

Růst a vývoj rostlin - praktikum

MB130C78

Blok 2

Role aktinového cytoskeletu v morfogenezi rostlinných buněk - analýza fenotypu

Fenotypová analýza mutanta *arpc1*

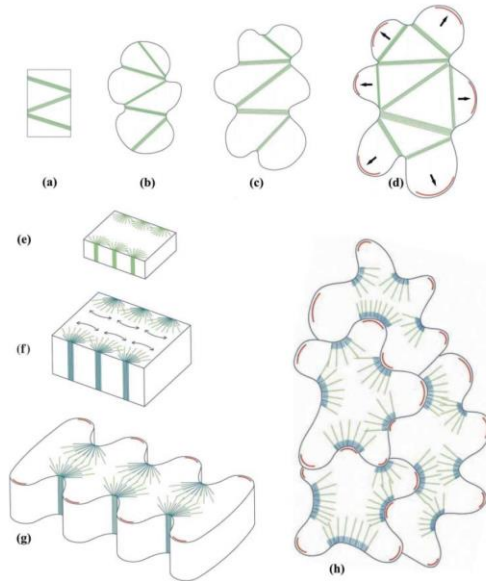
- 1) Srovnání růstu – měření délky kořenů a hypokotylů
- 2) Srovnání morfogeneze – měření elongace buněk hypokotylu a cirkularity buněk pokožky děložních listů
- 3) Porovnání fenotypu trichomů
- 4) Analýza buněčné adheze - test permeability pro rutheniovou červeň

Teoretický úvod:

Postembryonální vývoj rostlin je provázen průběžným formováním tvaru jednotlivých buněk. Obecně lze formování tvaru buněk chápat jako proces, ve kterém se skládají vlivy vnější a vnitřní, úlohu hrají jak biologické děje, tak fyzikální podmínky v konkrétním pletivu.

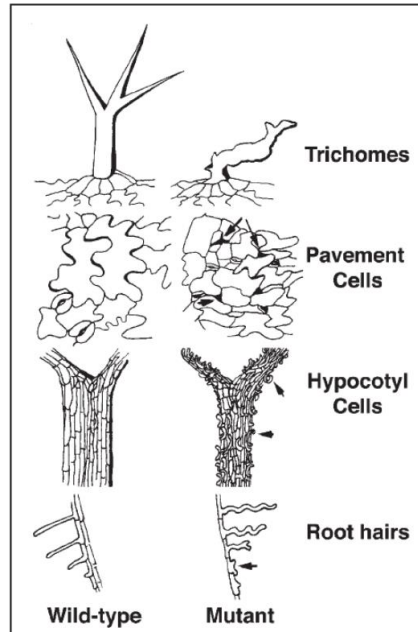
V tomto bloku si budeme demonstrovat důležitost cytoskeletu pro utváření tvaru pokožky listu (listové epidermis) a prodlužování orgánů (hypokotyl, stonek). Cytoskelet je tvořen vysoce dynamickou trojrozměrnou sítí proteinů, která je základní složkou všech eukaryotických buněk a u rostlin sestává se vzájemně propojených sítí mikrotubulů a aktinových filament. Při formování tvaru buněk je vždy důležitá souhra mezi složkami cytoskeletu a buněčné stěny (**Obr. 1**).

Aktinový cytoskelet u rostlin hraje roli v buněčných procesech, jako jsou pohyb organel, zavírání a otevírání průduchů, ustavení buněčné polarity, vývoj a směrovaný buněčný růst a buněčné dělení (Hussey et al., 2006). V našich úlohách se budeme zabývat proteiny, které iniciují vznik nových aktinových filament, tj. nukleují aktin. Aktinové nukleační faktory, které byly dosud objeveny u rostlin, zahrnují komplex Arp2/3 a forminy. Zatímco komplex Arp2/3 rozvětňuje síť stávajících aktinových filament, forminy katalyzují vznik přímých (nevětvících se) aktinových vláken (Goode a Eck 2007).



Obr. 1: Spolupráce mikrotubulů (zeleně), mikrofibril buněčné stěny (modře) a aktinových filament (červeně) při morfogenezi buněk listového mezofylu (a-d) a epidermis (e-h). Podle Panteris and Galatis, (2005).

