

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra fyziologie rostlin**



**Uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu během
zakládání Casparyho proužku v endodermálních buňkách
kořene *Allium cepa***

diplomová práce

Kateřina Macháčová

vedoucí diplomové práce: RNDr. Aleš Soukup, PhD.

konzultantka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, PhD.

Praha 2008

Pro mého dědečka a babičku

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím pouze uvedené literatury pod vedením RNDr. Aleše Soukupa, PhD. a RNDr. Kateřiny Schwarzerové, PhD. a že nebyla předložena na žádné jiné vysoké škole.

V Praze 20.dubna 2008

Kateřina Macháčová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Aleši Soukupovi, PhD. za vedení diplomové práce, za cenné rady v metodice a při zpracování výsledků a za trpělivou korekturu textů diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Kateřině Schwarzerové, PhD., která mi poskytla četné konzultace a rady při zpracování celé diplomové práce v nepřítomnosti mého školitele a vzbudila ve mně nadšení pro rostlinný cytoskelet.

Děkuji taktéž Mgr. Ondřeji Šebestovi za pomoc při práci s konfokálním mikroskopem a za pomoc v oblasti aplikace eliminace autofluorescence pozadí.

Mgr. Ivanu Kulichovi děkuji za dobrou týmovou práci při imunolokalizaci mikrotubulů *Arabidopsis thaliana*.

Mé díky patří i mému tatínkovi, Doc. Ing. Janu Macháčovi, DrSc., za pomoc s metodickou částí diplomové práce týkající se mikrovln, ale i za všeobecnou psychickou podporu při studiu a při zpracování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat mé mamince, Mgr. Renatě Macháčové, za péči, kterou mi celým svým srdcem dává, a svému bratrovi, Janu Macháčovi, za pomoc v překonání psychických problémů v době studia na UK.

Touto prací bych chtěla poděkovat i mému dědečkovi a babičce, Josefu a Heleně Macháčovým, za krásné chvílky, které jsem mohla s nimi strávit.

Neopomenutelný dík patří i mému partnerovi, Dr. Ing. Uwemu Großmannovi, za krásný a klidný život v posledních letech studia na UK a za pomoc při technickém zpracování jednotlivých kapitol diplomové práce.

Seznam použitých zkratek

AGPs	arabinogalaktanproteiny
BSA	bovine serum albumine (hovězí albumin)
CoA	koenzym A
3D	trojrozměrný
Diff	rozdíl
EB1	END-BINDING PROTEIN1
ETOH	etanol
FITC	fluorescein
GDP	guanosindifosfát
GRP	protein bohatý na glycin
GTP	guanosintrifosfát
MAP-proteiny	Microtubule-associated proteins (proteiny asociující s mikrotubuly), např. MAP65
MOR1	MICROTUBULE ORGANIZATION 1
MS	Murashige a Skoog médium
MTSB	microtubule-stabilizing buffer (pufr stabilizující mikrotubuly)
p90	protein vázající se k tubulinu
PBS	phosphate buffered saline
PBSA	hovězí albumin v PBS
PEG 400 distearate	Poly(ethylene glycol) distearate 400
PLD	fosfolipáza D
RGB mód	červený – zelený – modrý mód
SCR	SCARECROW
SHR	SHORT-ROOT
Spc98	Spindle pole body component 98
SPR1	SPIRAL1
+TIPs	microtubule plus-end-tracking proteins
TMBP200	tobacco microtubule bundling protein 200
TRITC	rhodamin
WAK	wall-associated kinases (kinázy asociované s buněčnou stěnou)
γ -TuRC	γ -tubulin ring complex (γ -tubulinový kruhovitý komplex)

Obsah

1	Úvod s hypotézou diplomové práce	11
2	Literární úvod	13
2.1	Endodermis a její vývoj se zaměřením na vytváření Casparyho proužků.....	13
2.1.1	Proendodermis	15
2.1.2	Stav č. 1 – Casparyho proužky	15
2.1.3	Stav č. 2 – suberinová lamela	20
2.1.4	Stav č. 3 – terciární stěna	23
2.1.5	Propustné buňky („passage cells“) u endodermis.....	24
2.2	Rostlinný cytoskelet s detailnějším pohledem na mikrotubuly	26
2.2.1	Mikrotubuly, jejich vznik a uspořádání	26
2.2.2	Kortikální mikrotubuly a celulózasyntáza	34
2.2.3	Buněčné kontinuum: mikrotubuly, plasmatická membrána, buněčná stěna	37
	Mikrovlny	41
3	Metodika	43
3.1	Vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene <i>Allium cepa</i>	43
3.1.1	Imunodetekce mikrotubulů v buňkách endodermis kořenů <i>Allium cepa</i>	43
3.1.2	Pozorování preparátů	44
3.2	Aplikace metodiky fixace mikrotubulů s využitím účinku mikrovln na cytoskelet buněk kořenů <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.3	Pozorování základní struktury kořene cibule <i>Allium cepa</i> se zaměřením na endodermis	46
4	Výsledky	47
4.1	Pozorování základní struktury kořene cibule <i>Allium cepa</i> se zaměřením na strukturu endodermis ve stavu proendodermis a prvního vývojového stavu	47
4.2	Vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene <i>Allium cepa</i>	56
4.3	Aplikace metodiky fixace mikrotubulů s využitím účinků mikrovln na cytoskelet buněk kořenů <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
4.4	Uspořádání kortikálních mikrotubulů v endodermis kořene cibule <i>Allium cepa</i>	64
4.4.1	Pozorování kortikálních mikrotubulů konvenčním a konfokálním fluorescenčním mikroskopem	64
4.4.2	Eliminace autofluorescenčního signálu buněčné stěny ze zeleného signálu protilátky při snímání konfokálním mikroskopem	69
4.4.3	3D-rekonstrukce optických řezů z konfokálního mikroskopu za využití metod eliminace autofluorescence a uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu pod zvlněnou buněčnou stěnou Casparyho proužku	74
4.5	Změna uspořádání kortikálních mikrotubulů během vývoje proendodermis do stádia založení Casparyho proužku v prvním vývojovém stavu endodermis v kořeni cibule <i>Allium cepa</i>	79
5	Diskuze	87
5.1	Vývoj endodermis v kořenech cibule <i>Allium cepa</i> se zaměřením na strukturu endodermis ve stavu proendodermis a prvního vývojového stavu	87
5.2	Vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene <i>Allium cepa</i> a v kořeni <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
5.3	Uspořádání kortikálních mikrotubulů v endodermis kořene cibule <i>Allium cepa</i>	92
5.4	Změna uspořádání kortikálních mikrotubulů během vývoje proendodermis v kořeni cibule <i>Allium cepa</i>	95
5.5	Vztah uspořádání kortikálních mikrotubulů a zakládání Casparyho proužků.....	96
6	Závěr	101
7	Summary.....	103

8	Seznam použité literatury.....	105
9	Přílohy diplomové práce	115
9.1	Pracovní protokoly (ke kapitole 3.1.1).....	115
9.1.1	Fixace a zalévání kořenových špiček <i>Allium cepa</i> pro vizualizaci mikrotubulů v buňkách endodermis	115
9.1.2	Nepřímá imunodetekce tubulinu v buňkách endodermis kořenů <i>Allium cepa</i>	119
9.1.3	Složení a příprava chemikálií pro imunodetekci mikrotubulů.....	121
9.1.4	Poznámky k pracovním protokolům	126
9.2	Aplikace metodiky fixace mikrotubulů s využitím účinků mikrovln na cytoskelet buněk kořenů <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
9.3	Protokol pro obarvení řezů ze Steedmanova vosku sudanem.....	132
9.4	Makro pro eliminaci autofluorescenčního signálu buněčné stěny (ke kapitole 4.4.2).	133

1 Úvod s hypotézou diplomové práce

Endodermis se nachází v kořenech všech cévnatých rostlin, kde tvoří vnitřní vrstvu primární kůry kořene odvozenou ze základního meristému. Byla poprvé spatřena a popsána v polovině 19. století Planchonem u kořene *Victoria regia*. V novodobé literatuře je mylně přičítáno prvenství Robertu Caspary, který se obdobně jako Planchon věnoval výzkumu endodermis. Caspary sám nazval endodermis „ochrannou pochvou“ („Schutzscheide“) (Obr. č. 1) (více Macháčová 2005). Endodermis je možné poprvé identifikovat ve stavu proendodermis. Následně pak endodermis přechází do prvního vývojového stavu, který je charakteristický zakládáním Casparyho proužku. U řady rostlin pokračuje ontogeneze endodermis uložením suberinové lamely na vnitřní vrstvu primární buněčné stěny, popř. dochází i k ukládání tzv. terciární buněčné stěny.

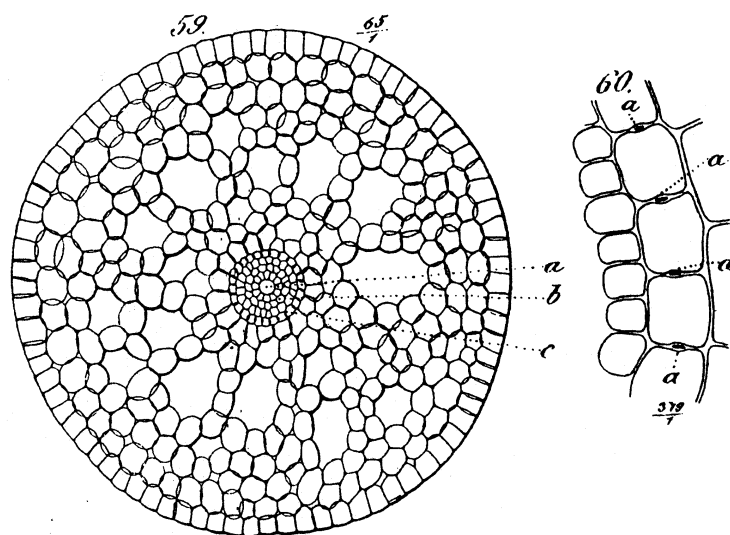
Diplomová práce se blíže zaměřuje na problematiku zakládání Casparyho proužků. Již Caspary pozoroval mezi radiálními buněčnými stěnami endodermálních buněk tmavé tečky (později pojmenované Casparyho proužky) a přemýšlel o jejich podstatě (Caspary ?, 1866). Dnes je známo, že Casparyho proužky jsou charakterizované zvláštním chemickým složením buněčné stěny a pevným propojením plasmatické membrány s buněčnou stěnou. Při chemické modifikaci buněčné stěny, která nejspíše předchází vzniku již výše zmíněného pevného propojení mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou (Karahara a Shibaoka 1998), dochází k ukládání ligninu a suberinu, a dost možná i dalších komponent, do míst Casparyho proužku. Transport těchto látek (nejspíše pomocí sekrečních drah) vyžaduje specifické směrování pouze do přesně vymezených oblastí buněčné stěny. Doposud není známo, jak je vymezený úsek buněčné stěny, kde se bude zakládat Casparyho proužek. Podstata samotného pevného propojení plasmatické membrány a buněčné stěny v místech Casparyho proužku je doposud také neznámá. Jednou z možných hypotéz je tzv. „protein linkage hypothesis“ (Clarkson a Robards 1975). Bohužel od roku 1975 nepřibylo mnoho nových poznatků osvětlujících princip pevné asociace v místech Casparyho proužku. Obecně lze říci, že mechanismus interakce plasmatické membrány a buněčné stěny je u rostlinné buňky doposud nepřilíš dobře popsán. Mezi kandidáty, kteří mohou hrát roli v propojení plasmatické membrány a buněčné stěny, patří např. extenziny, integrinům podobné proteiny, arabinogalaktanproteiny, kinázy asociované s buněčnou stěnou (wall-associated kinases), pektiny, forminy, kalózasyntáza, fosfolipáza D a celulózasyntáza (např. Johnson a kol. 2003; O'Neill a York 2003; Riese a kol. 2003).

Jak v chemické modifikaci, tak i ve vytváření pevné asociace plasmatické membrány k buněčné stěně může hrát důležitou roli jedna z buněčných struktur - cytoskelet. Je otázkou, jaké postavení zastává cytoskelet a zda existuje souvislost s asociací plasmatické membrány a buněčné stěny v místě Casparyho proužku.

V mé práci jsem se zaměřila na cytoskelet, resp. jeho mikrotubulární část, jako na možný prvek organizující chemickou modifikaci a vznik pevné asociace buněčné stěny a plasmatické membrány. Na základě známých funkcí cytoskeletu v rostlinné buňce jsme sestavili následující hypotézu:

Cytoskelet hraje roli při vzniku, popř. se přímo funkčně podílí na asociaci plasmatické membrány a buněčné stěny v místech Casparyho proužku.

Pokud tomu tak je, měl by se tento fakt projevit na uspořádání kortikálního cytoskeletu během vývoje endodermálních buněk.



Obr. č. 1 Příčný řez stonkem *Elodea canadensis* s detailním pohledem na „ochrannou pochvu“: a) „centrální kanál“ („centraler Canal“), b) „svazek vodivých elementů“ („Leitzellenbündel“), c) „ochranná pochva“ („Schutzscheide“), označení a, a, a – „tmavý bod“ mezi radiálními buněčnými stěnami sousedních buněk. (Caspary 1866)

2 Literární úvod

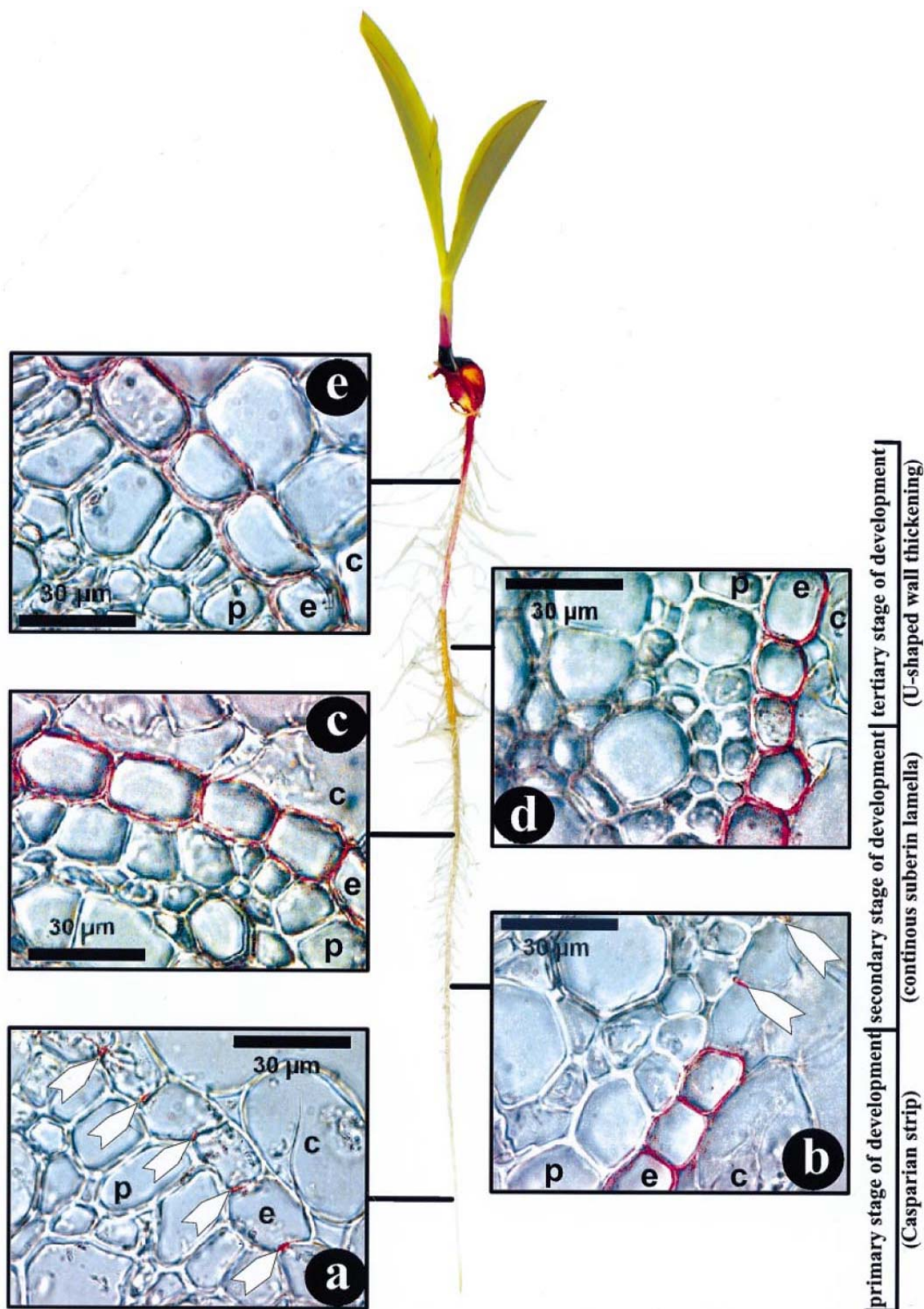
2.1 Endodermis a její vývoj se zaměřením na vytváření Casparyho proužků

Endodermis je obvykle jednovrstevná, u některých druhů, např. u Asteraceae, může docházet k tangenciálnímu dělení endodermálních buněk, endodermis je pak dvouvrstevná (Williams 1954, převzato z Esau 1960). Endodermis hraje v kořeni nezastupitelnou úlohu. Slouží jako apoplastická bariéra v transportu iontů a vody do středního válce kořene – je podmínkou selektivního transportu mezi rhizosférou a středním válcem. Funkce je dána modifikací buněčné stěny a pevnou asociací buněčné stěny s plasmatickou membránou. Současně dodává endodermis kořeni mechanickou oporu a zabraňuje vstupu mykorhizních hub, mikroorganismů a bezobratlých živočichů do středního válce. V případě poranění nebo odumření vnějších vrstev kořene může endodermis sloužit i jako vnější povrch kořene (Van Fleet 1961, Steudle a Peterson 1998, Zimmermann a kol. 2000, Steudle 2000a, Barrowclough a kol. 2000, Steudle 2000b, Sattelmacher 2001, Miyamoto a kol. 2001, Ranathunge a kol. 2003, Enstone a kol. 2003, Cholewa a Peterson 2004, Karahara a kol. 2004).

Vývoj endodermis:

Van Fleet (1961) a Clarkson a Robards (1975) dělí průběh vývoje endodermis do 3, resp. 4 vývojových stavů: a) proendodermis, b) stav č. 1 – vytváření Casparyho proužků v radiálních stěnách buněk, c) stav č. 2 – ukládání suberinové lamely na vnitřní povrch primární buněčné stěny, d) stav č. 3 – vytváření terciární stěny, tj. ukládání stěnového materiálu na suberinovou lamelu. e) Tento materiál může později lignifikovat – tuto fázi označuje Van Fleet (1961) jako 4. vývojový stav.

