

Měření redoxních potenciálů v rostlině a jejich význam

JAROSLAV BENADA

Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž,
tel.: 0634/31 71 31 , email: benada@vukrom.cz.

Podstata metody

Redoxní potenciál (RP) je měřen vpichem plíškové nebo jehlové platinové elektrody do pletiv. Srovnávací elektrodou je nasycená kalomelová elektroda (+244 mV).

Shrnutí základních praktických postupů

Dno Petriho misky pokrýt roztokem KCl nebo vodovodní vodou. Do držáku upevnit nasycenou kalomelovou elektrodu, aby se její báze stýkala s vodou. Zapnout měřicí přístroj. Prepolarizovat očištěnou Pt elektrodu slabým roztokem ferrikyanidu, opláchnout ji destilovanou vodou, vpíchnout ji do pletiva a vložit do Petriho misky. Nastavit hodnotu „Data min.“. Hodnotu zapsat.

Co je třeba v laboratoři

Pro měření jsou vhodné pH metry umožňující měření v oblasti mV nebo i technické multimetry s dostatečnou impedancí (alespoň 10 Mohm) a funkcí „Data hold“ a „Data min/max hold“.

Pracovní postup

Pokud je pletivo dostatečně tuhé jako hlíza brambor, vpich se provede přímo. V listech se měření provede tak, že listy se nejdříve svinou a elektroda se vpíchne do svitku. Je třeba dbát, aby pokud možno celá elektroda byla pokrytá rostlinným pletivem nebo orgánem. Pak se měřený objekt vloží do Petriho misky, kde je malé množství roztoku KCl (0.1%) nebo stačí i běžná vodovodní voda. Vrstva této vody musí pokrývat dno Petriho misky, měřený orgán však nesmí být pod vodou. Srovnávací elektrodou je nasycená kalomelová elektroda (+244 mV), která zasahuje do vody v Petriho misce. Poněvadž záleží na gradientech redoxních potenciálů, není třeba v první fázi naměřené hodnoty přepočítávat.

Před měřením je třeba platinovou elektrodu prepolarizovat ponořením do slabého roztoku ferrikyanidu (cca 0,1%) a následně opláchnout destilovanou vodou. Koncentraci roztoku ferrikyanidu je třeba volit tak, aby prepolarizovaná elektroda měla hodnotu vyšší než je redoxní potenciál pletiva. Po vpíchnutí platinové elektrody začne hodnota potenciálu klesat, až na určité hodnotě se zastaví a pak potenciál opět stoupá. Tento spodní bod obratu se zaznamená jako RP pletiva. Pro měření jsou vhodné pH metry umožňující měření v oblasti mV nebo i technické multimetry s dostatečnou impedancí (alespoň 10 Mohm) a funkcí „Data hold“ a „Data min/max hold“.

Vyhodnocení experimentálních dat

Je třeba vzít v úvahu, že RP se v rostlině mění v závislosti na ontogenesi a vlivem vnějších podmínek. V rostlině existují výrazné gradienty redoxního potenciálu, např.

mezi jednotlivými listy na stéble obilnin, v rámci jednoho listu i v rámci jednoho orgánu. Tak u bramborové hlízy mají povrchové partie RP vysoký (nad +100 mV), vnitřek hlízy RP pod + 100 mV. I v rámci těchto partií jsou rozdíly v RP, např. podle blízkosti oček. RP je ovlivněn především všemi vlivy, které ovlivňují dýchání orgánů. Např. ponoření bramborové hlízy do vody vede k výraznému poklesu RP v povrchových partiích. RP kolísá během dne: u listů obilnin během dne jsou hodnoty RP průkazně nižší než v noci. RP je výrazně ovlivňován teplotou, výživou, regulátory růstu jako je např. CCC, vadnutím atd. Proto pro měření je třeba vybírat orgány nebo jejich části ze stejných podmínek. Zpravidla stačí 10 měření a výpočet střední chyby průměru.

Zhodnocení finanční a časové náročnosti

Samotné měření je málo finančně náročné. Vhodné pH metry jsou zpravidla v laboratořích běžně dostupné. Cena vhodných multimetrů se pohybuje do 5 tis. Kč. Kombinované platinové elektrody se pro tento typ měření nehodí. Dělené redoxní elektrody bývají u některých výrobců dosažitelné (platinová stojí cca 2 tis. Kč, ale lze je amatérsky zhotovit zatavením Pt plíšku nebo drátu do skleněné trubičky nebo do nástavce pro automatické pipety).

I když samotné měření není finančně náročné, důsledky výsledků měření vyžadují spolupráci týmu specialistů z biofyziky, biochemie a fyziologie rostlin. Především bude třeba identifikovat příslušné vysoce specializované nosiče elektronů (musí jich být tolik, aby pokrývaly všechny rostlinné druhy a odrůdy). Dále bude třeba experimentálně dokázat nebo vyvrátit hypotézu, že v živé buňce není volný kyslík.

Časová náročnost. Získání dolního bodu obratu trvá u některých objektů jen 1 minutu, jindy trvá déle. Co zabere čas, je informovanost experimentátora o gradientech RP v příslušné rostlině. Pokud by experimentátor nebral v úvahu gradienty RP a vliv vnějších podmínek, pak dostane velký rozptyl a nepoužitelné výsledky.

Úskalí metody

Metoda byla vyvinuta v souvislosti s hledáním podstaty odolnosti rostlin proti obligátním parazitům (v první fázi na modelu proměnlivé odolnosti obilnin k padlí travnímu na obilninách). Tato odolnost je charakterizována 1. gradientem choroby na rostlině, 2. změnou náchylnosti orgánů rostliny během ontogenese a růstu, 3. rozdílnou náchylností jednotlivých buněk ležících blízko sebe, 4. relativně rychlou změnou odolnosti i během několika hodin.

Jestliže byly stanoveny vlastnosti této odolnosti, bylo jasné, že odolnost nemůže spočívat v nějaké živině nutné pro parazita, ale v nějakém velmi dynamickém faktoru. Postupně byla pozornost soustředěna na změny biofyzikálních stavů, především na redoxní potenciál a pH.

Tipy a triky

Samotné měření redoxního potenciálu je poměrně jednoduché a nenáročné na přístrojové vybavení. Je vhodné i pro studenty a amatéry. Hodnot redoxního potenciálu lze okamžitě využít v kombinaci s klasickými metodami experimentální morfologie

pro studium translokace růstových látek a pro nové pojetí celistvosti rostliny, kde základem jsou gradienty RP. Prozatím bylo dokázáno, že IAA je translokován do oblasti vysokého RP.

Pro první měření na uvedení do metodiky je vhodné použít dužnatá pletiva jako jsou hlízy brambor.

Redoxní potenciál lze v některých případech měřit i neinvazivní metodou, tedy ve vodném prostředí, aniž by se elektroda vbodla do pletiva. Nechají se naklíčit obilky ječmene nebo pšenice tak, aby délka kořenů byla cca 5 mm. 10 g takových obilky se přelije převařenou destilovanou vodou, aby všechny obilky byly ponořeny ve vodě. Do kádinky k obilkám se upevní kyslíková elektroda, platinová a kalomelová elektroda. Během cca 10 minut naklíčené obilky spotřebují při laboratorní teplotě všechny kyslík a redoxní potenciál z hodnoty kolem +100 mV (hodnota bez přepočtu na potenciál nasycené kalomelové elektrody) klesne za 30 minut na hodnotu -500 až -550 mV. Při nižší teplotě a při menší životnosti kořenů redoxní potenciál klesá pomaleji (až několik hodin). Pokud je do kádinky přidáno na začátku pokusu několik krystalů $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ nebo KNO_3 , pak k hlubokému poklesu redoxního potenciálu nedojde. Tento účinek nemá síran amonný nebo močovina. Z tohoto pokusu lze odvozovat, že nosiče redoxního potenciálu poměrně rychle a snadno pronikají z pletiv kořenů a klíčku do vodného prostředí a že rostlinná pletiva mohou využívat pro aerobní dýchání dusičnanový anion. Dále bylo zjištěno, že při delším uchovávání naklíčených obilky pod vodní hladinou již redoxní potenciál dál neklesá. Co je tato hodnota -500 až -550 mV? Při přepočtu na potenciál srovnávací elektrody se dostaneme k hodnotě -256 až 306 mV. V této oblasti by měl ležet podle některých tabulek redoxní potenciál NAD/NADH, tedy počátek dýchacího řetězce.

Srovnání s alternativními metodami

Nejsou mi známy práce o redoxních potenciálech měřené touto metodou. V drcečných pletivech rostlin se pokoušeli zjišťovat RP v Jeně (Rumeni 1954) s použitím redoxních barviv. Tato metoda se neosvědčila, protože základem RP je dýchání intaktní buňky. RP vzniká jako výsledek aktivity dehydrogenas a terminální oxidace. Pokud aktivita dehydrogenas převyšuje aktivitu terminálních oxidas, RP klesá a obráceně. Podrobněji byla předložena metoda a výsledky s ní dosažené již zveřejněna (Benada 1997 a 1998).

Literatura

- Rumeni, G., 1954.- Ber. Dtsch. Bot. Ges.67, 334-340
 Benada, J., 1997.- Pflschutzber.57, 37-48.
 Benada, J. 1998.- Agro č.5, 55-63.

Další doporučená literatura

Seznam dřívějších publikací a přednášek z posledních let lze najít na www.vukrom.cz. (Je třeba otevřít 3 verze: českou, anglickou a německou. Nejsou to překlady, ale materiály, jak byly původně vypracovány.)

Imunochemické metody v cytopathologii rostlin

MICHAELA SEDLÁŘOVÁ^{1,2}, PAVLA BINAROVÁ², ALEŠ LEBEDA¹

¹ Katedra botaniky PŘF UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice,
tel.: 068/524 10 24, email: sedlarova@prfholnt.upol.cz

² ÚEB AV ČR, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc

Odpověď rostliny na pathogenní agens začíná aktivací genů odpovědných za syntézu obranných látek již několik minut po navázání kontaktu rostliny a pathogenu. Následuje řada strukturních i biochemických změn, jejichž rozsah resp. rychlost závisí na povaze interakce. Jednou z nejrychlejších je i přestavba cytoskeletálních struktur. Cílem této práce je upozornit na některé metodické problémy, které provázely výzkum modifikace cytoskeletu u systému *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* (původce plísně salátové) během 48 h po inokulaci (Sedlářová *et al.* 1999).

Při mikroskopickém studiu dynamiky změn probíhajících v infikovaných buňkách jsme postaveni před nutnost kombinace klasických metod tak, aby bylo vyváжено zobrazení struktur jak rostliny, tak i pathogenu. Nejvýznamnější je to u raných fází pathogenese – před penetrací a krátce po ní, kdy jsou změny na buněčné úrovni málo nápadné. Pro vizualizaci hyf a infekčních struktur *B. lactucae* pomocí světelné mikroskopie se používá anilinová modř (Lebeda *et Reinink* 1991), která se váže k β -1,3-glukanu (používá se i k detekci depozice kalosy, v UV žlutý signál). Imunocytochemické techniky zahrnují řadu dílčích kroků, přičemž každé promývání snižuje i tak malou pravděpodobnost nalezení klíčící spory. Lepších výsledků je možno dosáhnout zvýšením koncentrace inokula a jeho objemu aplikovaného na jednotku plochy pletiva (listu) (Lebeda 1986).

Pro umožnění vstupu imunofluorescenčních sond do buněk je barvení nejčastěji prováděno na řezech, buňkách suspenzních kultur nebo jsou používány techniky mikroinjekce. Žádný z výše zmíněných postupů však nebyl vhodný pro studium mikrotubulů a mikrofilament v epidermálních buňkách v primárních fázích vývoje pathogenu, kdy je nutno zachovat integritu pletiva.

Pro výše uvedené výzkumné cíle byla propracována metoda fluorescenčního značení mikrotubulů pomocí imunolokalizace α -tubulinu na bločcích pletiva (Binarová *et al.* 1994). Jako optimální se jeví bločky cca 1x1 mm. Pro narušení buněčných stěn byla použita enzymová směs (Binarová *et al.* 1996) a infiltrace látek do pletiv byla zvýšena inkubací ve vakuu (fixace, barvení primární a sekundární protilátkou). Překážkou detekce fluorescenčního signálu se však stal vysoký stupeň autofluorescence chlorofylu, který je v listech salátu a locik hojně zastoupen. Na únosnou míru se podařilo tento signál snížit extrakcí barviva ethanolovou řadou, methanolem při -20°C . Pro detekci aktinových filament byla modifikována přímá imunofluorescenční mikroskopická technika pomocí barvení rhodaminem-phaloidinem v živých buňkách. Epidermis z abaxiální strany listu byla sloupnuta a ihned na skle barvena barvicí směsí (Binarová *et al.* 1996). Pozorování následovalo ihned 2-3 h po nabarvení. Metoda stripů pokožky je vhodná i pro detekci fenolických látek (nepublikováno) případně jiné metody, kde barvení probíhá přímo na podložním skle a není nutné promývání nebo jiná drastická manipulace

s objektem.

Tento výzkum byl realizován díky podpoře projektů: Vnitřní granty UP pro rok 1998 (č. 31 90 30 04); MŠMT „Stresová a patologická biologie, biochemie a bioenergetika rostlin“ (J14/98:N70000010) a ME125 Kontakt (Rakousko-český program pro spolupráci).

Literatura

- Binarová, P., Rennie, P., Fowke, L. 1994. - *Protoplasma* **180**: 106-117.
 Binarová, P., Čihalíková, J., Doležel, J., Gilmer, S., Fowke, L.C. 1996.
In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant **32**: 59-65.
 Lebeda, A. 1986. - In: Lebeda, A. (ed.): Metody testování rezistence zelenin vůči rostlinným patogenům, 105-113. VHJ Sempra, VŠÚZ Olomouc.
 Lebeda, A., Reinink, K. 1991. - *Plant Pathol.* **40**: 232-237.
 Sedlářová, M., Lebeda A., Binarová P. 1999. - In: Lebeda, A., Křístková, E. (eds.): Eucarpia Leafy Vegetables '99, 199-204. Olomouc, Palacký University.

Detekce viru žluté nekrotické žilkovitosti řepy *in situ*

LENKA BURKETOVÁ, MARCELA FELTLOVÁ A KATEŘINA ŠTILLEROVÁ

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6
 tel.: 02/243 10 109, fax.: 02/243 10 113, email: burketova@ueb.cas.cz

Detegovat rostlinné viry v pletivech je možné kvantitativně nebo kvalitativně. Pro pouhé potvrzení přítomnosti viru v rostlině se nejčastěji používá ELISA, elektronová mikroskopie nebo PCR, pro kvantifikaci viru pak většinou ELISA. Potřebujeme-li však např. hodnotit rezistenci hostitele k viru, je užitečné doplnit sledování obsahu viru o jeho lokalizaci, což je možné jednak v rámci celé rostliny pomocí otisku jednotlivých částí rostliny na nitroceluloseovou membránu a dále pak mikroskopickým pozorováním na řezech. Vzhledem k velikosti rostlinných virů (desítky až stovky nm) je možné detegovat jejich přítomnost světelným mikroskopem až po jejich imunochemickém značení. Obě metody jsou založeny na detekci obalového proteinu viru pomocí specifických polyklonálních protilátek.

Virus žluté nekrotické žilkovitosti řepy (*beet necrotic yellow vein virus* – BNYVV) je původcem nebezpečného karanténního onemocnění cukrovky, zvaného rhizománie. Virus se reprodukuje téměř výlučně v kořenech a jeho přenos zajišťuje půdní mikroorganismus *Polymyxa betae*. Pro hodnocení rezistence kultivarů cukrovky jak k samotnému viru tak k přenašeči lze použít imunolokalizaci viru v kořenech rostlin na makroskopické a mikroskopické úrovni.

Imunolokalizace BNYVV na řezech kořenů

Modifikovaný postup podle Dewitte *et al.* (1999), Beneše (1973) a Votrubové *et al.* (1987) se skládá z následujících kroků:

Není-li uvedeno jinak, jsou jednotlivé kroky prováděny při pokojové teplotě.

- rychlý odběr materiálu
- fixace (fixáž: 3% (hm./obj.) paraformaldehyd v PBS - 0,5 h vakuová infiltrace,

pak ještě ponechat ve fixáži 2,5 h při 4°C). PBS (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,0 mM K_2HPO_4 , pH 7,2)

- vypírání fixáže v PBS, 4°C (nejlépe přes noc)
- postupné převedení vzorků do roztoku sacharosy v PBS (0,11M, 0,22M, 0,44M, 0,88M a 1,76M vždy 12-24 h, 4°C), dobře prosycené vzorky klesají ke dnu
- nařezání vzorků na zmrazovacím mikrotomu (řezy 6-8 μm) a nasbírání řezů na podložní skla
- převedení řezů z 1,76M sacharosy v PBS do PBS: 0,88 M; 0,44 M; 0,22 M; 0,11 M sacharosa v PBS; vždy 10 min; opláchnutí PBS, 2 x 5 min
- opláchnutí TBS, 1 x 5 min (TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6)
- TBS + 1% (obj./obj.) Triton X-100, 30 min
- opláchnutí TBS, přikrytí skel speciálními krytkami pro imunodetekci (Shandon) a propláchnutí TBS (2,5 ml/sklíčko), 2 x 4 min
- blokování T*S4 (100 μl /sklíčko), 3 x 20 min, (T*S4: 20 mM glycin, 0,2% (obj./obj.) CWFSg (*cold water fish skin gelatin*), 0,1% (obj./obj.) Tween 20, 4% (obj./obj.) ovčí sérum v TBS)
- inkubace s primární protilátkou v T*S4 (králičí protilátka proti BNYVV, ředění 1:100, 100 μl /sklíčko), 4°C, přes noc
- opláchnutí TBS (2,5 ml/sklíčko), 5 x 4 min
- inkubace se sekundární protilátkou v T*S4 (ovčí protilátka proti králičí značená alkalickou fosfatase, ředění 1:100, 100 μl /sklíčko), 2 h
- opláchnutí TBS (2,5 ml/sklíčko), 5 x 4 min
- opláchnutí v AP-P (2,5 ml/sklíčko), 3 x 4 min (AP-P - pufr pro alkalickou fosfatase: 100 mM Tris, 2 mM MgCl_2 , pH 9,5)
- inkubace se substrátem NBT/BCIP v AP-P (500 μl /sklíčko), 10 min (NBT/BCIP v AP-P: 0,37 mM NBT a 0,35 mM BCIP v AP-P)
- opláchnutí v 2 mM EDTA v TBS (2,5 ml/sklíčko), 5 min
- fixace 2,5% (obj./obj.) glutaraldehydu v TBS (2,5 ml/sklíčko), 2 x 10 min
- opláchnutí deionisovanou vodou (2,5 ml/sklíčko), 3 min, sejmutí krytek, další inkubace sklíček opět v kyvetě; deionisovanou vodou 2 x 3 min
- odvodnění řezů alkoholovou řadou a xylénem (ethanol 50%, 70%, 96%, 96%, 100%; Xylen I, II) po 5 minutách
- zamontování preparátu do média DPX Mountant for histology (Fluka)
- pozorování výsledku v mikroskopu.

