

Růst a vývoj rostlin - praktikum

MB130C78

Blok 3

Embryogeneze, dědičnost znaků

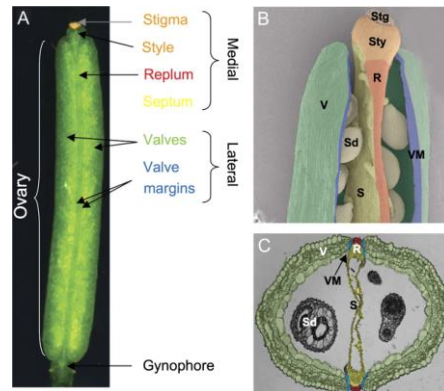
Úlohy:

1. Embryogeneze - určení vývojových fází embrya *Arabidopsis thaliana*
2. Embryonální mutace - nalezení embryí nesoucích mutaci v genech postihujících jejich správný vývoj u *Arabidopsis thaliana*
3. Markery embryonálního vývoje u *Arabidopsis thaliana* - fluorescenční lokalizace markerových proteinů *in vivo*, křížení markerových linií

Teoretický úvod

Embryonální vývoj

Plodem řady brukvovitých včetně huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) je šešule. Otevřením jejích chlopní se odhalí semena nesoucí uvnitř zárodek nové rostliny (**Obr. 1**). Právě tyto zárodky (embrya) budou hlavním tématem dnešních úloh praktika.

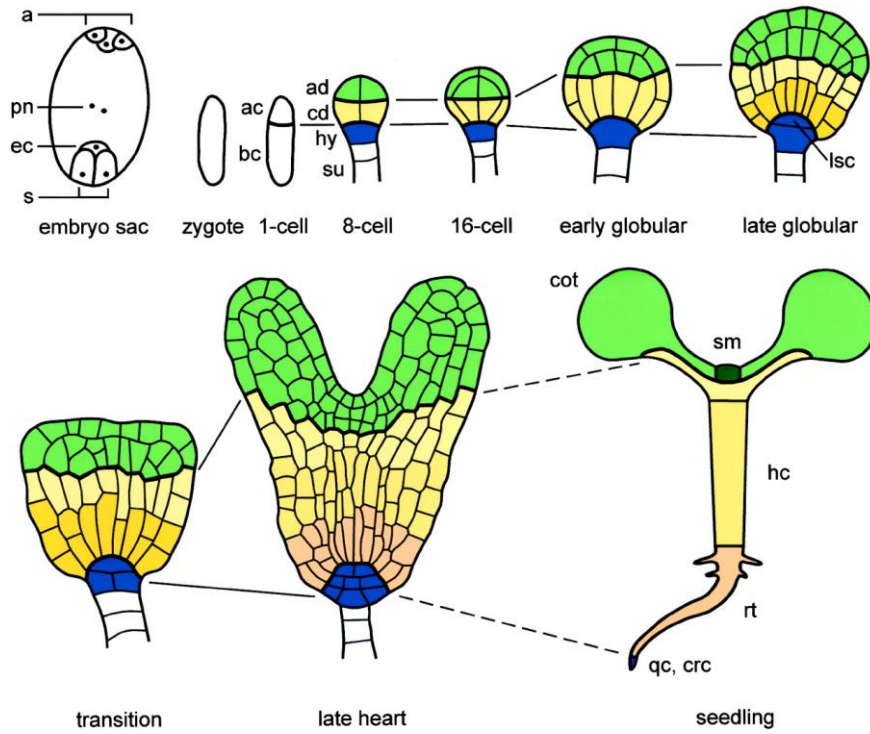


Obr. 1: Struktura plodu *Arabidopsis thaliana*. Nezralý plod před otevřením (**A**), zralý plod během otvírání zobrazený skanovací elektronovou mikroskopií (**B**) a příčný řez plodem (**C**). Převzato z Girin et al. (2009).