Vytváření jednotlivých vývojových stavů u *Zea mays* je patrné na Obr. č. 2.



Obr. č. 2 Vývoj endodermis u *Zea mays* (stáří 10 dní), příčné řezy 4, 12, 20, 28 a 36 cm od kořenové špičky, k obarvení použit Sudan III. a) Endodermis v prvním vývojovém stavu. Šípkami označen Casparyho proužek. b) Přechod z prvního vývojového stavu endodermis do druhého stavu. U některých buněk patrná suberinová lamela. První vývojový stav znázorněn šípkami. c) Endodermis v druhém vývojovém stavu – suberinová lamela se nachází ve všech buňkách. d) Počátek vytváření terciární buněčné stěny („U“ typ). f) Třetí vývojový stav v pokročilé fázi. (Schreiber a kol. 1999)

2.1.1 Proendodermis

Endodermis se vyvíjí z buněk apikálního meristému (Esau 1960). Pro vznik proendodermálních buněk u modelového organismu *Arabidopsis thaliana* je typické asymetrické dělení buněk, při kterém vzniknou dvě dceřiné buňky, které se odlišují svou velikostí, popř. i tvarem. Společná iniciála pro primární kůru a endodermis vzniká u *Arabidopsis thaliana* asymetrickým dělením iniciál sousedících s klidovým centrem. Společná iniciála podstupuje dále asymetrické periklinální dělení, jež dá vznik endodermální buňce a buňce primární kůry. Endodermální identita a správný vzorec periklinálního dělení iniciál základního meristému je regulován komplexem genů SCARECROW (SCR) a SHORT-ROOT (SHR). [Analogicky funguje tento systém i u *Zea mays* (Lim a kol. 2000).] SCR je exprimován v iniciálách základního meristému a následně v endodermální buňce. Je zodpovědný za správné druhé asymetrické dělení pod kontrolou SHR. K expresi SHR dochází pouze ve středním válci, ale jeho produkt - transkripční faktor - je transportován ze středního válce do přilehlých vrstev pletiv. Působí neautonomně v klidovém centru, iniciále základního meristému a endodermis (Nakajima a kol. 2001). U mutantů *scr* a *shr* je první asymetrické dělení v pořádku, druhé však neproběhne. Dojde k vytvoření pouze jediné vrstvy buněk, která je pozitivní na markery endodermis i primární kůry. U *scr* nese tato jediná vrstva vlastnosti primární kůry i endodermis (včetně Casparyho proužku) (Laurenzio a kol. 1996), u *shr* pouze vlastnosti endodermis (více Kamiya a kol. 2003).

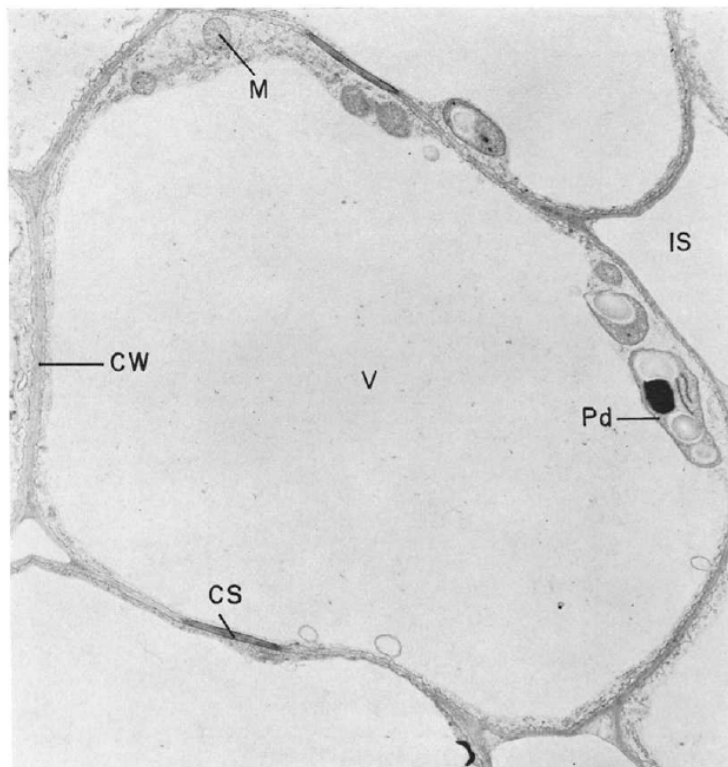
Identifikace proendodermis je možná poměrně blízko kořenové špičce. Verdaguer a Molinas (1997) poprvé identifikovali vyvíjející se proendodermis u *Quercus suber* v místech, kde dozrává protofloém. Buňky proendodermis obsahují menší vakuoly než jak je patrné u buněk primární kůry (Clarkson a Robards 1975, Verdaguer a Molinas 1997). U buněk proendodermis je možné také detekovat vyšší obsah fenolických látek, který je pravděpodobně spojen s modifikací buněčné stěny v následujícím vývoji (Van Fleet 1961). Obr. č. 24a - cc ukazují proendodermis, resp. endodermis s ještě nevytvořenými Casparyho proužky na příčných řezech kořenem *Allium cepa*.

2.1.2 Stav č. 1 – Casparyho proužky

V dalším vývoji endodermis se vytváří tzv. Casparyho proužek v radiální buněčné stěně endodermálních buněk (Obr. č. 20, Obr. č. 24d - ee), v místě tohoto proužku lze

detekovat specifické chemické složení buněčné stěny a pevné spojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou.

V raném stavu endodermis – u proendodermis - nelze pozorovat žádné propojení mezi buněčnou stěnou a cytoplasmatickou membránou. Postupně s rostoucí vzdáleností od kořenové špičky dochází v místě budoucího Casparyho proužku k modifikaci buněčné stěny,



Obr. č. 3 Příčný řez kořenem *Convolvulus arvensis*. Detail endodermální buňky v prvním vývojovém stavu (s Casparyho proužkem v radiální buněčné stěně). Vpravo od endodermální buňky se nachází parenchymatické buňky kortexu, vlevo pak pericykl. CS – Casparyho proužek, CW – buněčná stěna, IS – mezibuněčný prostor, M – mitochondrie, Pd – plastid, V – vakuola. Elektronový mikroskop. Zvětšení 10000x (Bonnnett 1968)

kteřá se stává elektrondensní (Ma a Peterson 2001a).

V tomto místě se začíná mezi radiální buněčnou stěnou a cytoplasmatickou membránou vytvářet těsné spojení, které se následně rozšiřuje podél radiální buněčné stěny.

Endodermis vstupuje do prvního vývojového stavu. Na Obr. č. 3 je ukázána buňka endodermis v prvním

vývojovém stavu u *Convolvulus arvensis*, která je tvořena velkou centrální vakuolou, její cytoplasma se nachází v periferní zóně při buněčné stěně (Bonnnett 1968).

Casparyho proužky se poprvé objevují v místech, kde

dozrává protoxylém. Např. u *Primula acaulis* (Lux a Luxová 2003) a u *Gentiana asclepiadea* (Šottníková a Lux 2003) je to ve vzdálenosti přibližně 4 mm od kořenové špičky, u *Pontederia cordata* cca. 5 mm (Seago a kol. 2000a) a u *Nymphaea odorata* asi 10 mm od kořenové špičky (Seago a kol. 2000b). U *Quercus suber* vzniká Casparyho proužek ve vzdálenosti 20 – 25 mm od kořenové špičky (Verdaguer a Molinas 1997). Je vidět, že číselné údaje se od sebe liší. Vzdálenost od kořenové špičky, kde dochází k zakládání jednotlivých vývojových stavů, se liší dle druhu rostliny a lze předpokládat, že bude závislá i na způsobu kultivace a rychlosti růstu. Roli zde budou hrát i vlivy vnějšího prostředí, např. přítomnost stresových podmínek (Ma a Peterson 2003).

Casparyho proužky se začínají vytvářet, resp. rozšiřovat nejdříve v buňkách sousedících s floémem, následně pak v buňkách sousedících s xylémem (Verdaguer a Molinas 1997, Ma a Peterson 2001a). Proužek může být u různých druhů rostlin různě široký, nerozkládá se však po celé délce radiální a transverzální buněčné stěny (Ma a Peterson 2001a; Enstone a kol. 2003). Např. u *Convolvulus arvensis* je šířka Casparyho proužku 2 μm , jeho tloušťka je 0,2 μm (Bonnett 1968). Pouze ojediněle lze pozorovat proužek širší než 1/3 – 1/2 antiklinální stěny. Příkladem může být *Gentiana asclepiadea*, u které se Casparyho proužek rozkládá po celé antiklinální buněčné stěně (Šottníková a Lux 2003). Dle Enstone a Peterson (2005) je často u pozorovaných modelů patrný zakládající se Casparyho proužek nejdříve blíže vnitřnímu okraji radiální buněčné stěny, následně se pak rozšiřuje směrem vně. Při stresu ze zasolení se může rozšířit Casparyho proužek v endodermálních buňkách (Karahara a kol. 2004). Toto (ještě společně se zakládáním Casparyho proužku blíže kořenové špičce) může přispívat k zesílení funkce endodermis jako apoplastické bariéry. Radiální šířka Casparyho proužku se zvyšuje s expanzí radiální buněčné stěny endodermálních buněk, která předchází tvorbě Casparyho proužku (Yokoyama a Karahara 2001). Pokud je již Casparyho proužek plně vyvinut, nerozšiřuje se dále, i když endodermální buněčná stěna expanduje.

Proces vytváření Casparyho proužků, na rozdíl od následujících vývojových stavů, je synchronizován (Clarkson and Robards 1975). Synchronní zakládání Casparyho proužku pozorovali např. Lux a Luxová (2003) u *Primula acaulis*. Z práce Enstone a Peterson (2005), v které byly vyvíjející se kořeny *Zea mays* vystavovány různým podmínkám vnějšího prostředí, vyplývá, že synchronizace zakládání Casparyho proužků není ovlivňována podmínkami vnějšího prostředí, tento vývojový proces je nejspíše přísně naprogramován vývojovými posloupnostmi. Podmínky vnějšího prostředí mohou ale ovlivnit vzdálenost místa od vrcholu, v kterém bude docházet k zakládání prvního vývojového stádia.

U některých rostlin [např. *Monstera deliciosa* a *Clivia miniata* (Zeier a Schreiber 1998), *Pontederia cordata* (Seago a kol. 2000a), *Nymphaea odorata* (Seago a kol. 2000b) a *Acorus calamus* (von Guttenberg 1968)] končí vývoj endodermis po vytvoření Casparyho proužků, u většiny druhů rostlin však dochází k dalšímu vývoji endodermis – ukládá se suberinová lamela a vzniká terciální buněčná stěna.

Při sekundárním tloustnutí kořene dochází u *Gentiana asclepiadea* nejdříve k tangenciálnímu prodloužení buněk endodermis, později dochází k výraznému antiklinálnímu dělení. Původní antiklinální buněčné stěny nesou Casparyho proužky, u nových se však již netvoří. Dochází však k uložení suberinové lamely a terciální buněčné stěny (Šottníková a Lux 2003).

Charakteristiky Casparyho proužku – detailnější popis:

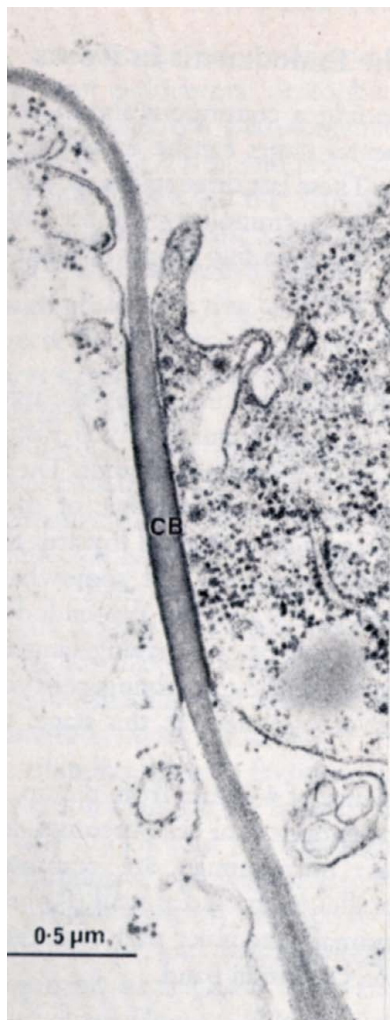
a) modifikace buněčné stěny v místech Casparyho proužku

V místech Casparyho proužku dochází k ukládání lipidických (hydrofóbních) a polyfenolických látek do primární buněčné stěny. Z lipidů se ukládají suberiny, z polyfenolů pak ligniny. Mimo polysacharidů buněčné stěny obsahuje oblast Casparyho proužku velké množství bílkovin (Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b, Schreiber a kol. 1999, Zeier a Schreiber 1999, Zimmermann a kol. 2000). U rostlin, u nichž je endodermis trvale v prvním vývojovém stavu [např. *Clivia miniata* a *Monstera deliciosa* (Zeier a Schreiber 1998)], obsahují buněčné stěny většinou více ligninu a méně suberinu než rostliny, u nichž endodermální buňky pokračují ve vývoji, tedy dochází u nich k ukládání suberinové lamely a terciální buněčné stěny (Schreiber a kol. 1999). Zdá se tedy, že dominantním materiálem Casparyho proužku jsou právě ligniny nebo jim podobné látky. Buněčná stěna v místě Casparyho proužku se jeví díky svému chemickému složení v elektronovém mikroskopu jako elektrondensní, její struktura je více homogenní než struktura okolní buněčné stěny (Bonnett 1968, Clarkson a Robards 1975).

Zahájení a regulace přesně lokalizované modifikace buněčné stěny jsou doposud neznámé. Předpokládá se existence poziční informace určující místo budoucího Casparyho proužku (Yokoyama a Karahara 2001). Uvažuje se o možné úloze dosud neznámého regulačního mechanismu v určení místa ukládání výše zmíněných látek do primární buněčné stěny endodermis (Ma a Peterson 2001a).

Během vývoje Casparyho proužků u *Allium cepa* nedochází k výrazným změnám v protoplastu endodermálních buněk, např. ke zvýšené tvorbě transportních váčků (Ma a Peterson 2001a). To by ukazovalo na dodávání monomerů hydrofóbních molekul do buněčné stěny přímo přes plasmatickou membránu. Avšak u *Ranunculus acris* bylo pozorováno četné množství diktyosomů v protoplastu, což poukazuje na možnost transportu pomocí exocytózy [Scott a Peterson 1979, převzato z Ma a Peterson (2001a)]. Karahara a Shibaoka (1998) sledovali ve své práci efekt brefeldinu A, který působí jako inhibitor sekreční dráhy transportu v buňce, na vývoj Casparyho proužku u *Pisum sativum*. Předpokládali, že prekurzory ligninu a suberinu jsou syntetizovány v buňce, transportovány sekrečními drahami na povrch buněk a polymerovány v buněčné stěně pomocí peroxidáz. Pro potvrzení své hypotézy použili právě brefeldin A. Zjistili, že brefeldin A nejen inhibuje modifikaci buněčné stěny v místě Casparyho proužku, ale i vytvoření pevné adheze plasmatické membrány k buněčné stěně. (Je však otázkou, zda je primárním efektem ovlivnění cytoskeletu, nebo důsledek ovlivnění transportu prekurzorů extracelulárního materiálu.) Karahara a Shibaoka (1998) tedy

předpokládají, že modifikace buněčné stěny předchází vytvoření asociace plasmatické membrány a buněčné stěny. [Stejnou následnost procesů pozorovali i Yokoyama a Karahara (2001) u *Pisum sativum*.] Domnívají se, že změna v chemickém složení buněčné stěny v místě Casparyho proužku je požadavkem pro vytvoření pevné asociace plasmatické membrány s buněčnou stěnou. U obou procesů pak předpokládají účast sekrečních drah.



Obr. č. 4 Radiální stěna endodermálních buněk v prvním vývojovém stavu na příčném řezu kořenem ječmene 4 cm od kořenové špičky. Buňky jsou plasmolyzovány. Je zde dobře patrná asociace buněčné stěny a plasmatické membrány v místě Casparyho proužku (CB). (Clarkson a Robards 1975)

b) asociace plasmatické membrány s buněčnou stěnou v místech Casparyho proužku

Kromě specifického chemického složení buněčné stěny v místech Casparyho proužku je pro první vývojový stav charakteristická i již několikrát zmíněná asociace buněčné stěny a plasmatické membrány v místě Casparyho proužku. Toto propojení je dobře patrné při ošetření buněk hypertonicným roztokem, kdy dochází k tzv. „band plasmolysis“. V místě asociace, tedy v místě Casparyho proužku, nedojde k oddělení plasmatické membrány od buněčné stěny (viz. Obr. č. 4).

Předpokládá se, že podstatou spojení buněčné stěny a plasmatické membrány v místě Casparyho proužku by mohla být asociace proteinů v buněčné stěně s proteiny vnější vrstvy plasmatické membrány, tzv. „protein linkage hypothesis“ (Clarkson a Robards 1975). Experimentální data potvrzující tuto hypotézu stále chybí. V izolovaném Casparyho proužku u *Clivia miniata* bylo zjištěno vyšší množství dusíku, což může ukazovat na přítomnost stěnových proteinů v místech proužků [Schreiber a kol. 1994, převzato z Zeier a Schreiber (1998)].

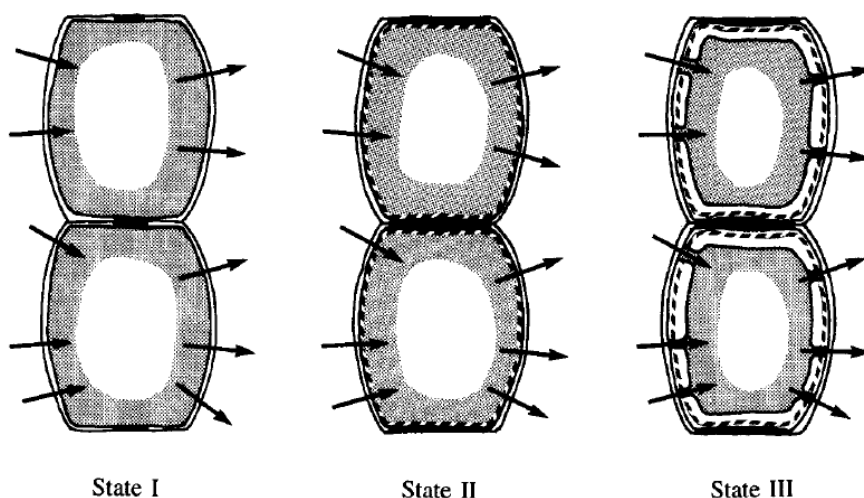
Typické pro endodermální buňky je i rozložení plasmodesmů v endodermální buňce. Poměrně vysokou frekvenci plasmodesmů lze najít v tangenciální buněčné stěně, naopak v radiální a transverzální buněčné stěně je frekvence plasmodesmů extrémně nízká (Ma a Peterson 2001b). V místech Casparyho proužků nebyly např. u *Convolvulus arvensis*

detekovány žádné plasmodesmy (Bonnett 1968). Toto vylučuje v případě endodermis možné vysvětlení „band plasmolysis“ v propojení buněčné stěny pomocí plasmodesmů.