ARP2/3 komplex je evolučně konzervovaný proteinový komplex složený ze sedmi podjednotek (ARP2, ARP3 a ARC1-ARC5) s poměrně konzervovanou strukturou. Rostliny postrádající podjednotku ARC5 jsou životaschopné, fertillní, a mají charakteristické fenotypové projevy, mezi které patří změněná morfologie trichomů, pokožkových buněk a změny v délce kořene a hypokotylu (**Obr. 2**). V těchto rostlinách je pravděpodobně sniženou schopností aktinu vytvářet vlákna snížena schopnost buněk nabývat konkrétního tvaru. Naproti tomu delece podjednotek Arp2/3 u živočišných buněk je často letální (Winter et al., 1999).



Obr. 2: Fenotyp rostlin s mutovaným Arp2/3 komplexem. Nejnápadnějšími jsou postižení tvaru buněk pokožkových pletiv listu, jako jsou trichomy a dlaždicové buňky (pavement cells), pokožky hypocotylu a pokožky kořene (kořenové vlásky). Podle Mathur (2005).

porovnání délek hlavního kořene a hypokotylu

porovnejte délku kořenů a hypokotylů semenáčků WT a *arpc1*

Pomocí fotoaparátu nebo mobilního telefonu nafotťte rostlinky narostlé na agarových plotnách spolu s měřítkem, pomocí programu ImageJ změřte délky kořenů a hypokotylů semenáčků WT a mutantu *arpc1*. Naměřené hodnoty porovnejte, vizualizujte pomocí krabicových grafů (boxplot) a statisticky srovnajte pomocí t-testu.

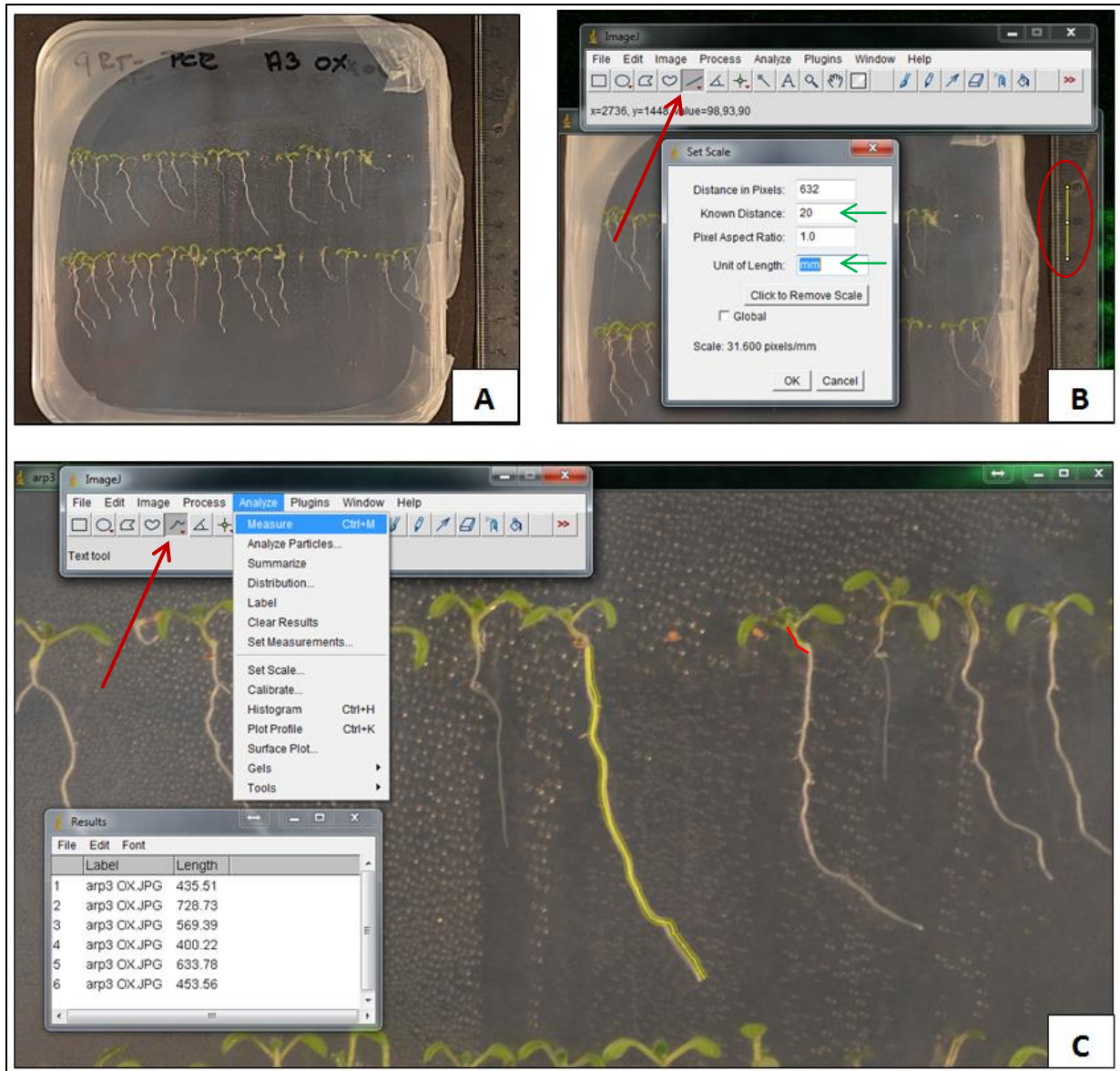
Materiál a postup:

Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

1. semenáčky *Arabidopsis thaliana* pěstované 7 dnů *in vitro* na agarovém médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 0,8% agar, 2,2g/l MS soli, pH 5.7.
2. fotoaparát a pravítko.
3. PC s programem ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Postup:

- 1) Misky s nasazenými rostlinami vyfoťte spolu s pravítkem, dle **obr. 5A**. pravítko bude použito jako měřítko pro kalibraci v programu ImageJ
- 2) Snímky přeneste do laboratorních notebooků a otevřete v programu imageJ.
- 3) Nastavte měřítko pomocí pravítka:
Pomocí nástroje pro výběr přímé čáry (*Straight line*) (**Obr. 5B – červená šipka**) nakreslete úsečku podél hrany pravítka dlouhou 20mm (**Obr. 5B – červený ovál**). Pomocí příkazu Set Scale (*Analyze/Set Scale*) zadejte v programu délku nakreslené úsečky a její jednotky (**Obr. 5B – Set scale – zelené šipky**).
- 4) Délku kořene a hypokotylu rostlin změřte pomocí nástroje *Freehand lines* (**Obr. 5C - šipka**). V horní liště programu z nabídky Draw Tools použijte nástroj *freehand lines* a obtahujte nejprve kořeny rostlin. Měření zaznamenávejte po každém obkreslení kořene nebo hypokotylu pomocí příkazu *Measure* (*Analyze/Measure*) nebo jednodušeji stisknutím klávesy M. Výsledky se zobrazí v tabulce dialogového okna Results. Změřte kořeny první vybrané linie (**Obr. 5C – žlutě naznačené**), čísla si zkopírujte do excelového souboru a popište názvem linie. Postupně změřte kořeny obou linií. Stejně postupujte při měření hypokotylů (**Obr. 5C –červeně naznačené**) Pomocí tabulkového editoru (Excel) vypočítejte průměrnou délku hypokotylů a kořenů na miskách pro všechny linie. Vytvořte krabicové grafy. Statisticky porovnejte délky kořenů a hypokotylů mezi WT a *arpc1* pomocí t-testu. Do protokolu zařaďte snímky linií na miskách a zpracované grafy.



Obr. 5: Měření délek hypokotylu a kořene. Práce s programem ImageJ.