Fialové zbarvení indikující přítomnost obalového proteinu BNYVV bylo pozorováno zejména ve středním válci, ale i v primární kůře a v epidermis. Obarvené byly i některé trvalé spory přenašeče (cystosory), většinou však zbarvení s výskytem cystosorů neko-localizovalo.

Imunolokalizace BNYVV na otiscích kořenů

Metoda otisku pletiv na membránu umožňuje lokalizovat virus v jednotlivých částech rostliny. Je založena na přenesení štřávy na nitrocelulosovou membránu, detek-

ci obalového proteinu viru pomocí specifických protilátek a chromogenní, případně luminiscenční, vizualizaci (Hsu a Lawson 1991, Kaufmann *et al.* 1992, Kastir - Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik, Aschersleben – ústní sdělení).

Postup se skládá z následujících kroků:

- navlhčení nitroceluloseové membrány (Hybond C+, Amersham Biotech) v PBS a rozprostření kořenů na membránu
- důkladné poválení membrány s kořeny umístěné mezi filtračními papíry fotografickým válečkem (asi 1 min)
- usušení membrány na vzduchu
- vyblokování volných míst na membráně 3 % hovězím sérumalbuminem v PBS, 1 h
- inkubace membrány s primární králičí protilátkou proti BNYVV (použité ředění 1:300) v blokovacím roztoku, 2 hodiny při pokojové teplotě
- opláchnutí membrány PBS, 2 x 5 min
- inkubace se sekundární ovčí protilátkou proti králičí konjugované s alkalickou fosfátasou v PBS (použité ředění 1:200), 1 hodinu při pokojové teplotě
- opláchnutí membrány v PBS 2 x 10 min a v substrátovém pufru pro alkalickou fosfátasu (viz výše), 1x 10 min
- vizualizace po přidání substrátu (viz výše)

Na membráně obvykle zůstává patrný celý otisk kořene a části kořenů obsahující virus jsou temně fialově zbarveny.

Vybavení laboratoře a zhodnocení finanční a časové náročnosti

Kromě běžného vybavení je potřebný zmrazovací mikrotom, světelný mikroskop a fotografický váleček.

Finančně náročné jsou především primární a sekundární protilátky a dále pak nitroceluloseová membrána, které je poměrně velká spotřeba.

Příprava mikroskopických preparátů trvá nejméně 7 - 10 dní. Na provedení otisků stačí pouze jeden den.

Literatura

- Beneš, K. 1973. - Biol. Plant. **15** (1): 50-56
- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, and Van Onckelen, H. 1999. - Plant. Physiol. **119**: 111-121
- Hsu, H.T., Lawson, R.H. 1991. – Plant. Dis. **75**: 292-295
- Kaufmann, A., Koenig, R., Lesemann, D.-E. 1992. – Arch. Virol. **126**: 329-335
- Votrubová, O., Rovenská, B., Pazourková, Z., Pazourek, J. 1987. - Mikroskopická technika pro biotechnologii a šlechtitele. Vysoká škola zemědělská, Fakulta agronomická, Praha.

γ -Tubulin v acentrosomálních rostlinných buňkách

VĚRA CENKLOVÁ¹, DENISA DRYKOVÁ², BETTINA HAUSE⁴, PAVEL DRÁBER³, PAVLA BINAROVÁ²

¹ ÚEB AVČR, Sokolovská 6, 77200 Olomouc, ČR; ² MBÚ AVČR, Vídeňská 1083, 14220

Praha 4 - Krč, ČR, tel.: 068/522 85 21-2, email: cenklova@ueb.cas.cz; ³ ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4 – Krč, ČR; ⁴ Ústav biochemie rostlin, P. O. Box 110432, D-06018 Halle, SRN

γ -Tubulin, známý jako obecná součást center pro organizaci mikrotubulů u všech dosud studovaných eukaryotických organismů, kolokalizuje u vyšších rostlin se všemi mikrotubulárními strukturami vyskytujícími se v průběhu buněčného cyklu. V naší laboratoři se snažíme o bližší charakterizaci tohoto proteinu pomocí řady biochemických technik a pomocí imunofluorescence. Bylo prokázáno, že největší část γ -tubulinu je přítomná v cytoplasmě a pouze minoritní část se vyskytuje v jádrech. Naše výsledky naznačují, že rostlinný cytoplasmatický γ -tubulin se vyskytuje s největší pravděpodobností, podobně jak je to známo u jiných organismů, ve formě komplexů s dalšími proteiny.

γ -Tubulin byl lokalizován nepřímou imunofluorescencí v jádrech u několika rostlinných druhů (*Vicia faba*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Hordem vulgare* a *Picea abies*). Detailní lokalizace γ -tubulinu v jádrech a na chromosomech byla analyzována pomocí konfokální mikroskopie a srovnávána s lokalizací kinetochorového markeru – fosfoepitopu rozeznávaného protilátkou MPM-2. Výsledky potvrdily přítomnost γ -tubulinu v pre-kinetochorové oblasti, ale γ -tubulin se vyskytoval také v jiných oblastech jádra - v těsné blízkosti kondenzovaného chromatinu. Ovlivnění izolovaných jader DNAsou, s následnou imunolokalizací potvrdilo, že γ -tubulin je v jádře asociován s chromatinem. Chaotropní látky (např. KI) zcela odstranily γ -tubulin z jader a při vyšších koncentracích byla výrazně poškozena struktura jader. Immunodetekce γ -tubulinu na blotech potvrdila nejvyšší množství tohoto proteinu v jádrech v G2 fázi buněčného cyklu.

Binarová P., Cenklová V., Hause B., Kubátová E., Lysák M., Doležel J., Bögre L., Dráber P.: Nuclear γ -tubulin during acentriolar plant mitosis. *Plant cell* 12/3: 433-442, 2000

Podporováno granty GAČR A 5020803-1998 a GAČR 204/99/D092.

Metody násobného značení cytoskeletálních struktur ve fluorescenční mikroskopii

EDUARDA DRÁBEROVÁ

Ústav molekulární genetiky AVČR, Vídeňská 1083, 142 02 Praha 4, tel.: 02/475 26 30, email: drabere@biomed.cas.cz

Násobné fluorescenční techniky umožňují určit vzájemnou lokalizaci proteinů v rámci jedné buňky či tkáně. Nejčastěji jsou užívané techniky imunofluorescenční založené na konjugaci fluorescenčních látek se specifickými protilátkami. Imunofluorescenční metody pak mohou být kombinovány s fluorescenčními látkami, které se specificky zabu-

dovávají do buněčných organel (jádro, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát apod.). Fluorescenční látky – fluorofory - absorbují světlo o určité vlnové délce (absorpční nebo též excitační vlnová délka) a emitují jinou, vyšší vlnovou délku světla (emisní vlnová délka). Jestliže jsou tyto látky osvětleny při excitační vlnové délce a prohlíženy přes filtr propouštějící pouze světlo o emitované vlnové délce, lze pozorovat svícení na tmavém pozadí. Specifické protilátky vykazují vazbu pouze na určitý protein, proti kterému vznikly. Navázáním fluoroforu na protilátku vzniká sonda, která označí pouze sledovaný protein. V současné době jsou komerčně dostupné desítky fluoroforů s emisí v různé části spektra. Toho využívají metody násobných fluorescenčních značení, kdy je za pomoci různých fluoroforů současně sledována distribuce dvou i více proteinů. K vyhodnocování fluorescenčních preparátů se používá fluorescenční mikroskop, který je na rozdíl od normálního světelného mikroskopu vybaven silným zdrojem světla (nejčastěji rtuťová výbojka) a vhodnou soustavou filtrů, v případě preparátů o větší tloušce je lépe použít mikroskop konfokální.

Cytoskelet je síť proteinových vláken, prostupujících cytoplasmu všech eukaryontních buněk. Tvoří ho tři typy filament - mikrotubuly, mikrofilamenta a střední filamenta, lišící se stavebními proteiny i morfologií. Základní stavební komponentou mikrotubulů je protein tubulin, mikrofilamenta jsou tvořena aktinem a pro střední filamenta existuje několik typů základních stavebních proteinů, které vykazují sekvenční homologii a jejichž výskyt je tkáňově specifický (Kreis a Vale 1999).

Pracovní postup

Fixace

Základem přípravy vzorků pro imunofluorescenční detekci je umožnit molekulám protilátek proniknout ke sledovaným strukturám a přitom struktury co nejlépe zachovat. Jako fixativa se nejčastěji užívají roztoky formaldehydu nebo glutaraldehydu v pufru, který sledované struktury stabilizuje. Pokud jsou sledované struktury uvnitř buňky, je nezbytné penetrovat membránu. Nejčastěji se užívají neiontové detergenty jako je např. Triton X-100, Saponin nebo Nonidet P-40. V některých případech je vhodné použít fixaci methanolem při -20°C , která bývá často doplněna fixací acetonem. Při těchto fixacích jsou membrány rozlámány mrazem. U rostlinných buněk komplikuje přípravu preparátů buněčná stěna, kterou je třeba enzymaticky natrávit (Smertenko *et al.* 1997). Extrakční a fixační podmínky jsou voleny tak, aby byly všechny sledované struktury zachované, dostupné pro použité protilátky, a aby současně byly zachovány antigenní determinanty rozpoznávané danými protilátkami. Reaktivita mnoha protilátek závisí právě na fixačních podmínkách (Herzog *et al.* 1994). Výběr správné fixace je zvláště důležitý při použití monoklonálních protilátek, které rozpoznávají pouze jeden epitop sledovaného proteinu (Dráber *et al.* 1989). Pro násobná značení cytoskeletálních struktur buněk tkáňových kultur se nám nejvíce osvědčila extrakce 0,2% Tritonem X-100 a fixace 3% formaldehydem v pufru stabilizujícím mikrotubuly (Dráberová a Dráber, 1993).

Pozn.: Aby se zabránilo nežádoucím nespecifickým vazbám protilátek na fixovaný ma-

teriál, je lépe připravit čerstvý formaldehyd rozpuštěním paraformaldehydu a glutaraldehyd používat v čistotě pro elektronovou mikroskopii.

Vlastní značení

K detekci proteinů může být používána přímá imunofluorescence, kdy je protilátka rozpoznávající studovaný protein přímo konjugovaná s fluoroforem. Konjugace protilátek je však náročná a mnohé protilátky (zejména monoklonální) ztrácejí po konjugaci svoji schopnost vázat se na antigen. Proto se častěji používá imunofluorescence nepřímá, při které je první protilátka detegována druhou značenou protilátkou. Komerčně dostupné jsou protilátky proti imunoglobulinům různých živočišných druhů konjugované s různými fluorofory. Jestliže jsou při násobném značení použity primární protilátky připravené v různých živočišných druzích (např. myší monoklonální protilátka a králičí polyklonální protilátka), jsou k jejich detekci užity druhově specifické protilátky značené různými fluorofory. K násobnému značení je možné využít i dvou myších monoklonálních protilátek různých tříd (např. IgG a IgM) a detegovat je třídě-specifickými anti-myšími protilátkami. Někdy je výhodné konjugovat primární protilátky s biotinem a následně je detegovat značeným avidinem nebo jeho deriváty (streptavidin, extravidin). Při násobných značeních je možné výše uvedené postupy kombinovat (Dráberová a Dráber 1999).

Pozn.: Vždy je nezbytné provést kontroly prokazující, že samotné sekundární protilátky (případně značený avidin nebo jeho deriváty) nevykazují vazbu na vzorek, že každá primární protilátka reaguje v násobném značení stejně, jako když je použita samostatně a konečně je nezbytné ověřit, že druhově-specifické (případně třídě-specifické) protilátky nereagují s imunoglobuliny jiných druhů (případě tříd) užitých v daném systému.

Vyhodnocení preparátů

Výběr fluoroforů závisí na sestavě filtrů dostupných pro daný mikroskop a na citlivosti detekčního systému. Emisní spektra vybraných fluoroforů by se měla překrývat co nejméně. Protože jednotlivá fluorescenční svícení nesmí přesvěcovat do sestavy filtrů určených pro fluorofor s jiným emisním maximem, používají se k násobnému značení filtry s úzkou pásmovou propustností. Čím užší je však pásmová propustnost filtru, tím menší je intenzita svícení. Příklady fluoroforů užívaných pro násobná značení jsou uvedeny v tab. 1. Značení jednotlivými fluorescenčními sondami je prohlíženo přes odpovídající sestavu filtrů. Vybrané pole může být fotografováno pro každý fluorofor zvlášť na černobílý film nebo dohromady na barevný film či diapozitiv (násobná expozice do jednoho políčka filmu). Nevýhodou této metody je poměrně malá úspěšnost, snímky bývají barevně nevyvážené, se světlým pozadím. Mnohem efektivnější je sejmutí záření jednotlivých fluoroforů CCD kamerou a složení takto získaných polí do jednoho obrázku.

Tab. 1. Charakteristika některých fluoroforů, užívaných pro násobná značení

* Názvy a zkratky fluoroforů jsou psány tak, jak je uvádějí anglické katalogy

Fluorofor*	Exitační/Emisní max. (nm)	Barva	Použití
Aminomethylcoumarin, AMCA	350/450	modrá	značení protilátek
Cyanine, Cy2	492/510	zelená	značení protilátek
Fluorescein isothiocyanate, FITC	492/520	zelená	značení protilátek
Tetramethylrhodamine, TRITC	555/580	červená	značení protilátek
Lissamine rhodamine B	570/590	červená	značení protilátek
Texas Red, TR	596/620	červená	značení protilátek
Indocarbocyanine, Cy3	552/565	červená	značení protilátek
Indodicarbocyanine, Cy5	650/670	červená	značení protilátek
DAPI	359/460	modrá	značí DNA
HOECHST 33258	365/465	modrá	značí DNA
Ethidium bromide	518/605	červená	značí DNA, RNA
Propidium iodide	535/617	červená	značí DNA, RNA

Pozn: Pro dvojí imunofluorescenční značení se často používají tyto kombinace: FITC/TRITC, FITC/TR, Cy2/Cy3, FITC/Cy3. Protilátky konjugované s AMCA se většinou užívají až při vícenásobném značení, protože tento fluorofor není příliš silný a velmi rychle se vysvěcuje (podobně se chovají i další fluorofory s absorpcí v ultrafialové části spektra, které se užívají pro imunodetekci). K detekci pomocí AMCA je vybírán protein, který se dá nejsnáze detegovat, zatímco pro detekci minoritního proteinu je vhodný např. Cy3, který je velmi silný a jeho vysvěcování je minimální. Cy5 není viditelný lidským okem, proto nemůže být použit pro pozorování v konvenčním fluorescenčním mikroskopu. Výhodný je však pro násobná značení při pozorování v konfokálním mikroskopu, který není vybavený laserem pro ultrafialové záření.

Tipy a triky

- Je výhodné používat komerčně dostupné značené sekundární protilátky určené přímo pro násobná značení vysycené imunoglobuliny živočišných druhů, s kterými je jejich reakce nežádoucí. Osvědčily se nám zejména značené protilátky od firmy Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
- Spotřebu protilátek, které nebývají nejlevnější, lze minimalizovat velikostí sklíček, na kterých je materiál fixovaný. Nám se osvědčilo nařezat krycí skla s fixovanými buňkami na sklíčka o velikosti přibližně 7x7mm, ta překlopit na kapku (stačí 20 μ l) protilátky na parafilmu umístěném ve vlhké komůrce. Promývání po inkubaci je prováděno ve 24 jamkových deskách.
- Protilátky lze více ředit v přítomnosti dalšího proteinu v ředícím pufru. Nám se osvědčil 2% bovinní sérový albumin.
- Pro násobná značení je možné fixovaný materiál inkubovat současně s oběma primárními a následně po promytí i s oběma sekundárními protilátkami. Někdy však může dojít ke kompetici či stérickému bránění vazby protilátek, pak je nutné značení rozložit tak, aby se nejprve navázala protilátka s nižší afinitou nebo protilátka rozpoznávající hůře dostupný epitop.
- K potlačení nežádoucího vysvěcování fluoroforů se přidávají různá činidla do monto-

vacího média. Často ale činidlo zabraňující vysvěcování jednoho fluoroforu potlačuje svícení fluoroforu jiného. Proto je při násobném značení nutné připravit montovací medium tak, aby bylo optimální pro všechny užití fluorofory. Nám se osvědčil 0,6% n-propylgalát v mediu MOWIOL 4-88 (Osborn a Weber 1982). Při vyšších koncentracích n-propylgalát zabraňuje vysvěcování fluoresceinu účinněji, potlačuje však svícení TRITC a AMCA

- Při fotodokumentaci je výhodné používat citlivé filmy. Nám se nejlépe osvědčil Kodak TriX 400 pro černobílou fotografii a Kodak Ektachrom 400 Professional pro barevné diapozitivy.

Literatura

- Dráber, P., Dráberová, E., Linhartová, I., Viklický, V. 1989. - J. Cell Sci. **92**: 519.
Dráberová, E., Dráber, P. 1993. - J. Cell Sci. **106**: 1263.
Dráberová, E., Dráber, P. 1999. – In: Kohen E. (ed.): Application of optical engineering to the study of cellular pathology, Vol. 2. Research Signpost.
Herzog, M., Draeger, A., Elher, E., Small, J. V. – 1994. In: Celis J. E. (ed.): Cell Biology. A laboratory Manual, Vol. 2. Academic Press, London.
Kreis, T., Vale, R. 1999. - Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press, Oxford.
Osborn, M., Weber, K. 1982. In: Wilson L. (ed.): Methods in cell Biology, Vol. 24. Academic Press, New York.
Smertenko, A., Blume, Y., Viklický, V., Opatrný, Z., Dráber, P. 1997. - Planta **201**: 349.

Preparing plant tissue cryosections for light microscopy – a little improvement

MARCELA FELTLOVÁ

Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 160 00 Praha 6 - Lysolaje, Czech Republic
tel.: +420/2/203 90 402, fax: +420/2/203 90 419, email: feltlova@ueb.cas.cz

Introduction

Cryosectioning is widely used for preparation of animal tissues for either light or electron microscopy, but not for plant tissues. Beneš (Beneš 1973) studied the effects of many different chemicals, physical conditions, and techniques on the quality of frozen sections of *Vicia faba* root tips. I applied some of methods presented in his paper to *Chenopodium rubrum* shoot apices and cotyledons, *Nicotiana tabacum* leaves and *Beta vulgaris* roots, but the frozen sections were often damaged. So, this procedure was modified to be useful for abovementioned plant material, and now it is possible to prepare high quality frozen sections 5-8 μm thick.