V místě asociace buněčné stěny a plasmatické membrány je plasmatická membrána tlustší a pravidelnější než plasmatická membrána v ostatních částech buňky. Vnější vrstva lipidické dvojvrstvy je v tomto místě silnější než vnitřní vrstva. Chemické složení plasmatické membrány v místě Casparyho proužku se bude nejspíše lišit od chemického složení plasmatické membrány v ostatních částech endodermální buňky [Karahara a Shibaoka 1992, převzato z Karahara a Shibaoka (1998)].

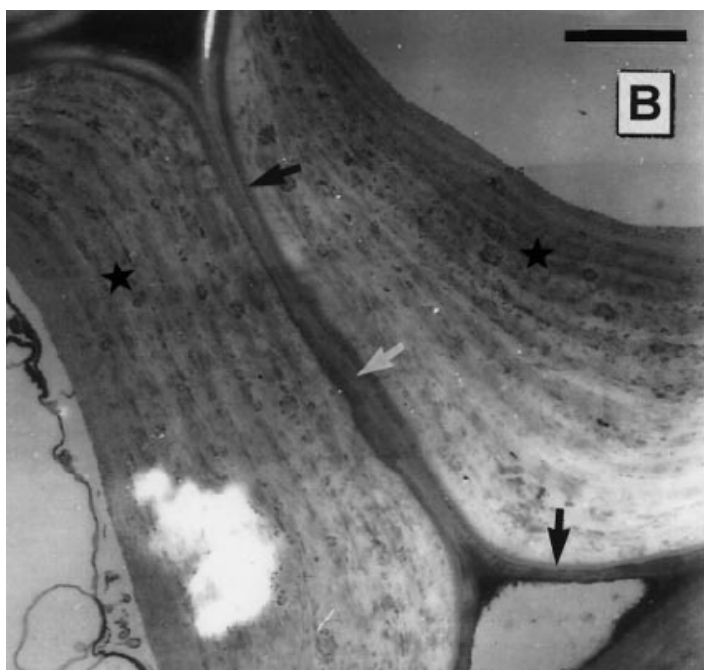
2.1.3 Stav č. 2 – suberinová lamela

V tomto procesu dochází k ukládání suberinu mezi buněčnou stěnu a plasmatickou membránu, tedy na vnitřní povrch celé buněčné stěny s výjimkou oblasti plasmodesmů (Obr. č. 5, Obr. č. 6, Obr. č. 25c, cc). Chemické složení tohoto suberinu se liší od chemického složení suberinů ukládaných v prvním a třetím vývojovém stavu (Verdaguer a Molinas 1997, Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b, Schreiber a kol. 1999, Zeier a Schreiber 1999 a Zimmermann a kol. 2000). Odlišnost se projevuje hlavně v alifatické složce, která tvoří dominující část suberinové lamely. Suberin ukládající se v prvním vývojovém stavu obsahuje velice málo či žádné nenasycené mastné kyseliny, zatímco suberin, který je součástí suberinové vrstvy, obsahuje daleko více těchto mastných kyselin. Suberinová lamela obsahuje i lignin (Zeier a kol. 1999a). Chemické složení ligninu v suberinové lamele se však také nejspíše liší od složení ligninu ukládaném v prvním a třetím vývojovém stavu (Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b).



Obr. č. 5 Schéma změn ve struktuře buněčné stěny během vývoje endodermis. Plasmodesmy jsou znázorněny šipkami, cytoplasma tečkovaně, Casparyho proužky černě a suberinová lamela přerušovanou linkou. (Peterson a Enstone 1996)

K vytváření suberinové lamely dochází v době, kdy není ještě plně vyvinut metaxylém, tedy např. u *Quercus suber* ve vzdálenosti 30 – 35 mm od kořenné špičky (Verdaguer a Molinas 1997), u *Primula acaulis* pak ve vzdálenosti 30 – 40 mm od vrcholu



Obr. č. 6 Detail radiální endodermální stěny *Allium cepa* na příčném řezu kořenem. Bílá šipka ukazuje Casparyho proužek v centrální části radiální buněčné stěny (první vývojový stav), černá šipka označuje suberinovou lamelu (druhý vývojový stav), třetí vývojový stav, tedy terciární buněčná stěna, je patrná v místě hvězdičky. 12000x, úsečka = 1 μm (Zeier a Schreiber 1998)

kořene (Lux a Luxová 2003). Nejdříve se ukládá suberinová lamela v buňkách endodermis ležících v blízkosti floému, později v buňkách endodermis sousedících s xylémem (Verdaguer a Molinas 1997, Ma a Peterson 2001a, Šottníková a Lux 2003).

Na úrovni jednotlivých buněk začíná depozice suberinové lamely v místech primárního políčka plasmodesmů. Tloušťka vyvinuté suberinové lamely je v těchto místech okolo 100 nm, v ostatních oblastech 30 nm (Ma a Peterson 2001a). Suberinová

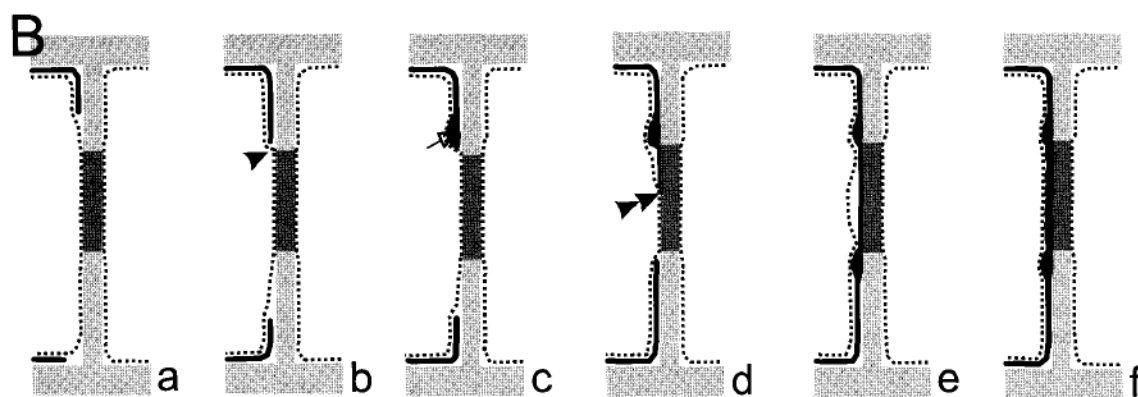
vrstva u dřevin (tedy u rostlin s rozsáhlým sekundárním tloušťnutím) může být 4 – 8x tlustší než u bylin (Verdaguer a Molinas 1997). K depozici suberinu dochází nejspíše cestou exocytózy, tedy pomocí váčků odvozených od Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula fúzujících s plasmatickou membránou, čemuž odpovídá i velké množství diktyosomů a endoplasmatického retikula v cytoplasmě buněk tohoto vývojového stádia (Ma a Peterson 2001a).

Obecně přijímaným modelem procesu vytváření suberinové lamely je model navržený v práci Ma a Peterson (2001a), který předpokládá, že se suberinová lamela ukládá i v místě Casparyho proužku (Obr. č. 7). Suberin se nejdříve začne ukládat na buněčnou stěnu primárních políček plasmodesmů vnější tangenciální stěny, přičemž ale nedochází k přerušení plasmodesmů, následně pak u vnitřní tangenciální stěny. Vrstva suberinu se dále rozšiřuje, až se rozkládá podél celé tangenciální stěny. Ukládání pokračuje i v radiálních stěnách až do hranice Casparyho proužku, který brání svou pevnou asociací buněčné stěny s plasmatickou membránou ukládání suberinu. Na okrajích Casparyho proužku následně dochází

k pozorované časté invaginaci plasmatické membrány, akumulaci velkého množství váčků v prostoru mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou a k akumulaci suberinu (Ma a Peterson 2001a). Hromadění suberinu způsobí oddělení plasmatické membrány od buněčné stěny v místech Casparyho proužku. Suberin se tedy může ukládat mezi buněčnou stěnu a plasmatickou membránu. Mezitím „opožděná“ suberinová lamela, jež se zakládá na vnitřní tangenciální straně, dosáhne okraje Casparyho proužku a stejným způsobem jako „první lamela“ pokračuje ve svém rozšiřování i přes Casparyho proužek. Výsledně se nachází suberinová lamela v celé šířce Casparyho proužku. Plasmatická membrána přilne po svém oddělení od buněčné stěny k lamele, obnoví se však pevná asociace plasmatické membrány a buněčné stěny v místech Casparyho proužku, která je typická pro endodermis v prvním vývojovém stavu.

V místech Casparyho proužku však může v rozporu s navrženým modelem suberinová lamela chybět, či je podstatně tenčí (Clarkson a Robards 1975). Dřevnaté krytosemenné (např. *Quercus suber*) nemají ve střední části Casparyho proužku suberinovou lamelu, zatímco bylinné dvouděložné (např. *Ranunculus acris*) mají lamelu po celé délce proužku (Scott a Peterson 1979, převzato z Verdaguer a Molinas 1997; Verdaguer a Molinas 1997). Po uložení suberinové lamely, tedy po vytvoření druhého vývojového stavu, již nedochází k „band plasmolysis“, ale dojde k přerušení pevné vazby buněčné stěny a plasmatické membrány (Ma a Peterson 2001a). Je tedy velmi pravděpodobné, že se suberinová lamela nachází i v místech Casparyho proužku, jak ukazuje navržený model (Obr. č. 7) (Ma a Peterson 2001a).

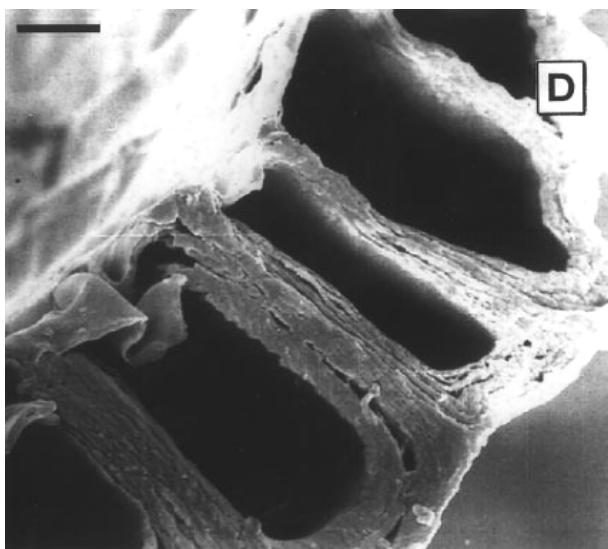
Ukládání suberinové lamely je na rozdíl od prvního vývojového stavu asynchronním procesem (Clarkson a Robards 1975, Lux a Luxová 2003).



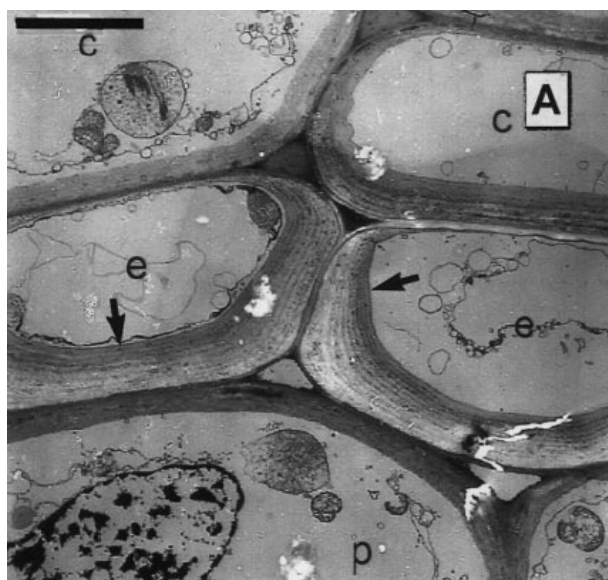
Obr. č. 7 Model procesu vytváření suberinové lamely u kořenů *Allium cepa*. Popis k obrázku v textu. Černá linka – suberinová lamela, tečkovaná linka – plasmatická membrána, černý pruh – Casparyho proužek, šedivě – buněčná stěna. b) Šipka značí okraj Casparyho proužku, c) šipka ukazuje na místo hromadění suberinu, d) šipka označuje ukládání suberinu mezi buněčnou stěnu a plasmatickou membránu v místech Casparyho proužku. (Ma a Peterson 2001a)

2.1.4 Stav č. 3 – terciární stěna

K ukládání terciární ztlustlé celulózové stěny (Obr. č. 6, Obr. č. 9 - Obr. č. 10) dochází ihned po vytvoření suberinové lamely (Verdaguer a Molinas 1997, Ma a Peterson 2001a),



Obr. č. 8 Detail izolované endodermální buňky *Iris germanica*. Patrná rozsáhlá depozice materiálu terciární buněčné stěny hlavně v místech radiální a vnitřní tangenciální stěny buňky. 1900x, úsečka = 5 µm (Zeier a Schreiber 1998)



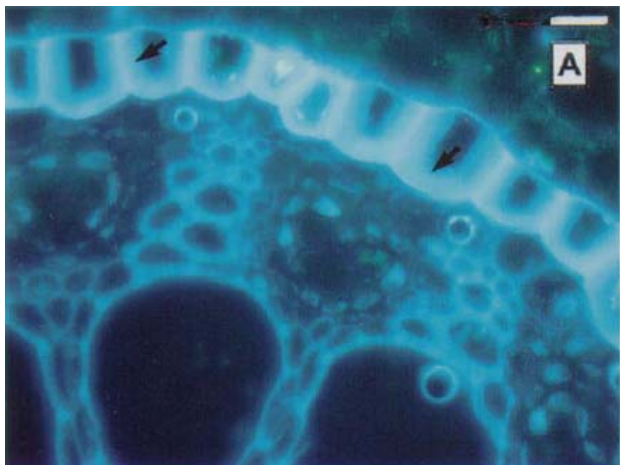
Obr. č. 9 Příčný řez kořenem *Allium cepa*. Dvě endodermální buňky v třetím vývojovém stavu. Šípkami je označena terciární buněčná stěna „U“ typu. 3000x, úsečka = 5 µm (Zeier a Schreiber 1998)

jedná se o proces asynchronní (Clarkson a Robards 1975, Lux a Luxová 2003). Terciární stěna se ukládá u mnohých jednoděložných a několika druhů dvouděložných. Většina dvouděložných však vůbec terciární stěnu nevytváří (Enstone a kol. 2003). Stejně jako u druhého vývojového stavu, ani v tomto vývojovém stavu nedochází u endodermálních buněk k přerušení plasmodesmů, popřípadně depozici terciární buněčné stěny v oblasti primárních políček plasmodesmů (Clarkson a kol. 1971, Ma a Peterson 2001a).

Terciární buněčná stěna je tvořena polysacharidy (Po degradaci jsou detekovány především monomery glukózy a arabinózy.) a často impregnovaná ligninem. Suberinu se v této fázi ukládá podstatně méně než v druhém vývojovém stavu (Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b, Schreiber a kol. 1999, Zeier a Schreiber 1999, Zimmermann a kol. 2000).

K vytváření terciární buněčné stěny dochází u *Quercus suber* přibližně ve vzdálenosti cca. 200 mm od kořenové špičky (Verdaguer a Molinas 1997), u

Primula acaulis pak ve vzdálenosti 60 mm od vrcholu kořene, tedy v místě, kde začíná u *Primula acaulis* sekundární růst kořene (Lux a Luxová 2003).



Obr. č. 10 Příčný řez kořenem *Iris germanica* pod UV excitací (365 nm) ukazující vrstvu endodermálních buněk. Casparyho proužky v radiální buněčné stěně vykazují silnou autofluorescenci, třetí vývojový stav, tedy terciární buněčná stěna v místech radiální a vnitřní tangenciální stěny, jeví slabší autofluorescenci (označeno šipkou). 400x, úsečka = 20 μm (Zeier a Schreiber 1998)

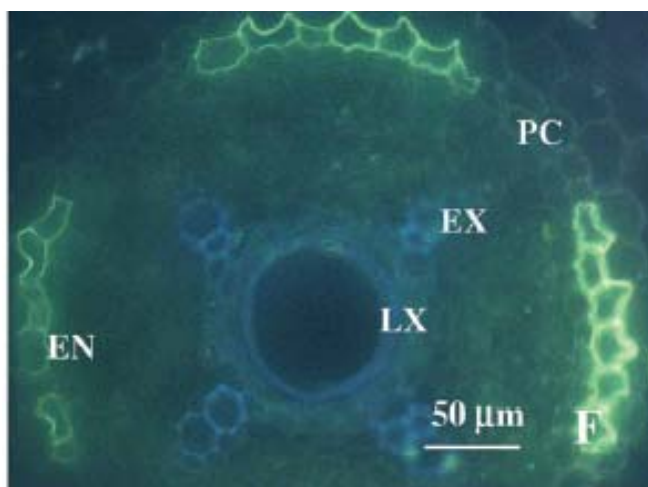
Podle tvaru výsledné depozice terciární buněčné stěny se obvykle u rostlin rozlišují dva typy ztlustlin: a) „C“ typ (Clarkson a Robards 1975), či také označení „U“ typ (Zeier a Schreiber 1999) – na vnější tangenciální straně endodermální stěny je celulózová stěna tenčí než na vnitřní – tedy dochází k ukládání materiálu buněčné stěny hlavně na radiální a vnitřní tangenciální stěně. Tato forma se vyskytuje hlavně u trav. b) „O“ typ – stěna je uložena rovnoměrně v rámci celé buňky (Clarkson a Robards 1975).

U *Primula acaulis* koreluje s třetím vývojovým stavem obnovení antiklinálního dělení u endodermálních buněk, které začíná po asynchronní suberizaci, má také asynchronní charakter (Lux a Luxová 2003). Toto antiklinální dělení je reakce na zvětšování průměru středního válce způsobeného činností kambia. Endodermis je u tohoto druhu jedinou vrstvou primární kůry, u které se zvětšuje průměr středního válce nejen zvětšováním buněk, ale i přídatným dělením buněk, čímž dochází k zvyšování počtu buněk v endodermální vrstvě buněk a zvětšuje se obvod endodermis.

