž pozitivní Mäuleho reakci. Tyto reakce jsou v buněčných stěnách považovány za důkaz výskytu ligninu. Tuto kladnou odezvu lze potlačit extrakcí 4M KOH s 0,2M NaBH₄ a to jak v gumách, tak i v lignifikovaných buněčných stěnách. Výskyt pozitivní reakce přiřítané lignifikaci je však v gumách nepravidelný a lze ji těžko spojovat s odolností vůči alkalické hydrolyze. V gumách s pozitivní reakcí na lignin byla často pozorována i pozitivní Millonova reakce. Protože tato reakce může být způsobena nejen přítomností tyrozinu, ale i jinými látkami (např. prekurzory ligninu), lze předpokládat, že obě skupiny reakcí detekovaly v některých případech shodný substrát. Millonova reakce však byla pozitivní i na gumách s negativní reakcí na lignin a po extrakci 4M KOH. Lze tedy říci, že není způsobena pouze ligninem a jeho prekurzory.

Interpretace výše uvedených a podobných výsledků je komplikována přítomností širokého spektra různorodých látek, často sekundárních metabolitů. Právě tento faktor, odlišující rostliny od živočichů, je třeba brát v úvahu při výkladu výsledků. Některé z použitých metod byly původně vypracovány pro živočišný materiál a z toho vychází i jejich tradiční interpretace, jejíž užití pro rostlinný materiál však může vést k mylným závěrům. Žádná z použitých důkazových reakcí není stoprocentně specifická a může tedy docházet i k různým interferencím. Je proto třeba užívat širšího spektra reakcí různého typu. Interpretace výsledků v takovémto širším kontextu pak zvyšuje jejich výpovědní hodnotu. Pravděpodobnost chybné interpretace lze snížit také kombinací s vhodně volenými biochemickými metodami.

Literatura:

- Baker JR (1958) Principles of biological microtechnique (a Study of Fixation and Dyeing). London: Methuen and Co. Ltd.
- Beneš K (1968) On the stainability of plant cell walls with alcian blue. *Biol Plant* 10: 334-346.
- Biggs KJ, & Fry SC (1990) Solubilization of covalently bound extensin from *Capsicum* cell walls. *Plant Physiol* 92: 197-204.
- Bradley DJ, Kjellbom P, & Lamb C (1992) Elicitor- and wound- induced oxidative cross - linking of a proline - rich plant cell wall protein : A novel, rapid response. *Cell* 70: 21-30.
- Carpita NC, & Gibeaut DM (1993) Structural model of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
- Carpita NC (1989) Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry* 28: 121-125.
- Carpita NC (1996) Structure and Biogenesis of the Cell-Walls of Grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Carpita NC (1984) Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentration of alkali. *Phytochemistry* 23: (5). 1089-1093.
- Chesson A, Gordon A, & Scorbbe L (1995) Pectic polysaccharides of mesophyll cell walls of perennial ryegrass leaves. *Phytochemistry* 38: 579-583.
- Fry SC (1982) Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell - wall glycoprotein. *Biochem J* 204: 449-455.
- Fry SC (1986) Cross-linking of matrix polymers in growing cell wall of angiosperms. *Ann Rev Plant Physiol* 37: 165-86.
- Geier T (1980) PAS - positive reactions of phenolic inclusions in plant cell vacuoles. *Histochemistry* 65: 167-171.
- Grabber JH, Haltfield RD, Ralph J, Zon J, & Amrhein N (1995) Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. *Phytochemistry* 40: 1077-1082.
- Harris PJ, & Hartley RD (1976) Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Graminae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508
- Hartley RD, & Morrison III WH (1991) Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell wall of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. *J Sci Food Agric* 55: 365-375.
- Iiyama K, Lam TB, & Stone BA (1994) Covalent cross - links in the cell wall. *Plant Physiol* 104: 315-320.
- Javis MC, Hall MA, Threlfall DA, & Friend J (1981) The polysaccharide structure of potato cell walls: Chemical fractionation. *Planta* 152: 93-100.
- Kieliszewski MJ, Leykam JF, & Lamport DTA (1990) Structure of the threonine-rich extensin from *Zea mays*. *Plant Physiol* 92: 316-326.
- Lam TBT, Iiyama K, & Stone BA (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry* 31: 1179-1183.
- McCann MC, Wells B, & Roberts K (1992) Complexity in the spatial localisation and length distribution of plant cell wall matrix polysaccharides. *J Microscopy* 166: 123-136.
- Pearse AGV (1968) *Histochemistry (Theoretical and Applied)*. London: J. and A. Churchill Ltd.
- Qi XY, Behrens BX, West PR, & Mort AJ (1995) Solubilization and Partial Characterization of Extensin Fragments from Cell-Walls of Cotton Suspension-Cultures -Evidence for a Covalent Cross-Link Between Extensin and Pectin. *Plant Physiol* 108: 1691-1701.
- Redgwell RJ, & Selvedran RR (1986) Structural features of cell wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carb Res* 157: 183-199.
- Rudall PJ, & Caddick LR (1994) Investigation of the presence of phenolic compounds in monocotyledonous cell walls, using UV fluorescence microscopy. *Ann Bot* 74: 483-491.

- Saulnier L, Thibault J, Chanliaud C, & Marot C (1995) Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydr Polym* 26: 279-287.
- Scalbert A, Monties B, Lallemand JY, Guittet E, & Rolando C (1985) Ether linkages between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24: 1359-1362.
- Schibua N, & Nakane R (1984) Pectic polysaccharides of rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* 23: 1425-29.
- Schowalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.
- Selvedran RR (1975) Analysis of cell wall material from plant tissues : extraction and purification. *Phytochemistry* 14: 1011-1017.

Aplikace konfokální mikroskopie při studiu prostorového uspořádání rostlinného pletiva

Soukup, A., Votrubová, O.

