

# Růst a vývoj rostlin - praktikum

## MB130C78

---

### Blok 4

## Embryogeneze a dědičnost znaků

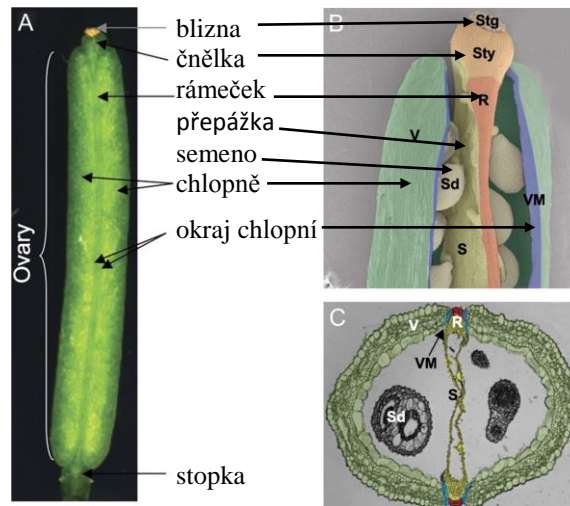
### Úlohy:

1. Embryogeneze - vývojové fáze zárodku *Arabidopsis thaliana*
2. Mutace postihující vývoj embrya u *Arabidopsis thaliana*
3. Markery embryonálního vývoje u *Arabidopsis thaliana* - lokalizace fluorescenčních proteinů v zárodku; 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.



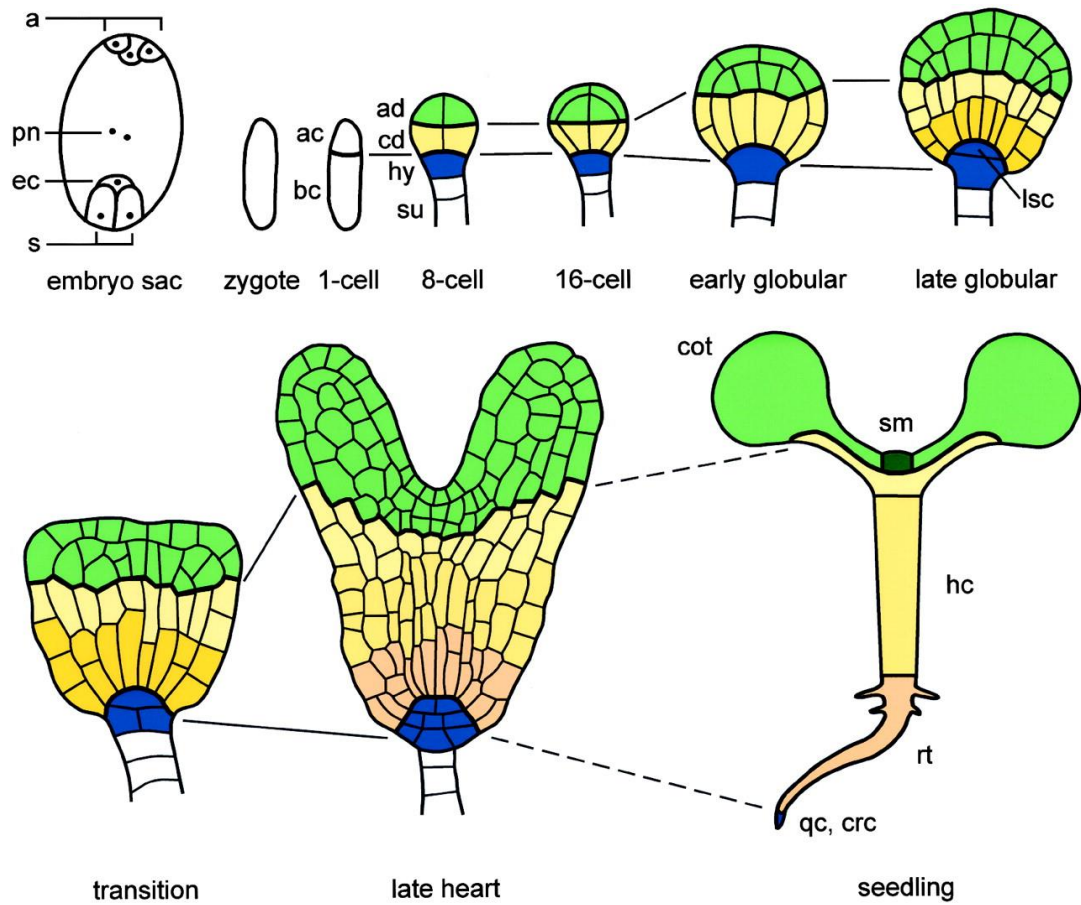
**Obr. 1:** Struktura plodu *Arabidopsis thaliana*. Nezralý plod před otevřením (**A**), zralý plod během otvírání zobrazený skenovací elektronovou mikroskopií (**B**) a příčný řez plodem (**C**). Převzato z Girin et al. (2009).