2.1.5 Propustné buňky („passage cells“) u endodermis

Jedná se o endodermální buňky, u nichž vývoj dosáhl pouze prvního vývojového stavu, tedy vytvoření Casparyho proužků (Obr. č. 11). Může se jednat pouze o dočasnou situaci, vývoj těchto buněk může být pouze zpožděn, např. jako u endodermálních buněk nacházejících se v blízkosti xylému, jež jsou obklopeny buňkami pozdějších vývojových stádií. U *Quercus suber* postupně ubývá s rostoucí vzdáleností od kořenové špičky množství propustných buněk, tj. dochází se zpožděním k vytváření suberinové vrstvy u těchto buněk. Ve vzdálenosti 80 mm již nejsou přítomny žádné propustné buňky (Verdaguer a Molinas 1997). U některých druhů rostlin (např. zástupci Iridaceae) se naopak nachází tzv. „permanent passage cells“, jež nikdy nezískají suberinovou lamelu a terciární stěnu (Clarkson a Robards 1975).

Pro představu lze uvést srovnání počtu propustných buněk ve vzdálenosti 200 mm od kořenové špičky u *Cucumis sativus* (2 - 5 propustných buněk) a *Cucurbita ficifolia* Bouche (20 – 24 propustných buněk) (Lee a kol. 2005).



Obr. č. 11 Příčný řez kořenem *Cucurbita ficifolia* Bouché 200 mm od kořenové špičky. Obarvení pomocí fluorol yellow 088. Propustné buňky (PC) se nebarví. EN – endodermis, EX – časný metaxylem, LX – pozdní metaxylem. Fluorescenční mikroskop (390 – 420 nm) (Lee a kol. 2005)

Přítomnost propustných buněk ve vrstvě endodermálních buněk zvyšuje propustnost kořene pro transport vody směrem do středního válce. Propustné buňky jsou důležité i v případě, kdy dochází k odumírání epidermis a primární kůry a endodermis se stává vnější vrstvou kořene. V tomto procesu došlo k redukci absorpční plochy pro příjem iontů pouze na vnější tangenciální stěnu endodermálních buněk. Předpokládá se, že po uložení suberinové lamely v endodermis

zůstává vnější tangenciální stěna propustných buněk jediným místem, kde může dojít k příjmu iontů do symplastu (Peterson a Enstone 1996). Je však nutné vzít v úvahu, že k odumírání vnějších vrstev kořene dochází obvykle v době, kdy jsou již vyvinuté laterální kořeny.

2.2 Rostlinný cytoskelet s detailnějším pohledem na mikrotubuly

2.2.1 Mikrotubuly, jejich vznik a uspořádání

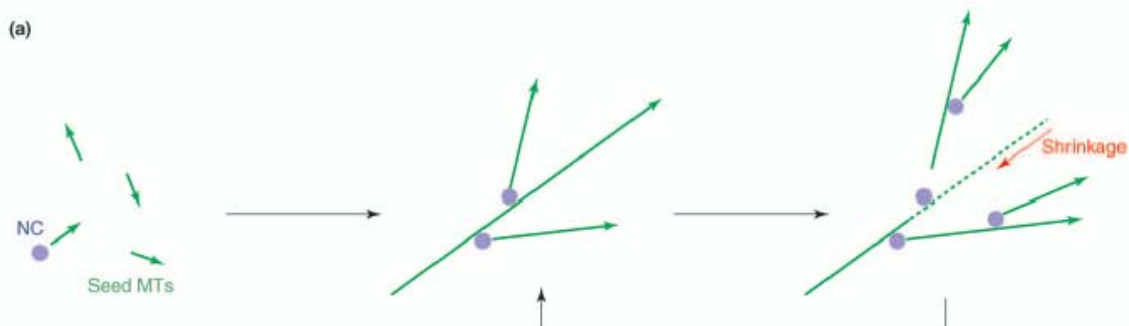
Cytoskelet je síť navzájem propojených vláknitých polymerů proteinového charakteru. Tato struktura zajišťuje v buňce důležité funkce. Je zodpovědná za prostorové uspořádání buněčných organel, slouží pro transport vnitrobuněčných struktur, určuje pohyb stavebních prvků, ale i celé buňky, zúčastňuje se formování tvaru buněk. Neopomenutelná role cytoskeletu je i jeho účast v přenosu informací. U rostlin je cytoskelet nepostradatelný v procesu mitózy a meiózy, v dělení buněk a ukládání buněčné stěny, v prodlužování a diferenciaci buněk. Cytoskelet je tvořen mikrotubuly, mikrofilamenty a intermediálními filamenty. Všechny tyto složky jsou velice dynamické struktury, které podstupují neustálé procesy polymerace a depolymerace (např. Alberts a kol. 1998, Buchanan a kol. 2006, Taiz a Zeiger 2006).

Následně bude podrobněji popsán **mikrotubulární cytoskelet**, jehož uspořádání bylo v rámci této diplomové práce sledováno v endodermálních buňkách kořene *Allium cepa*. Mikrotubuly jsou duté „trubice“ o průměru 24 nm sestavené z heterodimerů globulárního α - a β -tubulinu, které se nachází ve všech eukaryotických buňkách. Primární struktura mikrotubulů je u těchto buněk vysoce konzervovaná. Mikrotubuly jsou polarizovaný systém s minus koncem (místo depolymerace a pomalé polymerace) a s plus koncem (převážně místo polymerace). Růst mikrotubulů se uskutečňuje tedy hlavně na plus konci. Jak α -, tak i β -tubulin váže GTP (guanosintrifosfát), s nímž nasedají na plus konec mikrotubulů. V průběhu posunu heterodimeru v rámci mikrotubulu dochází u β -tubulinu k hydrolýze GTP na GDP (guanosindifosfát). GTP na α -tubulinu však zůstává. Tímto procesem se vytvoří na plus konci mikrotubulu tzv. GTP – čepička. Tato GTP – čepička stabilizuje mikrotubulus. Pokud dojde v oblasti čepičky k hydrolýze GTP, mikrotubulus se stává nestabilní a postupně dochází k jeho depolymeraci [proces tzv. „katastrofy“ („catastrophe“)]. Pokud mikrotubulus opět získá GTP – čepičku, obnoví se jeho růst [proces tzv. „záchrany“ („rescue“)] (Hashimoto 2003). Heterodimery α - a β -tubulinu jsou uspořádány v mikrotubulu do šroubovice, každá „řada“, tedy tzv. „protofilamenta“, obsahuje 13 heterodimerů na příčném řezu (Alberts a kol. 1998). Pro nukleaci je nezbytný γ -tubulinový kruhovitý komplex, tzv. γ -TuRC (γ -tubulin ring complex), v kterém je přítomno kromě 10 až 13 γ -tubulinových molekul (viz. dále) i několik dalších proteinů (např. Spc98) sloužících k lokalizaci proteinu a k zvýšení nukleární aktivity (Hashimoto a Kato 2006, Pastuglia a kol. 2006). U rostlin slouží γ -tubulin k vytváření a

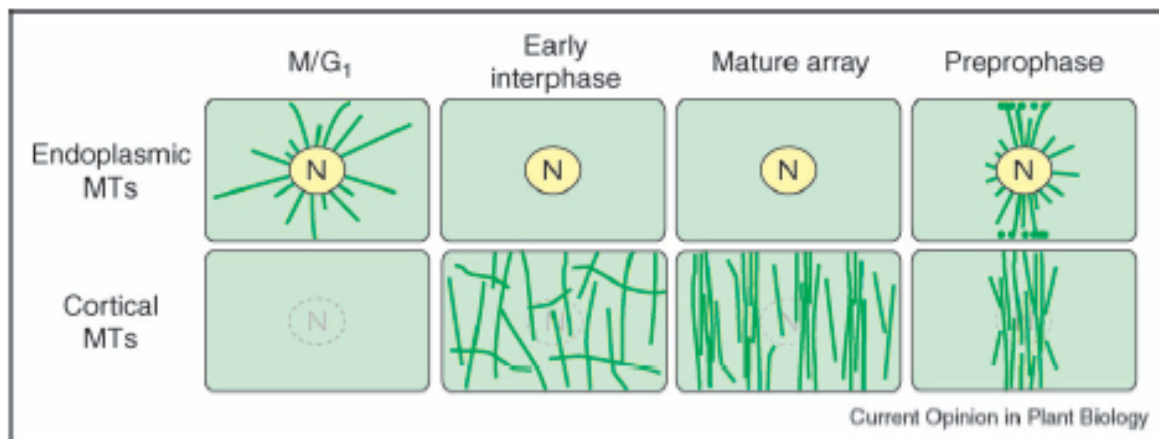
organizování uspořádání mikrotubulů v rámci jednotlivých fází buněčného cyklu (Pastuglia a kol. 2006).

U živočišných buněk se nachází tzv. organizační centrum mikrotubulů, kde je „ukotven“ minus konec mikrotubulů. Organizačním centrem může být centrosom u živočichů s centriolami a pericentriolárním materiálem či bazální tělísko (spodní část bičíku). Důležitou roli hraje γ -tubulin nacházející se v organizačním centru, který slouží jako počáteční bod pro polymeraci nových mikrotubulů (Eckardt 2006). Rostoucí mikrotubuly dosahují do kortikální oblasti buněk. Při růstu mikrotubulu dochází k depolymeraci rostoucího vlákna pouze ojediněle. Naopak v okrajových oblastech buněk podstupují mikrotubuly neustále fáze růstu a zkracování, jejich chování nabývá dynamické podoby (Komarova a kol. 2002). Tento proces se nazývá tzv. „dynamická nestabilita“, časové úseky růstu se tedy střídají s rychlým zkracováním mikrotubulů. U rostlin umožňuje dynamická nestabilita mikrotubulů neustálé „znovuvytváření“ uspořádání kortikálních mikrotubulů.

U rostlinných buněk na rozdíl od živočišných buněk chybí organizační centrum mikrotubulů. K nukleaci mikrotubulů dochází u rostlin na různých místech v buněčném kortexu přímo na stávajících mikrotubulech či i volně v cytoplasmě a na jaderné membráně. Mikrotubuly a jaderná membrána tedy mají v rostlinných buňkách nukleační aktivitu. Pro rostliny je tedy typický jiný způsob nukleace nových mikrotubulů, je to tzv. nukleace mikrotubulu závislá na mikrotubulu (microtubule – dependent microtubule nucleation) (Obr. č. 12). Tento typ nukleace byl nalezen i u kvasinek a řas [Inouye 1993, Janson a kol. 2005, převzato z Murata a Hasebe (2007).]

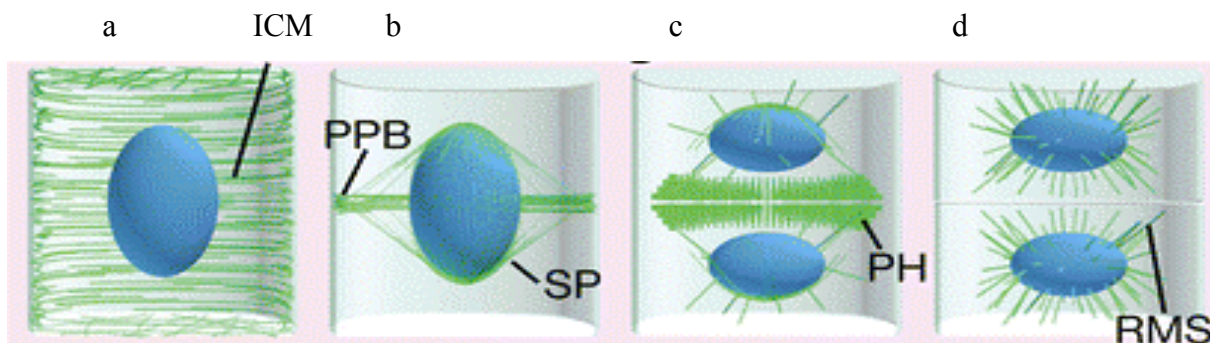


Obr. č. 12 Nukleace interfázních mikrotubulů. V časté fázi interfáze se objeví v kortexu buňky několik zárodků mikrotubulů. Není jasné, zda jsou nukleovány *de novo* nebo jsou transportovány od endoplasmatických mikrotubulů. Nové kortikální mikrotubuly se vytváří na již existujících mikrotubulech pod určitým úhlem. Vznikající nový mikrotubulus se odpojuje od nukleačního místa a pohybuje se směrem ke kortexu. Zdá se, že nukleační komplex zůstává na původním místě i po depolymeraci jeho nesoucího mikrotubulu a to v aktivním stavu. Šipky ukazují směr plus konce mikrotubulů. (Hashimoto a Kato 2006)



Obr. č. 13 Dynamická reorganizace rostlinných mikrotubulů během interfáze. Horní řada obrázků znázorňuje endoplasmatické mikrotubuly vycházející z jaderného obalu. Ty přispívají nejspíše k nukleaci kortikálních mikrotubulů a k formaci předprofázového prstence. Spodní panel charakterizuje změnu uspořádání kortikálních mikrotubulů. Vytváří se v rámci celé buňky, následně se pravidelně uspořádávají. (Hashimoto a Kato 2006)

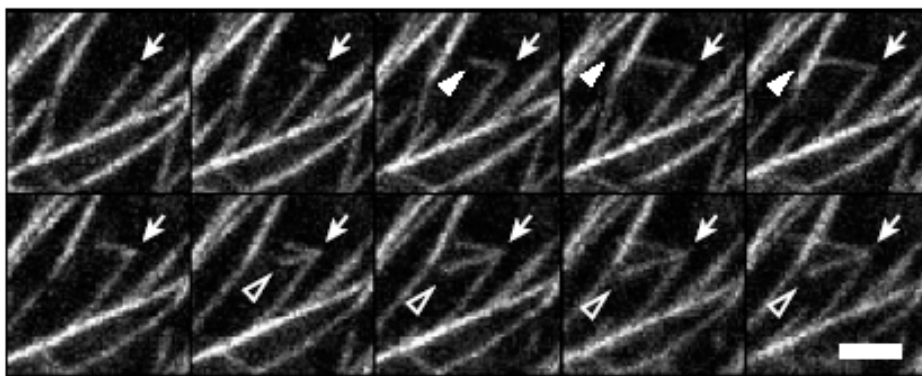
Nukleární aktivita, vázaná na již existující mikrotubuly, se uplatňuje v rostlinné buňce především během organizace tzv. kortikálního mikrotubulárního cytoskeletu. Kortikální mikrotubuly se v buňce vytváří v průběhu interfáze (Obr. č. 13, Obr. č. 14) a jde o svazky mikrotubulů probíhajících těsně pod plazmatickou membránou. Tyto mikrotubuly jsou nukleovány buď na stávajících mikrotubulech či volně v prostoru kortikální cytoplasmy (Obr. č. 12). V prvním případě jsou na stávajících mikrotubulech navázány γ -tubulinové komplexy, které dávají vznik novým mikrotubulům pod úhlem asi 40° . Původní mikrotubulus s vytvářenými novými mikrotubuly připomíná strukturu stromu, tzv. „tree-like organisation“ (Murata a Hasebe 2007). V druhém případě dochází k nukleaci na volných γ -tubulinových komplexech, které byly před nukleací taktéž asociovány s mikrotubuly, které však podstoupily depolymeraci. Mikrotubulární iniciály mohou být vytvářeny v kortikální cytoplasmě *de novo*, či jsou dopravené pomocí endoplasmatických mikrotubulů, vedoucích z jaderného povrchu ke kortexu buňky (Hashimoto a Kato 2006). Po iniciaci tvorby mikrotubulů se nové mikrotubuly oddělují od místa nukleace, vzniká však spojení s plazmatickou membránou nejspíše pomocí tzv. „plasma-membrane-associated protein linkers“ („propojující proteiny asociované s plazmatickou membránou“) (viz. dále). Jedním z těchto proteinů může být fosfolipáza D (PLD) asociující s mikrotubuly (např. Lloyd a Chan 2004, Hashimoto a Kato 2006).



Obr. č. 14 Pět uspořádání mikrotubulů v rostlinných buňkách. A) interfáze, b) pozdní profáze, c) telofáze, d) ihned po cytokinezi. Jádra obarvená modře, mikrotubuly zeleně. ICM – interfázové kortikální mikrotubuly, PPB – předprofázový prstenec mikrotubulů, SP – mikrotubuly vřeténka, PH – mikrotubuly fragmoplastu, RMS – radiální mikrotubulární systém. (Mineyuki 2007)

Tubulinová vlákna vytvářející se na γ -tubulinu se postupně oddělují od γ -tubulinu (Obr. č. 15) nejspíše pomocí heterodimerického enzymu kataninu, který „odřezává“ jak kortikální, tak i endoplasmatické mikrotubuly od jejich nukleačních míst (Lloyd a Chan 2004). I přes to však nejspíše zůstávají nové mikrotubuly navázány na plasmatické membráně (Hashimoto 2003). Pokud dojde k oddělení γ -tubulinu od samotného mikrotubulu, dochází k depolymeraci na minus konci, zatímco na plus konci přisedají nové dimery. Pokud je proces depolymerace na minus konci a polymerace na plus konci vyvážený, délka mikrotubulu se nemění, mění se však jeho pozice v rámci buňky. Tento proces umožňuje pohyb vlákna mikrotubulu. Dochází tedy k tzv. „treadmilling“, při kterém se jednotlivé jednotky tubulinu posunují v rámci mikrotubulu od plus konce k minus konci (např. Hashimoto 2003). U nově tvořených mikrotubulů může po jejich oddělení z γ -tubulinu dojít k úplné depolymeraci (Shaw a kol. 2003). Po oddělení nového mikrotubulu z iniciačního místa může dojít z daného místa k nové nukleaci, jak ukazuje Obr. č. 15. Další nový mikrotubulus vzniká často pod jiným úhlem než předchozí mikrotubulus vznikající ze stejného místa iniciace (Shaw a kol. 2003).

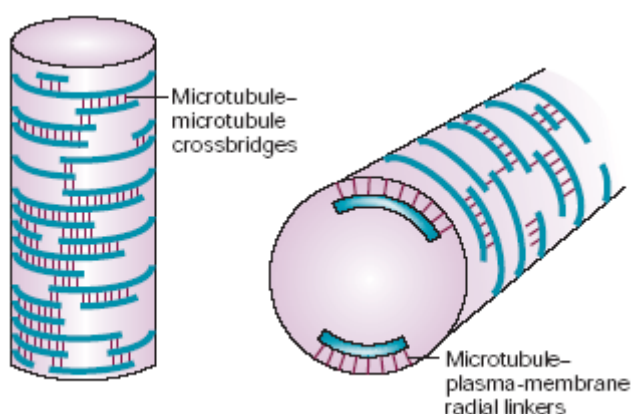
Jak se tedy zdá, jsou mikrotubuly nejdříve polymerovány, resp. vytvořeny a pak teprve uspořádány do správného vzoru. Toto podporují i četné pokusy s aplikací látek způsobujících depolymeraci mikrotubulů. Pokud se navodí zpět jejich polymerace, jsou nové mikrotubuly nejdříve uspořádány nepravidelně, teprve později zaujímají uspořádání typické pro daný typ a tvar buňky.