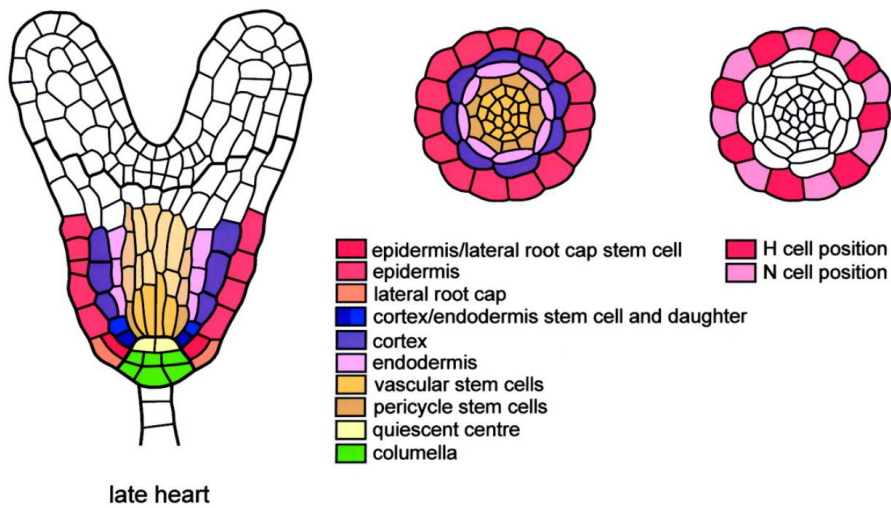
Embryonální vývoj (**Obr. 2**) začíná oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou a následným vznikem zygoty. Tato protáhlá buňka se nesouměrně dělí. Toto stádium se nazývá jednobuněčné embryo, protože menší apikální buňka dává vzniknout většině zárodku a tedy posléze celé rostlině kromě klidového centra kořene a kořenové čepičky. Větší bazální buňka vytvoří pouze hypofýzu (z níž vzniknou jmenované části kořenové špičky) a suspensor. Dělením buněk zárodku postupně dojde k vytvoření kulovitého (*globular*) embrya. V této fázi se z hypofýzy oddělí čočkovitá buňka (*lens shaped cell*), budoucí klidové centrum. V přechodném (*transition*) stádiu se začnou prodlužovat 2 protilehlé okraje horní části zárodku, trend, který pokračuje dále v srdcovitém a torpédovitém embryu a vede ke vzniku děloh. Mezi dělohami se zakládá meristem vrcholy prýtu. Souběžně se diferencují další pletiva (**Obr. 2**).

Právě popsané procesy jsou závislé na síti transkripčních regulátorů, ale i na funkci dalších faktorů. Nezastupitelnou úlohu hrají i fytohormony. Asi nejlépe prozkoumaná je funkce auxinu v embryonálním vývoji. Bílkovinné přenašeče se starají v různých částech zárodku o rozdílné koncentrace auxinu (**Obr. 3**), na které reagují transkripční faktory z rodin ARF (auxin response factor), WOX (Wuschel-like homeobox) a další. Buňky v místech nejsilnějšího toku auxinu se mění na vodivá pletiva.

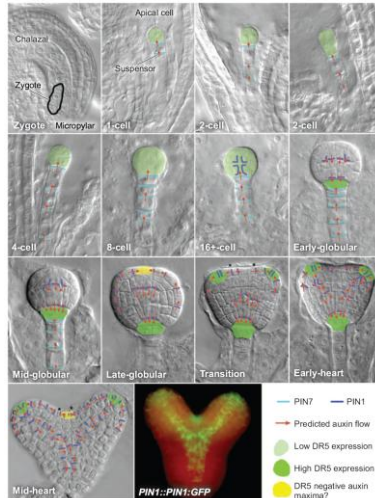
A



B

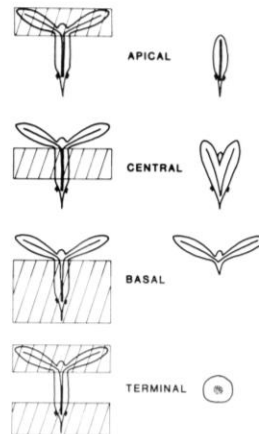


Obr. 2: Schematické zobrazení embryogeneze *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Přehled stádií embryonálního vývoje. **(B)** Označení embryonálních pletiv. Upraveno z Laux et al. (2004).



Obr. 3: Embryogeneze *Arabidopsis thaliana* s vyznačením gradientů auxinu a lokalizací jeho přenašečů PIN1 a PIN7. Převzato z Bowman nad Floyd (2008).

Poškození některých genů je pro vývoj rostliny natolik vážnou překážkou, že nedojde ani k vytvoření životaschopného embrya. Mayer et al. (1991) rozdělili závažné efekty vývojových mutací podle domény zárodka, kterou postihnou na apikální (vrchol; např. cup-shaped cotyledons), centrální (fackel), bazální (kořenový pól; monopteros) a terminální postihující jak apikální tak bazální (gnom) (**Obr. 4**). Tyto mutanty patřili mezi vůbec první, které byly u rostlin podrobně charakterizovány včetně identifikace příslušných genů.



