

# Růst a vývoj rostlin - praktikum

## MB130C78

---

### Blok 4

# Embryogeneze a dědičnost znaků

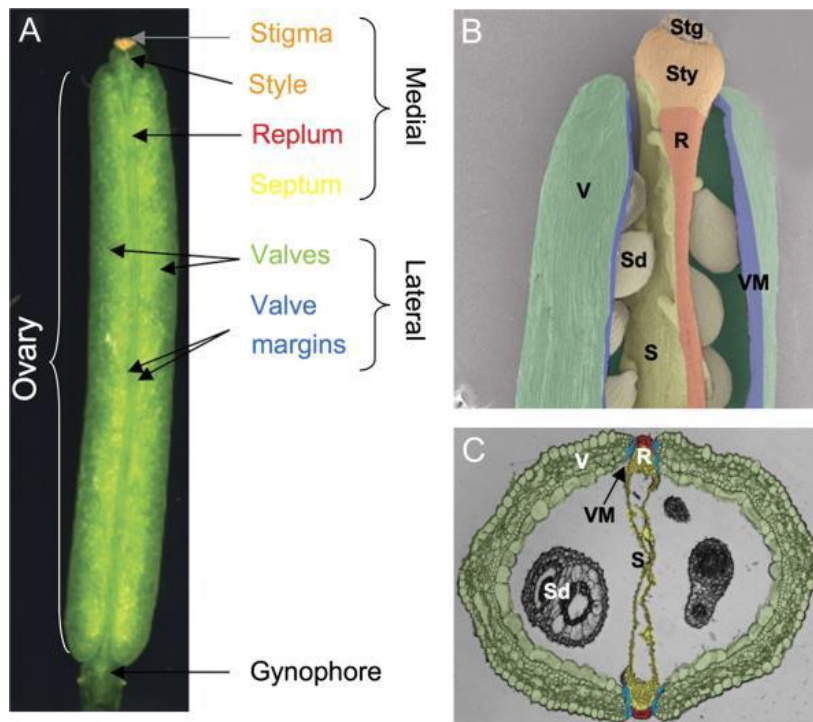
## Úlohy:

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 embryích a semenech, křížení markerových linií

## Teoretický úvod

### Embryonální vývoj

Plodem řady brukvovitých včetně huseničku 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.