Obr. č. 15 Iniciacie mikrotubulů a jejich jednosměrný pohyb. Časová série dvou nových mikrotubulů (plný a nevyplněný trojúhelník) polymerujících z místa označeného šipkou v buněčném kortexu a oddělujících se od místa původu v různém úhlu. (Shaw a kol. 2003)

Dynamika mikrotubulů je v buňce řízena pomocí regulačních proteinů napojených na signální dráhy. Důležitou roli v dynamice mikrotubulů hrají i tzv. MAP-proteiny („Microtubule-associated proteins“, „proteiny asociující s mikrotubuly“). MAP-proteiny pomáhají při nukleaci, jsou zodpovědné za stabilizaci a destabilizaci mikrotubulů, propojují jednotlivé mikrotubuly ve svazcích, pomáhají navazovat mikrotubuly na buněčné složky (Wasteneys 2002). Hamada (2007) dělí MAP-proteiny do dvou skupin. První skupina proteinů se věnuje polymeraci a depolymeraci mikrotubulů, druhá pak organizaci struktury mikrotubulů a zprostředkování jejich funkce. Do první skupiny patří MAPs, které se váží na plus konec mikrotubulu, tzv. „plus-end-binding-proteins“. Je to např. SPIRAL1 (SPR1), který se váže i podél mikrotubulů (Paradez a kol. 2006), +TIPs (microtubule plus-end-tracking proteins) (Hamada 2007) či EB1 (END-BINDING PROTEIN1). Tyto proteiny se velice rychle odpojují, pokud mikrotubulus přestává růst. Na minus konci jsou navázány tzv. „minus-end-binding-proteins“ - např. Spc98 (Spindle pole body component 98). MAP-proteiny slouží i jako „vazači“ koncových komplexů proteinů mikrotubulů, které jsou zodpovědné za vazbu ke specifickým místům v buňce, např. ke kinetochoru (Hashimoto 2003, Hashimoto a Kato 2006). Uvažuje se i o vlivu těchto proteinů na směr sklonu závitů u helikálně uspořádaných mikrotubulů. Např. mutace u proteinu SPR1 v *Arabidopsis thaliana* vede k vytvoření levotočivé orientace mikrotubulů v helixu (Ishida a kol. 2007). Mezi MAPs proteiny patří i katanin, který odděluje rostoucí mikrotubulus z místa jeho nukleace (Wasteneys 2002). Specifickými MAPs jsou i tzv. motorové proteiny: kinesiny, dyneiny a myosiny. Zajišťují vnitrobuněčný transport, a to transporty váčků, organel, pohyb cytoplasmy a v době dělení buněk pohyb chromozómů. Právě kinesiny zprostředkovávají pohyb po mikrotubulech, přispívají i k uspořádání mikrotubulů. *Arabidopsis* obsahuje asi 61 genů kódující polypeptidy s kinesinovým katalytickým centrem (Lee a Liu 2004).

MAP-proteiny mohou hrát roli i ve svazování mikrotubulů (Wasteneys a Yang 2004, Oda a Hasezawa 2006), které je důležitou součástí uspořádání mikrotubulů. Mikrotubuly mohou být ve svazcích uspořádány vůči sobě v paralelním postavení nebo v antiparalelním, které pak vede k nejednotné polaritě celého svazku (Hamada 2007). Kortikální mikrotubuly jsou drženy mezi sebou pomocí můstků, tzv. „microtubule-microtubule crossbridges“ (Obr. č. 16), které jsou tvořené vlákny proteinu MAP65 o délce rovnající se přibližně šířce volného prostoru mezi dvěma mikrotubuly ve svazku (25 až 30 nm). Uvažuje se také o dalším



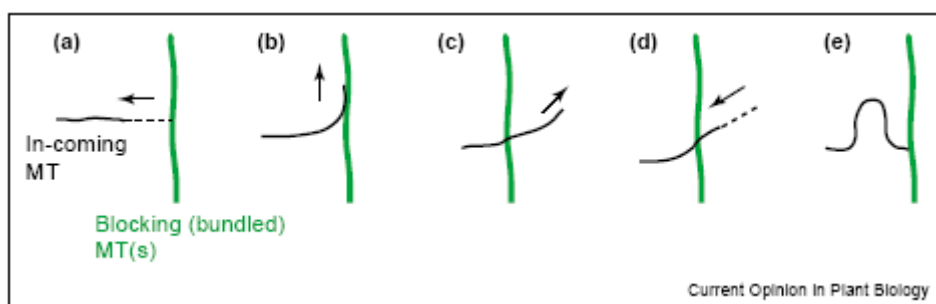
Obr. č. 16 Kortikální mikrotubuly v rostlinné buňce jsou rozmístěné po buněčném kortexu. Vzájemné propojení zajišťují můstky, tzv. „microtubule-microtubule crossbridges“, propojení s plasmatickou membránou pak proteiny „plasma-membrane-associated protein linkers“. (Lloyd a Chan 2004)

propojovacím proteinu, o tzv. TMBP200 (tobacco microtubule bundling protein 200), který je homologem proteinu MOR1 (MICROTUBULE ORGANIZATION 1). Jedná se taktéž o vláknitý protein avšak s délkou pouze 10 nm (Lloyd a Chan 2004). Mutant *Arabidopsis thaliana mor1* je mutant citlivý na teplotu, při růstu rostliny při teplotě vyšší

než 28°C dochází k rozpadu uspořádání kortikálních mikrotubulů a jejich fragmentaci. MOR1 má tedy nejspíše za úkol stabilizovat mikrotubuly (Ishida a kol. 2007) ale zároveň i kontrolovat délku mikrotubulu. Pokud je mikrotubulus delší, aktivuje tento protein proces dynamické nestability (Hamada 2007).

K uspořádání, resp. k přeuspořádání mikrotubulů v rámci rostlinné buňky dochází neustále. Princip uspořádání mikrotubulů z náhodně lokalizovaných mikrotubulárních vláken není objasněn. Při tomto procesu by mohl hrát důležitou roli kontakt mezi jednotlivými mikrotubuly, tedy co se stane, když jeden mikrotubulus narazí na druhý (Hashimoto 2003). Obr. č. 17 ukazuje na různé možnosti. Může dojít k depolymeraci mikrotubulu, který narazil svým plus koncem na překážku, resp. na jiný mikrotubulus, či může dojít k změně směru pohybu, popř. k deformaci narážejícího mikrotubulu. Výsledkem může být již výše zmíněná svazčitost mikrotubulů, resp. vytvoření či zesílení svazku mikrotubulů díky změně pohybu narážejícího mikrotubulu. Na úhlu „nárazu“ může záviset, zda dojde při nárazu na jiný mikrotubulus k rychlé depolymeraci či vytvoření svazku (Hashimoto a Kato 2006). Pokud je úhel tupý (nad 40°), dochází k rozpadu, resp. k částečné depolymeraci narážejícího

mikrotubulu, který může následně obnovit růst jiným směrem než byl směr původní. Ostrý úhel (pod 30°) naopak vede ke svazčitosti. Úhel „nárazu“ tedy pomáhá selektovat mikrotubuly o správné orientaci a následně „svazovat“ mikrotubuly do svazků. Uvažuje se i o možnosti překřížení mikrotubulů bez či s následnou depolymerací plus konce rostoucího mikrotubulu (Hashimoto 2003). Úlohu může hrát i asociace mikrotubulů s plasmatickou membránou, která může stabilizovat mikrotubuly. Např. při překřížení mikrotubulů dojde u jednoho z mikrotubulů ke krátkému oddělení od plasmatické membrány. To může vést ke ztrátě stability a již výše zmíněné depolymeraci, či dojde po překřížení k obnovení asociace s plasmatickou membránou. [Právě kontakt s plasmatickou membránou je pro mikrotubuly nezbytný. Pokud dojde ke ztrátě tohoto kontaktu, nastane velice často depolymerace mikrotubulu (Shaw a kol. 2003).] Všechny tyto procesy mohou vést k vytvoření paralelního samouspořádání mikrotubulů s minimalizací překřížení. Nejen schopnost samouspořádání mikrotubulů, ale i další buněčné regulace jsou nezbytné k vytvoření stejného uspořádání mikrotubulů v prodlužujících se buňkách (Hashimoto 2003).



Obr. č. 17 Možnosti výsledku kontaktu mikrotubulů. Jeden (černý) mikrotubulus roste proti jednomu (zelenému) mikrotubulu či svazku mikrotubulů, který blokuje jeho dráhu. A) Černý mikrotubulus depolymeruje. B) Černý mikrotubulus změni směr růstu a spojí se se zeleným. C) Černý mikrotubulus překříží zelený a pokračuje ve svém růstu. D) Černý mikrotubulus překříží zelený a začíná se rozpadat. E) Pokud je černý mikrotubulus stabilizovaný, může se po kontaktu se zeleným mikrotubulem prohnout. (Hashimoto 2003)

Přeměna uspořádání mikrotubulů může být tedy uskutečněna pomocí *de novo* polymerace v preferované orientaci a pomocí transportu endoplasmatických mikrotubulů do kortikální oblasti [Shaw a kol. (2003) považuje tento transport za minoritní.], pomocí selektivní stabilizace určitých mikrotubulů, pomocí pohybu polymerů motory z místa na místo („sliding“, tedy pomocí translokace) či pomocí pohybu na základě vlastní polymerační a depolymerační aktivity („treadmilling“) (Shaw a kol. 2003, Paradez a kol. 2006). Práce Shaw a kol. (2003) ukazuje, že mikrotubuly se pohybují hlavně pomocí polymerace a depolymerace a ne pomocí translokace. Translokace byla pozorována velice zřídka, pokud již

k translokaci došlo, jednalo se o velice pomalý proces. To samé nejspíše platí i pro celé svazky mikrotubulů.

Kortikální mikrotubuly byly poprvé u rostlin popsány v práci Ledbetter a Porter (1963). Jedná se o mikrotubuly nacházející se pod plasmatickou membránou v kortikální cytoplasmě. V prodlužující se buňce jsou kortikální mikrotubuly orientované kolmo k hlavní ose buňky (tzv. transverzální mikrotubuly). Mikrotubuly jsou navzájem uspořádány paralelně, lze však najít i mikrotubuly, které překřičují své sousedy. Pokud elongace buňky přestává, dochází k reorientaci mikrotubulů do podélného uspořádání, jako je tomu např. u parenchymatických buněk primární kůry kořene. Jako mezikrok mezi podélným a transverzálním postavením mikrotubulů je šikmé postavení. Ne u všech druhů rostlinných buněk je však uspořádání kortikálních mikrotubulů v interfázi stejné. Příkladem k výše zmíněným parenchymatickým buňkám mohou být laločnaté buňky epidermis, u kterých nelze pozorovat obecnou orientaci mikrotubulů. Mikrotubuly u nich spíše sledují tvar buněčné stěny (Paradez a kol. 2006).

Endoplasmatické mikrotubuly (nebo také „nucleus – associated microtubules“, „mikrotubuly asociující s jádrem“) vznikají na komplexech γ -tubulinu umístěných na povrchu jádra na přelomu M a G1 fáze buněčného cyklu (Obr. č. 13, Obr. č. 14) a dále rostou směrem k plasmatické membráně. Jejich funkcí je nejspíše distribuce γ -tubulinových komplexů z povrchu jádra do kortexu buňky, ne všechny buňky však vytváří endoplasmatické mikrotubuly (Lloyd a Chan 2004). Tento typ nukleace není nejspíše závislý na preexistujících mikrotubulech, protože jaderná membrána dokáže i bez přítomnosti mikrotubulů dát základy novým mikrotubulům [Stoppin a kol. 1994, převzato z Murata a Hasebe (2007)].

Mikrotubuly nabývají během buněčného cyklu různé uspořádání (Obr. č. 13 a Obr. č. 14). Jedná se o vytváření předprofázového prstence, dělicího vřeténka a fragmoplastu. V interfázi (G1, S, G2 fáze) tvoří větší část mikrotubulů právě kortikální mikrotubuly, menší počet mikrotubulů směřuje paprscitě od jádra buňky (endoplasmatické mikrotubuly). Na konci interfáze a začátku profáze větší část kortikálních mikrotubulů depolymeruje. Místo nich se vytváří tzv. **předprofázový prstenec**, který přetrvává až do rozpadu jaderné membrány. Předprofázový prstenec je útvar složený z mikrotubulů a mikrofilamentů. Nachází se pod plasmatickou membránou v místech, kde se po jaderném dělení bude během dělení buňky vytvářet nová buněčná stěna oddělující dceřiné buňky od sebe. Dále tvoří mikrotubuly **dělicí vřeténko**. Základ dělicího vřeténka u rostlin tvoří mikrotubuly paralelně uspořádané a

vycházející z dvou protilehlých bodů. Princip určení polohy těchto dvou bodů v buňce není dosud vysvětlen (Buchanan a kol. 2006). Následný proces mitózy u rostlin je podobný s mitózou živočichů. Při cytokinezi u rostlin je nutné vytvořit novou střední lamelu a buněčnou stěnu mezi dělicími se buňkami. Místo dělení je určeno předprofázovým prstencem a fragmoplastem. **Fragmoplast** je zodpovědný u rostlin za rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné. Jedná se o útvar vytvořený z mikrotubulů a aktinových filament. Mikrotubuly mají svůj minus konec v pólu vřeténka, resp. u nově vytvořeného jádra. Směřují kolmo k rovině dělení.

2.2.2 Kortikální mikrotubuly a celulózasyntáza

Otázka vlivu orientace kortikálních mikrotubulů na ukládání celulózových mikrofibril pomocí celulózasyntázy ležící v plasmatické membráně je stále nezodpovězena. Dlouho se předpokládalo, že kortikální mikrotubuly „vedou“ pohyb celulózasyntázy. Jedná se o tzv. hypotézu vedení mikrofibril (Smith a Oppenheimer 2005, Paradez a kol. 2006). Např. při diferenciaci tracheálních buněk je v prvních fázích uspořádán cytoskelet podélně k hlavní ose buňky. Před ukládáním sekundární buněčné stěny se však přeorientovává do transverzální polohy. Paralelně k tomuto uspořádání dochází následně k ukládání celulózních mikrofibril pomocí mobilního komplexu celulózasyntázy v plasmatické membráně. Při vytváření protoplastů z těchto buněk dochází po odstranění buněčné stěny k změně tvaru buněk. Kortikální mikrotubuly zůstávají propojeny s plasmatickou membránou, dochází však k jejich dezorientaci. Tento proces je následován i změnou směru posunu celulózasyntázy. Po indukci regenerace buněčné stěny dochází k opětovnému uspořádání mikrotubulů do transverzální polohy (Lloyd 1999). Tento proces je následován i změnou směru funkce celulózasyntázy. Energie na posun enzymového komplexu celulózasyntázy plasmatickou membránou je dodávána z polymerace celulózy. Celulózasyntáza tedy potřebuje být pouze vedena, třeba přímo či nepřímo pomocí interakce s kortikálními mikrotubuly (Smith a Oppenheimer 2005). Vedení celulózasyntázy pomocí mikrotubulů může být podpořeno vazbou komplexu celulózasyntázy na mikrotubuly (např. pomocí motorového proteinu kinesinu) či pouhou bariérou vytvořenou mikrotubuly pro pohyb komplexu enzymu tvořícího celulózu (Paradez a kol. 2006).

Celulózasyntáza ale nejspíše nepotřebuje pro produkci celulózy mikrotubuly (více Paradez a kol. 2006). Uspořádání mikrotubulů se díky „treadmilling“ velice rychle mění, mikrotubuly nezůstávají po delší čas ve stejném uspořádání. Celulózasyntáza, která se v porovnání s mikrotubuly pohybuje daleko pomaleji, dokáže vytvářet organizovanou

strukturu celulózy i po rozpadu kortikálních mikrotubulů (Smith a Oppenheimer 2005). Na druhé straně mají mikrotubulární svazky dlouhou životnost, což může podporovat výše zmíněnou teorii o „vedení“ celulózasyntázy pomocí mikrotubulů.

Hypotéza vedení mikrofibril neodpovídá v případě apikálního růstu pylové láčky a kořenových vlásků. Např. u kořenového vlásku není uspořádání svazků mikrotubulů paralelní k ukládání celulózy. Funkce kortikálních mikrotubulů je při apikálním růstu tedy nejspíše nezávislá na orientaci celulózových mikrofibril (Buchanan a kol. 2006, Wasteneys a Yang 2004).

Při prodlužování buňky se neukládá pouze celulóza, ale i ostatní složky buněčné stěny jako hemicelulózy, pektiny a stěnové proteiny, které se nesyntetizují přímo v plasmatické membráně, resp. v buněčné stěně, ale jejich složky musí být transportovány pomocí váčků k plasmatické membráně a dále do buněčné stěny. Byly nalezeny váčky nejen s vláknitým stavebním materiálem buněčné stěny, ale i váčky s komplexem celulózasyntázy, resp. s částicemi roset. Již Maitra a De (1971) [převzato z Oda a Hasezawa (2006)] referovali o vesikulech, které byly asociované k mikrotubulům pod sekundární buněčnou stěnou. Oda a Hasezawa (2006) však uvádějí, že ukládání hemicelulózy, xylanu a ligninu do buněčné stěny je nezávislé na mikrotubulech.