Procedure

Unless stated otherwise, all steps are performed at ambient temperature.

- Fix small pieces of plant material in an appropriate volume of fixative (0.5% (v/v) glutaraldehyde and 3% (w/v) paraformaldehyde mixture in PBS (135 mM NaCl,

2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , and 8 mM K_2HPO_4 , pH 7.2) under a vacuum for 30 min and then store in the fixative for 2.5 h at 4°C (Dewitte *et al.* 1999). An appropriate volume of the fixative and all the other solutions described in this procedure is at least 50x-100x larger than the volume of the fixed samples (Wolf 1954).

- Wash samples in PBS 5x5 min and then overnight at 4°C.
- Transfer samples to sucrosePBS solutions of increasing concentrations (0.11 M; 0.22 M; 0.44 M; 0.88 M; 1.76 M sucrose in PBS, respectively) about 12 – 24 h each, all treatment at 4°C (Beneš 1973 - modified). Samples properly impregnated with sucrose settle to the bottom of the vessel.
- Samples may be stored in a fresh 1.76 M sucrosePBS solution either at -20°C or -72°C for several months (or years) if necessary. No changes in plant tissue structure were observed after the storage at low temperature. This step is very convenient for processing of large sample series.
- Align the defrosted samples into a droplet of 15% (w/v) gelatin (Merck, cat. n. 1.04078.0500) in PBS in a specific orientation, allow them to refreeze and use a cryomicrotome for cutting sections (usually 5-8 μm thick).
- Pick up the sections with slides that have been coated with Gatenby's glue. (Gatenby's glue: 27% (v/v) ethanol, 6.3% (v/v) acetic acid, 1.35% (w/v) gelatin, 0.09% (w/v) $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$; Paleček (Faculty of Science, Charles University, Prague) – personal communication)
- Immerse the slides in 1.76 M sucrosePBS at 4°C. (It's possible to store the slides overnight in this solution if necessary. It's also possible to mount the sections into 1.76 M sucrosePBS and check the quality of the sections under the microscope.)
- Wash the slides in sucrosePBS solutions of decreasing concentrations (0.88 M; 0.44 M; 0.22 M; 0.11 M sucrose in PBS, respectively) 10 min in each and in PBS 2x5 min. The slides are then ready for following use.

Frozen sections prepared this way are very convenient for immunodetection of desired antigens.

Sections, which have been prepared in the manner mentioned above, may also be stained with the classical histological dyes e.g. Alcian blue (stains cell wall) and Kernechtrot (stains chromatin):

- Wash the slides with sections in deionized H_2O 3x3min.
- Stain the sections with Alcian Blue solution for 10-20 min (0.1% (w/v) Alcian Blue, 3% (v/v) acetic acid, and 0.5% (v/v) Triton X-100; (Votrubová *et al.* 1987 – modified: in the case of frozen sections it is better to add Triton X-100 for more rapid staining)).
- Wash the slides in deionized H_2O 3x3min.
- Stain the sections with warm Kernechtrot solution for 3-5 min (0.1% (w/v) Kernechtrot and 5% (w/v) $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; (Votrubová *et al.* 1987)).
- Wash the slides in deionized H_2O 3x3min.
- Dehydrate sections gradually by sequentially immersing the slides in the following series of ethanol solutions: 50%, 70%, 96%, 96% and 100%. Each immersion is

for 5 minutes. After the final ethanol immersion place the slides in xylene for 2x5 min (Votrubová *et al.* 1987 – modified).

- Mount in DPX Mountant for histology (Fluka) and observe under the microscope.

Technical notes and comments

Using the method described above it is possible to get high quality frozen sections (cryosections) with basic laboratory equipment and with a good freezing microtome and a microscope.

The whole procedure of preparing cryosections is relatively time consuming, from the fixation of the plant material to sectioning it lasts about 7 days but cryosections are only minimally damaged. To reduce the time needed for preparing the plant material I tried gradual transfer of the samples to less concentrated sucrose solutions (0.44 M or 0.88 M) or direct transfer to 0.88 M ethanol (Beneš 1973), but the resulting sections were unusable. The use of sucrose concentrations higher than 1.76 M were not an improvement.

I found that it is easier to orient and cut small samples properly frozen in a droplet of 15% gelatin in PBS. Solutions with lower or higher gelatin concentrations or CRYO-M-BED embedding compound (Bright Instrument Company Limited) weren't so convenient for thinner section (4-6 µm) cutting.

Two things are crucial for good sectioning - the cutting temperature and the quality of the cryomicrotome knife. The cutting temperature depends on required section thickness – for thinner sections it is necessary to lower the temperature. I normally cut at about -25°C to -30°C. A standard knife for cryosectioning (or disposable blade) has to have a perfectly sharpened edge.

Freeze sections are often used instead of paraffin sections for immunolocalization of desired antigens. In comparison with resin sections the chemicals used are relatively cheap and moreover there is no resin inside the sample.

References

- Beneš, K. 1973. - Biol. Plant. **15** (1): 50-56
Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, and Van Onckelen, H. 1999. - Plant. Physiol. **119**: 111-121
Votrubová, O., Rovenská, B., Pazourková, Z., Pazourek, J. 1987. - Mikroskopická technika pro biotechnology a šlechtitele. Vysoká škola zemědělská, Fakulta agronomická, Praha.
Wolf, J. 1954. - Mikroskopická technika optická i elektronová pro biologické účely. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha.

This work was supported by a grant of the GAČR 206/96/K188.

Automatizovaná metoda stanovení viability buněk v suspenzní kultuře

MILOSLAVA FOJTOVÁ, ALEŠ KOVAŘÍK

Laboratoř molekulární epigenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel.: 05/415 17 179, email: fojtova@ibp.cz

Automatizovaná metoda stanovení viability buněk v suspenzní kultuře kombinuje barvení buněk fluoresceindiacetátem s následným vyhodnocením fluorescenčního signálu živých buněk pomocí PhosphorImageru. Ve srovnání s mikroskopickou analýzou barvené populace buněk je tento způsob detekce rychlejší a díky eliminaci subjektivní chyby, kterou je manuální vyhodnocení mikroskopického obrazu zatíženo, i přesnější. Stanovení viability buněk v suspenzní kultuře s využitím PhosphorImageru je optimální v případě potřeby sledovat změny viability v širší kolekci vzorků.

Úvod

Práce s buňkami v suspenzní kultuře vyžaduje mnohdy stanovení viability, jejíž změny jsou jednou z odpovědí buněk na změněné kultivační podmínky, přítomnost stresových faktorů apod. Zavedenými metodami lze většinou prokázat zachování či neporušenou funkci určitých buněčných struktur, ovšem nejpřesvědčivější průkaz životaschopnosti buněk – schopnost dělit se – je možno dokumentovat pouze zřídka, například pomocí časosběrné fotografie.

Hojně používanými metodami stanovení počtu živých buněk jsou vitální barvení, především „*dye exclusion test*“, barvení fluoresceindiacetátem a barvení tetrazoliovými solemi.

„Dye exclusion test“ je založen na neprostupnosti – alespoň dočasné – membrán živých buněk pro trypanovou modř. Po tomto barvení je tedy možno detegovat živé buňky v modrém roztoku barviva jako bezbarvé.

Fluoresceindiacetát (FDA) prochází buněčnou stěnou i cytoplasmatickou membránou a v buňce je štěpen účinkem esteras. Vzniklý fluorescein je příčinou zelené fluorescence, kterou buňky barvené FDA jeví v ultrafialovém světle. Z narušených buněk, které nemají intaktní buněčné obaly (buněčnou stěnu, resp. membránu) se fluorescein uvolní.

Tetrazoliumchlorid je akceptorem elektronů. Jeho redukce v buňce za vzniku nerozpustného barviva formazanu svědčí o funkčním dýchacím řetězci.

Všechny popsané metody používají ve finále vyhodnocení barvené populace buněk mikroskopicky. Pokud se však jednotlivé buňky dotýkají nebo dokonce překrývají, může být problematické je identifikovat. Tento problém je zvláště výrazný v případě rostlinných buněk, které rostou často v řetězcích, což zvyšuje subjektivní chybu při manuálním vyhodnocení. Určitým řešením je počítání pouze buněčných jader po barvení Hoechst 33258, i když v tomto případě je výsledkem analýzy celková suma buněk, neboť buňky je nutné před barvením fixovat. Významným faktorem je velká časová náročnost, spjatá s vyhodnocováním statisticky významného počtu buněk. Tento

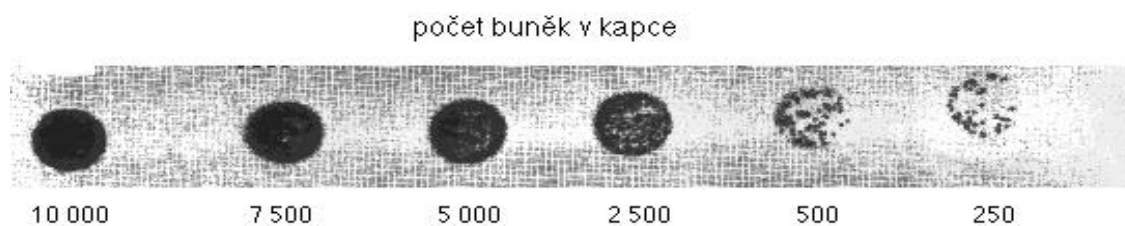
problém řeší použití průtokového cytometru, ale toto zařízení je poměrně drahé a nepatří k běžné výbavě molekulárně-biologických laboratoří.

Princip metody

Metoda založená na kvantifikaci fluorescence buněk po barvení FDA na PhosphorImageru je určena pro rychlé rutinní stanovení viability buněk v suspenzní kultuře. Buňky jsou obarvené FDA dle klasického protokolu (Power *et al.* 1984) a jejich fluorescence je přímo měřena PhosphorImagerem. Dále prezentované údaje byly získány s tabákovou suspenzní kulturou (TBY-2, Nagata *et al.* 1992) rostoucí za standardních podmínek. Počet buněk pro konstrukci kalibrační křivky byl stanoven počítáním v Burkerově komůrce pod mikroskopem s fázovým kontrastem.

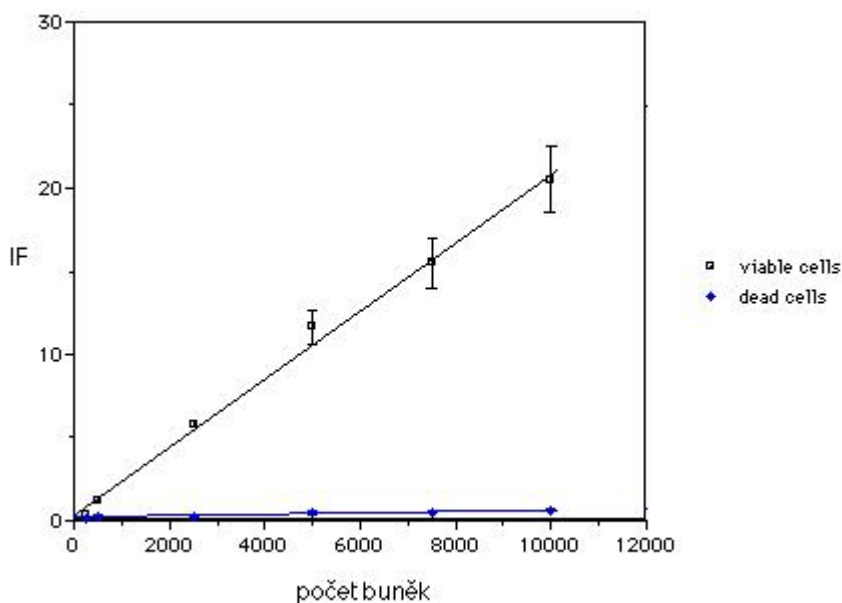
Pracovní postup

Kultura TBY-2 v exponenciální fázi růstu o známé hustotě byla příslušně naředěna a smíchána s jedním objemem FDA, výsledná koncentrace FDA v reakční směsi byla 7.5 mg/ml (FDA od Sigmy, St. Luis, USA, zásobní roztok FDA – 3 mg/ml v acetonu – byl ředěn v poměru 1:200 v médiu MS, Murashige a Skoog 1962). Po pěti až deseti minutách inkubace při laboratorní teplotě byl alikvot obarvených buněk nakapán na nylonovou membránu (Hybond N, Amersham, Anglie) a ponechán zaschnout. Membrána byla položena aplikovaným vzorkem na plochu PhosphorImageru (STORM 860, Molecular Dynamics, USA) a v režimu „press sample“ byla detegována fluorescence jednotlivých kapek za následujících podmínek: blue-fluorescence laser channel (excitační vlnová délka 450 nm), nejvyšší možné rozlišení (100 pixel) (obr. 1).



Obr. 1. Fluorescence buněk TBY-2 obarvených FDA a imobilizovaných na nylonové membráně detegována pomocí PhosphorImageru. Obrázek byl získán v programu ImageQuant při rozsahu citlivosti 1-100 000. Při vyšších ředěních buněčné suspenze je možno rozeznat obrysy buněčných shluků, každý shluk obsahuje průměrně 5-10 buněk.

Intensita fluorescence v každé kapce byla vyhodnocena programem Image Quant™ (Molecular Dynamics, USA) užitím elipsovité integrační metody. Jednotky fluorescence byly poté vyneseny do grafu proti známému počtu buněk v kapce (obr. 2).



Obr. 2. Grafické vyjádření vztahu mezi počtem živých buněk a intenzitou fluorescence. Každý bod reprezentuje průměr z pěti nezávislých měření. Jako kontrola nulové viability byla měřena fluorescence buněk usmrcených teplotním šokem (5 min při 75°C).

Zhodnocení metody

V tomto vynesení bylo lineárního vztahu dosaženo pro 250 – 10 000 buněk v kapce, s citlivostí minimálně 50 buněk na kapku. Kromě rychlosti metody (celé stanovení je možno – včetně měření na PhosphorImageru – provést během 15 minut) je významným kladem stabilita fluorescence vzorku buněk imobilizovaných na membráně (minimálně 2 týdny), což přináší možnost proměření série vzorků po skončení deletrvajícího experimentu a tím i další časovou úsporou.

Závěrem lze říci, že použití PhosphorImageru pro vyhodnocení růstu a viability buněk rostlinné suspenzní kultury je vhodné pro rychlé, rutinní měření velkého množství vzorků s vysokou přesností.

Literatura

- Kovařík, A., Fojtová, M. 1999. – *BioTechniques* **27**: 685-688.
 Murashige, T., Skoog, F. 1962. – *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
 Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S. 1992. – *Int. Rev. Cytol.* **132**: 1-30.
 Power, L.B., Chapmen, J.V., Wilson, D. 1984. - In: *Laboratory Manual. Plant Tissue Culture*, p. 15-19. University of Nottingham, Nottingham.

Práce vznikla za podpory grantu GAČR 521/98/0045.

The use of fluorescent probes and microscopy in the study of physiological processes in plant cell and tissues

STEPHEN J. HALPERIN

Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 160 00 Praha 6 - Lysolaje, Czech Republic, tel.: +420/2/203 90 402, fax: +420/2/203 90 419, email: steveh@ueb.cas.cz

What are fluorescent probes and how may they be used in plant cells and tissue?

Fluorescent probes are dyes which may be introduced into cells, and which fluoresce upon illumination from a particular wavelength of light. This fluorescence may then be quantified with the use of a camera or a photometer. There are currently available many dyes which fluoresce in response to particular intracellular events and conditions, such as the following: ion uptake, protein synthesis, membrane polarity, cell division, and enzyme activity. Because of fluorescent dyes, it is now possible to observe and measure these events inside of living plant cells and tissues, with high spatial resolution.

The process is quite simple in principle. A plant cell or tissue is chosen, and a dye for a specific parameter is chosen, e.g cytosolic pH. The dye is then applied to the cell or tissue (by one of a variety of methods), and the specimen is observed with the use of a fluorescent light microscope. A camera or photometer is the used to record the image, and the image or light signal is transferred to a computer with image analysis software or fluorescent spectrophotometric software. The measurements are then recorded, and images can be saved for further work or for publication.

In this abstract I will describe the procedures which I have used for measuring cytosolic Ca, Na, pH, and K in root hairs. For other intracellular events the specifics will vary according to the the cell or tissue type, and the dye used. I will also discuss the type of equipment needed, the cost, and a comparison to other methods used.

Measuring intracellular ions in root hairs

Plant growth conditions: Plants of *Arabidopsis thaliana* are grown in a thin layer (about 5 mm thick) of solid agarose medium, on a 00-grade coverslip and under aseptic conditions. *Arabidopsis* is a good plant to use because the roots are very thin, and can be grown in a thin layer of gel. Thinness is important because the distance between the objective lenses and the coverslip is very short, and the use of thicker roots and thick layers of gel will make it difficult if not impossible to obtain fluorescent images. Also, for such work a microscope slide cannot be used because the glass is too thick.

Applying the dye: The coverslip and plant are transferred as a unit to a Petri dish. An appropriate solution of the dye (about 20 ml volume) is pipetted onto the part of the gel containing the region of interest of the plant. Typically, staining time is about 1 hour.

The concentration of the dye depends on the dye to be used, and must be determined experimentally on the system being used. There are two general methods by which dyes may be introduced into cells, invasive and non-invasive. Invasive means include microinjection and electroporation. Microinjection entails impaling the cell with a needle made from a capillary tube, and electroporation involves opening pores in the

plasma membrane of the cell using an electric current. Both methods can disrupt the cell, and are very difficult and time-consuming. These methods are used for dyes which are too big to be able to enter the cell by diffusion, and are sometimes needed in experiments confirming that the dye has stayed in the cytoplasm. Noninvasive methods include the following: 1) adding the dye in a solution which is at a pH which permits the dye to diffuse through the plasma membrane, or 2) using an esterified form of the dye which permits diffusion across the plasma membrane, and within the cell the ester group is cleaved off the dye molecule. Indo-1, a dye used to measure intracellular Ca (Wymer et al. 1997), SBFI for intracellular Na (Minta and Tsien, 1989), and PBFI for intracellular K (Lindberg S, 1995) are all loaded by method 1), and BCECF for intracellular pH (Brauer D et al., 1995; Bates TR 1998) is loaded by method 2).

Getting an image: The coverslip with the plant is placed onto the microscope. The light source is usually a Xenon lamp, and filters are placed in the path of the incoming light to illuminate the specimen with a particular wavelength of light. A better system employs one or two monochromators which allow one to precisely control the wavelength, since monochromators have a much smaller bandwidth than filters.