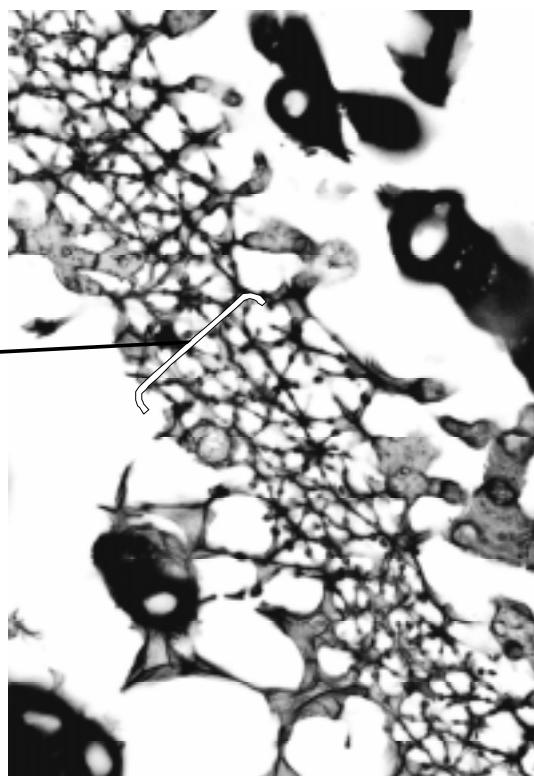
Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha
tel: 02/21 95 31 48, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: votrub@prfdec.natur.cuni.cz

Studium prostorového uspořádání rostlinných pletiv je často velmi důležité pro pochopení jejich funkce v rostlinném těle. Orientaci v komplikované prostorové struktuře může v některých případech usnadnit použití konfokální mikroskopie. Objekt lze být tímto způsobem vizualizovat jako jednotlivé tenké optické řezy, počítačem vytvořenou projekci série takových řezů, či jejich prostorovou rekonstrukci poskytující celkový přehled o uspořádání pletiva.

Příkladem použití může být studium struktury nodálních sept rákosu a jejich funkce. U rákosu obecného, stejně jako u ostatních mokřadních rostlin, je nezbytnou anatomickou adaptací pro život v zaplaveném a často anaerobním substrátu existence vzájemně propojených mezibuněčných prostor, které umožňují zásobování rostlinných orgánů pod vodní hladinou kyslíkem z nadzemní části. Nadzemní orgány jsou propojeny s oddenky a kořeny provzdušňovacími kanály, začínajícími v listových pochvách, kde komunikují s vnějším prostředím prostřednictvím průduchů. Kanály neprocházejí prýtem kontinuálně, ale jsou v nodech děleny septy o vysoké porozitě, která umožňují objemový tok vzduchu, ale zároveň brání průchodu vody a tím zaplavení celého podzemního systému v případě poškození některého z podzemních orgánů. Čelo kapaliny, která byla aplikována do oddenku pod nízkým tlakem (10kPa), se ve vrstevnaté struktuře nodálního septa zastavila po průchodu jemným aktinenchymem, na jeho hranici. Je to tedy právě tato střední vrstva (obr. 1;2), která zastaví průchod fázového rozhraní mezi vodou a vzduchem. Pro vysvětlení funkce těchto sept bylo nutné získat představu o trojrozměrném uspořádání



obr.1 – septum – jemný aktinenchym, trvalý preparát (safranin – anilínová modř) (50x2,5)



obr.2 – detail jemného aktinenchymu LSCM (60x) optický řez

pletiva a o velikosti jednotlivých intercelulárních prostor. Pro studium struktury sept byly použity tenké optické řezy získané konfokálním mikroskopem (LSCM, Bio Rad MRC 600). Jednotlivé optické řezy umožnily správnou orientaci v komplikované prostorové struktuře, která je jen obtížně sledovatelná tradičními metodami světelné mikroskopie. Malá tloušťka optického řezu zajistila, že jsme bezpečně odlišili hranice buněk a intercelulár (obr. 1;2), což umožnilo další zpracování analyzátozem obrazu (Lucia G, LIM), s jehož pomocí byly odhadovány velikosti pórů mezi buňkami. Takovéto rozlišení bylo značně obtížné a nepřesné u obrazu s velkou hloubkou ostrosti, kde se překrývají a splývají průměty těchto hranic. Bohužel tato metoda je jen obtížně použitelná pro kompaktnější pletiva se silnější buněčnou stěnou, kde lze získat čitelný obraz pouze v povrchové vrstvě.

Na základě znalosti anatomie septa se domníváme, že síť drobného aktinenchymu slouží jako matrice, na jejíž hranici se v intercelulárních prostorách vytvoří menisky fázového rozhraní mezi vodou a vzduchem. Povrchové napětí fázového rozhraní může zabránit za daného tlaku dalšímu toku kapaliny. Tuto představu podporuje dobrá shoda naměřených tlaků, potřebných pro protlačení vody septem, a hodnot, které byly po anatomickém zpracování septa a odhadu velikosti intercelulárních prostor dopočítány s ohledem na předpokládaný mechanismus funkce. Dále pro ni svědčí i ztráta této schopnosti septa po zrušení fázového rozhraní mezi vodou a vzduchem, kterého bylo dosaženo po protlačení vody septem nebo zavodněním intercelulár v nodu za sníženého tlaku.

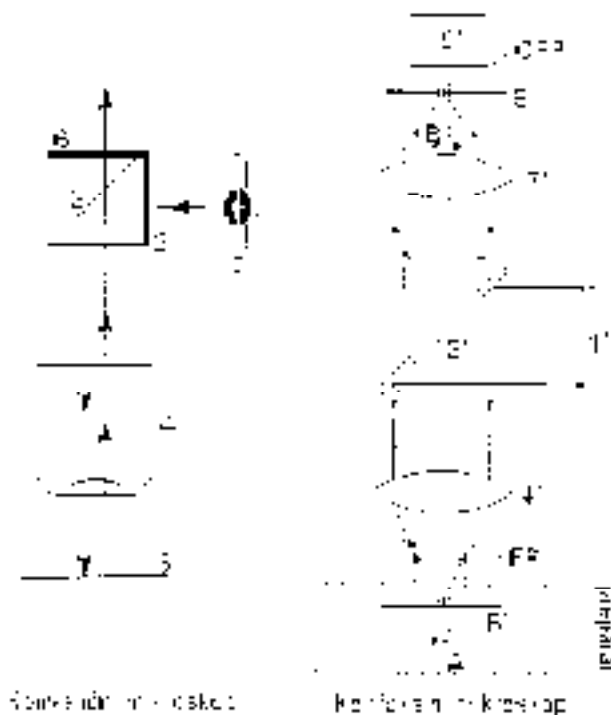
Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Široký, J.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: siroky@ibp.cz