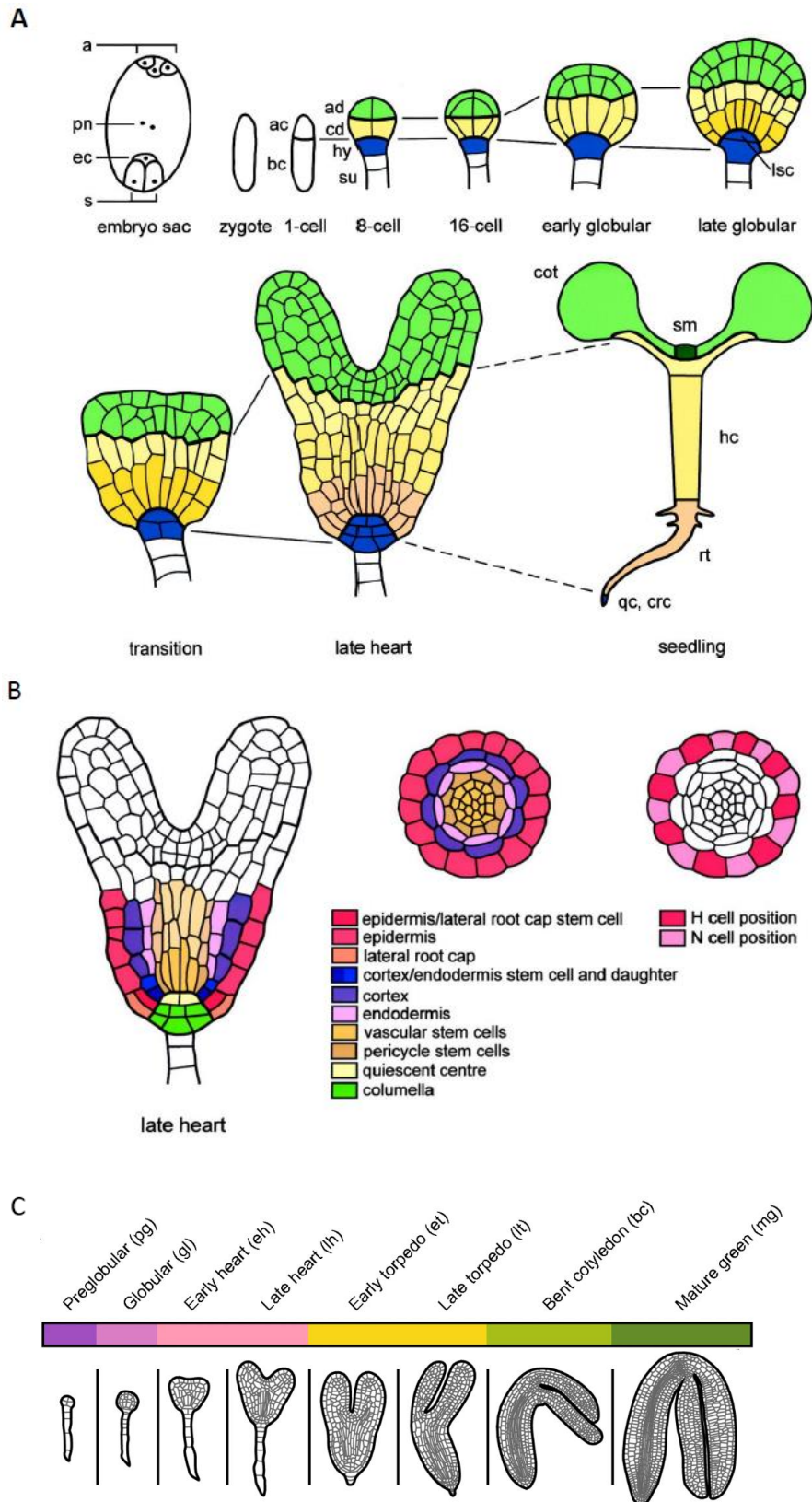


**Obr. 1:** Struktura plodu *Arabidopsis thaliana*. Nezralý plod před otevřením (**A**), zralý plod během otvírání zobrazený skenovací elektronovou mikroskopií (**B**) a příčný řez plodem (**C**). Převzato z Girin et al. (2009).

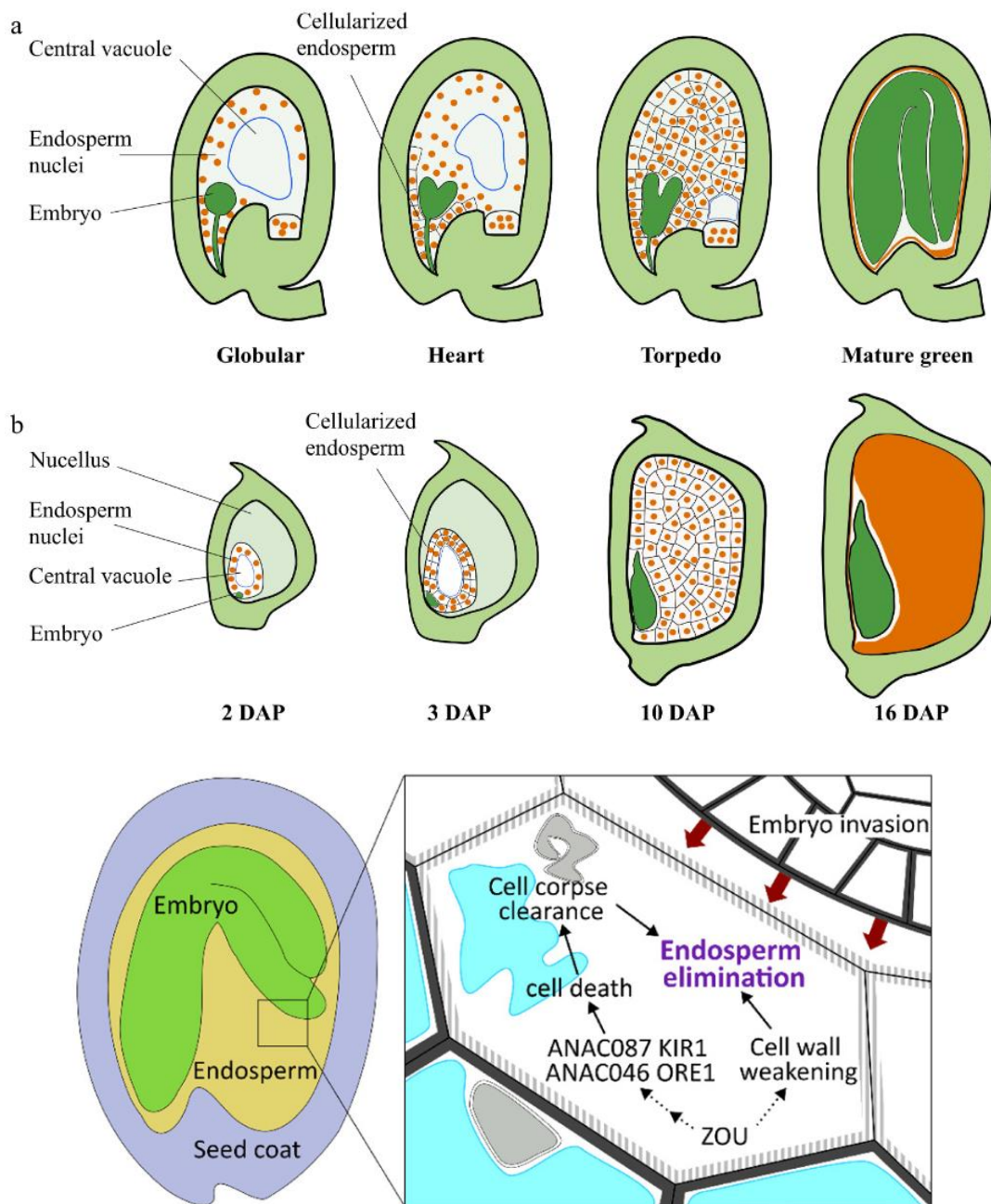
Embryonální vývoj (**Obr. 2**) začíná oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou, které splynou v zygotu. Tato protáhlá buňka se nesouměrně dělí. Vzniklé 2 buňky tvoří stádium nazývané jednobuněčné embryo, protože **skoro celý zárodek (a posléze celá rostlina) vzniká z menší apikální buňky**. Větší 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**). Současně s vývojem embrya se rozvíjí podpurná pletiva endospermu a osemení (**Obr. 3**). **V pletivech endospermu** je důležitá jejich postupná specifická degradace prostřednictvím **programované buněčné smrti**.