Most systems are epifluorescent. The excitation light is passed through the objective to the specimen. The fluorescent light from the specimen is then collected by the objective lens, and a dichroic mirror placed behind the objective lens divides the excitation light from the emitted light. The emitted light is then directed to either the ocular lens or to the camera. For quantification, a CCD-camera and image analysis program are essential. The image is channeled to the CCD camera, is converted into a computer signal, and the image appears on the computer, and the fluorescent image may be measured for various dimensions (length, width, intensity, etc.). The image analysis software also allows one to adjust the image (contrast, adding colors, background subtraction, etc.).

The images obtained may be bright or faint, depending on the dye. Root hairs stained with BCECF are very bright, and thus it easy to obtain nice images with a black background. Indo-1, SBFI, and PBFI are much fainter, and the cell may be only slightly brighter than the background. This means that the contrast settings are critical, and the background subtraction must be done correctly.

Types of experiments that may be performed

The kinds of measurements that are to be done are of many kinds. I have used Indo-1 to measure the concentration of Ca in the cytosol of root hairs, and also to measure the Ca gradient in the cytosol within the first few microns of the tip of the root hair. I have also measured rapid changes in cytosolic pH (within minutes), and have measured the rapid uptake of Na from the medium using the Na-binding dye SBFI. Some of my most interesting results are that within the first 5 minutes of exposure to NaCl, root hairs take up nearly all of the Na that they will take up, but there is no accompanying rapid change in cytosolic K, pH, or Ca. After a few days, cytosolic Ca is sharply decreased by external NaCl, but pH is not affected. Increasing the external Ca resulted in a decreased uptake of Na (Halperin, 2000). Fluorescent dyes may also be used to identi-

fy morphological structures (Halperin *et al.* 1997).

These results demonstrate that the use of fluorescent dyes enable the microscope to be a powerful tool for physiological measurements, and indeed is superior to methods which employ destructive techniques (such as freeze-fracturing for membrane structure, X-ray microanalysis for intracellular Na, and excised tissue as used in ³¹P-NMR for intracellular pH). Microelectrodes also permit measurements of ion concentrations within living cells, but the method is spatially limited and one is not always certain that a cell is responding normally with a big piece of glass sticking into it, let alone using microelectrodes with additional environmental stresses such as NaCl. Also, microelectrodes are useful for ion concentrations and membrane potential, but fluorescent dyes may be used to monitor a much wider variety of cellular functions.

Selection of plant, dye, and equipment

For such work, small plants, or tissues or cells are best because such material is small and thin, and allows for the best microscopic images. With few exceptions, work with fluorescent dyes is done on living cells. Under actual working conditions, it is usually best if the cells are embedded in a gel, because if they are in solution they will move around which makes it impossible to obtain a good image. Also, it is best if the cells are pressed flat against the coverslip, because the fluorescent signal is very dim and the farther the cells are from the objective lens the dimmer the signal is. If the dye is being used to measure a physiological process which changes over time, then it is important to control the temperature of the specimen. This can be done by perfusing liquid medium through the gel which contains the cells. There are expensive chambers that one can buy which allow one to precisely control the physical conditions of the specimen, but a little ingenuity with a Petri dish and a pump can suffice.

The selection of the dye is determined by what is to be measured. The dyes used are very expensive (from \$45.00-\$250.00/mg), but 1 mg of dye can last a very long time because one uses ng or mg at a time. When I get a dye, I solubilize it so that it is in a 1 mM solution of ethanol, then pipette 20 ml aliquots into Eppendorf tubes. These solutions are then dried at room temperature, and the solid dye is left behind in each tube (it cannot be seen at this point). The tubes are then placed in -80 C, where the dye will be good for a very long time. If the dye is frozen in solution, then the working lifetime is about 1-2 months.

For all of the most important details on the dyes, I refer you to Molecular Probes, Inc. They have an online catalog which gives all of the details on every available dye, including spectral analysis, references, calibration, how the dyes are used, etc. The website is www.probes.com

The hardware is the very expensive part. The total cost of such a system is in the \$300,000-\$500,000 range. It consists of an illumination source, a microscope, a CCD camera plus intensifier, a monitor, and a computer plus an image analysis program. Also necessary are the proper excitation and emission filters, and the right dichroic cubes. The companies that I am familiar with are Photon Technology International, Universal Imaging, and Nikon. The microscope need not be a confocal microscope,

my research was performed on an old Nikon diaphot light microscope. A light microscope is in general more flexible than a confocal microscope for fluorescence purposes, but a confocal microscope gives much better images. Also bear in mind that the more up-to-date the system is, and a confocal microscope is part of such a system, the easier it is to convince reviewers that your work is of high quality.

Potential obstacles and how to overcome them

What I have just described is a very simplified overview of the use of fluorescent dyes for the analysis of plant tissues. There are many difficulties involved. The most important, probably, is that fluorescent images are very dim and it is difficult to obtain good images. There is no one solution to the problem, because it depends on the dye and the system. But some things I can suggest are the following: make every effort to maximize the amount of dye that you can safely load into the cells without killing them. For some dyes, such as BCECF-AM for pH, the proper concentration is 2 mM. For others, such as Indo-1 pentapotassium salt (for intracellular Ca) it can be 20 mM. Also, the amount of time that the cell are exposed to the dye can be important but in my experience is not critical.

The objective lenses used, however, can be of great importance. Indeed, some of my work would not have been possible without the 40x oil immersion fluorescence lens. Without a doubt, this is the best possible lens to use on most systems. A 20x lens for fluorescence lets in more light, and if one is not focusing in on subcellular regions yields the best images. The limitation though is that it is not good for measuring very small changes in ion concentration that occur over a few microns (such as Ca gradients at the tips of root hairs). A 40x fluorescent oil immersion lens lets in almost as much light as a 20x fluorescent lens, but gives greater magnification and better resolution, and lets one see things (like Ca gradients) that cannot be seen with a 20x lens. A 60x lens is excellent for brightfield images, but in general lets in too little light for most dyes to be seen.

Also of importance are the contrast settings on the camera. Because fluorescent images are dim, one needs an intensifier attached to the camera to amplify the signal. The contrast settings can be done through the software. Generally, I like to blacken as much of the background as possible, even at the risk of losing some signal, because I am sure that what I see is pure signal. There is an important point that I would like to make here, and that is this: very little of your work will be with the ocular lens. Fluorescent cells can be very faint to the human eye, and you really can't quantify with your eyes anyway. The image through the ocular lens is useful for general investigation, and for me peace of mind! But the real work will be with the images on the monitor attached to the camera.

Finally, obtaining standard curves which allow one to relate fluorescence intensities to real ion concentrations is a difficult process. One needs the proper ionophore and the imaging techniques worked out beforehand. Also, due to unknown factors, *in vitro* curves and *in vivo* curves never coincide exactly, there is always some discrepancy.

The most probable reason is that the cell itself does have an influence on the optics.

Summary

Fluorescent dyes are a valuable asset in the field of plant physiology, and allow the measurement of important physiological parameters in living cells which cannot be measured by other techniques currently in use. The cost is expensive, but if several researchers pooled their resources such a system is quite feasible, and the benefits gained are well worth the effort.

References

- Bates TR(1998) The importance of root hairs in phosphorous acquisition and the mechanism of root hair elongation in phosphorous deficient *Arabidopsis thaliana* plants. Ph.D thesis, The Pennsylvania State University
- Brauer, Otto J, Tu SI (1995) Selective accumulation of the fluorescent pH indicator, BCECF, in vacuoles of maize root-hair cells. *J. Plant Physiol.* 145: 57-61
- Halperin SJ, Kochian LV, Lynch JP (1997) Salinity stress inhibits calcium loading into the xylem of excised barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *New Phytol.*135: 419-427
- Halperin, SJ (2000) The effects of sodium chloride stress upon the transport of calcium in roots of *Hordeum vulgare* and intracellular ion concentrations in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Ph.D Thesis, The Pennsylvania State University.
- Lindberg S (1995) In-situ determination of intracellular concentrations of K⁺ in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Kara) using the K⁺-binding fluorescent dye benzofuran isophthalate. *Planta* 195: 525-529
- Minta A, Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for sodium. *J. Biol. Chem.* 264:19449-19457
- Wymer CL, Bibikova TN, Gilroy S (1997) Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 12: 427-439

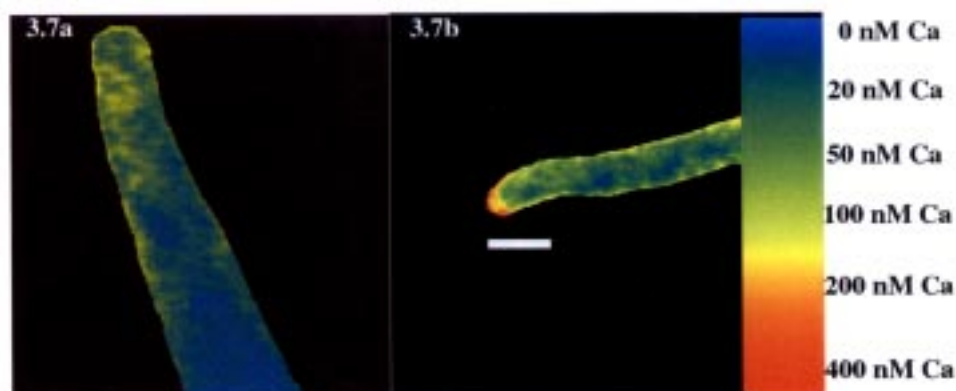


Fig. 1. Fluorescence emission ratio of *A.thaliana* root hairs grown in 2mM Ca and 60mM NaCl (a) or 0mM NaCl (b), showing cytosolic Ca distribution. Notice sharp gradient at the tip in the 0mM NaCl treatment which is lacking in the 60mM NaCl treatment. Hair illuminated with 355±5 nm light, emission measured at 405 and 485 nm, and viewed with an oil immersion lens. The white line represent 10 microns.

An improved method of *Chenopodium rubrum* cultivation for studying photoperiodic flower induction

JAN KOLÁŘ AND MARCELA FELTLOVÁ

Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 160 00 Praha 6 - Lysolaje, Czech Republic,
tel.: +420/2/203 90 414, fax: +420/2/203 90 419, email: kolar@ueb.cas.cz

- 1. *Chenopodium rubrum* as a model photoperiodic plant**
- 2. Drawbacks of earlier cultivation methods**
- 3. Method development**
- 4. Evaluation of the improved method**

The dicot plant *Chenopodium rubrum*, ecotype 374, is a good model for studying photoperiodism. This short-day flowering plant could be grown in constant light at 20°C and induced to flower by a single dark period (optimal night length is 12-13 h) at the age of just 5 days (Ullmann *et al.* 1985b). Seedlings are usually cultivated in small plastic containers (approx. 3 x 5 x 1.5 cm) filled with perlite and watered with 1/2 strength Knop nutrient solution or hydroponically on a nylon mesh above 1/2 Knop solution. Flowering is assessed as percentage of plants, which developed flower buds 7 – 9 days after the inductive night. The experiments are therefore fast (just 14 days from germination to results) and seedlings, which are about 1 cm high, require very little space. *C. rubrum* was frequently used for testing effects of plant hormones on flowering (Ullmann *et al.* 1985a) and for studying morphological and cellular changes associated with flower development (*e.g.* Albrechtová *et al.* 1997).

The greatest drawback of *C. rubrum* as an experimental model is its high phenotypic variability. Even a quite uniform population of plants produces seeds of different size, viability and germination behavior. This variability is decreased by synchronizing germination by a light and temperature regime (12 h light, 30 °C; 12 h dark, 10 °C; 18 - 20 h light, 30 °C). Only seedlings of average size are planted for a photoperiodic experiment, further reducing variability. Despite of these efforts, plants still do not have very uniform growth rates. This is important because there is only a short time window of high photoperiodic sensitivity just after opening of cotyledons. Blažková *et al.* (2000) described more precisely that *C. rubrum* plants are most sensitive to a single dark period from the time when primordia of the second pair of leaves are established to the time when these leaves are higher than shoot apex. In a variable population, it is very difficult to start darkness exactly at a time when the majority of plants is in such developmental stage. This problem increases variations in flowering response between experiments. Moreover, in 1998 we observed an almost complete lack of photoperiodic flower induction in our *C. rubrum* plants. Seedlings in perlite grew well but flowering after a 12-h darkness was only 0 – 30%, compared to usual 80 – 100%. Plants in hydroponic culture were sensitive to pathogens and their shoot apices often became necrotic so that their flowering response could not be determined. Causes of this reduced flowering

remain unknown. They might include decrease in photoperiodic sensitivity during 25 years of reproduction in greenhouse conditions without selection pressure, or subtle microclimatic changes after moving plant incubators to a new location.

Whatever the cause, our aim was to optimize *C. rubrum* cultivation in order to maximize its flowering after a 12-h darkness. These improvements turned out to be crucial:

- a) We found that plants become photoperiodically sensitive as soon as their cotyledons fully open to horizontal position. This corresponds to the start of second leaf pair morphogenesis, which also marks the beginning of photoperiodic sensitivity (Blažková *et al.* 2000, see above). In contrast to shoot apex morphology, easily visible cotyledonary development can be used as a marker for experimental plants that cannot be dissected. Maximal flowering is achieved when a dark period starts 6 h after opening of cotyledons but a 4-h shift in timing reduces flowering by only 5-15 %.
- b) We added another selection step to the method because individual seedlings in a population open their cotyledons within a wide range of more than 24 h. Therefore after 40 – 55% of plants have open cotyledons, all other plants are removed. Plants of extreme size are also excluded.
- c) It was suggested that *C. rubrum* in favorable culture conditions prefers vegetative growth and is less sensitive to flower induction (Seidlová, personal communication). We thus apply a mild stress (limitation of root space and lower nutrient supply) to *C. rubrum* plants. Seedlings are grown in 96-well flat-bottom ELISA plates floating in Knop nutrient solution. The wells are filled with perlite and have a 1-mm hole in bottom to provide nutrient solution. Watering plants with 1/2 strength Knop solution instead of formerly used 1/2 Knop solution further increased flowering from 70% to 90%.

These modifications of the original cultivation method resulted in higher and more reproducible flowering. Selection of seedlings before planting to perlite and plants with open cotyledons prior to dark induction is absolutely crucial for reproducibility. It is always necessary to select average plants from the population. In addition, the same batch of seeds (produced in the same place and at the same time) must be used for the whole series of experiments. Photoperiodic responsiveness of young *C. rubrum* plants could be also drastically altered by seemingly minor changes. At least these factors should be kept constant to assure high flowering and low inter-experimental variability: light intensity ($130 - 140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and quality (cool white fluorescence lamps), temperature (20 ± 1 °C), humidity (approx. 80%), and size of perlite particles (0.4 - 0.8 mm).

References

- Albrechtová, J.T.P., Slavík, J., Wagner, E. 1997. – Endocyt. Cell Res. **12**: 83
Blažková, A., Vondráková, Z., Krekule, J. 2000. – Biol. Plant. **43**: 31
Ullmann, J., Krekule, J., Pavlová, L. 1985a. – Biol. Plant. **27**: 398
Ullmann, J., Seidlová, F., Krekule, J. 1985b. – Biol. Plant. **27**: 367

Determination of cell cycle stages and quantification of immunolabelling in root tissue sections using image analysis

MIROSLAV OVEČKA¹, ZORA HANÁČKOVÁ¹, FRANTIŠEK BALUŠKA^{1,2}.

¹Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, SK-842 23 Bratislava, Slovak Republic, tel.: +421/7/594 12 926, email: botuove@savba.savba.sk; ²Universität Bonn, Botanisches Institut, Venusbergweg 22, D-53115 Bonn, Germany.

Introduction

Immunofluorescence microscopy is one of the methods most widely and routinely used in cell biology. With the possibility to quantify spatial and temporal changes in the intensity and localisation of the immunolabelling, detection of any antigens provides a view into cellular structure. Therefore, introduction of image analysis in immunofluorescence microscopy privileged this method to be fully supplementary to modern methods of molecular biology.

Background

The presented method comprises optimised embedding and sectioning approach suitable for the immunolocalisation in whole plant tissues, and determination of cell cycle stages from sectioned root tissue using image analysis. Preparation of whole root for immunofluorescence microscopy is needed for precise links of immunolabelling with cell proliferation and differentiation. Sections of Steedman's wax-embedded material proved extremely suitable for indirect immunofluorescence microscopy and the visualisation of wide range of proteins in plant root including microtubules (Baluška *et al.* 1992) and actin microfilaments (Baluška *et al.* 1997). Nuclear volume and DNA content represents two main determinants of the chromatin structure and structural organisation of the plant interphase nuclei (Barlow 1977, Baluška 1990). Nuclear structure in root meristem is in close correlation with the DNA synthesis which is related to successive stages of cell cycle.

Materials and equipment

Plant material – roots of 3-days old 5 cm long *Medicago sativa* seedlings

Tissue preparation - microtubule stabilising buffer, phosphate-buffered saline, Steedman's wax (PEG 400 distearate+1-hexadecanol₂ = Brown *et al.* 1989)

Indirect immunofluorescence microscopy – routinely equipped laboratory for light and fluorescence microscopy - Zeiss Jenalumar light microscope equipped-with epifluorescence, (Carl Zeiss, Jena, Germany), fluorescence filters for UV (U 204, B 226, G244) and blue (D 480, D 535, G 247) excitation, rotary microtome (Reichert, Austria), anti-MAPK rabbit polyclonal primary antibody, FITC-conjugated anti-rabbit secondary antibody, 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), toluidine blue

Image analysis - LEICA Q500MC image analysis system equipped with QWin software (Leica Cambridge Ltd. England, UK), Sigma Plot (Jandel Scientific, USA) statistical software.

Procedures

Intact roots were fixed in formaldehyde made up in microtubule stabilising buffer allowing a good preservation of microtubule cytoskeletal elements. The samples were embedded in the low melting point Steedman's wax. 7 µm thick sections were prepared with rotary microtome. After dewaxing primary and secondary antibodies were used for detection of expected antigens. DAPI, the most common dye for nuclear DNA labelling was applied followed by staining the sections with toluidine blue for diminishing the autofluorescence of root cell walls.