Použití konvenčního fluorescenčního mikroskopu při studiu biologických struktur je často limitováno jednak tloušťkou pozorovaného objektu, jednak následující skutečností: Zaostříme-li ve fluorescenčním mikroskopu na nějaké buněčné struktury obarvené patřičným fluorochrómem, výsledný obraz je do jisté míry tvořen světlem emitovaným z fokální roviny i vrstev, nalézajících se nad a pod rovinou zaostření. To přispívá k více či méně “rozmazanému” obrazu v němž je identifikace jemných struktur obtížná. Naproti tomu, konfokální mikroskopie (pro přehled viz Pawley, 1995) umožňuje získání obrazu z jediné definované fokální roviny; struktury ležící mimo tuto rovinu se nezobrazí. Navíc je možno získat řadu po sobě následujících konfokálních obrazů z předem definovaných fokálních rovin (t.zv. optická tomografie). Vzhledem k tomu, že jednotlivé obrazy se ukládají v elektronické formě na disku výkonné pracovní stanice, je možné z takových obrazů rekonstruovat trojrozměrný obraz pozorovaných struktur či dále tyto komplexní obrazy manipulovat.

Princip konfokálního mikroskopu. Konfokální efekt může být dosažen na základě různých optických principů, většina z nich však vychází z původního patentu Minskyho z r. 1957 (viz. Minsky 1988). Zde se zaměříme na konstrukci tzv. konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM). Objektem budou např. buněčná jádra obarvená současně dvěma fluorochrómy: jaderná DNA propidium iodidem (PI), jaderné histony pak po protilátkové reakci (viz Vyskot, B., Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů, tento sborník) fluoresceinem (FITC). Srovnání konvenčního fluorescenčního a konfokálního laserového skenovacího mikroskopu znázorňuje obr. 1. Ve fluorescenčním mikroskopu je zdrojem světla rtuťová výbojka (1), jejíž světlo dopadá na excitační filtr (2), který dále propouští pouze světlo určitých vlnových délek. Světlo se dále odráží od polopropustného dichromatického zrcadla (3), prochází objektivem (4) k preparátu (5). Zde dochází k excitaci fluorochrómu a tyto emanují světlo následujících vlnových délek: 615 nm, červené (PI) a 520 nm, zelené (FITC). Světlo obou vlnových délek pak můžeme po průchodu dichromatickým zrcadlem a bariérovým filtrem (6) současně pozorovat jako různé zbarvené jaderné struktury. V konfokálním mikroskopu je zdrojem excitačního světla laser (1'), jehož paprsek se po odražení dichromatickým zrcadlem (3') v daném okamžiku soustředí objektivem (4') na velmi malou oblast (fokální bod - FP) plochy ve fokální rovině (5'). Zmíněné fluorochrómy opět emitují červené a zelené světlo. Paprsky obou vlnových délek po průchodu dichromatickým zrcadlem jsou soustředěny achromatickou optikou (7') do ohniska, tzv. konfokálního bodu (CFP). V konstrukci mikroskopu je dále umístěna clona (8') s velmi malým otvorem (desítky nm) v konfokálním bodu. Tato clona nepropustí žádné světlo, které by vycházelo z oblastí jiných, než je fokální bod. Například, místo (A) v preparátu mimo fokální rovinu se zobrazí jako (B) mimo konfokální rovinu a jeho obraz není mikroskopem registrován. Konfokální clona však podstatně sníží intenzitu světla, takže by nebylo pozorovatelné pouhým okem. Proto je světlo registrováno fotonásobičem (9'). Protože v našem příkladu současně sledujeme emisi jak červeného, tak zeleného světla, je vhodné obě vlnové délky oddělit sekundárním dichromatickým zrcadlem a jejich intenzity zaznamenat zvlášť. Výsledkem je tedy informace o intenzitě světla emitovaného fluorochrómem v jediném pixelu fokální roviny našeho preparátu. Tato informace se uloží do počítače spolu se souřadnicemi pixelu, x , y . Celý děj trvá přibližně mikrosekundu. Během další mikrosekundy získáme podobnou informaci ze sousedního pixelu a tedy během sekundy skenovacím způsobem z plochy maximálně 1024 x 1024 pixelů. Na obrazovce počítače se tak objeví dvojbarevný obraz DNA a histonů v naší předem definované fokální rovině analyzovaného jádra. Stejně můžeme získat obraz další fokální roviny, která může být od předchozí vzdálena pouhý zlomek mikrometru. Postupně tak lze naskenovat celé jádro v rozměrech x , y , z a následně tyto obrazové informace využít.



Obr. 1:
Srovnání uspořádání konvenčního fluorescenčního a konfokálního mikroskopu

Konfokální software. Různí výrobci konfokálních mikroskopů používají kromě jistých modifikací vlastního mikroskopu rovněž různé programy pro zpracování obrazových informací, tyto programy jsou provozovány na různých počítačích. Obecně platí, že manipulace s množstvím dat, která jsou generována systémem CLSM, je možná pouze na velmi výkonných pracovních stanicích. Programy některých výrobců obsahují rovněž důležité utility pro import či export dat mezi různými systémy, tak se dají zpracovat data přenesená z jiných konfokálních mikroskopů.

Programové vybavení počítače spojeného s konfokálním mikroskopem většinou umožňuje nastavení parametrů mikroskopu a řízení vlastního skenování. Dále takové aplikace zahrnují utility, které jsou obsaženy v běžných programech známých jako "obrazová analýza". Jedná se především o různé filtrace obrazu, zdůrazňování vybraných struktur, měření intenzity jednotlivých barev v definovaných oblastech, měření délek a ploch a počítání objektů. Zatímco obecná obrazová analýza pracuje s dvourozměrným obrazem, software konfokálního mikroskopu umožňuje provádět tyto analýzy v prostoru: k typickým úlohám patří měření délek prostorové křivky nebo výpočet objemů vizualizovaných struktur - např. buněčných organel. Soubor dat (dataset) získaný optickou tomografií tkáňových nebo buněčných struktur je možno dále využít k tvorbě tzv. projekcí a projekčních sekvencí. Projekcí rozumíme dvojrozměrné znázornění obrazů z různých fokálních rovin v jednom společném obrazu. Projekce používají pro tvorbu výsledného obrazu různé algoritmy, takže výsledkem mohou být obrazy které spíše znázorňují povrch struktur, jindy zdůrazňují intenzivněji obarvené struktury, jindy lze generovat obrazy "průhledné". K dosažení maximálního prostorového vjemu je možno generovat stereoskopické obrázky. Projekce můžeme vytvářet v jakémkoli naklonění prostoru x , y , z a tudíž nahlížet na analyzované struktury z jakéhokoli úhlu. Série projekcí s mírně pozmeněnými úhly náhledu pak dovolí struktury na obrazovce počítače naklánět či rotovat - vizuální informace z pozorovaného objektu je natolik komplexní, že ji jen těžko můžeme srovnávat se statickým obrazem konvenčního mikroskopu.