Embryonální vývoj je umožněn souhrou řady proteinů kódovaných v genomu *Arabidopsis thaliana*. Nezastupitelnou úlohu hrají i fytohormony. Asi nejlépe prozkoumaná je funkce auxinu v embryonálním vývoji. **Obr. 4** 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. 5**).

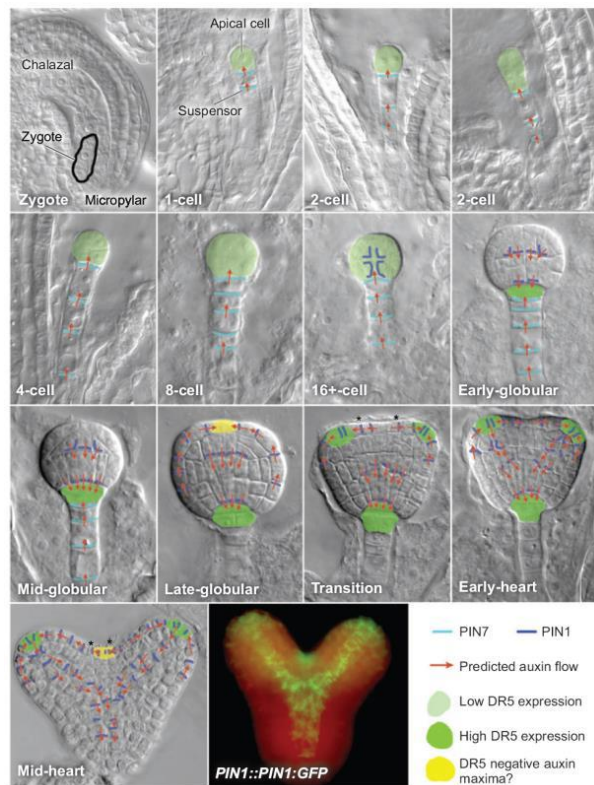


**Obr. 2:** Schematické zobrazení embryogeneze *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Přehled stádií embryonálního vývoje. **(B)** Označení embryonálních pletiv. **(C)** Přehledné označení jednotlivých stádií embryogeneze. Upraveno z Laux et al. (2004) a Hofmann et al. (2019).