Embryonální vývoj (**Obr. 2**) začíná oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou, které splynou v zygotu. Tato protáhlá buňka se nesouměrně dělí. Vzniklé 2 buňky tvoří stádium nazývané jednobuněčné embryo, protože skoro celý zárodek (a posléze celá rostlina) vzniká z menší apikální buňky. Větší bazální buňka vytvoří pouze suspensor spojující embryo se zbytkem semene a hypofýzu, z níž vznikne klidové centrum (základ meristému špičky kořene) a kořenová čepička. 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. Tento trend pokračuje dále v srdcovitém a torpédovitém embryu a vede ke vzniku děloh. Mezi dělohami se zakládá meristém vrcholu prýtu. Souběžně se diferencují další pletiva (**Obr. 2**).

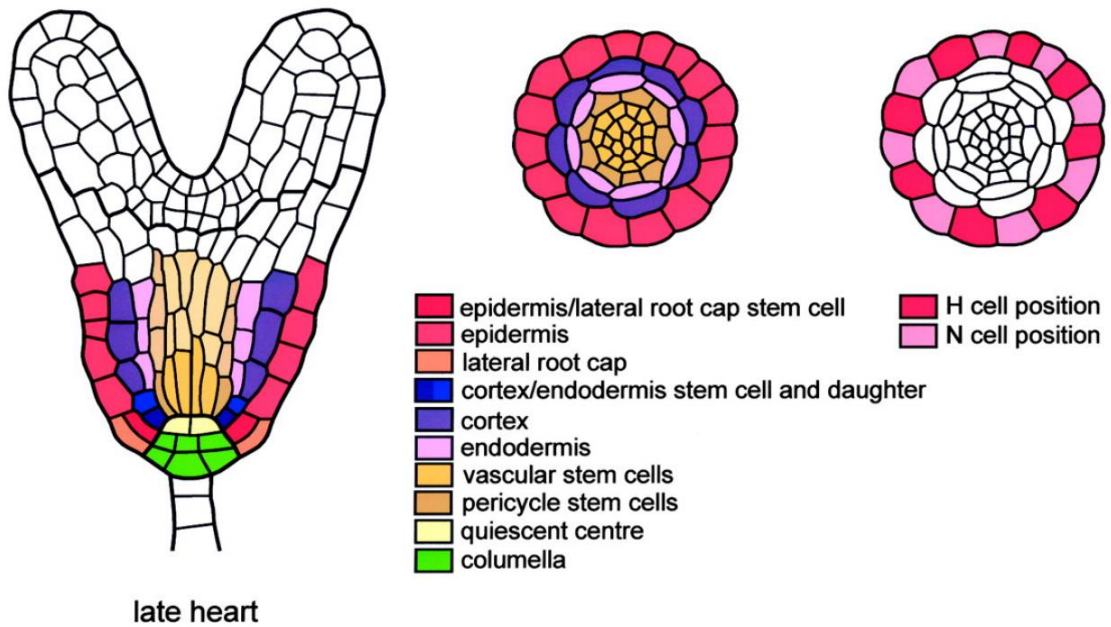
Embryonální vývoj je umožněn souhrou řady proteinů kódovaných v genomu *A. thaliana*. Nezastupitelnou úlohu hrají i fytohormony. Asi nejlépe prozkoumaná je funkce auxinu v embryonálním vývoji. **Obrázek 3** znázorňuje rozmístění auxinu (zviditelněného pomocí markeru DR5:GFP) v zárodcích různého vývojového stupně.

Poškození některých genů naruší vývoj rostliny natolik, že nedojde ani k vytvoření životaschopného embrya. Mayer et al. (1991) rozdělili následky vývojových mutací podle části zárodku, kterou postihnou na apikální (vrchol; např. mutace nazvaná *cup-shaped cotyledon*), centrální (*fackel*), bazální (kořenový pól; *monopteros*) a terminální - postihující oba póly embrya (*gnom*) (**Obr. 4**).