Samples stained with DAPI and visualised using UV filter set -were used for quantitative measurement. With a number of approximately 100 examined cells sequence of two parameters - size and DNA amount within the population of interphase nuclei can be used as a standard reference values. Total nuclear DNA content was recorded from individual nuclei and assigned to „C“ class by reference to the values of nuclei assigned into phases G1, S, G2 on the basis of nuclear size and DNA amount (Baluška and Barlow 1993, Baluška *et al.* 1996). The smallest nuclei just after telophase were classified as G1 phase nuclei, the largest ones until the prophase were classified as G2 phase nuclei. Intermediate sized nuclei with intermediate DNA content were classified as nuclei in S phase of cell cycle. Using this standardisation the system was set up for automatic evaluation of interphase cell cycle stages. Nuclear area and integrated grey level (sum of grey level values of pixels overlaid by the binary feature in the stored grey image) of nuclear DNA staining were used for preparation of reference G1 and G2 values. In this way the error arising from the section position of the nuclei was eliminated. These reference values were incorporated and processed in characterisation of all recorded nuclei from evaluated root samples. The same method using LEICA Q500MC image analysis system can be directly applied to semi-quantification of immunolabelling in double- or triple-labelling experiments with the possibility to relate the value of immunolabelling to the certain stage of cell cycle. As an example of double immunolabelling processed by above described image analysis approach nuclear localisation of mitogen-activated protein kinase in *Medicago sativa* root meristem is described.

Method significance

In comparison with other methods of indirect immunofluorescence microscopy of plant tissues the samples prepared in low melting point Steedman's wax maintain a good relationship between antigen preservation and accessibility (Vitha *et al.* 1997). The main benefit from our section-using method in comparison with methods where cell wall is the physical barrier and source of autofluorescence (e.g. squash preparation) is a clear nuclear image, therefore a higher magnification and a higher resolution can be used. Besides, nuclear image is not overlaid by autofluorescent cell wall and no drastic enzymatic digestion of cell wall is necessary.

In comparison with more precise methods of nuclear DNA determination (e.g. flow cytophotometry) the big advantage of our method is in close relation between quantitative and developmental data. Using longitudinal root sections large numbers of cells can be examined in their successive developmental stages.

This work was supported by Grant Agency VEGA, Grant No. 6030 from the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia.

References

- Baluška, F. 1990 - *Protoplasma* **158**: 45.
 Baluška, F., Parker, J.S., Barlow, P.W. 1992 - *J. Cell Sci.* **103**: 191.
 Baluška, F., Parker, J.S., Barlow, P.W. 1992 - *J. Cell Sci.* **103**: 191.
 Baluška, F., Barlow, P.W. 1993 - *Eur. J. Cell Biol.* **61**: 160.
 Baluška, F., Barlow, P.W., Parker, J.S., Volkmann, D. 1996 - *J. Plant Physiol.* **149**: 119.
 Baluška, F., Vitha, S., Barlow, P.W., Volkmann, D. 1997 - *Eur. J. Cell Biol.* **72**: 113.
 Barlow, P.W. 1977 - *Ann. Sci. Nat. Bot. [Ser 12]* **18**: 193.
 Brown, R.C., Lemmon, B.E., Mullinax, J.B. 1989 - *Bot. Acta* **102**: 54.
 Vitha, S., Baluška, F., Mews, M., Volkmann, D. 1997 - *J. Histochem. Cytochem.* **45**: 89.

The study of regeneration of senescent plastids into chloroplasts in *Sinapis alba* L. cotyledons

LENKA SAGANOVÁ, JÁN HUDÁK

Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, 84215 Bratislava, Slovak Republic, tel.: +421/7/602 96 646, email: saganova@fns.uniba.sk

Introduction

Regeneration of senescent plastids into chloroplasts is very interesting and important for better understanding of plastid biogenesis. The study of plastid transformation can indicate the approaches of the possible manipulation of leaf senescence. Photosynthetically active chloroplasts lose their membrane system in the process of senescence and gradually they are developed into senescent plastids—gerontoplasts (Hudák 1981, 1996). During the reversion process chromoplasts are transformed into chloroplasts. Leaf regreening is accompanied with structural changes of plastids (new membranes are differentiated) and with synthesis of chlorophyll. The result of the process is full transformation of chromoplasts into chloroplasts. Only few attempts to induce transformation of chromoplasts into chloroplasts have been made till now. Devidé and Ljubešić (1974, 1981, 1984) and Grönegress (1971) described regreening in lemon and pumpkin fruits and in carrot roots, respectively. In all these observations chromoplasts were changed into chloroplasts by changing of light conditions. On the base of our preliminary experiments the cotyledons have proved to be the suitable plant material for the study of regreening processes especially for their short life span.

Material and methods

Plant material

Cotyledons of *Sinapis alba* L. were used in the experiments. The seeds of mustard were sown in clay-sand soil and cultivated in a cultivating chamber for 34 days with light regime 14 hours and 10 hours night at the temperature 25-30 °C.

Methods

1. Chlorophyll determination

The chlorophyll content (Chl a, Chl b, a+b) was determined directly in acetone extracts (80 % acetone, p.a.). The spectrophotometric measurements of the photosynthetic pigment in experimental material were made on spectrophotometer Jenway 6405 UV/Visible. The chlorophyll contents were calculated according to Lichtenthaler (1987). The results were expressed per dry mass of samples.

2. Extraction and identification of the cytokinins

Extraction and Purification of cytokinins

Extraction and purification was performed according to the method of Redig et al. (1996). Samples were extracted with Bielecki solvent (Bielecki, 1964) containing a mixture of deuterated standards (Z9G, Z9ROG, DHZ9G, Z7G, Z9R, ZOG, DHZ9R, Z, DHZ, IP9G, IP7G, IP9R, IP) and 80 % methanol. Extract was then centrifuged and the resulting supernatant was purified using DEAE-Sephadex (to separate nucleotides), C18 cartridges, and immunoaffinity columns. The combination of these methods separates cytokinins into three fractions : 1. Free bases, ribosides and N₉-glucosides; 2. ribotides; and 3. N₇- and O-glucosides. Finally were the resulting fraction evaporated. The evaporation residues were dissolved in acetonitrile : water solution (2:8 v/v), filtered through 0.2 µ porosity filter and analysed by LC/MS/MS.

Quantitative analyses of cytokinins

Analyses were performed by the modified method described by Prinsen et al. (1995) and Witters et al. (1999) using HPLC (Beckman System Gold, 507 autosampler, 125 gradient HPLC pump) linked to an ion trap mass spectrometer (LCQ, Finnigan MAT, USA) equipped with an electro-spray interface. 10µl of sample were injected onto a C8 column (4 µm, 250×2 mm, Supersphere RP Select B, Merck) and eluted with acetonitrile : 0.001% acetic acid in water using gradient elution (from 14% to 100% of acetonitrile) at flow-rate of 200 µL min⁻¹. The effluent was introduced into the electro-spray source and analysed by positive MS/MS full scan mode.

Results

Understanding of plastid regeneration is one of fundamental questions in the study of plastid biogenesis and using of appropriate plant material is key problem in the solving of this phenomenon. Cotyledons are suitable experimental material for study of greening process due to their short lifetime what enables to repeat experiments in a short time. Mustards cotyledons are intensively green after emerging from the soil. This colouration prevails until the period when the stems and leaves are differentiated (approximately after 10-15 days of cultivation). In this period, cotyledons lose their green colour, gradually they turn yellow and about on the 20th day of cultivation they fall down. When in the phase of mustard development with yellow cotyledons, the stem are decapitated, originally yellow cotyledons are regreened within 3-5 days. An interesting phenomenon is observed on the cotyledons in the case when the stems are remo-

ved from the seedlings in the initial phase of stem differentiation. These cotyledons, without stems, are intensively green (evergreen) during the whole time of cultivation (20-25 days) and their size is bigger than the size of cotyledons with the stems. When the stems from seedling are removed, the sink of cytokinins is blocked, and they begin to accumulate in the cotyledons. Therefore we suppose that this storing of cytokinins in senescent cotyledons might have induced the their regreening.

References

- Bieleski, R.L. 1964. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal Biochem* 9 : 431-442.
- Devidé, Z., Ljubešić, N. 1974. The reversion of chromoplasts to chloroplasts in pumpkin fruits. *Zeitschrift für Pflanzenphysiol* 73 : 296-306.
- Grönegress, P. 1971. The regreening of chromoplasts in *Daucus carota* L. *Planta (Berl.)* 98 : 274-278.
- Hudák, J. 1981. Changes of chloroplast structure during natural senescence in cotyledons of *Sinapis alba* L. *Photosynthetica* 15 : 174-178.
- Hudák, J. 1996. Photosynthetic apparatus, pp. 27-48. In Pessaraki, M (ed), *Handbook of photosynthesis*, Dekker, New York.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids : pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Ljubešić, N. 1981. The regreening of tubulous chromoplasts in fruits of *Cucurbita maxima* Duch. cv. *turbaniformis*. *Acta Bot Croat* 40 : 61-66.
- Ljubešić, N. 1984. Structural and functional changes of plastids during yellowing and regreening of lemon fruits. *Acta Bot Croat* 43 : 25-30.
- Prinsen, E., Redig, P., Van Dongen, W., Esmans, E. L., Van Onckelen, H. A. 1995. Quantitative analysis of cytokinins by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9 : 948-953.
- Redig, P., Schmülling, T., Van Onckelen, H. 1996. Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Physiol* 112 : 141-148.
- Witters, E., Vanhoutte, K., Dewitte, W., Macháčková, I., Benková, E., Van Dongen, W., Esmans, E.L., Van Onckelen, H. A. 1999. Analysis of cyclic nucleotides and cytokinins in minute plant samples using phase-system switching capillary ion-spray LC-MSMS. *Phytochem Anal* 10 : 143-148.

Acknowledgement

This work was supported with grants : VEGA 1/7256/20, UK/100/2000.

Testing the permeability of root – wall apoplast

ALEŠ SOUKUP AND OLGA VOTRUBOVÁ

Department of Plant Physiology, Charles University, Viničná 5, Prague, CZ-128 44, Czech Republic: tel.: +420/2/219 53 185, fax.: +420/2/219 53 306, email: asoukup@mail.natur.cuni.cz, votrub@mail.natur.cuni.cz

Root is usually the plant organ carrying out anchorage as well as communication of plant with soil environment including water and nutrient uptake. Internal space of the root is traditionally divided into two domains. Symplastic continuum is surrounded by

plasmatic membrane, which serves as a highly selective barrier enabling, to high degree, active regulation of compounds passing through. On the other hand apoplast is defined as a space on the nonprotoplasmatic side of plasmalemma, occupying mostly the porous cell wall and dominated by passive almost non-selective transport. Anyway even in apoplast may be movement of water, solutes or other compounds changed by “course adjustment” of transport pathways by structural changes and/or impregnation of cell walls. Permeability of root apoplast is thus one of the meaningful parameters regarding root function and properties. It is considered to play important role in water and nutrient uptake, oxygen economy of wetland plants as well as other fields of stress ecophysiology. Presented methods may extend the circle of tools used in this kind of studies. Both of the procedures base on the compounds, almost not permeating plasmalemma, penetrating into the root tissue via apoplastic space.

Test based on PAS reaction (Periodic acid – Schiff’s reagent) reaction (Pearse 1985)

Underground organs of intact plants (or their segments sealed by lanolin) were submerged into aqueous solution of periodic acid (0.1%) for 2 hours. After thorough wash in water the remnants of periodic acid can be eliminated during 30-minutes wash in reducing solution (Pearse 1985) (this step is not necessary). All the sites reached by periodic acid from surrounding solution may be localised afterwards on sections (fresh or permanent) by Schiff’s solution (for description of PAS reaction see Pearse 1985). This reagent detects aldehydes that were produced by periodic acid oxidation of cell-wall polysaccharides and stains them intensively purple (fig1.b-d). In case of fixation of the material this should be taken into consideration and fixatives introducing aldehydes into the tissue should be avoided. Control sections of roots without periodic acid treatment should be included to confirm the origin of the aldehydes.

Fe²⁺ based test

Underground organs of intact plants (or their segments sealed by lanolin) were submerged into aqueous solution of ferrous sulphate (25mM) for 2 hours. Ferrous ions were than oxidised to ferric precipitate by addition of hydrogen peroxide (2mM) for another 2 hours. Ferric precipitate was later histochemically detected as a precipitate of Berlin blue on fresh free hand sections (fig.1a). Modification of this method was already used by de Rufz de Lavison (1910) where plants were subjected to spontaneously precipitating ferrous sulphate for 24 h. Also this procedure was found to be useful and giving good results.

Detection of ferrous ions: sections were treated for 5 - 15 mins in solution containing HCl (0,5%) and K₄Fe(CN)₆ (1%), washed in distilled water and mounted into 50% glycerol. Alternatively sections may be directly mounted into 50%glycerol containing 0,5% of H₂SO₄ and 1% K₄Fe(CN)₆.

Despite the fact that methods presented here are not able to quantify the permeability or reflection coefficient of root-wall apoplast in physical terms they enable us to localise the sites where apoplast is permeable to solutes from surrounding. In our study re-

sults obtained in this way were correlated with differentiation of hypodermal cell layers of wetland plants and their lignification and suberisation.

The advantages can be seen in using relatively small inorganic ions that may mimic the soil solution solutes better than uncharged apoplastic organic tracers of high molecular weight that are commonly used (Peterson 1981; Enstone & Peterson 1992, Barnabas 1996). High background autofluorescence of cell walls, especially in grasses, may also cause some difficulties during detection of such tracers. Detection based on PAS reaction was precisely localised, permanent and easy to observe.

The disadvantage of those methods is toxicity of used concentrations of chemicals to the plant that was shown during subsequent cultivation.

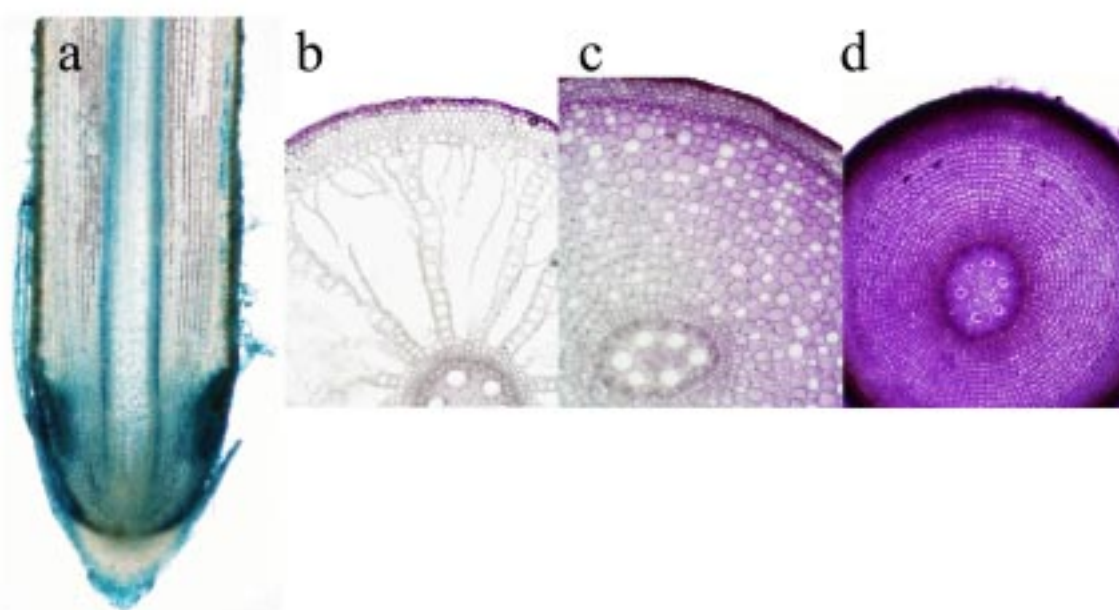


Fig. 1. Results obtained by above mentioned tests:

- a) Penetration of Fe^{2+} ions into apical part of detached root of *Phragmites australis* was detected as a blue precipitate on the longitudinal section. (magnification = 40x)
- b-d) Sites of the apical part of *Phragmites* root reached by periodic acid were stained intensively purple. Transverse sections were 100mm(b) 12mm(c) and 4mm(d) behind the root tip. (magnification = 100x)

References

- Barnabas, A.D. 1996. *Aquatic Botany* 55: 217-225.
- de Rufz de Lavison, M.J. 1910. *Rev.Gén.De Botanique* 22: 225-241.
- Enstone, D.E.; Peterson, C.A. 1992. *Can. J Bot.* 70: 1502-1512.
- Pearse AG. 1985. *Histochemistry (Theoretical and Applied)*. London: J. and A. Churchill Ltd.
- Peterson, C.A.; Mary; Humpreys, G.B. 1981. *Can. J Bot.* 55: 61/8-625.

Acknowledgement: The work was funded from grants VS 96 145 and J13/98113100004

Využití frakcionace stabilních izotopů ^{13}C a ^{18}O ve fyziologii rostlin, půdní biologii a ekologii

JIŘÍ ŠANTRŮČEK^{1,2} A HANA ŠANTRŮČKOVÁ^{1,3}

¹ Biologická fakulta, Jihočeská universita v Českých Budějovicích a ² Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, tel.:038/777 55 27, email:jsan@umbr.cas.cz

³ Ústav půdní biologie AV ČR, Na sádkách 7, 370 05 České Budějovice.

Úvod

Moderní zájem o obsah přirozeného výskytu stabilního izotopu uhlíku a kyslíku (^{13}C a ^{18}O) v organické hmotě a v atmosféře vzešel z požadavku rekonstrukce paleoklimatu pomocí biologických markerů. Přesnost takových rekonstrukcí závisí na tom, jak přesně dokážeme popsat rozdělování (frakcionaci) těžkých izotopů v kinetických a rovnovážných procesech probíhajících v živých organismech. Díky teoretickým popisům frakcionace víme proč obsahují těla rostlin a dalších živých tvorů v potravním řetězci včetně člověka jiný (většinou nižší) obsah těžkých izotopů ^{13}C , ^{18}O případně ^{15}N a ^2D (^2H) než jaký je v okolním prostředí v atmosféře, v půdě nebo ve vodě. Protože jednotlivé biochemické reakce nebo transportní procesy diskriminují nebo preferují využití těžšího izotopu specifickou měrou, představuje izotopové složení biomasy (např. poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v sušině listu, v mikroorganismech, v půdě nebo v kosterních zbytcích člověka) "otisk prstu" vypovídající o tom, který substrát, která reakce a která metabolická nebo transportní cesta "byla použita". Např. frakcionace mezi stabilními izotopy ^{13}C a ^{12}C , ^{18}O a ^{16}O nebo ^2H a ^1H v organické hmotě těl rostlin je biomarkerem integrujícím působení stresu (např. sucha), informujícím o mechanismech koncentrujících CO_2 v rostlinných buňkách a tkáních, o zdroji vody v rostlině (podzemní nebo z atmosférických srážek) nebo o potravních zdrojích konsumentů primární rostlinné produkce. Izotopový signál ^{13}C byl použit při selekci genotypů s vyšší efektivitou využití vody ("suchovzdorných") nebo k posouzení plasticity daného druhu ke zvyšující se koncentraci CO_2 v atmosféře Země. Velké uplatnění našlo měření poměru $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ve výzkumu fotosyntézy a vodního režimu rostlin, v poslední době pak také v projektech zaměřených na heterotrofní metabolické procesy jako temnotní dýchání.