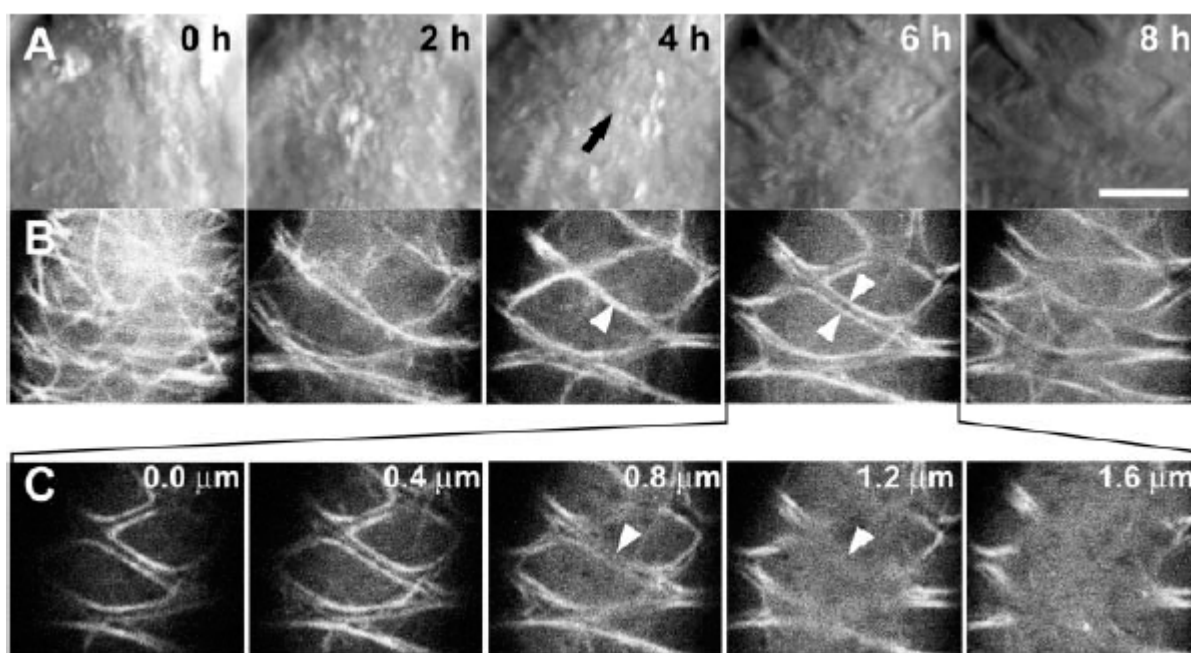
Mikrotubulární cytoskelet hraje významnou roli i při ukládání sekundární buněčné stěny. Příkladem jsou cévní články se ztloustlou a lignifikovanou sekundární buněčnou stěnou, která vykazuje celou škálu nejrůznějších vzorů. Pro dosažení specifických vzorů je nutná přítomnost regulačních mechanismů ukládání sekundární buněčné stěny, které mají vymezit oblast plasmatické membrány, kde dojde k depozici materiálu do buněčné stěny. Jsou také zodpovědné za vytvoření přesných a ostrých hranic sekundární buněčné stěny a řídí paralelní ukládání celulózových mikrofibril. Otázkou je, zda je toto ukládání vedeno sítí mikrotubulů nebo třeba sítí již existujících celulózových mikrofibril. Emons a Mulder (1998) předpokládají přítomnost tzv. aktivačních domén, kde dochází k exocytóze váčků nesoucích celulózasyntázu do plasmatické membrány.

Mezofylové buňky *Zinnia elegans* v suspenzní kultuře po vhodné aktivaci podstupují diferenciaci v cévní články, která je semisynchronní. Při tomto procesu dochází ke změně orientace mikrotubulů z podélné pozice do pozice transverzální [Fukuda a Kobayashi 1989, převzato z Oda a kol. (2005)]. Kortikální mikrotubuly jsou nezbytné pro založení tvaru budoucí buněčné stěny, resp. pro ohraničení daného okrsku plasmatické membrány a při prvních krocích depozice sekundární buněčné stěny. Pokud je však již vzor budoucí buněčné stěny založen a dochází k ukládání jejích složek, nejsou již mikrotubuly potřeba k udržení

správné depozice. V pozdějších fázích ukládání sekundární buněčné stěny hrají roli samotné celulózové mikrofibrily, které přejímají roli v udržení vymezených hranic plasmatické membrány. Celulózové mikrofibrily mají také stabilizovat síť kortikálních mikrotubulů v prvních fázích depozice buněčné stěny. Ještě před ukončením depozice složek sekundární buněčné stěny dochází k rozpadu sítě kortikálních mikrotubulů (Roberts a kol. 2004).

V buněčné suspenzi *Arabidopsis thaliana*, jejíž buňky stabilně exprimovaly tubulin v translační fúzi s GFP, byla indukována diferenciace v tracheální elementy a během tohoto procesu sledována změna mikrotubulárního cytoskeletu *in vivo* (Obr. č. 18) (Oda a kol. 2005). Nepravidelně uspořádané kortikální mikrotubuly postupně vytvořily široké svazky. V místech, kde se vytvořily tyto svazky mikrotubulů, začalo postupně ukládání sekundární buněčné stěny. Nejdříve docházelo k přeuspořádání kortikálních mikrotubulů, teprve pak došlo k ukládání sekundární buněčné stěny. Počet mikrotubulů, které se uspořádají v místě budoucí sekundární buněčné stěny, odpovídá rozsahu uložené sekundární buněčné stěny (Oda a Hasezawa 2006). S rozšířením a ztloustnutím sekundární buněčné stěny dochází k rozdělení širokého svazku mikrotubulů na dva svazky, které se následně nacházejí pod oběma okraji sekundární buněčné stěny ukládané směrem do buňky. Oba svazky mikrotubulů se od sebe v průběhu depozice sekundární buněčné stěny postupně vzdalují. Uprostřed pod vytvořenou sekundární buněčnou stěnou již nejsou kortikální mikrotubuly přítomny (Obr. č. 18). Po ukončení depozice sekundární buněčné stěny dochází k přeskupení mikrotubulů a následně k jejich rozpadu. Není však pravidlem, že všechny svazky mikrotubulů začnou indukovat ukládání sekundární buněčné stěny. Kromě samotné přítomnosti mikrotubulů je nejspíše důležitý i oboustranný kontakt mezi mikrotubuly a buněčnou stěnou (Oda a Hasezawa 2006).

Po aplikaci kolchicinu (inhibitor polymerace mikrotubulů) na buňky během nejranějších fází vzniku sekundární buněčné stěny došlo k abnormální depozici sekundární buněčné stěny (Oda a kol. 2005). Po aplikaci mikrotubuly stabilizující látky taxolu na jiné buňky došlo k vytvoření jednoduchého, šikmého vzoru sekundární buněčné stěny. Sekundární buněčná stěna však byla užší, což bylo nejspíše způsobeno nemožností rozdělit svazek mikrotubulů na dva (taxol zabraňuje dynamice mikrotubulů). Svazky mikrotubulů jsou tedy důležité nejen k určení vzoru budoucí sekundární buněčné stěny, ale i v samotném procesu jejího ukládání (Oda a kol. 2005). Nejspíše hrají i roli v rozdělení plasmatické membrány na domény, kde bude docházet k ukládání sekundární buněčné stěny a kde ne, resp. jaká část plasmatické membrány bude mít specifickou afinitu pro transportní váčky s materiálem [Hogetsu 1991, převzato z Roberts a kol. (2004) a Oda a kol. (2005)].



Obr. č. 18 Časové pozorování buněk *Arabidopsis thaliana* exprimujících GFP-tubulin při ukládání sekundární buněčné stěny v a) světlém poli (BF) a b) s GFP-tubulinem. V každém časovém úseku bylo nasnímáno konfokálním mikroskopem pět optických řezů s intervalem 0,4 μm . Maximální projekce. Černá šipka ukazuje na tvořící se sekundární buněčnou stěnu, trojúhelník na svazky mikrotubulů. C) Pět optických rovin z bodu b) z časového úseku šesti hodin. Pod sekundární buněčnou stěnou (trojúhelník) nejsou pozorovatelné mikrotubuly. Délková úsečka = 5 μm . (Oda a kol. 2005)

Existují tedy alespoň čtyři alternativy možné spolupráce mikrotubulů a celulózasyntázy. První ukazuje na nutnost přítomnosti mikrotubulů pro aktivitu celulózasyntázy. Druhá alternativa uvažuje spíše o funkci mikrotubulů jako koordinátorů ukládání celulózy, resp. že mikrotubuly slouží pro transport ostatních složek buněčné stěny. Třetí alternativa považuje mikrotubuly za pomocníky při koncentrování a organizování komplexu celulózasyntázy. Čtvrtá alternativa uvažuje o nutnosti přítomnosti dynamicky se měnícího uspořádání mikrotubulů a jeho vedení pro vytvoření měnícího se vzoru ukládání celulózy, který je důležitý pro expanzi buněčné stěny (Paradez a kol. 2006).

2.2.3 Buněčné kontinuum: mikrotubuly, plasmatická membrána, buněčná stěna

Pro buňky je důležité dokázat reagovat na podněty z vnějšího prostředí, kterým je u živočišných buněk extracelulární matrix a u rostlinných buněk buněčná stěna. Je důležité zajistit i mechanické propojení plasmatické membrány s extracelulární matrix, resp. buněčnou stěnou. V evoluci došlo u živočišných buněk k vytvoření tzv. buněčného kontinua, tedy strukturního a funkčního propojení extracelulární matrix s cytoskeletem přes plasmatickou membránu. Mezibuněčné spoje dělíme u živočišných buněk na tzv. těsné spoje (tight junctions, occluding junctions), adhezivní spoje (anchoring junctions) a vodivé spoje

(communicating junctions) (Alberts a kol. 1994). U živočišných buněk jsou těsné spoje založeny na funkci klaudinů a okludinů, mezi adhesivní spoje patří spoje napojené na aktinový cytoskelet (např. adhezivní pás či fokální kontakty) a na intermediální filamenta (desmozómy a hemidesmozómy). Podstatou propojení dvou plasmatických membrán jsou proteiny kadheriny, podstatou propojení buňky s extracelulární matrix jsou transmembránové proteiny integriny. Mezi vodivé spoje u živočišných buněk patří konexony (Alberts a kol. 1994, 1998). O přítomnosti buněčného kontinua u rostlinných buněk není mnoho známo. Výše zmíněné rozdělení mezibuněčných spojů se u rostlin nepoužívá, i když lze najít z funkčního hlediska paralely: Příkladem vodivých spojů mohou být u rostlinných buněk plasmodesmy, příkladem adhesivních spojů Hechtovy vlákna a příkladem těsného spoje právě Casparyho proužek v endodermis.

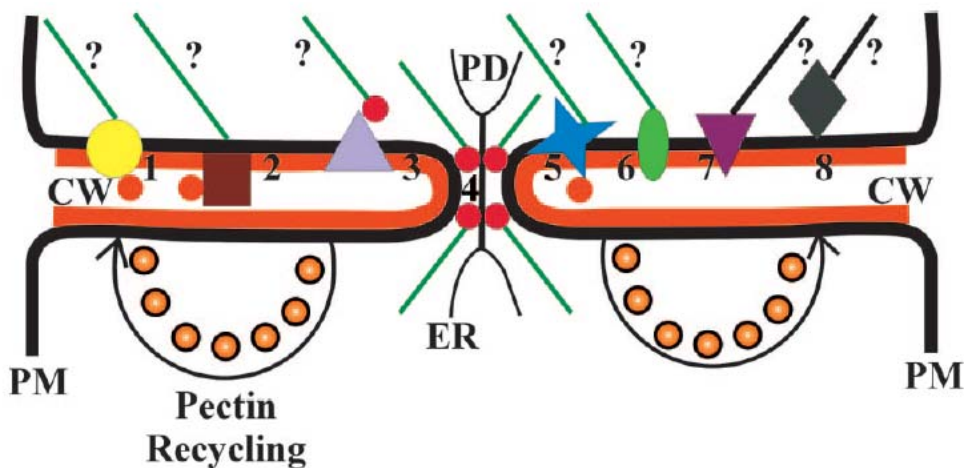
Mechanické propojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou je možné pozorovat např. při plasmolýze buněk, kdy právě s výjimkou určitých oblastí plasmatické membrány, kde se nacházejí Hechtova vlákna, dochází k její separaci od buněčné stěny. Pokud buňka obsahuje více úzkých oblastí plasmatické membrány s Hechtovými vlákny, je více odolná plasmolýze. Pokud se nachází v buňce méně těchto oblastí, i když širších, dochází k větší plasmolýze (Lang a kol. 2004). Pevné propojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou je přítomno i v endodermis v podobě Casparyho proužku. Otázkou zůstává, zda je možné najít nějaké strukturní paralely s Hechtovými vlákny.

Propojení plasmatické membrány a buněčné stěny Casparyho proužku může být založeno na propojení proteinů v buněčné stěně s proteiny plasmatické membrány (Clarkson and Robards 1975), které mohou komunikovat s buňkou na základě jejich interakce s rostlinným cytoskeletem. U rostlinných buněk však chybí informace o propojovacích článcích mezi cytoskeletem a buněčnou stěnou. Dle databáze genomu *Arabidopsis* [Arabidopsis Genome Initiative 2000, převzato z Baluška a kol. (2003) a z Lang a kol. (2004)] postrádají rostliny, resp. *Arabidopsis* řadu adhesivních proteinů přítomných u živočišných buněk, tedy např. integriny a kadheriny. Rostlinné buňky neobsahují ani proteiny asociované s aktinem, které propojují integriny s aktinovými mikrofilamenty u živočišných buněk [Hussey a kol. 2002, převzato z Baluška a kol. (2003)]. Zdá se však, že rostlinné buňky obsahují specifické integrin-like receptory (Faik a kol. 1998). Pokusy s aplikací polyklonálních protilátek proti živočišným, resp. lidským integrinům na rostlinný materiál ukázaly, že rostliny obsahují látky strukturně podobné integrinům, tzv. integrin-like proteiny. Tyto proteiny nejspíše zprostředkovávají vazbu plasmatické membrány k buněčné stěně např. u buněk *Zea mays*, kde je tato interakce důležitá pro vnímání osmotického stresu (Lü a kol.

2007), či v pylové láčce (výzkum u několika druhů rostlin), kde hrají roli při jejím apikálním růstu (Sun a kol. 2000).

V pevném propojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou může mít důležitou funkci cytoskelet. Ten je nejspíše zodpovědný za definování kontaktního místa plasmatické membrány s buněčnou stěnou (Kohorn 2000). Je však otázkou, zda to bude výhradně aktinový cytoskelet jako u živočichů. Na rozdíl od živočišných buněk jsou aktinová filamenta v rostlinné buňce zodpovědná hlavně za intracelulární pohyb. Kortikální mikrotubuly pak mají roli hlavně v kontrole tvaru buněk nejspíše včetně ukládání celulósových mikrofibril.

Pevné propojení plasmatické membrány a rostlinné buněčné stěny v Casparyho proužku může být podmíněno přítomností proteinů plasmatické membrány a proteinů buněčné stěny (Obr. č. 19). Může se jednat o transmembránové proteiny (např. kinázy asociované s buněčnou stěnou, tzv. „wall-associated kinases“; celulózasyntáza), o proteiny, jež jsou spojeny s plasmatickou membránou např. pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (např. arabinogalaktanproteiny, forminy), o proteiny buněčné stěny, které jsou připojeny k plasmatické membráně přes další spojovací články (např. extenziny), ale i o proteiny cytoplasmy, které mají napojení na plasmatickou membránu (např. rostlinný myosin VIII vázající se na aktinový cytoskelet a přímo, či nepřímo na kalózasyntázu; fosfolipáza D) (např. Johnson a kol. 2003; O'Neill a York 2003; Riese a kol. 2003, Baluška a kol. 2003).



Obr. č. 19 Možnosti propojení buněčné stěny s cytoskeletem na modelu dvou kořenových buněk s jedním plasmodesmem (PD), kterým prochází endoplasmatické retikulum (ER). Rostlinný myosin třídy VIII (červené kolečko a č. 4) se nachází na okrajích plasmodesmu, kde může sloužit jako propojovač aktinových filament s kalózasyntázou (č. 3). Adhesivní pektiny (oranžová barva) v buněčné stěně (CW) lemují vnější část plasmatické membrány (PM). Šipka znázorňuje jejich endocytózu (recyklaci). Pektiny mohou interagovat s proteiny asociovanými s buněčnou stěnou (č. 1), s jinými „receptor-like kinázami“ (č. 5) a s arabinogalaktanproteiny (č. 2). Dále mohou hrát roli v propojení buněčné stěny s mikrotubuly (černá linka) a s mikrofilamenty (zelená linka) následující látky: formin (č. 6), celulózasyntáza (č. 7), fosfolipáza D (č. 8). (Baluška a kol. 2003)

Wall-associated kinases (WAK) jsou transmembránové proteiny s cytoplasmatickou kinázovou serin-threoninovou doménou a s variabilní extracelulární doménou. Pokud je tato kináza fosforylovaná, váže se na stěnové pektiny asociované s plasmatickou membránou. WAK může být receptorem pro endocytózu adhesivních stěnových pektinů (Baluška a kol. 2003). Kohorn (2000) uvádí, že jedna z pěti izoform kinázy se váže v buněčné stěně k proteinům bohatým na glycin (GRP). WAK-like kinázy mohou být důležité pro interakce mezi buněčnou stěnou a cytoskeletem. O možné interakci samotných stěnových kináz s cytoskeletem se doposud nic neví [Verica a He 2002, převzato z Baluška a kol. (2003)].

Arabinogalaktanproteiny (AGP) jsou proteoglykany, u nichž cukry tvoří až 90% celkové molekuly (Kohorn 2000). Na rozdíl od WAK se nejedná o transmembránové proteiny, nýbrž jsou do membrány uchyceny pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (Johnson a kol. 2003). AGPs se váží na stěnové peptidy [Nothnagel 1997, převzato z Baluška a kol. (2003)]. AGPs mohou být přes proteiny plasmatické membrány připojeny nejen k mikrotubulům, ale i aktinové síti. Sardar a kol. (2006) se domnívají, že AGPs mohou být k cytoskeletu připojeny přímo, tedy navázáním na transmembránové proteiny, či nepřímo pomocí připojení k lipidovým raftům plasmatické membrány. K AGPs následně mohou být napojeny i ostatní složky buněčné stěny jako např. WAKs, celulózasyntáza nebo fosfolipáza D.

Fosfolipáza D (PLD) se zdá být důležitou molekulou v propojení plasmatické membrány a právě kortikálních mikrotubulů (Gardiner a kol., 2001). Připojení kortikálních mikrotubulů k plasmatické membráně je zprostředkováno komplexem tohoto enzymu s kyselinou fosfatidovou (Dhonukshe a kol. 2003). Aktivace PLD pomocí aktivátoru n-butanolu vedla k uvolnění kortikálních mikrotubulů z plasmatické membrány a k jejich částečné depolymeraci. I další aktivátoři PLD způsobili reorganizaci kortikálních mikrotubulů. Zdá se tedy, že právě aktivace PLD způsobuje změnu uspořádání mikrotubulů. Toto potvrdily i pokusy s inhibitory polymerace a depolymerace mikrotubulů, které měly vliv na mikrotubuly, avšak neovlivnily aktivitu proteinů PLD (Dhonukshe a kol. 2003).

Forminy jsou kandidátem na propojení aktinového cytoskeletu s buněčnou stěnou. Většina forminů nalezených u *Arabidopsis* je integrálním membránovým proteinem. Některé forminy mohou i nepřímo interagovat s mikrotubuly (Cvrčková 2000).