Biologický vzorek pro konfokální analýzu. Vzhledem k uvedenému principu konfokálního zobrazení je možno analyzovat živé nebo fixované vzorky o tloušťce až do několika stovek μm , mohou to tedy být malé organismy, tkáňové řezy, malé orgány, buňky nebo buněčné organely. Vzorky je nutno obarvit fluorochómem, který je excitovatelný světlem vlnové délky, kterou poskytuje laser. Zajímá-li

nás interakce struktur preparátu s nějakou sondou (protilátka, DNA při *in situ* hybridizaci, proba pro membránový transport), je třeba sondu naznačit jiným fluorochrómem emitujícím světlo odlišné vlnové délky (Suzuki *et al.* 1997). V takovém případě je při přípravě preparátu nutné zajistit penetraci proby v celém objemu vzorku. Kromě různých způsobů fixace k tomu může přispět permeabilizace preparátu detergenty, metanolem či acetonem. Při studiu prostorového uspořádání heterochromatinu jeder endospermu *Gagea lutea* a stanovení oblastí bohatých na 5-metylcytosin pomocí anti-5mC protilátky se nám podařilo zajistit průchod protilátky do vnitřních struktur jader o průměru větším než 40 nm (Bůžek *et al.* 1997).

Závěrem lze shrnout, že konfokální mikroskopie se stává nepostradatelnou metodou v biologickém či medicínském výzkumu nejen pro svoji schopnost zaznamenat prostorové uspořádání zkoumaného materiálu, ale především pro svoji vysokou hodnotu analytickou. Uložíme-li totiž digitalizovanou obrazovou informaci do počítače, je nasnadě zpracování dat nejen do podoby pěkných obrázků, ale také nasazení pokročilého matematického instrumentária.

Poděkování: Tato práce vznikla při řešení projektu 521/96/K117 Grantové agentury ČR

Literatura:

- Bůžek J, Ebert I, Ruffini-Castiglione M, Široký J, Vyskot B, Greilhuber J, (1997) Structure and DNA methylation pattern of partially heterochromatinised endosperm nuclei of *Gagea lutea* (Liliaceae). *Planta*, in press
- Minsky M, (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**: 128-138
- Pawley J B, (ed.), (1995) Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press, New York
- Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K, (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **45**: 49-53

Studium struktury chromatinu *Gagea lutea* pomocí konfokální laserové mikroskopie

Široký, J., Bůžek, J., Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41240500, e-mail: siroky@ibp.cz

Popsaným typickým příkladem fakultativní heterochromatinizace u rostlin je inaktivace tří sad chromozómů v pentaploidních jádrech endospermu jednoděložné rostliny křivatce žlutého (*Gagea lutea*, Bůžek et. al 1997). Pentaploidní jádra vznikají po druhém oplození fúzí triploidního chalazálního a haploidního mikropylárního jádra zárodečného vaku. Tak vznikne pentaploidní endosperm obsahující jeden paternální a čtyři maternální genomy. Romanov (1961) předpokládá, že jsou to právě ony tři ze čtyř maternálních genomů, pocházející původně z chalazálního polárního jádra zárodečného vaku, které vytvářejí později během vývinu osemení v jádrech denzní heterochromatinovou strukturu.

Uspořádání heterochromatinu v jádrech endospermu bylo studováno pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM). Bylo zjištěno, že během zrání endospermu prochází heterochromatin výraznými morfologickými změnami: V jádrech mladých buněk byl heterochromatin soustředěn do denzní rozvětvené masy jak v centrálních oblastech jádra, tak i na jeho periferii. V pozdějších vývinových stádiích byl pomocí CLSM zjištěn signifikantně menší objem jader a měnila se i lokalizace heterochromatinu směrem k periferním oblastem jádra. Studium mitotických preparátů bylo zjištěno, že heterochromatin se přeměňuje v metafázi chromozómy až v pozdní profázi, narozdíl od euchromatinu, kde je možno pozorovat normální spiralizaci chromozómů v časně profázi.

DNA v heterochromatinových oblastech bývá často výrazně hypermetylována (Lewis and Bird 1991). Předpoklad, že fakultativní heterochromatin tvořený třemi sadami inaktivních chromozómů bude u *G. lutea* extenzivně metylován, nás vedl k analýze distribuce 5-metylcytosinu (5-mC) v jádrech pomocí značení protilátkou anti-5-mC (Podestá et al. 1993). Intenzita značení anti-5-mC v heterochromatinových oblastech byla velmi nerovnoměrná: některé oblasti heterochromatinu byly hypermetylovány zatímco jiné, podobně jako euchromatin, nevykazovaly téměř žádný signál 5-mC. Podobně nebyly detegovány ani celé hypermetylované chromozómy v metafázi; jediné rozdílly ve stupni metylace na chromozómech vykazovaly 5-mC pozitivní pruhy, které představují konstitutivní heterochromatin s obsahem vysoce repetitivních, netranskribovaných sekvencí DNA.

Odlíšné výsledky poskytla nepřímá imunofluorescence po značení jader endospermu protilátkami rozpoznávajícími formy histonů H4 s acetylovaným lyzinem v různých pozicích (Jeppesen and Turner 1993). Jednotlivé protilátky specificky rozeznávají vnější lyzinové zbytky (Lys 5, Lys 8 a Lys 12) histonu H4 se nevázaly v doménách fakultativního heterochromatinu, ale naopak hyperacetylace H4 byla prokázána v oblastech euchromatinových. To je plně v souladu s předpokládanou transkripční aktivitou euchromatinu. Podobné výsledky byly získány při studiu fakultativní heterochromatinizace u savců, jmenovitě v případě inaktivace jednoho pohlavního chromozómu X v samičích buňkách konstituce XX (Jeppesen and Turner 1993). Pomocí Ag-NOR techniky a *in situ* hybridizace u *G. lutea* jsme dále zjistili, že rDNA lokusy z heterochromatinizovaných sad chromozómů jsou aktivní.