Využití technik stabilních izotopů v biologii umožnilo pokročit v predikci globálních klimatických změn. Další zpřesnění globálního cirkulačního modelu (GCM) je závislé mimo jiné na tom, jak kvalitní a úplný bude popis frakcionace ^{13}C a ^{18}O ve fotosyntéze a následných metabolických procesech v autotrofních a heterotrofních organismech. Sociální a ekonomický tlak spojený s hrozbou globální klimatické změny indukuje snahu zpřesnit GCM. Proto se na výzkum frakcionace přirozených izotopů a na výchovu expertů vynakládají značné finanční částky (viz např. celoevropský projekt NETCARB).

Podstata metod

Isotopy jednoho a téhož prvku lišící se hmotností (součtem protonů a neutronů) vstupují do stejných fyzikálních, chemických a biochemických procesů (reakcí). Díky roz-

dílné hmotnosti se ale v těchto reakcích rozdílně chovají. Obvykle těžký izotop reaguje pomaleji a dochází k jeho **diskriminaci**. V důsledku toho bývá produkt reakcí v porovnání se substrátem vstupujícím do reakce ochuzen o těžký izotop, dochází k nerovnoměrnému rozdělování – **frakcionaci** - izotopu. Poměr izotopového složení substrátu a produktu nebo látky na začátku a konci transportní dráhy se nazývá **izotopový efekt**. Ten se uplatňuje jak v kinetických tak v rovnovážných thermodynamických pochodech. Kinetický izotopový efekt je dán rozdíly v rychlostních konstantách daného procesu pro lehký a těžký izotop (např. difusní koeficient pro molekuly ¹³CO₂ je menší než pro ¹²CO₂). Při normálním izotopovém efektu je rychlostní konstanta pro těžší molekuly nižší než pro molekuly s lehčími izotopy. Thermodynamický izotopový efekt je způsoben izotopově specifickými rovnovážnými rychlostními konstantami (např. frakcionace izotopu uhlíku při ustavení karbonátové rovnováhy). Tento efekt je obecně menší, než vliv individuálních rychlostních konstant. Kinetický i thermodynamický efekt závisí na teplotě, kinetické vlivy jednotlivých, po sobě následujících reakcí, se obvykle nesčítají, naopak thermodynamické ano. K frakcionaci může docházet pouze v otevřeném systému, kde substrát je v přebytku (např. k diskriminaci ¹³C téměř nemůže docházet u rostliny pěstované *in vitro* - tj. ve skleněné uzavřené nádobě).

Měření přirozeného výskytu stabilních izotopů

Přirozený výskyt stabilních izotopů je možno měřit v jakémkoli pevném a kapalném materiálu nebo v plynech. K analýzám mohou být použity vzorky rostlinného materiálu, půda, ale i separované organické látky a plyny. Pro měření obsahu stabilních izotopů musí být vzorky kompletně spáleny a vzniklé oxidy od sebe odděleny kryogenní purifikací nebo separací a čistý vzorek jednoho plynu pak vstupuje spolu s nosným plynem do hmotového spektrometru. Měří se izotopové složení vzhledem ke standardu, protože určit absolutní poměr stabilních izotopů v materiálu je obtížné a nelze je dělat rutinními analýzami. Izotopové složení sledovaného vzorku se pak vyjadřuje jako relativní rozdíl izotopového poměru měřeného vzorku od izotopového poměru ve standardu. A protože tento rozdíl je malý a hodnoty by se pohybovaly v oblasti tisícín, pro přehlednost se relativní rozdíl násobí 1000 a značí se hodnotou d:

$$d = [(R_{\text{vzorku}} - R_{\text{stand.}}) / R_{\text{stand.}}] * 1000 \quad (‰)$$

R je poměr obsahu těžkého a lehkého izotopu ve vzorku a standardu (např. pro uhlík R=¹³C/¹²C). Zvyšování hodnoty d znamená zvyšování obsahu těžkého izotopu ve vzorku vzhledem k standardu a naopak snižování hodnoty d znamená snižování obsahu těžkého izotopu. Jako standardní materiál určený mezinárodní konvencí se pro uhlík užívá standard PDB (CO₂ vzniklý mineralizací fosilního vápence, Pe De Formation, *Belemnite* americana, Jižní Karolína) a pro kyslík standard SMOW (*Standard Mean Oceanic Water*). Kryogenní purifikace vzorku je časově náročná a v současnosti se pro analýzy biologického materiálu a směsi plynů téměř výhradně používají poměrové hmotové spektrometry (CF-IRMS, *Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometer*) s předřazeným prvkovým analyzátozem (pevné a kapalně vzorky) a plynovým chroma-

tografem (pevné, kapalné a plynné vzorky). Kryogenní purifikace se používá v geochemii a občas při analýzách půdních vzorků. Standardně dosahovaná přesnost stanovení $\delta^{13}\text{C}$ je $\pm 0,1 \text{ ‰}$.

Využití $\delta^{13}\text{C}$ při studiu fotosyntézy a výměny plynů mezi rostlinou a atmosférou

Z celkového uhlíku obsaženého v atmosféře Země je přibližně 98,9 % ^{12}C a 1,1 % ^{13}C . Změna v poměrném zastoupení stabilního izotopu ^{13}C v atmosférickém CO_2 oproti PDB standardu ($\delta^{13}\text{C}$) se pohybuje okolo -8 ‰ (současný vzduch je tedy proti třetihornímu ochuzen v podílu $^{13}\text{CO}_2$). CO_2 asimilovaný rostlinami při fotosyntetické karboxylaci je z větší části zabudován do rostlinné biomasy a po jejím odumření pak následně využíván heterotrofními organismy v půdě při rozkladných procesech. Na úrovni fotosyntézy dochází zvláště u rostlin s C3 typem fixace CO_2 k významné diskriminaci $^{13}\text{CO}_2$ proti $^{12}\text{CO}_2$, která způsobuje ochuzení rostlinné biomasy o těžký izotop ^{13}C ve srovnání s obsahem ^{13}C v atmosféře. K diskriminaci dochází hlavně díky nižší rychlostní konstantě pro karboxylaci $^{13}\text{CO}_2$ než $^{12}\text{CO}_2$ karboxylačním enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasaooxygenasa (Rubisco) a dále díky diskriminaci $^{13}\text{CO}_2$ při difusním přenosu mezi atmosférou a chloroplastem. Malá míra diskriminace u C4 rostlin je dána hlavně tím, že se při primární karboxylaci fosfoenolpyruvátu (PEP) PEP-karboxylasou využívá jako substrát HCO_3^- ion, nikoli rozpuštěný CO_2 jako v případě enzymu Rubisco. Přitom při hydrataci CO_2 je preferován $^{13}\text{CO}_2$, a tak HCO_3^- je obohacen o izotop ^{13}C . Další příčinou je to, že C4 rostlina následně hromadí CO_2 v pochvách cévních svazků a vytváří tak téměř uzavřený systém, z kterého není pro molekuly CO_2 úniku a nemůže tedy docházet ani k izotopové diskriminaci. Zákonitosti diskriminace $^{13}\text{CO}_2$ jsou poměrně dobře známy a formalizovány jednoduchým matematickým vztahem (Farquhar et al., 1989). Průměrný izotopový signál (δ) C3 rostlin je -27 ‰ , C4 rostlin -13 ‰ a řas -35 ‰ . Odchytky od průměrné hodnoty pro daný druh rostliny jsou většinou dány vlivem podmínek vnějšího prostředí. Například v podmínkách, kdy rostliny budou mít zavřené průduchy (např. v důsledku sucha) bude izotopový signál vytvářeného rostlinného materiálu vyšší (méně záporný; nižší diskriminace ^{13}C) než průměrná hodnota a naopak při plné otevřenosti průduchů bude izotopový signál nižší (více záporný; vyšší diskriminace ^{13}C). Isotopový signál $\delta^{13}\text{C}$ tak může sloužit jako bioindikátor časově integrující koncentraci CO_2 uvnitř listu, danou mimo jiné také tím, do jaké míry jsou otevřené průduchy a může být měřítkem účinnosti s jakou rostlina využívá vodu.

Isotopový signál $\delta^{18}\text{O}$

Už před 40 lety bylo známo, že geografické změny izotopových poměrů $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ nebo $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve vodě korelují s průměrnou roční teplotou vzduchu. Je to důsledkem dvou skutečností: a) při kondenzaci vodní páry se preferují těžší molekuly vody (obsahující ^2H a/nebo ^{18}O) a b) obsah nasycené vodní páry se zvyšuje úměrně s teplotou. Koncem 70 let se ukázalo, že izotopové složení celulosy buněčných stěn odráží izotopové složení podzemní vody a také koreluje s teplotou. Toho bylo využito např. při konstrukci „paleoteplooměru“ založeného na izotopové analýze celulosních zbytků rost-

lin. V posledním desetiletí se do studia frakcionace ^{18}O a deuteria v rostlinném těle vkládají naděje na detailnější poznání reakce rostlin na parametry vnějšího prostředí např. na vlhkost vzduchu ale např. i na odhalení „chybějícího konzumenta“ (*missing sink*) CO_2 v biosféře (např. Yakir 1992, Farquhar *et al.* 1993). Dnes je zřejmé, že např. isotopový signál $\delta^{18}\text{O}$ kyslíku uvolňovaného z vody v primárních fotosyntetických procesech do atmosféry je vyšší než ten, který má voda vstupující do rostliny. Víme, že voda v apoplastu listu a v chloroplastech je obohacena o ^{18}O proti vodě přijímané kořeny a známe asi hlavní mechanismy, které způsobují, že podobně bohatší na ^{18}O jsou i cukry a celuloza (Yakir 1992). Existují i první modely sumarizující představy o tom, jak $\delta^{18}\text{O}$ polysacharidů integruje hodnoty vlhkosti vzduchu při které rostlina roste.

Využití $\delta^{13}\text{C}$ při studiu interakcí rostlina – mikroorganismus

Stanovení $\delta^{13}\text{C}$ kořenových exsudátů (jako celku i jednotlivých organických látek) a rhizosféry mikroflóry může objasnit změny ve složení a využívání kořenových exsudátů během ontogenese rostlin. V předběžném pokusu jsme sledovali respiraci rhizosféry mikroflóry mladých rostlin banksie (*Banksia serrata* L.) pěstované v pískových kulturách. Současně jsme měřili $\delta^{13}\text{C}$ nadzemních částí, kořenů a vydýchaného CO_2 (Tab. 1). Zatímco $\delta^{13}\text{C}$ rostlinného materiálu se během ontogenese neměnilo, hodnota $\delta^{13}\text{C}$ - CO_2 reprezentující isotopové složení exsudátů využívaných rhizosféry mikroflórou, významně kolísala a rozdíl mezi ní a $\delta^{13}\text{C}$ rostlinného materiálu byl velký. Výsledky indikují, že složení využívaných kořenových exsudátů se významně mění během ontogenese a že měření $\delta^{13}\text{C}$ rostlinného materiálu není reprezentativní pro isotopové složení organických látek spotřebovávaných v rhizosféře rostliny.

Tab 1. $\delta^{13}\text{C}$ nadzemních částí a kořenů rostlin banksie (*Banksia serrata*, L.) pěstovaných v pískových kulturách po dobu 3 měsíců. Dále je uvedeno izotopové složení CO_2 uvolněného respirací rhizosféry mikroflóry (CO_2 , RH) a rychlost její respirace (respirace RH).

stáří rostliny (měsíce)	1	2	3
$\delta^{13}\text{C}$ nadzem. částí (‰)	-33,9	-34,5	-36,8
$\delta^{13}\text{C}$ kořenů (‰)	-33,9	-33,5	-36,4
$\delta^{13}\text{C}$ - CO_2 RH (‰)	-26,2	-30,1	-28,4
respirace RH ($\text{mg C g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	435	257	605

Rozdílnosti v isotopovém zastoupení uhlíku mezi C3 a C4 rostlinami a s tím související rozdíly v isotopovém složení půdní organické hmoty, která vznikla z C3 a C4 rostlin, lze využít při studiu tvorby kořenových exsudátů a jejich využití rhizosféry mikroflórou. Pokud se bude pěstovat C4 rostlina v půdě, kde vždy rostly C3 rostliny, isotopový signál zbytků kořenů a exsudátů bude významně odlišný od $\delta^{13}\text{C}$ půdní organické hmoty. Stanovením množství a isotopového signálu kořenů, mikrobiální biomasy, vydýchaného CO_2 a organických látek v rhizosféře je možno odhadnout, kolik uhlíku vstoupilo do půdy a jaká část nově vytvořené mikrobiální biomasy vznikla z rostlinného materiálu a jaká část z půdní organické hmoty. Tento přístup lze úspěšně použít i při studiu rozkladu jakýchkoli organických látek v půdě, pokud se liší svým isotopovým signálem (Šantrůčková *et al.* 2000b).

Využití $\delta^{13}\text{C}$ při studiu role půdních mikroorganismů v procesech přeměny C

Snad největší výhodou je, že metody stanovení stabilních izotopů umožňují studium neovlivněného půdního vzorku. Překážkou jejich většího rozšíření v půdně biologických studiích v současnosti jsou nedostatečné znalosti izotopové diskriminace na úrovni heterotrofního metabolismu. Izotopové složení půdní organické hmoty je obecně podobné izotopovému složení rostlinného pokryvu (Deines, 1980). Až do nedávné doby to bylo vysvětlováno tím, že izotopová diskriminace spojená s heterotrofním metabolismem půdních organismů je zanedbatelná. Ukazuje se ale, že diskriminace na úrovni mikrobiálního metabolismu může být v absolutních hodnotách srovnatelná s diskriminací v procesech fotosyntézy (Blair *et al.* 1985; Nakamura *et al.* 1990). Avšak vzhledem k velkému množství mikrobiálních pochodů, které v půdě probíhají, pravděpodobně dochází k vzájemnému vyrušení izotopového efektu jednotlivých metabolických pochodů. Dosavadní poznatky ukazují, že v aerobním heterotrofním metabolismu v ustálených podmínkách nedochází k významné diskriminaci, zatímco při změně podmínek prostředí nebo v anaerobních pochodech k diskriminaci dochází (Blair *et al.* 1985; Nakamura *et al.* 1990; Šantrůčková *et al.* 2000a). Při aerobní inkubaci půdy v konstantních podmínkách lze měření frakcionace izotopů využít k určení zdroje C pro půdní mikroorganismy. Jako příklad může sloužit testování pravdivosti hypotézy, že půdní mikroorganismy asimilují CO_2 . V pokusech jsme využili rozdílu v $\delta^{13}\text{C}$ v CO_2 , který byl uvolněn oxidací vápence ($+2,7\text{‰}$) a $\delta^{13}\text{C}$ v organické hmotě (-26‰). V půdě, kde byl v atmosféře přítomen oxid uhličitý z vápence (5 obj.%) byla hodnota $\delta^{13}\text{C}$ mikrobiální biomasy i vydýchaného CO_2 posunuta směrem k $\delta^{13}\text{C}$ vápence. V půdě inkubované v atmosféře bez CO_2 byla hodnota $\delta^{13}\text{C}$ mikrobiální biomasy a vydýchaného CO_2 shodná s $\delta^{13}\text{C}$ dostupné organické hmoty (tab. 2). Pokusy potvrdily schopnost půdních mikroorganismů asimilovat CO_2 v heterotrofním metabolismu.

Tab. 2. Změna izotopového signálu bakteriální biomasy a vydýchaného CO_2 v půdě inkubované v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 (5 obj.%).

$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	5 % CO_2	0 % CO_2
CO_2 v atmosféře	+2,7	-
organická hmota	-26,9	-26,9
bakteriální biomasa	-25,0	-27,0
vydýchaný CO_2	-17,1	-26,0

Po prohloubení základních znalostí o izotopové diskriminaci v mikrobiálním metabolismu umožní metody měření stabilních izotopů studium jednotlivých metabolických pochodů v podmínkách přirozeného prostředí. Jedním z příkladů je kvantifikace celkové tvorby extracelulárních metabolitů, jejichž měření je v současné době prakticky nemožné. Odhad izotopového složení a množství metabolitů je založen na tom, že $\delta^{13}\text{C}$ mikroorganismů je výsledkem bilance hmoty mezi vstupem - zdrojem C, a výstupy - CO_2 a extracelulárními metabolity.

Poděkování: Práce vznikla za částečné podpory grantů GA AV ČR (A6066901), MŠMT (123100004), GAČR (206/00/162) a Výkumného centra fotosyntézy (MŠMT).

Literatura

- Blair, N., Leu, A., Muñoz, E., Olsen, J., Kwong, E., des Marais, D. 1985. - *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 996-1001.
- Deines, P. 1980. - In: Fritz P., Fontes J.Ch. (eds.): *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, Vol. 1. Pp. 329-406. Elsevier, Amsterdam.
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T. 1989. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 503-537.
- Farquhar, G.D., Lloyd, J., Taylor, J.A., Flanagan, L.B., Syvertsen, J.P., Hubik, K.T., Wong, S.C., Ehleringer, J.R. 1993. - *Nature* **363**: 439-443.
- Nakamura, K., Takai, Y., Wada, E. 1990. - In: Durrance E.M., Galimov E.M., Hinkle M.E., Reimer G.M., Sugisaki R., Augustithis S.S. (eds.): *Geochemistry of Gaseous Elements and Compounds*. Pp. 455-484. Theoprastus Publications, Athens.
- Yakir, D. 1992. - *Plant Cell Environ.* **15**: 1005-1020.
- Šantrůčková, H., Bird, M. I., Lloyd, J. 2000a. - *Funct. Ecol.* **14** (v tisku).
- Šantrůčková, H., Bird, M.I., Frouz, J., Šustr, V., Tajovský, K. 2000b - *Soil Biol. Biochem.* (přijato do tisku).

Permeability of intact plant cuticles measured by chlorophyll fluorescence imaging

JIRÍ ŠANTRŮČEK^{*,†}, LUKAS SCHREIBER[&], EVA ŠIMÁŇOVÁ⁺ AND MARIE ŠIMKOVÁ^{*}

^{*}Institute of Plant Molecular Biology, AS CR, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic, tel.:038/777 55 27, email:jsan@umbr.cas.cz

[&]The University of Würzburg, Department of Botany II, Julius-von-Sachs-Platz 3, D-97082 Würzburg, Germany

[†]The University of South Bohemia, Faculty of Biology, CZ - 370 05, České Budějovice, Czech Republic

Introduction

The plant cuticle forms a transport limiting barrier on 95-99% of the leaf surface in all terrestrial plants. The leaf-atmosphere gas exchange is controlled predominantly by the cuticle when stomata are closed. The significance of this control is manifested by the adaptive variance of cuticular permeability for water. Water permeabilities of cuticles from plants native in humid climates are 2 orders of magnitude higher than that from plants in dry habitats. (Schreiber and Riederer 1996). The performance of plants in culture often depends on leaf application of pesticides, herbicides and fertilisers. The efficiency of such applications depends to a certain degree on cuticular permeability.