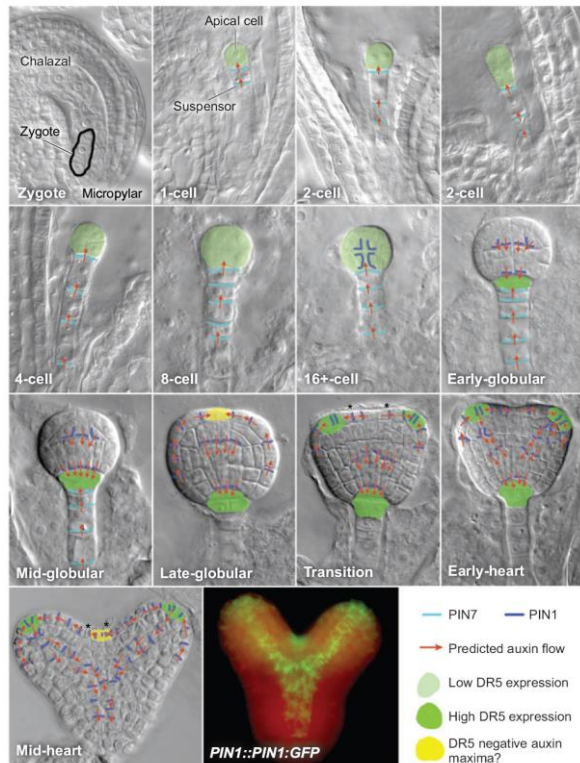
A



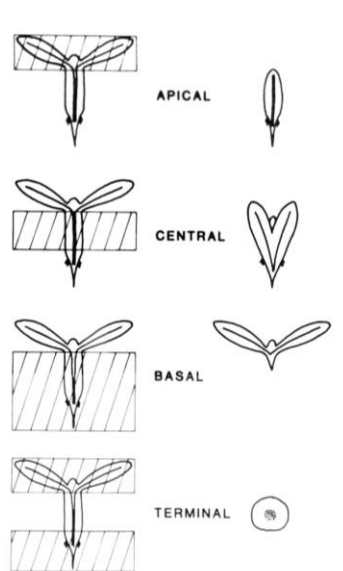
B



**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 a Floyd (2008).



**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, pro přenos pylu z jiného rodiče je tedy třeba používat pouze květy (poupata) s nedospělými tyčinkami. Ostrou pinzetou se odstraní všechny části květu kromě pestíku. Blizna takto připraveného květu se následně opylí tyčinkou z 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 stádium embryí izolovaných z různě starých šesulí *Arabidopsis thaliana*.

### Princip úlohy:

Tvar embrya se během vývoje mění – prochází řadou stádií. Květy huseníčku dospívají postupně a k oplození všech vajíček daného květu dojde v krátkém časovém úseku. Pozice (pořadí) plodu na rostlině proto koreluje se vývojovým stádiem zárodků v semenech uvnitř daného plodu.

### Zadání:

- Izolujte embrya ve třech různých stádiích a pozorujte je pod mikroskopem.
- Zakreslete a nákrese popište.
- Přiřadte izolovaná embrya k vývojovým fázím dle předloženého schématu (**Obr. 2**).
- Zdůvodněte, proč jste se rozhodli pro uvedené stádium.

### Materiál a postup:

#### Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

1) Kvetoucí a plodící rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované při 20°C, 16h světlo/8h tma.

2) Pinzeta s tenkými hroty, nůžky, injekční jehly, oboustranná lepicí páska, plastová Petriho miska, podložní a krycí skla, plastové kapátko, popisovač, binokulární preparační stereomikroskop, mikroskop se záznamovým zařízením.

#### Postup:

- 1) Naleznete na rostlině huseníčku šesuli číslo 10. Počítejte od nejmladší ke starším (tedy shora dolů), plod č. 1 je nejmladší takový, kde pestík přerostl délku koruny květu.
- 2) Nůžkami (popř. ostrou pinzetou) oddělte vybraný plod od lodyhy tak, abyste způsobili minimální poranění stonku.
- 3) Šesuli 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 semena a přeneste do kapky vody na podložním sklíčku. Jednotlivá semena nanoste tamtéž.
- 6) Pod stereomikroskopem otevřete vyvíjející se semena (dvěma jehlami nebo jehlou a pinzetou) a uvolněte embrya. Vaším cílem je získat alespoň 3 nepoškozené exempláře.
- 7) Pozorujte pod stereomikroskopem, popř. i pod mikroskopem, 1 typické embryo zakreslete do protokolu a popište. Protože je obvyklé odevzdat protokoly v elektronické podobě, sejměte nákrese vhodným způsobem (fotoaparát, skener) a vložte do protokolu.
- 8) Pokuste se pojmenovat stádium, ve kterém se typické embryo nachází. Svůj názor zdůvodněte.
- 9) Postup opakujte s šesulí číslo 8 a 5.

## 2. Mutace postihující vývoj embrya u *Arabidopsis thaliana*

### Cíl úlohy:

Zjistit, které z předložených rostlin nesou mutovanou alelu.