Poděkování: Práce vznikla při řešení projektů A5004601 GAAV ČR a 521/96/1717 GA ČR.

Literatura:

Bůžek J, Ebert I, Ruffini-Castiglione M, Široký J, Vyskot B, Greilhuber J, (1997) Structure and DNA methylation pattern of partially heterochromatinised endosperm nuclei of *Gagea lutea* (Liliaceae). *Planta*, in press

- Jepessen P, Turner B, (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytological marker for gene expression. *Cell* **74**: 281-289
- Lewis J, Bird A, (1991) DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett* **285**: 155-159
- Podestá A, Ruffini-Castiglione M, Avanzi S, Montagnoli G, (1993) Molecular geometry of antigen binding by a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Int J Biochem* **25**: 929-933
- Romanov ID, (1961) The origin of the unique structure of endosperm nuclei in *Gagea*. *Dokl Bot Sci Sect* **141**: 188-190

Nový typ víček pro fotoautotrofní *in vitro* kultury rostlin

Tichá, I.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2
tel: 02/21 95 31 71, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: iticha@prfdec.natur.cuni.cz

K uzavírání rostlinných explantátových kultur se obvykle používá alobal, vatové zátky, umělohmotná víčka, hliníkové čepičky apod. Nedostatkem těchto druhů víček je omezená propustnost pro plyny (CO_2 , vodní páru), což se projevuje vysokou relativní vzdušnou vlhkostí (RH) v kultivačních nádobkách (někdy téměř 100 % RH oproti 40 - 60 % RH ve vzduchu *ex vitro*) a velkými výkyvy v obsahu CO_2 . Během noci sice obsah CO_2 dýcháním rostlinek velmi vzroste, ale po rozsvícení se během tří až čtyř hodin koncentrace CO_2 fotosyntetickou činností rostlinek prudce sníží až na hodnotu kompenzačního bodu CO_2 , na které se udržuje po celý zbytek fotoperiody. Rostlinky rostou po většinu dne za nedostatku CO_2 .

Stále širší využívání rostlin pěstovaných *in vitro* v mikropropagaci, genovém inženýrství, genové manipulaci, kryoprezervaci atd. stimulovalo rovněž zájem o fotoautotrofní pěstování rostlinek *in vitro* za nepřítomnosti cukrů v médiu (levnější média, menší riziko infekce). Tyto rostlinky ale potřebují dostatek světla a CO_2 , aby mohly plně využívat své fotosyntetické schopnosti.

Proto byl vyvinut nový typ víček k uzavírání kultivačních nádob s rostlinnými *in vitro* kulturami, který je vysoce propustný pro plyny. Jedná se o japonský patent, který dodává firma Sigma (katalogové číslo C6920) pod jménem **suncaps** v rolích po 500 kusech, cena jedné role bez DPH je 3840,- Kč. Víčko ve tvaru čtverce se skládá z průsvitné polymethylpentenové fólie, jejíž střed je tvořen polypropylenovým filmem s mikropóry o velikosti 0,2 až 0,02 mm, který propouští CO_2 i vodní páru. Víčka se sterilizují mezi navlhčenými filtračními papíry a upevňují se na kultivační nádobky nastříhanými proužky parafilmu. Víčka **suncaps** se dají používat opakovaně. Procento infekcí je minimální. Průsvitná víčka zlepšují světelný požitek kultur. Díky propustnosti víček pro plyny se uvnitř kultivačních nádobek snižuje vysoká RH a rostlinky jsou dostatečně zásobeny oxidem uhličitým. Požadované koncentrace CO_2 v kultivačních nádobkách se docílí umístěním směsi karbonát/bikarbonátových pufrů do kultivačních boxů.

Porovnávala jsem růst rostlinek tabáku pěstovaných *in vitro* na médiu Murashige-Skoog (Sigma M 5519) bez sacharózy v nádobkách uzavřených alobalem nebo víčky **suncaps** (ozáření 180 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ během 16hodinové fotoperiody, 2M karbonát/bikarbonátový pufr, teplota den/noc 25/18 °C). Po 21 a 54 dnech (d) kultivace byly rozdíly v nárůstu listové plochy a sušiny u rostlinek tabáku vysoce průkazné. Celková listová plocha po 21 d kultivace byla u rostlinek s víčky **suncaps** zvýšená o 126 %, po 54 d kultivace o 445 % v porovnání s kulturami s alobalovými víčky. Celková sušina rostlinek (nadzemní část a kořeny) se zvýšila po 21 d kultivace s víčky **suncaps** o 153 %, po 54 d kultivace o 504 % ve srovnání s kulturami s alobalovými víčky (Tichá 1996).

Literatura:

Tichá, I.: Optimization of photoautotrophic tobacco *in vitro* culture: effect of **suncaps** closures on plantlet growth. - *Photosynthetica* 32: 475-479, 1996.

Synchronizace buněčného cyklu u smrku ztepilého /*Picea abies* (L.) Karst./

Überall, I.¹⁾, Havel, L.¹⁾, Kubaláková, M.²⁾

¹⁾ Ústav botaniky a fyziologie rostlin MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
tel: 05 45133023, e-mail: ivo@vszbr.cz

²⁾ Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 2, 772 00 Olomouc.

Jednou z metod ke studiu genomu rostlin jsou metody postavené na bázi *in situ* hybridizací. Některé modifikace těchto metod se provádějí přímo na metafázních chromozómech. Základním předpokladem úspěšné práce je dosažení dostatečného počtu nepoškozených metafázních chromozómů.

Pro získání maximálního množství nepoškozených metafázních chromozómů z kořenových meristémů smrku ztepilého byl použit kolchicin. Účinky kolchicinu na buňky kořenového meristemu se projeví hromaděním metafází mitotického dělení.