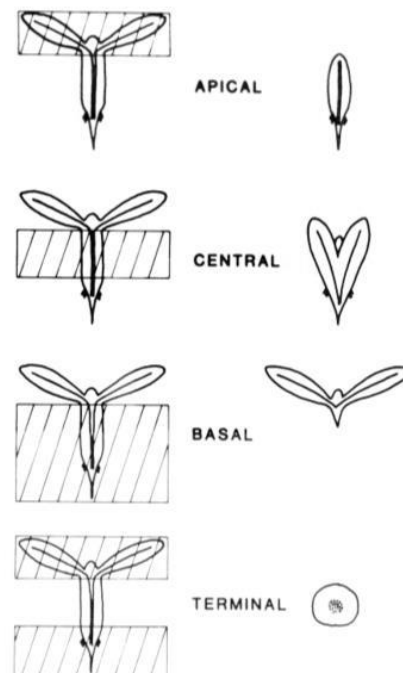


**Obr. 3:** Vývoj pletiv embrya, endospermu a osemení u *Arabidopsis thaliana*. Převzato z Xu and Zhang (2023) a Doll et al. (2023).





**Obr. 4:** Embryogeneze *Arabidopsis thaliana* s vyznačením gradientů auxinu a lokalizací jeho přenašečů PIN1 a PIN7. Převzato z Bowman a Floyd (2008).



**Obr. 5:** Mutace postihující vývoj embrya. Převzato z Mayer et al. (1991).

### Dědičná informace

Pro **kombinování** dědičných znaků různých linií se používá **křížení**. Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) 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 šešulí *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 s vývojovým stádiem zárodků** v semenech uvnitř daného plodu.

### Zadání:

- **Izolujte** embrya ve třech různých stádiích a pozorujte je pod mikroskopem.
- **Zakreslete** a náskres **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 šešuli 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) Šešuli umístěte na lepicí pásku přilepenou na Petriho misce „švem“ vzhůru.
- 4) Ostrou injekční jehlou naříznete 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 náskres 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 šešulí 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.**
- **Vyfoťte normální a mutantní embryo a obrázek popište (zdůrazněte rozdíly).**
- **Uveďte** počet morfologicky normálních a mutantních zárodků pro každou rostlinu.
- **Odhadněte** štěpný poměr a s jeho pomocí i povahu dané mutace (dominantní či recesivní).
- **Odpovězte** na otázku a úvahu 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)?

### 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 mutaci *cup shaped cotyledon2*. Tato rostlina se normálně vyvíjí, její potomstvo bude obsahovat klasický štěpný poměr 1/2/1 výskytu jedinců wt, heterozygotů a homozygotů *cup2*. Homozygotní jedinci se ale nevyvíjí dále, nejsou schopni tvořit správně rostlinné tělo a setrvávají ve stádiu srostlých děložních listů pohárkovitého tvaru (odtud název mutace).

**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 **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 otázku ze zadání.

### 3. Markery embryonálního vývoje u Arabidopsis thaliana - lokalizace fluorescenčních proteinů v embryích a semenech, křížení markerových linií

#### Cíl úlohy:

Zjistit, ve které části embrya a osemení 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 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. Rozdávány jsou některé z markerů přítomné přímo v embryu (WOX5, PIN1), v endospermu (pPASP3::H2A-GFP) či v osemení (pDMP4::H2A-GFP).
- 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** alespoň 4 nepoškozené zárodky a umístěte je rovnou do kapky perfluorodecalinu (PFD; Littlejohn et al., 2010) na podložní sklo.
- 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 a 3**).
- 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.
- Doll, N. M. et al.** (2023). Endosperm cell death promoted by NAC transcription factors facilitates embryo invasion in *Arabidopsis*. *Current Biology* **33**, 3785-3795.e6.
- Girin, T., Sorefan, K., and Ostergaard, L.** (2009). Meristematic sculpting in fruit development. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1493-1502.
- Hofmann, F., Schon, M. A. & Nodine, M. D.** (2019). The embryonic transcriptome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reproduction* **32**, 77–91.
- Laux, T., Wurschum, T., and Breuninger, H.** (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* **16**, S190-S202.
- Littlejohn, G. R., Gouveia, J. D., Edner, C., Smirnoff, N. & Love, J.** (2010). Perfluorodecalin enhances in vivo confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *New Phytologist* **186**, 1018–1025.
- 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.
- Xu, G. & Zhang, X.** (2023) Mechanisms controlling seed size by early endosperm development. *Seed Biology* **2**, 1–11.