Methods of cuticle permeability measurement

The rise of the interest in plant cuticles led to development of several techniques measuring its permeability. It is convenient to work with isolated astomatous cuticle and most of the permeability investigations were done using isolated cuticular membranes. The cuticle is usually isolated by digesting the cell walls with cellulase and pectinase. Obtained cuticular membranes (CM) are washed, dried and mounted between donor and receiver compartments of transport chambers. Time kinetics of permeance of a radioactive labelled organic substance or tritiated water from the donor compartment across the CM to the receiver compartment is used

to calculate the permeability (e.g. Niederl *et al.* 1997). Spectrophotometrical determination of the substance allows to avoid radioactivity (Schreiber *et al.* 1995). It was shown that the permeability of the cuticular wax layer is decisive for CM permeability. Due to the self-organising ability of the wax it was possible to relate the permeability of CM to that of isolated and reconstituted cuticular wax (Schreiber and Riederer 1996). In these experiments, the reconstituted wax layer was loaded with a labeled substance and kinetics of desorption were used to estimate the transport properties of the wax. More elaborate ways of permeability measurement represent the measurement of penetration of labelled organic substances across the cuticle into the intact epidermis and leaf. This way allows also measuring cuticular permeability of stomatous leaf surfaces when a hydrophilic non-wettable donor solution is used. The permeability of intact astomatous cuticle for water vapour was also estimated using conventional gas exchange technique (e.g. Kerstiens 1995, Boyer *et al.* 1997). Many attempts were made to calculate the permeability of stomatous cuticles for water from transpiration rates of leaves with presumably closed or blocked stomata (e.g. Slavik 1958, Santrucek and Slavik 1990).

There are several reasons for development of alternative approaches measuring cuticular permeability. First, the application of radiolabelled substances requires an expensive equipment and a laboratory approved for relevant safety and precaution standards. Second, the permeability of CM was shown to be fairly heterogeneous even if the cuticle was isolated from apparently uniform leaves of one plant (Schreiber *et al.* 1995, Baur 1997). From this point, a technique with 2D resolution would be appreciated. Third, measurements on intact leaves and on both astomatous and stomatous leaf sides are desirable. Here, we present a technique allowing comparative study of cuticular permeability with a 2D resolution potential. The method is based on chlorophyll fluorescence imaging and requires a photosynthetically competent leaf. Pubescent and stomatous leaf surface can be investigated.

Basic features of the proposed method

Chlorophyll fluorescence of a leaf at room temperature is emitted almost entirely from PSII and, after a leaf irradiation, it is quenched from its initial peak value F_p at the onset of photochemical and other energy dissipation processes. After 3-5 minutes of irradiation, the fluorescence approaches a pseudo-steady-state F_t . The quenching depends on reoxidation of the primary stable acceptor of electrons in PSII, Q_A , by a secondary quinone Q_B . The Q_A - Q_B electron transfer can be blocked by atrazin or diuron (DCMU), substances used as photosynthetic herbicides. When DCMU binds to Q_B in PSII, fluorescence quenching of the PSII complex is largely suppressed. DCMU permeability of leaf cuticles is several orders of magnitude lower than permeabilities of the cytosol, the plasmalemma or the stroma. Further PSII can be seen as an ultimate scavenger for DCMU. Thus, the time course of Chl quenching, expressed as $(F_p - F_t)/F_t$, should be linear with the slope proportional to the cuticular permeability for DCMU. The fluorescence parameter $(F_p - F_t)/F_t$ is called F in following text.

We tested the linearity of the F drop with time on leaves of *Helianthus annuus* and *Vinca rosea* using the CCD fluorescence imaging camera FluorCam (PSI Ltd. Brno, Czech Republic). 60 mL droplets of DCMU (10^{-4} - 10^{-6} M solution) or distilled water (control) were applied on the surface of adaxial and abaxial sides of leaf discs placed on wet filter paper in a Petri dish. F was calculated from the kinetics of fluorescence (Kautsky curve) measu-

red repeatedly 4-6 times after 30-50 minutes of darkness. F_t was measured after 3 minutes of irradiance with actinic light $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Results

The time course of F was linear for DCMU treated plants (Fig. 1). The control discs showed that the photosynthetic capacity of the leaves was not impaired during 8 hours of the discs incubation under the CCD camera. Slopes of the F kinetics (dF/dt) were directly proportional to the DCMU concentration (Fig. 2). In both investigated plant species, the permeance of abaxial (lower leaf side) cuticle was higher than that of adaxial (upper) leaf side.

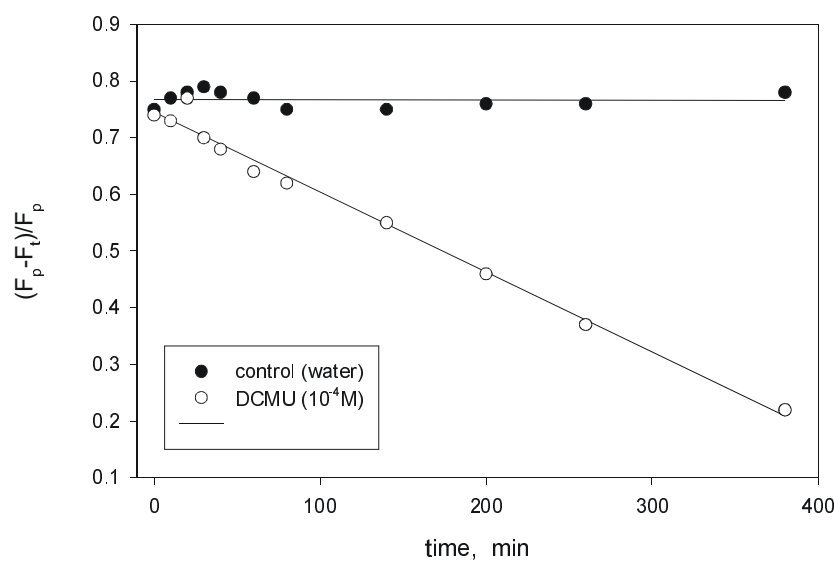


Fig. 1. Kinetics of fluorescence parameter F showing DCMU penetration through abaxial leaf surface of *Helianthus annuus* L.

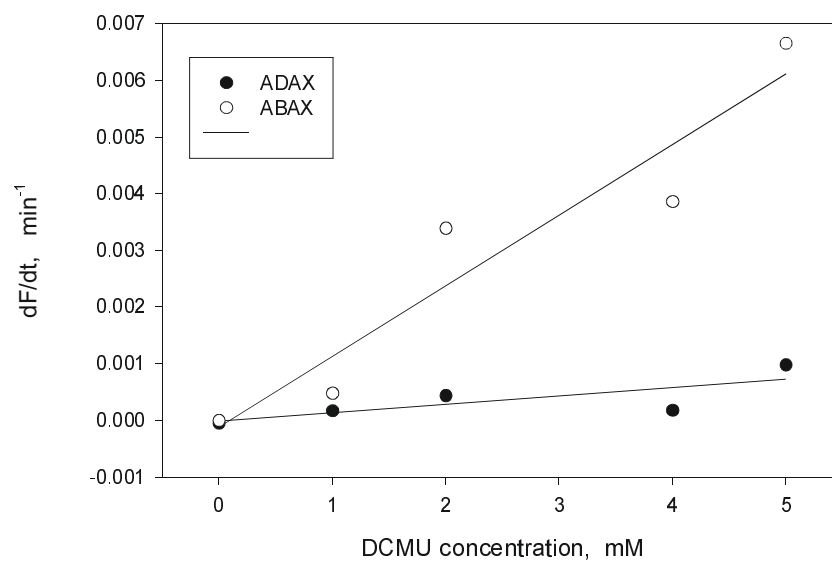


Fig. 2. Penetration rate of DCMU through abaxial (lower) and adaxial (upper) leaf surface of *Vinca rosea* expressed as absolute value of the slopes of fluorescence kinetics dF/dt and plotted versus DCMU concentration.

Conclusions

The described fluorescence imaging method can offer an alternative and promising tool for a comparative study of cuticular permeability of intact leaves. There was a tendency that permeabilities of abaxial (lower) leaf sides of sunflower and *Vinca rosea* were higher than permeabilities of adaxial (upper) leaf sides. Concomitant fluorescence and $^3\text{H}_2\text{O}$ measurements using intact leaves and isolated cuticles are needed in future to check the validity of the fluorescence imaging method.

Acknowledgement

The work was partially supported by the Czech-German bilateral grant (MSMT No. TSR-001-99), the MSMT grant No. 123100004 and by the grant of The Grant Agency of Academy of Sciences of The Czech Republic (grant No. A6051002).

References

- Baur P. 1997. *Plant, Cell and Environ.* **20**: 167-177.
Boyer J.S., Wong S.C. Farquhar G.D. 1997. *Plant Phys.* **114**: 185-191.
Kerstiens G., 1995. *New Phytol.* **129**: 495-503.
Niederl S., Kirsch T., Riederer M., Schreiber L. 1997. *Plant Phys.* **116**: 117-123.
Santrucek J., Slavik B. 1990. *J. Exp. Bot.* **41**: 795-802.
Schreiber L., Bach S., Kirsch T., Knoll D., Schalz K., Riederer M. 1995. *J. Exp. Bot.* **46**: 1915-1921.
Schreiber L., Riederer M. 1996. *Plant, Cell and Environ.* **19**: 1075-1082.
Slavik B. 1958. *Physiol. Plant.* **11**: 524-536.

Použití radioizotopů v biologickém výzkumu

RICHARD TYKVA

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR, 166 10 Praha 6

Ve vyžádaném přehledném příspěvku jsou shrnuta různá hlediska na použití látek značených radionuklidy ve stopovacích pracích s různými formami biologického materiálu, přednostně materiálu botanického a půdní mikroflory. Vzhledem k charakteru pořádaných metodických dnů a požadavku pořadatelů je výčet soustředěn především na laboratorní pokusy, jen okrajově na lyzimetry a polní pokusy nejsou zahrnuty vůbec. Rovněž není zahrnuto využití radionuklidy emitovaného ionizujícího záření z hlediska radiačních efektů, např. pro sterilaci.

Po analýze zásad pro práci s radioaktivními látkami jsou shrnuty přínosy radiostopovací metodiky pro zobrazování struktur a/nebo reakčních kinetik sledovaných látek. Pro ilustraci jsou uvedeny charakteristické příklady ze současného výzkumu. Stručně jsou popsána základní uspořádání pro měření aktivity radiostopovačů včetně odpovídajících příprav vzorků pro měření. Zahrnuty jsou také obecně používané postupy rozšířené o detekci radiostopovačů (např. radio HPLC). Pozornost je přitom věnována především radiostopovačům nejčastěji používaným v biologických pokusných systémech.

V závěrečné části jsou rozebrána úskalí radiostopovací metodiky a podány návody, jak jim čelit.

Dvourozměrná fluorescenční spektroskopie - netradiční metoda pro stanovení viability rostlinných buněk

RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹, GABRIELA KUNCOVÁ²

¹Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, tel.: 02/203 90 427, email: vankova@ueb.cas.cz;

²Ústav chemických procesů, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

Princip metody, popis spekter

Dvourozměrná fluorescenční spektroskopie (2D-FS) patří mezi fluorescenční metody, které využívají vlastnosti některých látek absorbovat zářivou energii o vhodné vlnové délce a při téměř okamžitém zářivém přechodu do základního stavu emitovat záření o vyšší vlnové délce. Obvyklé fluorescenční spektrofotometry pracují při jedné excitační vlnové délce, případně mohou být pomocí filtrů nastavitelné na několik vlnových délek. Podstata 2D-FS spočívá v měření intenzity fluorescence vyvolané excitačním zářením v oblasti 250 - 550 nm (pomocí monochromátoru, v nastavitelných skocích: 1 - 20 nm, maximální „scanovací“ rychlost 30 000 nm/min) v rozsahu emisních vlnových délek 260 - 600 nm. Během 1 minuty jsou získána trojrozměrná spektra o těchto parametrech: excitační vlnová délka, emisní vlnová délka, intenzita emise, tj. fluorescence. Typické 2D-FS spektrum je uvedeno na obr. 1. V levém horní rohu je oblast bez fluorescence. Podél diagonály je oblast rozptýleného světla, ve které se excitační vlnová délka rovná emisní. V pravé spodní oblasti lze detegovat fluorescenci látek, které můžeme identifikovat podle polohy maxima. Na obr. 1. je zachyceno 2D-FS spektrum buněk tabáku BY-2 inkubovaných v přítomnosti diacetátu fluoresceinu (FDA). V živých buňkách je díky vysoké esterasové aktivitě tento fluorogenní substrát štěpen na fluorescein, který velmi silně září (max. λ_{ex} 490 nm/ λ_{em} 510 nm).

Přednosti metody

Vzhledem k tomu, že při 2D-FS je snímána fluorescence v celé široké oblasti, lze analyzovat více fluorescenčních látek najednou. Tato metoda rovněž umožňuje detegovat potenciální překrývání jednotlivých fluorescenčních vrcholů, případně posuny maxim těchto vrcholů. K posunům může docházet jak při interakci s jinými fluorofory, tak při změně biologických nebo fyzikálních parametrů, např. pH (Marose et al. 1998).

Velkou výhodou této metody je možnost vytvářet diferenční spektra. Od spektra buněk inkubovaných s FDA může být odečteno spektrum buněk bez tohoto fluorogenního substrátu a tak eliminována vlastní fluorescence buněk. Případně lze od spektra buněk s FDA odečíst spektrum samotného substrátu a tím eliminovat pozadí způsobené samovolným rozložením FDA.

Možnosti experimentálního uspořádání

Při klasickém uspořádání je vzorek umístěn v křemenné kyvetě a k měření je použit horizontální paprsek. V případě rostlinných buněk ale v tomto uspořádání dochází ke

změnám fluorescence způsobeným jejich relativně rychlou sedimentací (1 - 2 min). Při pokusech zpomalit tuto sedimentaci (např. přidáním glycerolu), stabilizující prostředí značně interferovalo s měřenou fluorescencí. Proto byla fluorescence měřena za standardních podmínek (okamžitě po resuspendaci buněk), ovšem tato měření byla zatížena určitou experimentální chybou, protože nebylo možné zaručit ve všech vzorcích stejnou sedimentační rychlost. Negativní vliv sedimentace lze odstranit za použití světlovodných vláken (vnitřní průměr 3 mm, LUMATECH GmbH, Německo). Pomocí těchto vláken lze vertikálně snímat fluorescenci světlotěsně uzavřeného vzorku. V tomto případě je vliv sedimentace buněk zanedbatelný (Vaňková et al. 2000). Světlovodná vlákna mohou být využita i pro napojení spektrofotometru na bioreaktor. Velkou výhodou této metody je, že se jedná o neinvazivní metodu, která umožňuje opakovaná („on-line“) měření žádaných parametrů *in situ* (např. fluorescenci NAD(P)H) během kultivačního procesu. Není třeba odebírat vzorky, což může působit jak nežádoucí snížování biomasy, tak zvýšené riziko kontaminace (Marose et al. 1998).

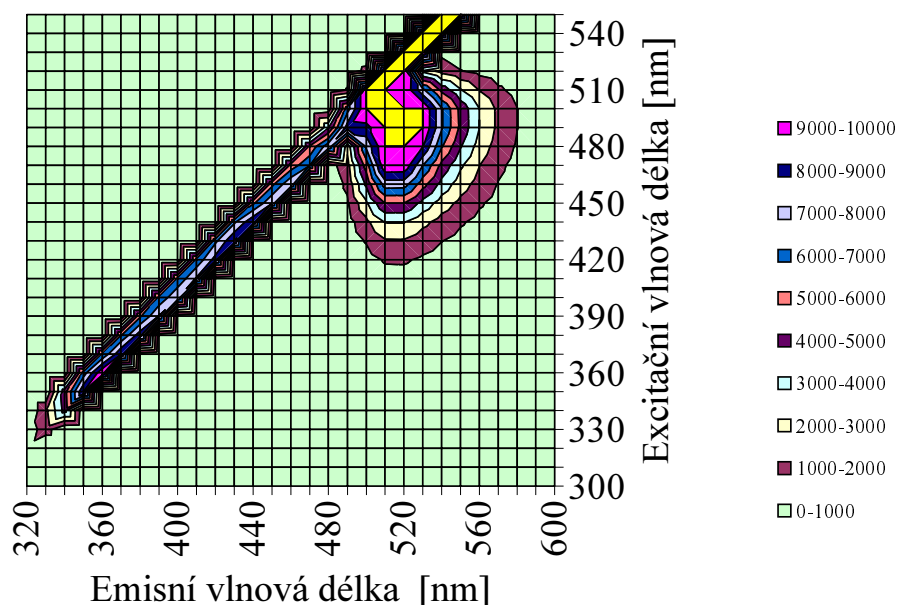
Nezbytné předpoklady

Použitelnost této metody je omezena na studium látek, které vykazují fluorescenci, nebo na stanovení enzymových aktivit, pokud je k dispozici vhodný fluorogenní substrát. Další nezbytnou podmínkou je zařízení: dvoudimenzionální spektrofluorometr. Běžně používaný přístroj Hitachi F 4500 stojí asi 1 milion Kč. Při použití vertikálního uspořádání je zapotřebí ještě světlovodných vláken (jejich cena činí asi 20 000 Kč).

Příklady aplikace

2D-FS je využívána především v mikrobiologii. Byla použita pro sledování růstu biomasy *Saccharomyces cerevisiae*, a to jak prostřednictvím měření fluorescence NAD(P)H, tak proteinů. Dále byla využita pro sledování vlivu dinitrofenolu na rozpojení elektronového transportu a fosforylace během respirace u *Escherichia coli*. U *Claviceps purpurea* 2D-FS umožnila kvantitativně stanovit produkci ergotových alkaloidů a u *Sphingomonas yanoikuyae* rychlost degradace fenantrenu (Marose et al. 1998).