Mikrovlny

Využití mikrovlnného záření je velmi široké od oblasti komunikací až po úpravu potravin. V laboratorní technice se mikrovlny používají např. také při fixaci [zrychlení fixace, zachování antigenicity (Login a kol. 1995)], dehydrataci, zalévání do parafinu, sušení řezů po krájení na mikrotomu, imunoznačení, v speciálních barvicích technikách (zkrácení barvicího času) a v *in situ* hybridizacích (<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/7361/handh2100microwave2.pdf>, duben 2007).

Za mikrovlny považujeme relativně úzkou oblast spektra elektromagnetického vlnění o kmitočtu od 0,3 do 30 GHz s vlnovou délkou v intervalu 0,01 až 1 m (podrobnější informace z oblasti fyziky viz. Fuka a kol. 1965; Vanovič a kol. 1969; Radiation, Elektromagnetická pole 1999). Mikrovlny patří mezi neionizující záření o nízké energii (10^{-3} eV) (Hájek 2006). To znamená, že nenarušují pevnost chemické vazby v molekulách.

V laboratorních pokusech se využívá pro aplikaci mikrovln na vzorek mikrovlnná trouba. Frekvence mikrovlnného záření v troubě je 2,4566 GHz, jeho vlnová délka pak 12,2 cm. Elektromagnetické vlny jsou v prostoru trouby odraženy a absorbovány. Odražení lze pozorovat např. u předmětů z kovu. Mikrovlny nemají schopnost procházet kovem ani být jím absorbovány. Materiály jako např. sklo, plast a vzduch umožňují pronikání vln, protože mají zanedbatelnou vodivost. Třetím druhem materiálů jsou polární látky, např. voda. Voda má na základě svého charakteru dipólu možnost pohlcovat mikrovlnné záření. Molekuly vody se v elektrickém poli uspořádávají svou zápornou částí (atomem kyslíku) ke kladnému pólu a svou kladnou částí (vodíky) k zápornému pólu. U mikrovlnné trouby se jedná o střídavé elektromagnetické záření, tedy amplituda dosahuje během jednoho cyklu nulové, minimální a maximální hodnoty (Fuka a kol. 1965). V mikrovlnné troubě se mění polarita $2,45 \cdot 10^9$ krát za sekundu. Tento trend se snaží sledovat i molekuly vody, které neustále reagují na měnící se polaritu elektrického pole. Dochází tedy k velice rychlé rotaci molekul vody, která způsobuje tření a srážky molekul vody. Výsledkem je přeměna mikrovlnné energie na tepelnou (Nebesářová a kol. 2001, Šauliová 2005, Hájek 2006, <http://www.otevrenaveda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/112.pdf>, 20.4.2007).

Mikrovlny mají na biologický materiál vliv tepelný i netepelný. Tepelný účinek mikrovln, jako první z efektů mikrovln, způsobuje dle práce Login a kol. (1998) zrychlení fixace. Zrychluje difúzi molekul a zvyšuje tak reaktivitu mezi biologickými a chemickými molekulami. Zdá se, že právě tento účinek je velmi podstatný pro urychlení fixace a některých dalších kroků v mikroskopické technice. O netepelném působení elektromagnetického vlnění

se doposud mnoho neví. Patří sem účinky, jež nejsou vyvolané ohřevem nebo se jím nedají vysvětlit.

Brown uvádí ve své studii (<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/7361/handh2100microwave2.pdf>, duben 2007), že mikrovlny způsobují během fixace stejné propojení proteinů a jejich koagulaci jako chemická fixace. Empiricky bylo zjištěno, že mikrovlny chrání buňky před autolytickými reakcemi, pomáhají také zachovávat buněčné detaily.

Netepelný účinek mikrovln ovlivňuje semipermeabilní charakter membrán, tedy průchod molekul přes membrány. Toto je způsobeno změnou propustnosti např. kanálů, ale i změnou elektrochemického potenciálu membrán (Marha a kol. 1971). Neustále rotující ionty mohou působit na své okolí mechanicky, tedy tlakem (Stavroulakis 2003). Tím může dojít např. k otevírání a zavírání mechanicky regulovaných kanálů v membráně, např. kanál pro vstup Ca^{2+} do buňky. To pak vede již k výše zmíněné změně elektrochemického potenciálu.

Ing. Jiří Pokorný, DrSc. (UFE AVČR, ústní sdělení) se domnívá, že zrychlení průtoku fixačního roztoku rostlinným pletivem je způsobeno vytvořením pórů v membránách. Jedná se zřejmě o jistou formu elektroporace na vyšším kmitočtu. Při elektroporaci se na buňky působí krátkými (několik mikrosekund až milisekund) pulzy vysokého napětí. Pokud je správně zvolena délka a intenzita pulzů, je vytváření pórů reverzibilní, tedy po krátké době dojde k opětovnému uzavření [Zimmermann a kol. 1981, převzato z Zimmermann a kol. (1982)]. Pórem mohou do buněk projít nesespecificky extracelulární komponenty – látky hydrofilní i lipofilní, neutrální i nabitě, s nízkou i vyšší molekulovou hmotností (Préat a kol. 1999, Weaver a kol. 1999). Elektroporace se využívá např. v transformacích, v indukcích buněčných fúzí, při aplikaci léčiv kůží a k zvýšení efektivity průniku chemoterapeutik do rakovinných buněk.

Mikrovlny by mohly nějakým způsobem ovlivnit i vlastní elektromagnetickou aktivitu živých buněk, resp. mikrotubulů. Kolem mikrotubulů se díky jejich polárnímu charakteru a termálními vibracím doprovázejících jejich polarizaci vytváří elektromagnetické pole. Toto elektrické pole může hrát důležitou úlohu v organizaci cytoskeletu, ale i v transportu buněčných komponent. Může také vyvolat elektrické vibrace molekul (např. vody) a struktur v sousedství (Pokorný 2001, Pokorný 2004, Pokorný a kol. 2005a, Pokorný a kol. 2005b).

3 Metodika

3.1 Vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene *Allium cepa*

V experimentech byla nejdříve používána klasická metoda vizualizace mikrotubulárního cytoskeletu v kořenech zahrnující chemickou fixaci pomocí 3,7% formaldehydu v MTSB (microtubule-stabilizing buffer), odvodnění, zalití do Steedmanova vosku, řezání a nepřímou imunodetekci využívající primární a sekundární protilátku. Jako primární protilátka byla aplikovaná protilátka proti anti- α -tubulinu. Pro její vizualizaci sloužila sekundární protilátka konjugovaná s fluoresceinem (FITC) či rhodaminem (TRITC). Tato metoda byla účinná pouze v místech kořenové špičky, kde mladé pletivo umožňuje snadný a rychlý průnik fixačního roztoku do středu kořene. Dále od kořenové špičky se nepodařilo dostatečně rychle zafixovat dynamicky se chovající mikrotubuly. Mikrotubuly v buňkách blíže střednímu válci a v samotných buňkách středního válce byly rozpadlé. Proto byla optimalizovaná metodika pro zvýšení efektivity fixace s použitím mikrovln (Macháčová a Soukup 2007).

Základní pracovní postupy k vizualizaci mikrotubulů v buňkách kořene *Allium cepa* byly modifikovány na základě prací Baluška a kol. (1992), Vitha a kol. (1997), Vitha a kol. (2000a) a Vitha a kol. (2000b). Protokoly byly upraveny tak, aby bylo možné detekovat mikrotubuly nejen v parenchymatických buňkách primární kůry, ale i v endodermis, popř. středním válci kořene. Mezi hlavní zlepšení patří již výše zmíněné zavedení pomocného prvku fixace, tedy působení mikrovlnného záření.

3.1.1 Imunodetekce mikrotubulů v buňkách endodermis kořenů *Allium cepa*

Pokusným materiálem byly segmenty pětidenních kořenů cibule kuchyňské (*Allium cepa*) pocházející z úseku kořene od apexu po 20 mm od kořenové špičky. Fixace vzorků probíhala ve 3,7% formaldehydu v MTSB za aplikace infiltrace za sníženého tlaku a působení mikrovln. Následně byly segmenty kořenů promyty, dehydratovány v PBS/etanolové řadě a zality do Steedmanova vosku. Po vychladnutí byly segmenty nařezány příčně (tloušťka řezu 50 μ m) a podélně (tloušťka řezu 35 – 40 μ m).

Řezy byly zavodněny pomocí PBS/etanolové řady (PBS - phosphate buffered saline) a promyty v MTSB. Jako permeační činidlo sloužil metanol, pro potlačení nespecifické vazby byl použit casein. Jako primární protilátka byly použity monoklonální myší anti- α -tubulin protilátky (Sigma, č. produktu: T6199; Amersham, č. produktu: N 356; Exbio, č. produktu:

11-250). Jako sekundární protilátky byly aplikovány králičí anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, č. produktu: A-11059), Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, č. produktu: A-11060). Na potlačení autofluorescence jsme použili toluidinovou modř, na obarvení jader Hoechst 33258, nebo propidium jodid. Řezy byly promyty v PBS a zality do 5% propylgalátu v glycerol:PBS, či do VECTASHIELD Mounting Medium (Vector laboratories) a oblepeny bezbarvým lakem na nehty. Preparáty byly uchovány v lednici za tmy.

Podrobné pracovní protokoly jsou v příloze č. 9.1 spolu se složením a pracovním postupem pro přípravu chemikálií pro imunodetekci mikrotubulů.

3.1.2 Pozorování preparátů

a) **Epifluorescenční mikroskop Olympus PROVIS AX 70** (Olympus Optical Co., Ltd. Japonsko) s monochromatickou CCD kamerou COHU 4910 a RGB kamerou Sony

- použité objektivy: UPlanApo 10x s numerickou aperturou 0,40

UPlanApo 20x s numerickou aperturou 0,70

LUMPlanFl 40x s numerickou aperturou 0,80 a vodní imerzí

- fluorescenční filtry:

Pro Alexa 488: U-MNIBA (Exc: 470-490 nm, Em: 515-550 nm)

U-MWIB (Exc: 460-490 nm, Em: 515 nm)

Pro Alexa 546 a propidium jodid

U-MWG (Exc: 510-550 nm, Em: 590 nm)

Pro Hoechst 33258 U-MWU (Exc: 330 – 385 nm, Em: 420 nm)

- digitální uložení pomocí NIS-Elements AR 2.30 (Laboratory Imaging)

b) **Epifluorescenční mikroskop Olympus BX51** (Olympus Optical Co.) s CCD kamerou Apogee U4000 (Apogee Instruments Inc.)

- použité objektivy: UPlanFl 10x s numerickou aperturou 0,30

UPlanFl 20x s numerickou aperturou 0,50

UPlan Fl 40x s numerickou aperturou 0,75

- fluorescenční filtry:

Pro Alexa 488: U-MWB2 (Exc: 460-490 nm, Em: 515 nm)

Pro Alexa 546 a propidium jodid

U-MWG2 (Exc: 510-550 nm, Em: 590 nm)

Pro Hoechst 33258 U-MWU2 (Exc: 330 – 385 nm, Em: 420 nm)

- digitální uložení pomocí Micro CCD

c) **Mikroskop Olympus BX50** (Olympus Optical Co.) s kamerou Nikon DS-U1

- použité objektivy: Plan 4x s numerickou aperturou 0,10
Plan 10x s numerickou aperturou 0,25
Plan 20x s numerickou aperturou 0,40
Plan 40x s numerickou aperturou 0,65
- digitální uložení pomocí Lucia image analysis software (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic)

d) **Konfokální mikroskop Leica TCS NT** (Leica Microsystems Heidelberg GmbH)

- použitý laser: argon/kryptonový laser 488 nm a hélium/neonový laser 405 nm
- použitý objektiv: HC Pl Apo20x objektiv s vodní imerzí a numerickou aperturou 0,7 a zoom (1,7 – 4,0)
- kanály: modrý kanál (excitace 405 nm): emise 409 – 473 nm
zelený kanál (excitace 488 nm): emise 500 – 600 nm

Rozlišení 1024x1024 pixelů

Frame-Average: 1

Line-Average: 8

Rychlost: 800x

Digitální uložení pomocí programu Leica (Leica Microsystems Heidelberg GmbH)

Zpracování fotografií:

Fotografie z konfokálního mikroskopu zpracovávají v programu Leica Lite (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) a Image J a dále pak v Adobe Photoshop 7.0.

3.2 Aplikace metodiky fixace mikrotubulů s využitím účinku mikrovln na cytoskelet buněk kořenů *Arabidopsis thaliana*

(Spolupráce s Mgr. Ivanem Kulichem, KFR PřF UK)

Úspěšnou fixaci mikrotubulů ve starších pletivech kořene *Allium cepa* pomocí 3,7% formaldehydu rozpuštěného v MTSB a s využitím vakuové infiltrace a účinku mikrovln jsme aplikovali na kořeny *Arabidopsis thaliana*, abychom ověřili pozitivní účinek mikrovlnného záření i při fixaci jiného rostlinného materiálu.

Jako pokusný materiál byl použit sedmidenní huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), wildetype vypěstovaný na obohaceném ½ Murashige a Skoog médiu. Pro pokusy byly použity celé rostliny, které byly nejdříve fixované v 3,7% formaldehydu v MTSB za využití infiltrace za sníženého tlaku a aplikace mikrovln. Následovalo promytí v MTSB, enzymová lázeň (pektolyáza Y-23, manitol v MTSB, inhibitory proteáz, Leupeptin a Pepstatin) a nové promytí. Dále byl aplikován metanol a PBSA (hovězí albumin v PBS). Jako primární

protilátka byla použita Monoclonal Anti- α -Tubulin from mouse (Sigma, č. produktu: T6199), jako sekundární pak Anti-mouse Alexa Fluor 488 from rabbit (Molecular Probes, č. produktu: A-11059). Promývání bylo v PBS. Vzorky byly zality do 50% glycerolu a oblepeny lakem na nehty.

Pracovní protokoly spolu s postupem přípravy chemikálií jsou v příloze č. 9.2.

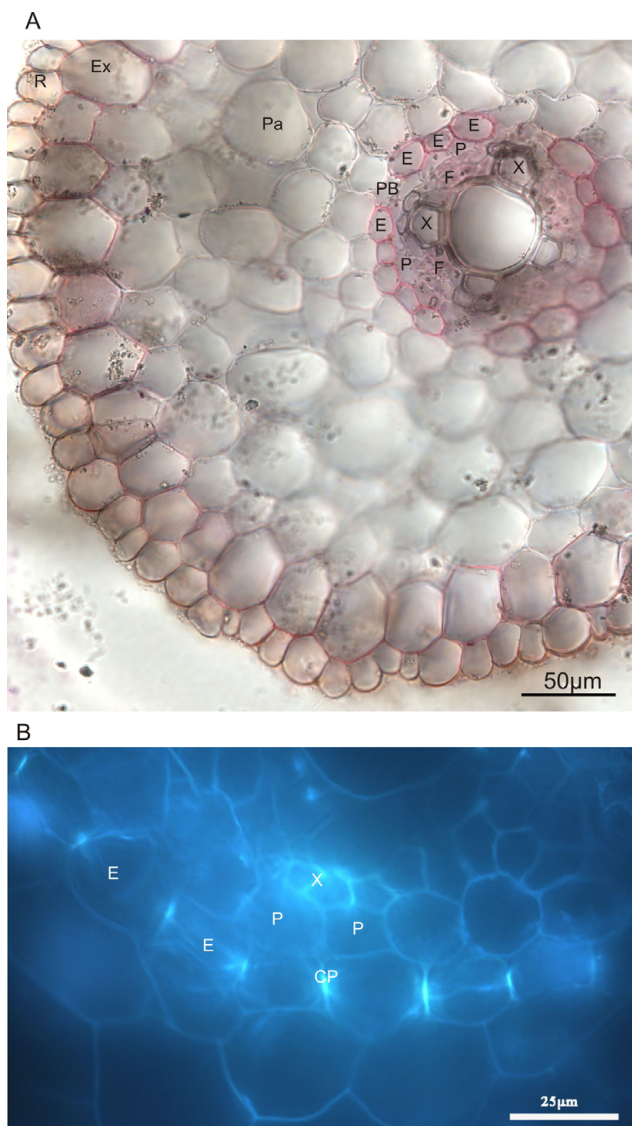
3.3 Pozorování základní struktury kořene cibule *Allium cepa* se zaměřením na endodermis

Segmenty byly fixovány a zality do Steedmanova vosku podle postupu v kapitole 3.1.1 a 9.1.1. Dále byly segmenty nařezány (příčné řezy - tloušťka 50 μm , podélné pak 40 μm). Následně byly řezy „odvoskovány“ dle protokolu v kapitole č. 9.3 a převedeny do PBS. Část řezů byla následně zalita do 5% propylgalátu v glycerol:PBS a oblepena bezbarvým lakem na nehty. Část řezů byla před zalitím obarvena sudanem rozpuštěným v polyethylenglycolu 400 (Brundrett a kol. 1991). Řezy byly pozorovány ve světlém poli, s využitím Nomarského interferenčního kontrastu či pomocí epifluorescenčního mikroskopu (autofluorescence buněčných stěn a Casparyho proužků).

4 Výsledky

(Lepší rozlišení fotografií je k nalezení na CD, které je přiloženo k diplomové práci.)