Obr. 4: Mutace postihující vývoj embrya. Převzato z Mayer et al. (1991).

Dědičná informace

Pro kombinování dědičných znaků různých linií se používá křížení. Huseníček je samosprašný, je třeba používat pouze květy s nedospělými tyčinkami. Ostrou pinzetou se odstraní všechny části květu kromě pestíku. Blizna takto připraveného květu se následně opylí tyčinkou ze druhého rodiče. Je vhodné zkontrolovat pod stereomikroskopem, že se na blizně opravdu zachytila pylová zrna.

Úlohy

1. Embryogeneze – vývojové fáze zárodku *Arabidopsis thaliana*

Cíl úlohy:

Určit vývojové stadium embryí izolovaných z různě starých šešulí *Arabidopsis thaliana*.

Princip úlohy:

V úloze jde o **mikroskopické sledování embryí izolovaných z šešulí různých stáří**. Jednotlivá embrya se izolují z vyvíjejících se semen uložených v šešulích. Jejich tvar je pro dané stádium typický (Obr. 2).

Zadání:

Pomocí mikroskopického pozorování přiřadte izolovaná embrya k vývojovým fázím dle předloženého schématu (Obr. 2).

Materiál a postup:

Rostlinný materiál, chemikálie a potřebné vybavení:

- 1) Kvetoucí a plodící rostlina *Arabidopsis thaliana* pěstované při 20°C, 16h světlo/8h tma.
- 2) Jemná biologická pinzeta s tenkými hroty, nůžky, injekční jehly, oboustranná lepicí páska, plastová petriho miska.
- 3) Voda.
- 4) Mikroskopická skla podložní a krycí, plastová kapátka, parafilm, fixy, binokulární preparační stereomikroskop, mikroskop se záznamovým zařízením.

Postup:

- 1) Naleznete na rostlině huseníčku šešuli číslo 10. Počítejte od nejmladší ke starším (tedy shora dolů), plod č. 1 je nejmladší takový, který přerostl délku koruny květu.
- 2) Ostrou pinzetou (popř. nůžkami) oddělte vybraný plod od lodyhy tak, abyste způsobili minimální poranění stonku.
- 3) Šešuli umístěte na lepicí pásku přilepenou na Petriho misce „švem“ vzhůru.
- 4) Ostrou injekční jehlou nařízněte oplodí z obou stran podél „švu“, uvolněné chlopně přitiskněte na lepicí pásku.
- 5) Pokuste se pinzetou uchopit placentu nesoucí vajíčka a přeneste do kapky vody na podložním sklíčku. Jednotlivá vajíčka nanoste tamtéž.

- 6)** Pod stereomikroskopem otevřete vajíčka (dvěma jehlami nebo jehlou a pinzetou) a osvobodte embrya. Vaším cílem je získat aspoň 3 nepoškozené exempláře.
- 7)** Pozorujte pod stereomikroskopem, popř. i pod mikroskopem, 1 typické embryo zakreslete do protokolu.
- 8)** Pokuste se pojmenovat stádium, ve kterém se typické embryo nachází.
- 9)** Postup opakujte s šesťlí číslo 8 a 5.

2. Mutace postihující vývoj embrya u *Arabidopsis thaliana*

Cíl úlohy:

Zjistit, které z předložených rostlin nesou mutovanou alelu.

Princip úlohy:

V úloze jde o nalezení embryí abnormálního fenotypu, čímž se odhalí přítomnost mutantní alely genu důležitého pro embryonální vývoj. Tvar mutovaného embrya je typický pro danou mutaci. Jednotlivá embrya se izolují ze semen uložených v šešulích pomocí jehly a ostré pinzety. Stanovením frekvence výskytu embryí nesoucích mutaci lze určit štěpný poměr.

Zadání:

Pomocí mikroskopického pozorování určete, které z předložených rostlin nese mutaci. Popište a dokumentujte fenotyp mutovaných embryí. Odhadněte frekvenci výskytu homozygotních mutantů.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál, chemikálie a potřebné vybavení:

- 1) Kvetoucí a plodící rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované při 20°C, 16h světlo/8 h tma. Jedná se o potomstvo rostliny heterozygotní v genu *gnom*, *fackel*, *monopteros* či *cuc1cuc2* (Obr. 4).
- 3) Jemná biologická pinzeta s tenkými hroty, injekční jehly, oboustranná lepicí páska, plastová petriho miska.
- 4) Voda.
- 5) Mikroskopická skla podložní a krycí, plastová kapátka, parafilm, fixy, binokulární preparační stereomikroskop, mikroskop se záznamovým zařízením.