U rostlinných buněk byla 2D-FS použita pro vyhodnocení vlivu různých způsobů imobilizace na buňky tabáku uvnitř gelových částic (Vaňková a Kuncová 1999). 2D-FS byla použita rovněž pro stanovení viability tabákové suspence BY-2 (Vaňková et al. 2000). Buňky lišící se svojí viabilitou od zcela živých až po naprosto neživé byly získány inkubací v dimethylsulfoxidu (0 - 10 %, v/v). Jejich viabilita byla stanovena prostřednictvím jejich esterasové aktivity. Tato metoda je velmi rychlá. Po pětiminutové inkubaci buněk s FDA bylo 2D-FS spektrum změřeno během jedné minuty. Množství uvolněného fluoresceinu bylo vyjadřováno v procentech kontroly. Jediné, čemu bylo třeba věnovat pozornost, byl roztok substrátu. Koncentrovaný zásobní roztok v acetonu byl uchováván zamražený po malých dávkách. Bezprostředně před měřením byl zředěn příslušným objemem vody. Při vyšších laboratorních teplotách ho bylo nezbytné během měření uchovávat v ledu.



Obr. 1. Dvoudimenzionální fluorescenční diferenční spektrum buněk tabáku BY-2 inkubovaných s diacetátem fluoresceinu.

Porovnání s jinými metodami

Vhodnost 2D-FS jakožto metody pro stanovení viability rostlinných buněk byla ověřena jejím porovnáním s běžně používanými mikroskopickými metodami. Buňky inkubované s FDA byly vyhodnoceny jak 2D-FS, tak pozorováním fluoromikroskopem. Počet živých a mrtvých buněk byl stanoven rovněž jejich počítáním po obarvení mrtvých buněk trypanovou modří (TB). Výsledky získané pomocí TB a 2D-FS spolu velmi dobře korelovaly. Porovnání 2D-FS a fluoromikroskopie ukázalo, že vzhledem k tomu, že výrazné procento buněk vykazovalo sníženou hladinu esterasové aktivity, její kvantifikace pomocí 2D-FS byla přesnější než počítání buněk na základě kritéria „ano/ne“.

Zhodnocení metody

2D-FS je rychlá a spolehlivá metoda, s velkým potenciálním využitím, které je ovšem, jako u všech fluorescenčních metod, omezeno na stanovení látek vykazujících fluorescenci a při přímém sledování v bioreaktoru nutností zvláštní kalibrace pro každý sledovaný proces. Její větší rozšíření je omezeno poměrně značnou finanční náročností na technické vybavení.

Literatura

- Marose S, Lindemann C, Scheper T (1998) Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnol Prog* 14: 63-74.
- Vaňková, R, Kuncová, G (1999) Two-dimensional fluorescence spectroscopy as a tool for estimation of growth and viability of immobilized plant cells. *Extended Abstracts of VIII. Int. Workshop on Bioencapsulation*, 13. - 15. 9. 1999, Trondheim, Norsko. P10
- Vaňková, R, Kuncová, G, Opatrná, J, Süßenbeková, H, Gaudinová, A, Vaněk, T (2000) Two-dimensional fluorescence spectroscopy – A new tool for determination of plant cell viability. zasláno do tisku

Poděkování: tento projekt vznikl za podpory grantů COST OC 840.20 a 840.10 a GA ČR č.:522/99/1024.

Stanovení mitotického indexu s ohledem na vliv měsíce

HELENA VLAŠÍNOVÁ, LADISLAV HAVEL

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno, tel.: 05/451 33 024, email: vlas@mendelu.cz

Tento příspěvek trochu vybočuje z linie nových metodických přístupů. Stanovení mitotického indexu (MI) není žádnou novinkou a je jen jednoduchým kritériem stavu dlouhodobě udržovaných kultur, jedním z markerů reakce na stres, změnu kultivačních podmínek apod. Podstatou je stanovení poměru dělicích se buněk k celkovému počtu všech sledovaných buněk. Potřebujeme jen světelný mikroskop s dostatečným zvětšením (okulár 10x, objektiv 20-40x). K pozorování stačí rychlé barvení acetokarminem (Němec 1962).

Celý postup není časově náročný, nejvíce času zabere vlastní počítání buněk. I to je možno značně urychlit pomocí některého z programů analýzy obrazu, např. Lucia (Opatrná 1997), Image Pro (Vlašínová a kol. 1998) nebo VISOR (Sunblad a kol. 1998). Metoda se zdá být jen rutinní záležitostí, přece jen má ale svá úskalí:

1/ denní periodičita

2/ průběh MI během **kultivačního intervalu** (odlišnosti u kultur s různou rychlostí růstu).

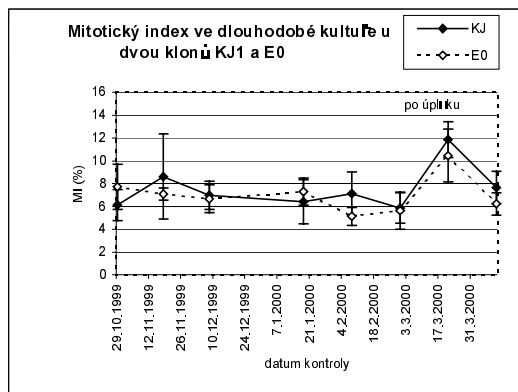
3/ **sezonní průběh, závislost na ontogenetickém stadiu** (faktory obecně známé).

4/ poslední úskalí, které mne přimělo k sepsání tohoto drobného příspěvku, je **periodičita měsíční**, respektive vliv fáze měsíce na frekvenci buněčného dělení. Na obr.1 můžete porovnat výsek z dlouhodobého sledování MI u modelových kultur. Jeho cílem bylo kromě průběžné kontroly stavu kultur v dlouhém časovém horizontu i posouzení závislosti na ročním období. Kultury byly hodnoceny vždy pátý den po pasáži ve stejnou hodinu každou druhou pasáž. Z grafu je patrné, že obě kultury dosáhly současně maxima, které vybočuje z průměrných hodnot. Zvažte sami, zda to může být zákonitostí a nebo jen zvláštní náhodou, že toto měření vyšlo právě na ráno po úplňku.

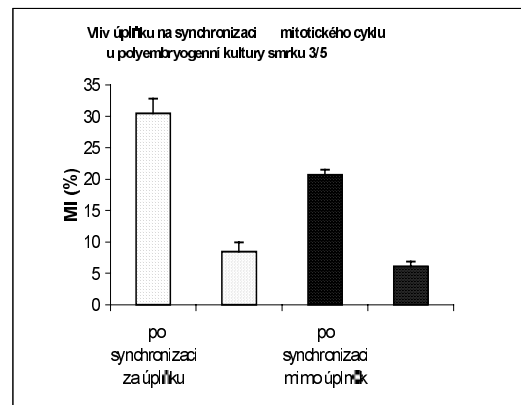
Protože se na našem pracovišti kromě sledování MI zabýváme i synchronizací mitotického cyklu u polyembryogenních kultur smrku, bylo předcházející pozorování zohledněno i v těchto pokusech. Na obr.2. je možno srovnat MI po synchronizační proceduře (Nkongolo, Klimaszevska 1994) za úplňku a mimo úplněk.

Existuje mnoho populárně naučné literatury, zabývající se problematikou vlivu měsíce na živé organismy včetně člověka. Bývají většinou označovány za "pavědecké". Vědecké práce z této oblasti jsou spíše vzácností. Efekt fází měsíce na klíčení semen řepy prokázali např. Sigmond a Sigmond (1996), kteří ve dvouletých pokusech zjistili o 10% lepší klíčivost při úplňku jak v laboratoři, tak v polních podmínkách.

Na závěr pár doporučení: v pokusech zaměřených na studium mitotického cyklu je třeba materiál k hodnocení odebírat ve stejnou denní dobu (u *in vitro* kultur i s ohledem na kultivační periodu). Vliv měsíční fáze je vhodné zohlednit při opakování pokusu, zejména pokud není možno provádět všechny varianty souběžně, případně ho využít při optimalizaci metodiky.



Obr.1. Porovnání výseku z dlouhodobého sledování MI u modelových kultur.



Obr.2. Srovnání MI po synchronizační proceduře (Nkongolo, Klimaszevska 1994) za úplňku a mimo úplněk.

Poděkování: Práce vznikla při řešení projektu 522/96/117 podporovaného GAČR

Literatura

- Němec B a kol.: Botanická mikrotechnika. Praha, 1962.
 Nkongolo K.K., Klimaszevska K. 1994. - Hereditas 73: 11-17.
 Opatrná J. 1997. - In Methods in Plant Sci., SEBR, Vranovská Ves u Znojma: 129-131.
 Sigmond S. a Sigmond E. 1996 – In ESNA (European society for new methods in agricultural research) XXVIth annual meeting, Buzeni: 168.
 Sunblad L.-G., Geladi P., Dunberg A., Sundberg B. 1998 – J. of Exp. Botany, 49: 1749-1756.
 Vlašínová H., Truksa M., Havel, L. 1998 - In ESNA XXVIIIth annual meeting, Brno: 162.

Izolace jader z buněk tabákových linií pro účely detekce jaderně specifických bílkovin

SYLVA ZELENKOVÁ, KATEŘINA SCHWARZEROVÁ, JAN PETRÁŠEK, ZDENĚK OPATRNÝ
 Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 00 Praha 2,
 tel.: 02/219 53 181, email: zelen@natur.cuni.cz

Úvod

Mikrotubulární cytoskelet reaguje na nízké teploty rozpadem na monomery. Mikrotubuly tabákových buněk BY-2 se zcela rozpadly již po 5 minutách inkubace v 0°C. Po přenesení do 25°C došlo k velmi rychlému obnovení intaktní sítě. Tuto schopnost buňky neztratily ani po 12 hod kultivace při 0°C. Imunofluorescenčně značené buňky byly studovány pomocí klasické fluorescenční i konfokální mikroskopie. Bylo prokázáno, že v interfázních jádrech chladem ovlivněných buněk se vyskytoval tubulin ve formě diskretních bodů, zatímco v kontrolních jádrech nebyl tubulin pozorován. Pro potvrzení výskytu tubulinu v jádře se ukázala jako nutná izolace intaktních jader spojená s biochemickou analýzou.

Vhodně zvolené metodiky izolace jader jsou pro biochemickou analýzu jaderných proteinů klíčové. Interfázové jádro není v buňce izolovanou organelou, ale je propojeno membránovými strukturami s cytolem a dalšími organelami. Proto je izolace in-

taktních jader bez kontaminace okolní cytoplasmou velkým problémem (Rando *et al.* 2000). Vysoké koncentrace cytoskeletálních proteinů tubulinu a aktinu v cytoplasmě tedy představují významný faktor, který je třeba vzít v úvahu.

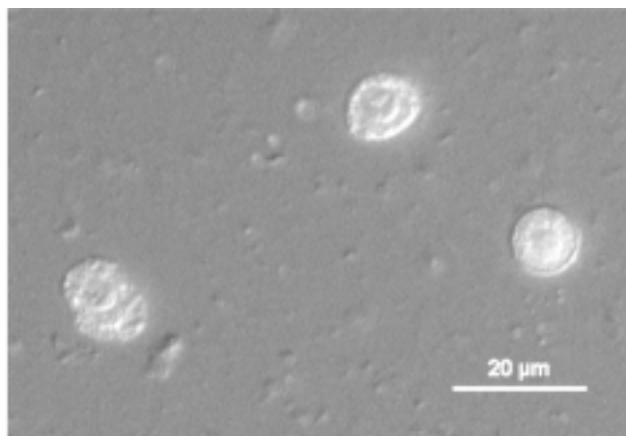
Metoda izolace jader

Izolace protoplastů

Buněčná kultura BY-2 (*Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2) byla kultivována podle Nagata *et al.* (1992). Exponenciální (3-denní) kultura byla zfiltrována přes nylonové síto (100 μm). 1g buněk byl okamžitě přenesen do 50 ml zkumavek (Falcon) s 25 ml enzymatické směsi (1% celulasa Onozuka R10 [Serva], 0,1% pektolyasa [Sigma] v 0,45 M manitolu, pH 5,5) (Mizuno 1992). Po uvolnění protoplastů (2,5-3 hod, 30°C, třepání 70 rpm) byla enzymatická směs odstraněna centrifugací (12 min, 70g). Protoplasty byly 2x promyty ve W5 médiu (NaCl 9 g/l, CaCl₂·2H₂O 18,37 g/l, KCl 0,37 g/l, glukóza 0,9 g/l, pH 5,8) při 50g po dobu 6 min. Protoplasty byly rozděleny na dvě části. Jedna polovina byla ihned dále zpracována, druhá byla resuspendována ve W5 mediu a umístěna do ledové lázně na dobu 12 hod (třepání 70 rpm). Po této inkubaci byla jádra izolována stejně jako u kontrolní varianty.

Izolace jader

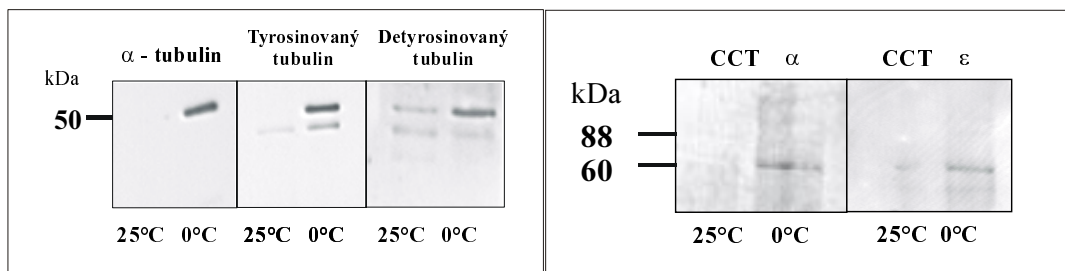
K protoplastům bylo přidáno 8 ml předchlazeného lyzačního pufru (15mM Tris, 2mM Na₂EDTA, 0,5mM spermin, 80mM KCl, 20mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 15mM merkaptotanol, pH 7,5) (Doležel *et al.* 1989) a směs okamžitě 5x prostríknuta injekční jehlou (Stoppin *et al.* 1994). Jádra se uvolnila ihned. Po sedimentaci (120g, 6 min, 4°C) byla jádra 2x promyta v pufru stabilizujícím mikrotubuly (25mM MES, 5mM MgCl₂, 1M glycerol, 1mM GTP, 1mM DTT, 1mM PMSE, 1mM aprotinin, 1mM leupeptin, 1mM pepstatin) (Nick *et al.* 2000). Čistota jader byla ověřena obarvením pomocí Hoechst 33258 a pozorováním pod mikroskopem (obr. 1). Jádra byla smíchána v poměru 1:1 se vzorkovým pufrům (450mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 8M močovina, 30% glycerol, 5% merkaptotanol, 0,5% bromfenolová modř) (Nick *et al.* 2000) a zamražena v -20°C.



Obr.1. Jádra izolovaná z buněčné linie BY-2

Imunodetekce jaderně specifických bílkovin

V jádrech izolovaných z protoplastů kultivovaných 12 hod při 0°C byl prokázán imunodetekcí (ECL detekční systém, Amersham) výrazně zvýšený obsah alfa tubulinu. Současně se ve zvýšené míře vyskytoval tubulin tyrosinovaný a detyrosinovaný. Přítomny byly také CCT α a CCT ϵ , podjednotky TCP-1 komplexu, který napomáhá utváření terciární struktury tubulinu a pravděpodobně se podílí na polymeraci tubulinu (Nick *et al.* 2000) (Obr.2).



Obr.2. Imunodetekce cytoskeletálních proteinů v izolovaných jádrech BY-2.

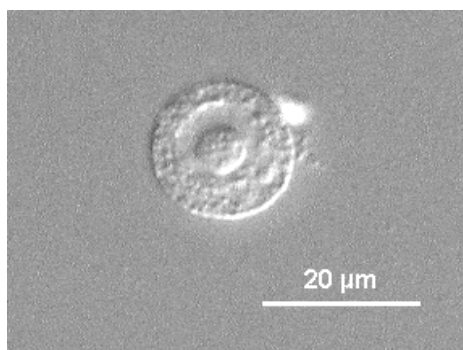
Výhody a úskalí metody

Úskalím všech metod izolace rostlinných jader je navrzení dostatečně šetrného postupu, který mechanicky ani chemicky nepoškozuje jádra. Rovněž použití detergentů a gradientu Percollu může značně změnit jadernou membránu a její integritu. Navíc bývají izoláty jader často znečištěny škrobovými zrny, kousky membrán a zbytky cytosolu.

Postupy izolace jader podle Stoppinové *et al.* (1994) a Mizuna (1993) byly vyvinuty pro testování schopnosti povrchu rostlinného jádra fungovat jako nukleační centra mikrotubulů - MTOC (Vaughn a Harper 1998). Naší snahou bylo využít jejich poznatky a přitom se pokusit navrhnout co nejjednodušší a nejkratší metodu izolace jader pro studium dynamiky tubulinu za chladových podmínek. Velmi se osvědčil roztok, který používal Doležel *et al.* (1989) pro přípravu jader pro průtokovou cytometrii. Jádra se totiž uvolnila okamžitě a prostříknutí roztoku jehlou odpovídající velikosti jader podle Stoppinové *et al.* (1994) umožnilo zároveň i jejich očištění.

I když byla čistota našich izolátů jader poměrně vysoká, bylo by možné ještě její vylepšení zařazením filtrace přes hustý filtr, případně další pročištění pomocí sacharosového gradientu. Metodu jsme úspěšně vyzkoušeli i pro izolaci jader z tabákové linie VBI-0, která se odlišuje od linie BY-2 velikostí buněk a růstovými parametry (Obr.3).

Experimentální výsledky potvrdily překvapivý cytologický nález tubulinu v chladově ovlivněných jádrech. Přispívají tak k výzkumu dynamiky cytoskeletu za stresových podmínek a spolu s pracemi Mizuta *et al.* (1995) a Wallinové a Strombergové (1995) ukazují na možnost polymerace specifických tubulinů za teplot těsně nad bodem mrazu.



Obr.3. Jádro izolované z tabákové linie VBI-0

Literatura

- Doležel, J.; Binarova, P.; Lucretti, S. 1989. - *Biol. Plant.* **31**: 113.
Mizuno, K. 1992. - *Plant Physiol.* **100**: 740.
Mizuno, K. 1993. - *Protoplasma* **173**: 77.
Mizuta, S.; Kaneko, M., Tsurumi, S. 1995. - *Planta* **196**: 190.
Nagata, T.; Nemoto, Y., Hasezawa, S. 1992. - *Int. Rev. Cytol.* **132**: 1.
Nick, P.; Heuing, A., Ehmann, B. 2000. - *Protoplasma* **211**: 234.
Rando, O.J.; Zhao, K.J., Crabtree, G.R. 2000. - *Trends Cell Biol.* **10**: 92.
Stoppin, V.; Vantard, M.; Schmit, A.C., Lambert, A.M. 1994. - *Plant Cell* **6**: 1099.
Vaughn, K.C. a Harper, J.I. 1998. - *Int. Rev. Cytol.* **181**: 75.
Wallin, M. a Stromberg, E. 1995. - *Int. Rev. Cytol.* **157**: 1.