Nejdříve bylo nutné nalézt vhodnou koncentraci a dobu působení kolchicinu. Jinak docházelo k jeho negativnímu působení na stav chromatinu (chromozómy byly příliš kondenzovány). U smrku byla zjištěna jako optimální koncentrace kolchicinu 0,05 % a doba působení 32 hodin. Za těchto podmínek se nachází 26,82 % buněk v metafázi mitózy. V kontrolní variantě bez kolchicinu bylo za stejných podmínek zjištěno 1,95 % metafází. Po uplynutí 32 hodin dochází i za přítomnosti kolchicinu ke snižování počtu metafází vlivem přechodu buněk do anafáze mitotického dělení.

Další zvýšení počtu metafází je možno dosáhnout reverzibilním zablokováním buněčného cyklu pomocí hydroxymočoviny nebo jiných látek (nejčastěji na přechodu fází G1 a S). Při využití tohoto postupu lze očekávat další zvýšení počtu metafází.

Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů

Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: vyskot@ibp.cz

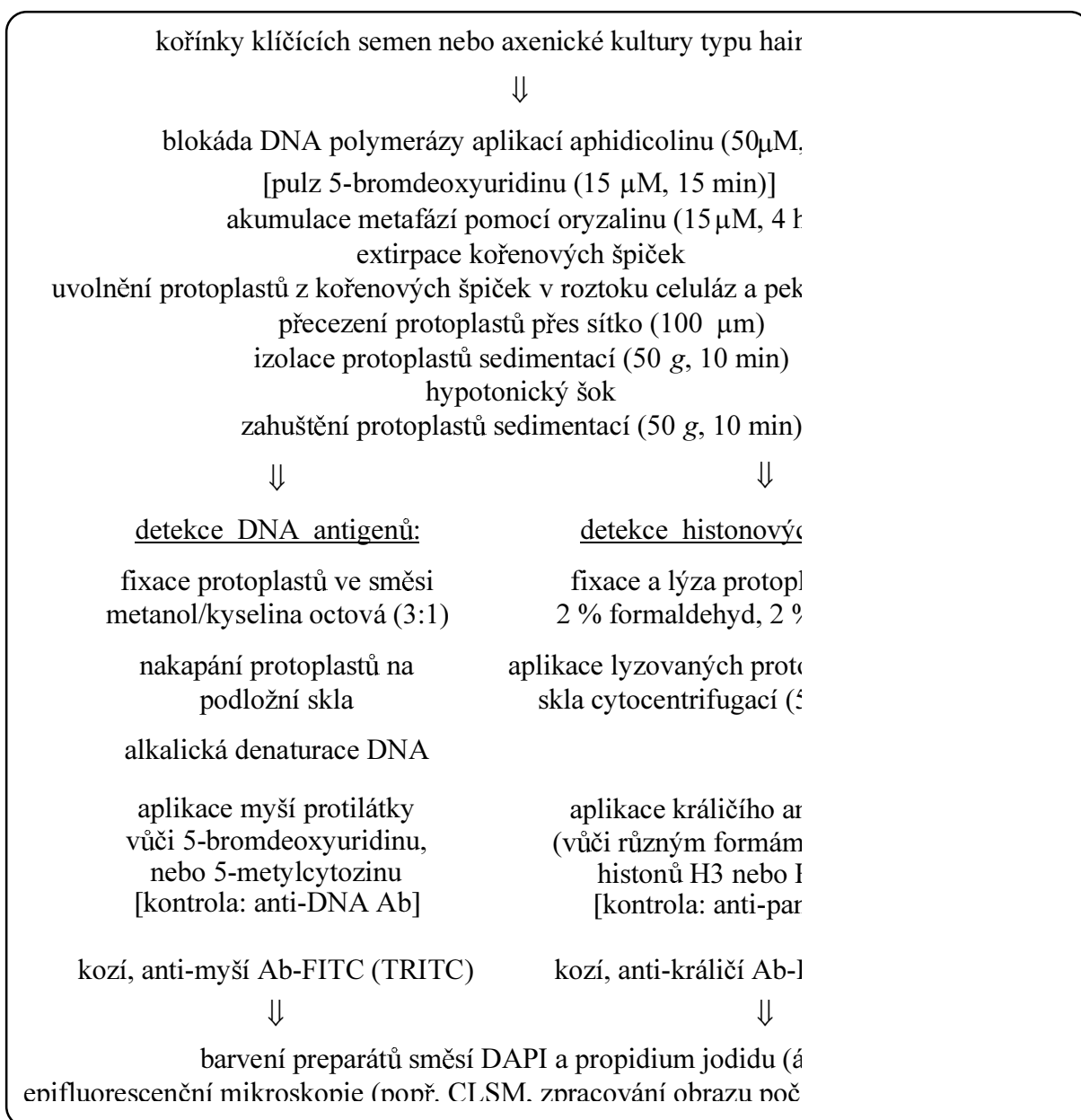
Metody využívající protilátek vůči nejrůznějším antigenům na cytologických preparátech se stávají velmi cenným nástrojem ke studiu struktury a funkce eukaryotických genomů. Jedním z klíčových bodů těchto metod je vhodná příprava preparátů. Cytologické vzorky by měly mít zachovány původní buněčnou organizaci, měly by umožňovat reprodukovatelnou penetraci protilátek a konečně fixace vzorků a další manipulace s nimi musí zachovávat antigenitu studovaných epitopů (Jeppesen 1994). Vypracování optimálního pracovního protokolu vždy vyžaduje najít rozumný kompromis, aby každý z uvedených bodů byl alespoň do přijatelné míry splněn. Největším problémem rostlinné molekulární cytologie je asi přítomnost buněčné stěny, která významně znesnadňuje vstup protilátek (a samozřejmě i dalších makromolekulárních sond, zejména enzymů a nukleových kyselin) a navíc se vyznačuje silnou autofluorescencí. Tento problém bývá obvykle řešen přípravou tkáňových řezů nebo chemickou degradací stěn aplikací celuláz a pektináz. Pro studium DNA epitopů může být obvykle použita kyselá fixace, která významně permeabilizuje buněčný materiál. Kyselá fixace však není vhodná ke studiu většiny proteinových antigenů: tehdy se nahrazuje aplikací neextračních, méně toxických fixací (zejména formaldehyd nebo glutaraldehyd).