Protokol by měl obsahovat: snímky obou linií, průměrné délky kořenů a hypokotylů obou variant, krabicové grafy zobrazující naměřené hodnoty a statistické zhodnocení rozdílů mezi liniemi.

porovnání tvaru pokožkových buněk děložních listů u rostlinek mutantů v komplexu ARP2/3

porovnejte tvar buněk pokožky děložních listů a pokožkových buněk hypokotylu. U pokožkových buněk děložních listů porovnejte schopnost buněk tvořit typické komplikované laločnaté tvary. U buněk pokožky hypokotylu porovnejte jejich schopnost elongace

Princip úlohy:

Principem úlohy je porovnat tvar buněk pokožky děložních listů mutantů v komplexu ARP2/3 mezi sebou a s WT rostlinami. Tvar buněk se bude měřit pomocí obrazové analýzy v programu ImageJ. Pro schopnost buněk tvořit složité laločnaté tvary změříte komplexnost jejich tvaru vyjádřenou pomocí cirkularity, pro změření schopnosti buněk hypokotylu elongovat změříte poměr délky a šířky buněk (aspect ratio)

Materiál a postup:

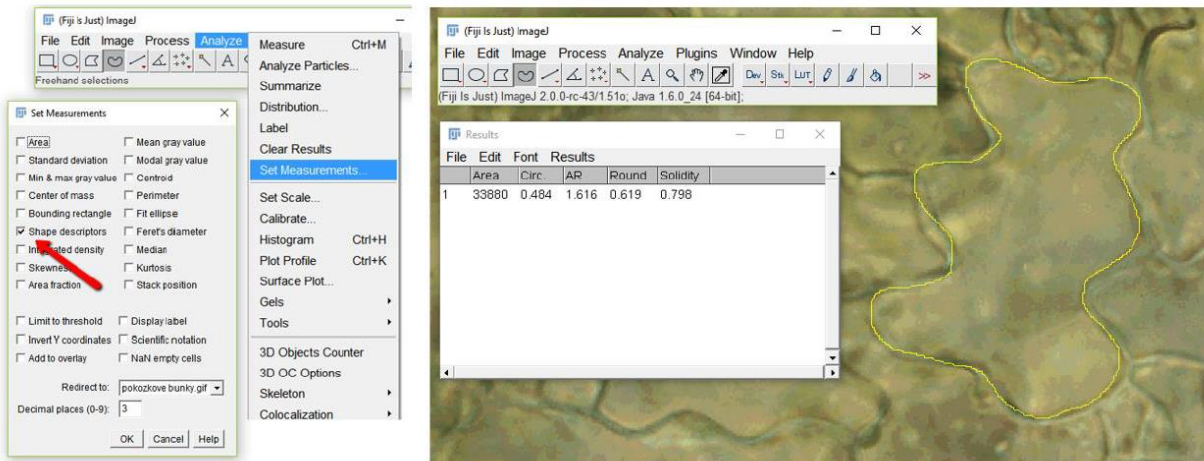
Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

1. Klíčící rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované 10 dnů in vitro na pevném médiu. mikroskop s kamerou
2. PC s programem ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Postup:

- 1) vytvořte preparát a pozorujte pod mikroskopem spodní pokožku děložního lístku a hypokotyl
- 2) Nasnímejte reprezentativní fotku zaostřenou na pokožkové buňky od každé varianty
- 3) Snímky přeneste do laboratorních notebooků a otevřete v programu imageJ.
- 4) Nastavte měření tvaru v *analyze/set measurements/shape descriptors*. Nastavte měření na 3 desetinná místa
- 5) Pomocí nástroje **freehand selection** obtáhněte tvar patnácti náhodně vybraných pokožkových buněk od první varianty a změřte (stisknutím klávesy M). Výsledky se automaticky ukládají do tabulky Results.
- 6) Výsledky měření pro Shape descriptors obsahují několik parametrů – nás bude zajímat pouze cirkularita a aspect ratio (AR) – cirkularita nabývá hodnot od 0 (dokonale nekulatý tvar, např. přímka) až do 1 (dokonale kulatý kruh). Čím laločnatější buňky, tím nižší cirkularita. AR – aspect ratio určuje poměr délky a šířky elongované buňky. Čím elongovanější buňka, tím větší hodnota AR.
- 7) Změřené hodnoty pro cirkularitu a AR přeneste do excelu

- 8) Vytvořte boxplot porovnávající cirkularitu a elongaci buněk u jednotlivých variant, nezapomeňte popsat osy, přidejte fotky reprezentativního výřezu jednotlivých variant. Provedte statistické porovnání obou variant pomocí t-testu.