### Princip úlohy:

Rostliny nesoucí mutantní alelu genu nezbytného pro úspěšný vývoj zárodku se projeví výskytem („vyštěpováním“) embryí s abnormálním fenotypem. Z podílu takto poškozených zárodků na celkovém počtu lze odhadnout, jakým způsobem se mutantní znak dědí.

### Zadání:

- Izolujte po 10 embryích ze 4 rostlin vyštěpující populace a pozorujte je pod mikroskopem.
- Vyfotografujte normální a mutantní embryo a obrázek popište (zdůrazněte rozdíly).
- Uveďte počet morfologicky normálních a mutantních zárodků pro každou rostlinu. Které rostliny nesou ve svém genomu danou mutaci?
- Odhadněte štěpný poměr a s jeho pomocí i povahu dané mutace (dominantní či recesivní).
- Odpovězte na následující otázky, výpočty vysvětlete. Uvažujte obecně, pro teoretický průměrný případ.
  - Pokud z každé ze 4 rozdávaných rostlin náhodně vyberete 10 embryí, kolik embryí celkem ponese mutantní alelu (průměrně)?
  - Když 4 rostliny z populace, která byla v praxi rozdávána, necháte dozrát a jejich semena vysejete, kolik nositelů mutantní alely najdete mezi rostlinkami ve stádiu 6 listů? Opět uvažujte průměrný případ a náhodný výběr 10 potomků od každé ze 4 rostlin.

### Materiál a postup:

#### Rostlinný materiál 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 pro jednu z následujících mutací: *gnom* či *cup shaped cotyledon2*.

2) Pinzeta s tenkými hroty, nůžky, injekční jehly, oboustranná lepicí páska, plastová Petriho miska, podložní a krycí skla, plastové kapátko, popisovač, binokulární preparační stereomikroskop, mikroskop se záznamovým zařízením.

#### Postup:

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

2) **Vypreparujte alespoň 10 zárodků.**

3) Pozorujte pod stereomikroskopem a hledejte abnormality ve vývoji. Preparát předložte ke kontrole vedoucímu praktika.

4) **Zapište si, kolik mutovaných embryí jste zaznamenali pro kterou rostlinu.**

5) Pomocí světelného mikroskopu či binokulárního stereomikroskopu se záznamovým zařízením nasnímejte embryo postižené mutací a normální embryo. Uložte si obrázky pro použití v protokolu (stačí z jedné rostliny).

6) Opakujte postup s rostlinami číslo 2, 3 a 4 (popřípadě i dalšími)

7) Odpovězte na otázky ze zadání.

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

#### Cíl úlohy:

Zjistit, ve které části embrya lze pozorovat markerové proteiny u 2 různých linií.

Křížením rostlin nesoucích dva různé fluorescenční markery získat potomstvo s oběma markery.

#### Princip úlohy:

Markerové linie využívají fluorescenční proteiny ke zviditelnění aktivity genů. Křížením takových linií vznikne potomstvo, které umožní sledovat aktivitu 2 různých genů v jedné rostlině. Pro úspěšné křížení je nezbytné zabránit samosprašení a přenést pyl z otcovské rostliny na bliznu rostliny mateřské.

#### Zadání:

- Pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorujte embrya z rostlin nesoucích fluorescenční markery. 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 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.
- 2) Pinzeta s tenkými hroty, nůžky, injekční jehly, jednostranná a oboustranná lepicí páska, plastová Petriho miska, podložní a krycí skla, plastové kapátko, popisovač, binokulární preparační stereomikroskop, 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.
- 2) Vypreparujte aspoň 4 nepoškozené zárodky.
- 3) Pozorujte pod fluorescenčním mikroskopem a pořídte obrazový záznam typického embrya. Ukažte vedoucímu praktika.
- 4) Popište, ve kterých pletivech či buňkách je fluorescenční protein přítomen (podle **Obr. 2**).
- 5) Na jedné z rostlin připravte alespoň 5 květů na křížení. Vyberte poupata, u kterých začíná prosvítat bílá koruna nebo co největší zcela uzavřená poupata.
- 6) Mladší poupata a starší květy a šešule na téže větvi odstraňte tak, abyste způsobili minimální poranění stonku.
- 7) Pinzetou odstraňte všechny květní části kromě pestíku.
- 8) Na větev nalepte kousek lepicí pásky s popisem křížení (stačí uvést otce) a vaším jménem.
- 9) Pinzetou oddělte tyčinku z plně otevřeného květu druhé rostliny.
- 10) Tyčinkou opylte připravené pestíky.
- 11) Pod stereomikroskopem zkontrolujte přítomnost pylu na blizně. V případě potřeby můžete opylování 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.