Ještě obtížnější je detekce proteinových antigenů na rostlinných chromozómech. Roztlakové preparáty bez kyselé fixace obvykle neposkytují ani reprodukovatelný vstup protilátek do buňky, ani dostatečnou kvalitu a rozložení metafázních chromozómů. Dosavadní studia acetylace nukleozomálních histonů byly proto prováděny v suspenzích chromozómů (Houben et al. 1996) nebo na částečně enzymaticky opracovaných roztlacích (Houben et al. 1997) i s pomocí konfokální laserové mikroskopie (Idei et al. 1996). V naší laboratoři jsme vyvinuli techniky přípravy metafázních chromozómů a interfázních jader z modelové dvoudomé rostliny knotovky bílé (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*), které jsou vhodné k nejrůznějším molekulárně-cytologickým účelům, jako jsou *in situ* nick-translace (Vyskot et al. 1993), autoradiografické studium replikace chromozómů (Široký et al. 1994), *in situ* hybridizace (Bůžek et al. 1997), nebo imunologické detekce 5-metylcytozinu (5-mC), 5-bromdeoxyuridinu (5-BrdU) a histonů (Vyskot et al. 1997).

Tyto techniky (přehledně uvedené na obr. 1) jsou založeny na synchronizaci buněčného cyklu v kořenových špičkách, následné akumulaci metafázi a enzymatické izolaci protoplastů (modifikováno podle Veuskense et al. 1995). Protoplasty jsou purifikovány filtrací a sedimentací, podrobeny hypotonickému šoku a posléze fixovány. Pokud je záměrem pokusu detekovat určitou sekvenci DNA (př. fluorescenční *in situ* hybridizací) nebo lokalizovat přirozené (př. 5-mC) nebo experimentálně aplikované (př. 5-BrdU) modifikované nukleotidy, protoplasty jsou fixovány ve směsi metanol:kyselina octová (3:1, v/v, minimálně 2 h, při -20°C) a volně kapány na podložní skla. K detekci DNA epitopů je třeba materiál denaturovat (obvykle ve směsi 50 mM NaOH, 30% etanol, 2 min, RT); koncentraci NaOH a dobu denaturace je nutné empiricky ověřit. Po blokování možných nespécifických vazeb (obvykle sérem z příslušného živočišného druhu nebo telecím sérum-albuminem) je aplikována protilátka: komerčně dostupné jsou monoklonální anti-BrdU IgG1 (př. Sigma) ke studiu kinetiky replikace DNA a monoklonální ss- plus ds-anti-DNA imunoglobulin (př. Boehringer) jako nutná pozitivní kontrola. Po důkladném odmytí primární protilátky (obvykle v 1xPBS s 0,5% Tween 20) je aplikována sekundární protilátka (podle živočišného zdroje primární protilátky) konjugovaná například s fluorescenčním barvivem (nejčastěji FITC nebo TRITC). Ředění protilátek udává výrobce, je však žádoucí je empiricky optimalizovat. Po důkladném promytí jsou preparáty barveny (př. DAPI plus propidium jodid, rozpuštěné ve Vectashieldu) a přiložené krycí sklíčko je rámováno lepidlem ("rubber cement").

Ke studiu histonů je třeba použít neextrakční fixáže, která má též za cíl navodit šetrnou lýzu protoplastů. 100 ml protoplastové suspenze (obsahující asi 10^4 protoplastů) v hypotonickém prostředí je pipetováno na podložní sklo pokryté poly-L-lyzinem do plastické komůrky "cytaset" vyráběné k přípravě živočišných cytologických preparátů (př. MPW Med-Instruments, Warszawa). Do komůrky se bezprostředně přidá 500 ml fixáže (2 % neutrální formaldehyd, 2 % Triton X-100) a vzorky jsou přichyceny a lyzovány na skle odstředivou silou ve speciálním výkyvném rotoru (500 g, 10 min). Zatímco pro živočišné buňky je doporučována centrifugace "na sucho" (přebytek tekutiny se vsákne do okolního filtračního papíru na podložním skle), pro rostlinné protoplasty se zdá být lepší centrifugace "na mokro" (přebytek fixáže zůstává na skle a po skončení centrifugace automaticky steče do přisazené mikrozkuřavky). Preparáty jsou ihned ponořeny do metanolu (-20°C , 10 min; ke zvýšení permeability) a dle potřeby skladovány v 50 % glycerinu v chladničce. Asi jedinou komerčně dostupnou protilátkou vůči histonům je myší monoklonální protilátka anti-histon-pan (př. Boehringer), která rozpoznává antigenní determinanty na všech typech histonů (H1, H2A, H2B, H3 a H4). Jako nejvhodnější odmývací i permeabilizující roztok je používán KCM ("potassium chromosome medium", podle Jeppesena 1994). Sekundární protilátka bývá obvykle opět konjugována s fluorescenčním barvivem.

Obr. 1. Schéma experimentů k detekci DNA (ss- a ds-DNA, 5-BrdU (acetylované histony) antigenů na rostlinných chromozómech



Hlavní předností výše uvedených technik je kvalita a četnost kompletních mitotických figur a jejich relativně dobře reprodukovatelné reakce s protilátkami. Mezi nevýhody patří určitá pracnost, velká spotřeba rostlinného materiálu a asi i finanční náročnost (zejména ceny aphidicolinu a Pectolyasy Y-23). Preparáty připravené bez fixace kyselinou octovou jsou obecně nižší kvality (obdobně jako u živočišných vzorků): ne všechny protoplasty lyzují a ne všechny mitotické figury jsou dobře rozloženy a umístěny v rovině podložního skla. U buněčného materiálu, který se vyznačuje silnou autofluorescencí se doporučuje využívat možnosti jiné detekce (př. sekundární protilátka značená koloidním zlatem, které je posléze zesíleno stříbrem; AuroProbe LM a IntenSE M, Amersham). Pokud nastávají problémy s penetrací protilátky přes zbytky cytoplazmy, je možné zvýšit permeabilitu aplikací mikrovlnného záření (viz Lu et al. 1997). Hlavním mementem všech imunochemických experimentů je absolutní nezbytnost provedení všech možných pozitivních a negativních kontrolních reakcí (preparátů), bez kterých je možné pozorovat, a posléze i opublikovat, nesčetnou řadu zajímavých artefaktů a na jejich základě formulovat velmi originální hypotézy a teorie.