Stanovení permeability povrchu listů

Stanovte míru permeability pokožkové vrstvy buněk pomocí barvení rutheniovou červení. Změna permeability povrchu listu rostliny zde slouží jako parametr udávající míru tvarového poškození a adheze buněk u jednotlivých mutantních linií (**Obr. 4**). Po inkubaci s barvivem (3h) pozorujte, zaznamenejte a vyhodnoťte míru zbarvení

Princip úlohy:

Rutheniová červeně je histologické barvivo, které neprochází přes neporušenou a nepřerušenu kutikulu a voskovou vrstvu do listu. Pokud je ale morfologie a tím pádem i adheze pokožkových buněk narušená, dojde k penetraci barviva do listu. Takovou situaci může být právě poškození aktinového cytoskeletu. Rutheniová červeně se váže na pektiny (polysacharidy kys. galaktouronové), které jsou hlavní složkou střední lamely a vyplňují prostory mezi přilehlými buněčnými stěnami. Výsledkem je červené zbarvení listu.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

- 1) Klíčící rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované *in vitro* na pevném médiu.
- 2) 0,01% vodný roztok rutheniové červeně (**Ammonium ruthenium oxochlorid**).
- 3) Kádinka na vodu, plastová miska se 6 jamkami, fixy
- 4) Pinzeta, nůžky
- 5) Makrostožan s fotoaparát

6) Podložní a krycí skla, plastové kapátko, voda

Postup:

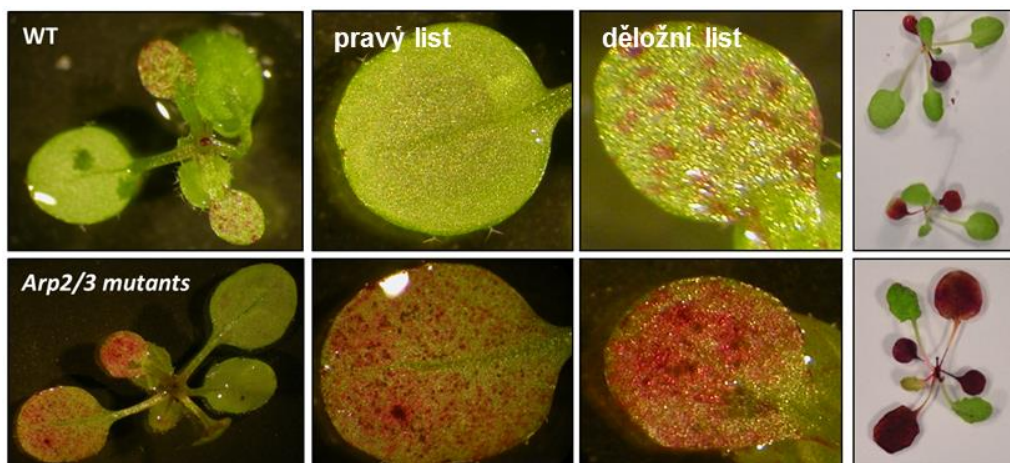
1) 0,01% vodný roztok rutheniové červeně převedte do dvou jamek plastové destičky, naplňte roztokem vždy alespoň polovinu objemu jamky.

2) Na stole máte připravené rostliny rostoucí v MS mediu. Pinzetou přeneste rostliny za hypokotyl do připravené lázně s rutheniovou červení - dejte pozor na porušení kutikuly a vosků. jednotlivé linie označte fixem. Ponechte stát 3h při pokojové teplotě.

3) Rostliny vyjměte z lázně (pinzetou), opatrně ponořením opláchněte ve vodě v kádince a pozorujte zbarvení jednotlivých listů u jednotlivých linií pod binokulární lupou. Celé rostliny vyfoťte (**Obr. 4A**).

4) Ustříhněte děložní list z každé pozorované linie a vytvořte z něho vodní preparát na podložním sklíčku. Pod mikroskopem vyfoťte detail pokožkových buněk (**Obr. 4B**).

5) Popište experiment svými slovy, vyhodnoťte míru zbarvení rostlin pro každou linii, doplňte obrazovou dokumentací celých barvených rostlin (**Obr. 4A**) a detailu pokožkových buněk (**Obr. 4B**).