Postup:

1) Z každé rostliny oddělte šešuli, která by podle vašich zkušeností z úlohy 1 měla obsahovat embrya minimálně ve stádiu pozdním srdcovitém (nebo vezměte 8. plod). Pracujte vždy jen s jedním plodem, aby ostatní mezitím neschly.

2) Vypreparujte aspoň 10 zárodků z každé šešule.

3) Pozorujte pod stereomikroskopem a hledejte abnormality ve vývoji.

4) Pomocí světelného mikroskopu či binokulárního stereomikroskopu se záznamovým zařízením nasnímejte embryo postižené mutací a normální embryo. Uložte si obrázky pro účely protokolu. **Do protokolu запиšte, kolik mutovaných embryí jste zaznamenali pro kterou rostlinu, pokuste se odhadnout štěpný poměr.**

3. Markery embryonálního vývoje u *Arabidopsis thaliana* - lokalizace fluorescenčních proteinů v zárodku; křížení markerových linií

Cíl úlohy:

Lokalizovat distribuci markerových proteinů v embryích izolovaných ze šešulí *Arabidopsis thaliana*. Zkřížit dvě rostliny nesoucí dva různé markery s cílem získat rostlinu nesoucí oba dva markery.

Princip úlohy:

V úloze jde o **mikroskopické pozorování distribuce fluorescenčních proteinů**. Jednotlivá embrya se izolují ze semen uložených v šešulích pomocí jehly a ostré pinzety.

Zadání:

Pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorujte embrya z rostlin nesoucích fluorescenční markery. Určete jaký marker nesou dvě předložené rostliny. Zhotovte obrazový záznam. Popište, ve kterých pletivech/buňkách embrya je daný marker aktivní. Předložené rostliny zkřížte s cílem získat rostlinu nesoucí oba markery.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál, chemikálie a potřebné vybavení:

- 1) 2 kvetoucí a plodící rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované při 20°C, 16h světlo/8h tma nesoucí každá jeden z fluorescenčních markerů.
- 3) Jemná biologická pinzeta s tenkými hroty, injekční jehly, oboustranná lepicí páska, plastová petriho miska.
- 4) Voda.
- 5) Mikroskopická skla podložní a krycí, plastová kapátka, parafilm, fixy, binokulární preparační mikroskop, fluorescenční mikroskop se záznamovým zařízením.

Postup:

- 1) Z každé rostliny oddělte šešuli, která by podle vašich zkušeností z úlohy 1 měla obsahovat embrya minimálně ve stádiu pozdním srdcovitém (nebo vezměte 8. plod). Pracujte vždy jen s jedním plodem, aby ostatní mezitím neschly.
- 2) Vypreparujte aspoň 4 nepoškozené zárodky.
- 3) Pozorujte pod fluorescenčním mikroskopem a pořídte obrazový záznam.
- 4) Na záznamu se pokuste popsat, ve kterých pletivech-buňkách je fluorescenční protein přítomen.

- 5) Na jedné z rostlin připravte aspoň 5 květů na křížení. Vyberte poupata, u kterých začíná prosvítat bílá koruna nebo ještě uzavřená poupata, ale co největší.
- 6) Pinzetou odstraňte všechny květní části kromě pestíku.
- 7) Mladší poupata a starší květy a šešule na téže větvi odstraňte.
- 8) Na větev nalepte kousek lepicí pásky s popisem křížení.
- 9) Pinzetou oddělte tyčinku z plně otevřeného květu druhé rostliny.
- 10) Tyčinkou opylte připravené pestíky.
- 11) Pod stereomikroskopem zkontrolujte přítomnost pylu na blizně. Opylování můžete opakovat s dalšími tyčinkami.

Citovaná literatura:

- Bowman, J.L., and Floyd, S.K.** (2008). Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 67-88.
- Girin, T., Sorefan, K., and Ostergaard, L.** (2009). Meristematic sculpting in fruit development. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1493-1502.
- Laux, T., Wurschum, T., and Breuninger, H.** (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* **16**, S190-S202.
- Mayer, U., Ruiz, R.A.T., Berleth, T., Misera, S., and Jurgens, G.** (1991). Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* **353**, 402-407.
- Petrasek, J., and Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *DEVELOPMENT* **136**, 2675-2688.