Poděkování: Výše uvedené metodiky byly vypracovány v rámci řešení projektu A5004601 Grantové agentury AV ČR.

Literatura:

- Bůžek J, Koutníková H, Houben A, Říha K, Janoušek B, Široký J, Grant S, Vyskot B (1997) Isolation and characterisation of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chromosome Res* **5**: 57-65.
- Frediani M, Giraldi E, Ruffini-Castiglione M (1996) Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the metaphase chromosomes of *Vicia faba*. *Chromosome Res* **4**: 141-146.
- Houben A, Belyaev ND, Turner BM, Schubert I (1996) Differential immunostaining of plant chromosomes by antibodies recognising acetylated histone H4 variants. *Chromosome Res* **4**: 191-194.
- Houben, A., Belyaev, ND, Leach CR, Timmis JN (1997) Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosome Res* **5**: 233-237.
- Idei S, Kondo K, Turner BM, Fukui K (1996) Tomographic distribution of acetylated histone H4 in plant chromosomes, nuclei and nucleoli. *Chromosoma* **105**: 293-302.
- Jeppesen P (1994) Immunofluorescence techniques applied to mitotic chromosome preparations. In: Gosden JR, ed. *Chromosome Analysis Protocols*. Totowa, Humana Press, pp 253-285.
- Lu Y-J, Cheng SJ, Ning J, Dong X-Y (1997) An accelerated *in situ* hybridisation procedure using microwave irradiation. *Chromosome Res* **5**: 147-149.
- Southgate, J., Trejdosiewicz, L.K. (1997) Immunolabelling of cells and tissues: approaches and pitfalls. *Hum Reprod* **12**: 65-75.
- Široký J, Janoušek B, Mouras A, Vyskot B (1994) Replication pattern of sex chromosomes in *Melandrium album* female cells. *Hereditas* **120**: 175-181.
- Veuskens J, Marie D, Spencer SC, Jacobs M, Negrutiu I (1995) Flow sorting of the Y sex chromosome in the dioecious plant *Melandrium album*. *Cytometry* **21**: 363-373.
- Vyskot B, Araya A, Veuskens J, Negrutiu I, Mouras A (1993) DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet* **239**: 219-224.
- Vyskot B, Široký J, Hladilová R (1997) A cytospin technique for the spreading of plant metaphases suitable for immunofluorescence studies. *Chromosome Res*, submitted.
- Yanagisawa T, Tano S, Fukui K, Harada K (1993) Analysis of replication pattern in soybean chromosomes by indirect immunofluorescence method. *Jap J Genet* **68**: 119-125.

Studium struktury a funkce pohlavních chromozómů *Melandrium album* pomocí imunocytochemických metod

Vyskot, B., Široký, J., Hladilová, R.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: vyskot@ibp.cz

Knotovka bílá (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*) představuje modelový dvoudomý druh s heteromorfními pohlavními chromozómy: samičí rostliny ($2n = 22 + XX$) jsou homogametické, zatímco samčí rostliny ($2n = 22 + XY$) jsou heterogametické. Chromozóm Y nese nejen geny, jejichž produkty potlačují vývin pestíků, ale i geny nezbytné ke tvorbě tyčinek. Úloha chromozómu X v determinaci pohlaví je dosud nejasná. Pohlavní chromozómy jsou u knotovky výrazně delší než autozomy, a jsou proto snadno rozlišitelné. Jelikož typ determinace pohlaví je analogický systému savčímu, vzniká otázka, zda v samičích somatických buňkách knotovky též dochází ke kompenzaci dávky genů nesených chromozómem X (fakultativní heterochromatinizace). Pomocí techniky *in situ* nick translace jsme prokázali určité rozdíly v metylaci cytozinu mezi dvěma samičími chromozómy X. Tyto rozdíly korelovaly s autoradiografickou analýzou kinetiky replikace, stupněm kondenzace i transkripční aktivitou. V předložené práci jsme sledovali kinetiku replikace DNA, metylace DNA a acetylaci nukleozomálních histonů pomocí protilátkových reakcí na mitotických preparátech. Synchronizované kořenové špičky byly v průběhu S-fáze značeny krátkými pulzy 5-bromdeoxyuridinu (BrdU), který byl posléze vizualizován s pomocí primární myši anti-BrdU Ab a sekundární anti-myši Ab konjugované s fluoresceinem. Výsledky ukazují, že replikace DNA obecně začíná v subtelomerických oblastech chromozómů a pozdní replikaci se vyznačují centromerické domény. Srovnání dvou chromozómů X na samičích metafázích pak potvrdilo výrazné rozdíly na kratším i delším ramenu; podstatná část delšího ramene jednoho z chromozómů X se replikuje až v pozdní S-fázi. S pomocí monoklonální protilátky vůči 5-metylcytozinu (anti-mC) jsme detekovali hypermetylované oblasti genomu. Na interfázních jádrech bylo možné prokázat pozitivní korelaci mezi konstitutivním heterochromatinem (chromocentra) a metylací DNA. Metylační obrazy na mitotických figurách vykazovaly nejsilnější signály v bezprostřední blízkosti telomerických oblastí. Rozdíly mezi dvěma chromozómy X byly markantní na obou ramenech. Kontrolní preparáty (s použitím anti-DNAAb) prokázaly homogenní značení celých chromozómů. Vzhledem k tomu, že inkorporovaný BrdU výrazně mění denaturační parametry DNA, nebylo možné provádět simultánní dvojistou imunodetekci BrdU a 5-mC. Na preparátech fixovaných formaldehydem a nanášených na skla pomocí cytocentrifugace byly prováděny pokusy o analýzu acetylaci nukleozomálních histonů H4. Kontrolní preparáty (s pomocí anti-histon-panAb) prokázaly vhodnost použité metodiky: interfázová jádra (mimo oblast jadérek) a chromozómy dávaly reprodukovatelné, homogenní signály. První výsledky prokázaly, že nejvyšší stupeň acetylaci lyzinových reziduí v pozicích 5, 8 a 12 u histonů H4 se nachází v subtelomerických oblastech chromozómů, což koreluje s časnou replikací DNA v těchto doménách.

Poděkování: Tento výzkum byl prováděn za finanční podpory Grantové agentury AV ČR (A5004601).