Kvantifikace počtu zkroucených a správně tvarovaných trichomů

Cílem úlohy je stanovení frekvence výskytu zkroucených a normálních trichomů na adaxiální straně prvních pravých listů mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* a divokých (wild-type) rostlin. U předložených rostlin spočítejte s pomocí binokulární lupy celkový počet trichomů na prvních pravých listech a vyhodnoťte, zda jsou trichomy normální či zkroucené.

Princip úlohy:

Tato úloha je zaměřena na morfologii trichomů (**Obr. 3**) u rostlin s mutací c komplexu ARP2/3. V roce 2003 Mathur a kolektiv publikovali práci, kde dokumentují zkroucený „distorted“ tvar

trichomů u rostlin s mutací v podjednotkách komplexu Arp2/3. Vaším úkolem v této úloze je porovnání tvaru a počtu trichomů u kontrolních (wild-type) rostlin s mutanty *arpc1*.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

- 1) Klíčnicí rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované *in vitro* na pevném médiu
- 3) Binokulární lupa s fotoaparátem

Postup:

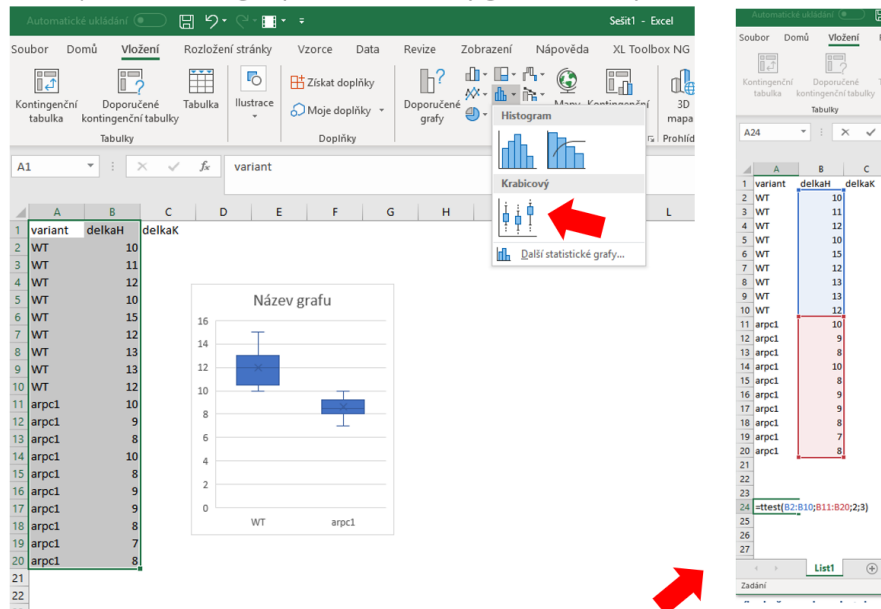
- 1) Pomocí binokulární lupy pozorujte morfologii trichomů. U každé rostliny určete, zda má na prvních pravých listech normální či zkroucené trichomy (**Obr. 3**) a stanovte jejich celkový počet. Vzhledem k tomu, že první pravé listy u *Arabidopsis thaliana* vyrůstají v párech, vyhodnoťte trichomy na obou prvních pravých listech. Rostliny z misky nepřenášejte a nechte je na médiu, tak jak narostly, budete je fotit a měřit v úloze 3.
- 3) Pořídte fotodokumentaci tvaru trichomů pro každou linii. Stačí jedna kvalitní fotografie pro každou linii.
- 4) Popište experiment svými slovy, vyhodnoťte tvar a uveďte počet trichomů u každé linie, doplňte obrazovou dokumentací.



Obr. 3: Fenotyp trichomů na prvních pravých listech semenáčků *Arabidopsis thaliana*. U kontrolních rostlin divokého typu (wt, vlevo) jsou trichomy správně utvářené, protažené, aktinový cytoskelet je plně funkční. Rostliny s mutovanou jednou podjednotkou komplexu Arp2/3 (vpravo) mají trichomy zkroucené a zakrslé.

Práce v excelu:

boxplot – vložení/grafy/vložit statistický graf/krabicový



pro statistickou analýzu použijte t-test. do prázdné buňky zadejte vzorec =TTEST(první výběr;druhý výběr;2;3) výsledkem bude p hodnota určující statistickou signifikanci rozdílu mezi mutantem a WT