4.1 Pozorování základní struktury kořene cibule *Allium cepa* se zaměřením na strukturu endodermis ve stavu proendodermis a prvního vývojového stavu



Obr. č. 20 a, b

a) Příčný řez kořenem *Allium cepa* (cca. 25 mm od kořenové špičky) obarveným sudanem. Červeně obarvena rhizodermis, hypodermis, endodermis (suberinová lamela) a cévní svazky. Ve vrstvě endodermálních buněk jsou přítomny suberinem neobarvené propustné buňky. Světlé pole. b) Příčný řez kořenem *Allium cepa* (cca. 12 mm od kořenové špičky). Autofluorescenční signál Casparyho proužků endodermis. Řez byl vytvořen řezáním ve Steedmanově vosku. Řezání a žehlení vzorků ve Steedmanově vosku může způsobovat změny tvaru buněk (viz. část obr. vlevo nahoře). Fluorescence. CP – Casparyho proužky, E – endodermis, Ex – exodermis, F – floem, P – pericykl, Pa – parenchym primární kůry, PB – propustné buňky, R – rhizodermis, X – xylem

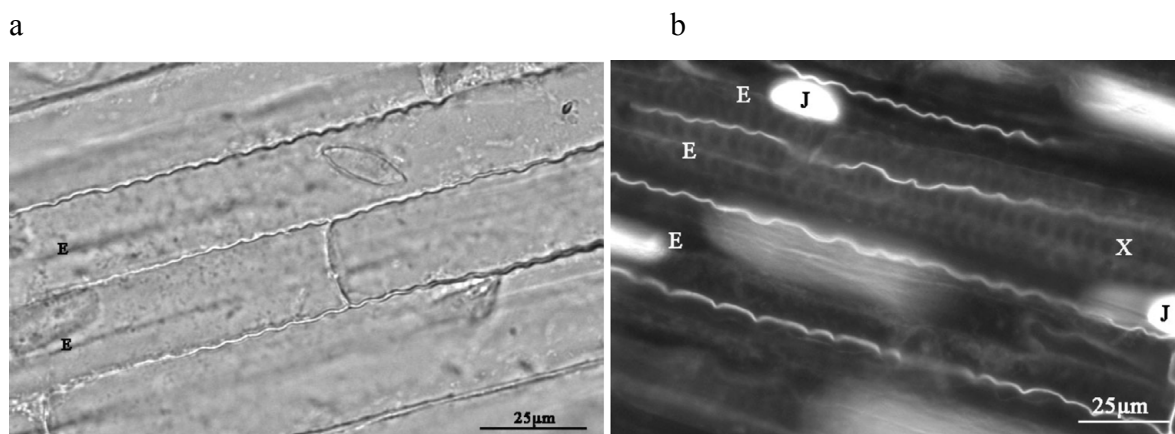
Pro pozorování změny uspořádání cytoskeletu během vývoje endodermis bylo třeba zdokumentovat strukturu a vývoj části kořene blíže kořenové špičky, resp. v prvních 25 mm od apexu kořene cibule *Allium cepa*. K tomuto vedla i nutnost rozpoznat buňky endodermis před vytvořením Casparyho proužku na podélných řezech kořenů zhotovených pro imunolokalizaci mikrotubulárního cytoskeletu. Z tohoto důvodu bylo záměrně při popisu základní struktury kořene pracováno se vzorky připravenými identickým způsobem jako u vzorků pro imunolokalizaci. Toto vede k snazšímu porovnávání vzorků mezi sebou. Negativem je však méně kvalitní obraz preparátů, jež je způsoben z velké míry problematickým řezáním ve Steedmanově vosku.

Apikální meristém kořene cibule kuchyňské (*Allium cepa*) má tzv. uzavřené uspořádání. Endodermis se vyvíjí z iniciál ze skupiny iniciál dávající vznik primární kůře a pokožce.

Endodermis v kořeni *Allium cepa* lze na základě Casparyho proužků

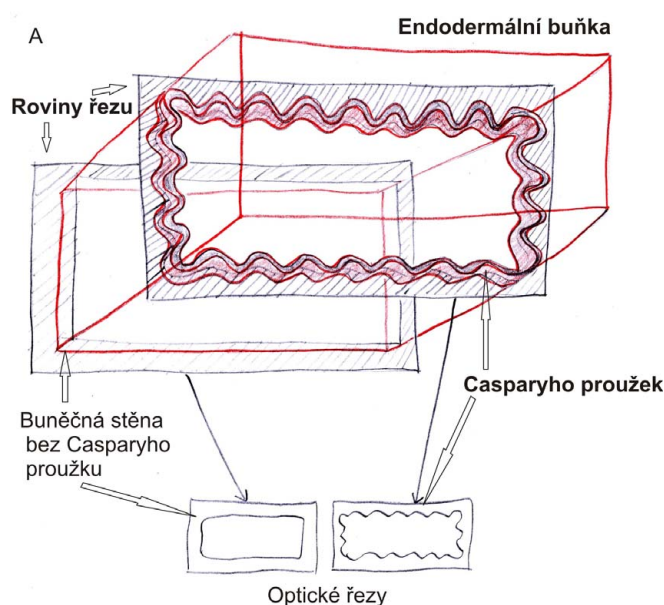
poprvé rozpoznat na příčných řezech ve vzdálenosti 8 – 10 mm od kořenové špičky v jejím prvním vývojovém stavu (Obr. č. 24, Obr. č. 25). V této vzdálenosti jsou v kořeni cibule poprvé viditelné zakládající se Casparyho proužky (Obr. č. 20). Lze je pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu na základě jejich typické autofluorescence. Casparyho proužky jsou nejdříve vidět jako velice tenké proužky v radiální buněčné stěně endodermis. Postupně se však rozšiřují. V pozdějších fázích zakládání Casparyho proužku je možné pro jejich detekci použít i barvení sudanem a následné pozorování ve světlém poli. V pozdějším stádiu jsou Casparyho proužky již rozpoznatelné ve světlém poli optického mikroskopu bez barvení díky jejich „tloušťce“. Tyto rozdíly tedy poukazují na fakt, že údaje o vzdálenosti zakládání Casparyho proužku od kořenové špičky jsou do jisté míry variabilní dle použité metody. Rozpětí číselného údaje u vzdálenosti je relativně velké i díky různé rychlosti růstu kořenů mezi rostlinami i v rámci jedné cibule. Rychlost růstu je ovlivněna i ročním obdobím. Na podzim je např. velice problematické získat „zakořeněnou cibulku“ cibule. Toto se dá předejít vystavením cibulí nízkým teplotám. Ale i u těchto rostlin byla pozorována odlišná rychlost růstu kořenů, resp. vzdálenost zakládání Casparyho proužků v endodermis od kořenové špičky v porovnání s jarními měsíci.

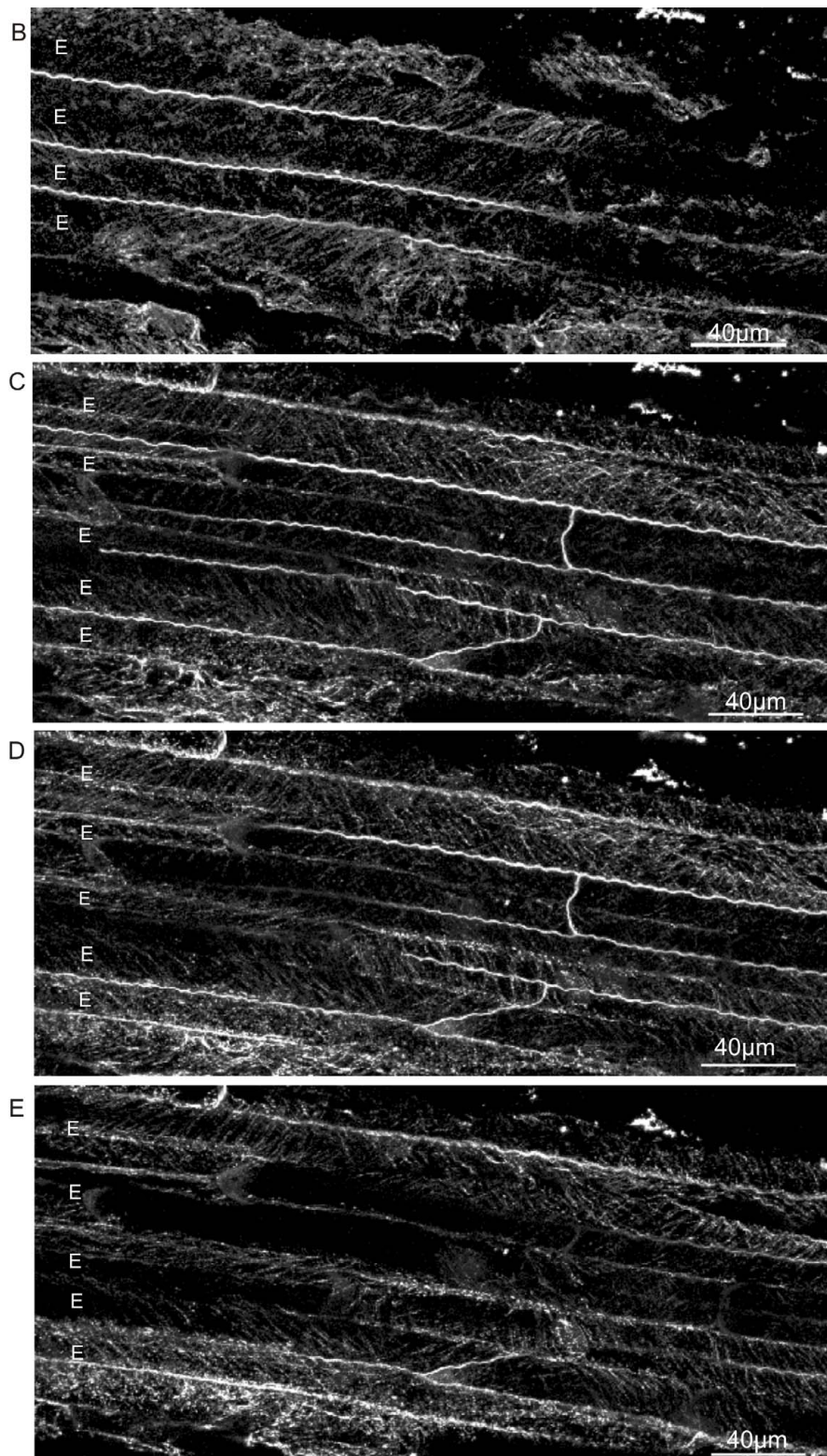
Vytváření Casparyho proužků v endodermálních buňkách je u cibule mírně asynchronní. Casparyho proužky se zakládají nejdříve v endodermálních buňkách v blízkosti floému, následně pak u endodermis v sousedství xylému. U některých kořenů je však zakládání přibližně současné, lze mluvit skoro o synchronizaci. U některých buněk poblíž xylému nelze Casparyho proužky detekovat, resp. se zakládají až se zpožděním. Jedná se o tzv. propustné buňky („passage cells“) (viz. kapitola 2.1.5).



Obr. č. 21 a, b Zvlněné buněčné stěny endodermis v místech Casparyho proužku na podélných řezech kořenem *Allium cepa* (15 až 20 mm od kořenové špičky). a) Pozorování ve světlém poli, b) autofluorescence buněčných stěn (Casparyho proužků). Hoechstem 33258 barvená jádra. Pod endodermis je možné rozpoznat sekundární buněčné stěny cévních svazků. Konvenční fluorescenční mikroskop. E – endodermis, J – buněčné jádro, X – xylem

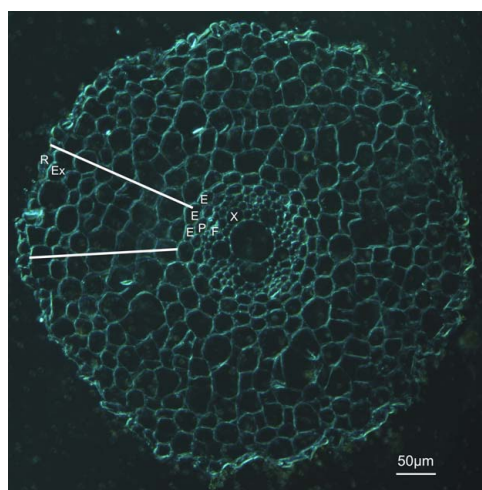
Pokud již došlo k založení Casparyho proužku, jeví se na podélných řezech buněčná stěna endodermis v místě Casparyho proužku zvlněně (Obr. č. 21). To je dobře patrné i na sérii optických řezů z konfokálního mikroskopu skrz podélně orientované endodermální buňky v oblasti Casparyho proužku a jeho nejbližšího okolí (Obr. č. 22b - e). Na Obr. č. 22b jsou vidět endodermální buňky, které vykazují na levé straně fotografie charakteristické zvlněně buněčné stěny (oblast horní části Casparyho proužku), na pravé straně je „prořezána“ nezvlněně buněčná stěna (skoro neviditelná) v místě těsně nad vytvořeným Casparyho proužkem. Na Obr. č. 22c jsou endodermální buňky prořezány již kompletně v místech Casparyho proužku. Na levé straně je zachycena spodní část Casparyho proužku, směr napravo odpovídá přechodu rovné buněčné stěny do zvlněněho charakteru, tedy do oblasti horní části Casparyho proužku. U Obr. č. 22d ukazuje levá strana fotografie rovnou buněčnou stěnu nyní již z oblasti těsně pod vytvořeným Casparyho proužkem. Buněčná stěna na pravé straně jeví ještě zvlněně charakter, avšak na následném optickém řezu (Obr. č. 22e) přechází i zde buněčná stěna do rovného uspořádání. Postupně byl tedy opticky prořezán úsek buněčné stěny endodermis okolo Casparyho proužku včetně. Zvlněně buněčné stěny se nachází pouze v místech Casparyho proužku. V ostatních úsecích buněčné stěny endodermis (tedy tam, kde se nenalézá Casparyho proužek) není možné pozorovat žádné zvlněně. Tloušťka buněčné stěny je v místech průběhu Casparyho proužku konstantní a nemění se v rámci průběhu zvlněně. Je taktěž důležité uvést, že zvlněně není v mnoha případech pravidelné. Často se objevují různě hluboké a široké „údolí a hory“ (např. Obr. č. 49, Obr. č. 51).





Obr. č. 22 a až e Přítomnost zvlnění buněčné stěny endodermis pouze v místech Casparyho proužku.
 a) Náčrt znázorňuje schématicky endodermální buňku cibule. Buněčná stěna označena červeně, modře označeny roviny optických řezů endodermální buňkou. Optický řez buněčnou stěnou mimo Casparyho proužek ukazuje nezvlněnou buněčnou stěnu, optický řez v místě Casparyho proužku pak zřetelně zvlněnou buněčnou stěnu o silné autofluorescenci. (autor K. Schwarzerová, PřF UK). b až e) Optické řezy zachycující postupné „prořezávání“ endodermálních buněk v místě Casparyho proužku a jeho nejbližšího okolí. (Endodermální buňky pochází ze segmentu kořene *Allium cepa* vzdáleném 15 až 20 mm od kořenové špičky.) Popis k obrázkům v textu. E – endodermis, fluorescence mikrotubulárního cytoskeletu a autofluorescence buněčné stěny. Konfokální fluorescenční mikroskop.

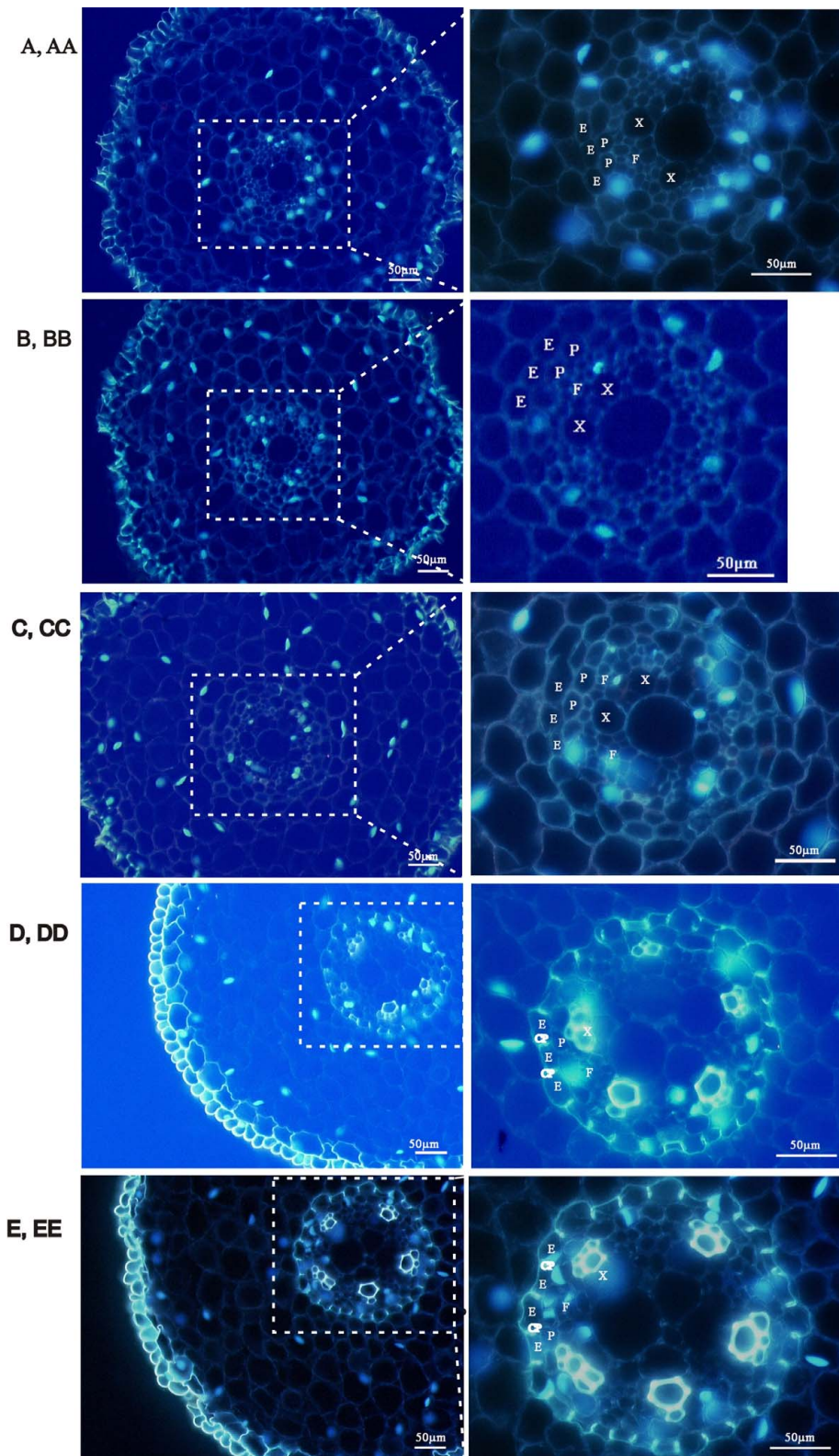
Na podélných řezech kořenem *Allium cepa* pocházejících z úseku za prvními 10 mm od kořenové špičky lze tedy dobře rozlišit endodermální buňky od okolních vrstev buněk na základě vytvoření Casparyho proužku. Avšak určení endodermální vrstvy buněk na podélných řezech odebraných do vzdálenosti 10 mm od kořenové špičky, resp. do vytvoření zvlněného charakteru buněčné stěny v místech Casparyho proužků bylo nesnadné. Jednou z možností, jak rozlišit endodermis, je odebrání segmentů o délce 10 mm z úseku kořene 5 – 15 mm od kořenové špičky. Na podélných řezech u konce segmentu vzdálenějšího kořenového apexu je možné najít endodermis v prvním vývojovém stavu, tedy se zvlněnou buněčnou stěnou. Od těchto buněk se pak postupuje v linii proendodermálních buněk směrem k apexu kořene. Podmínkou je však vytvoření kolmého správně orientovaného podélného řezu o délce 10 mm ve Steedmanově vosku, což je metodicky obtížné. Problémem je i časté zahnutí kořenů v blízkosti kořenové špičky.



Obr. č. 23 Příčný řez kořenem *Allium cepa* (vzdálenost cca. 10 mm od kořenové špičky) se znázorněnou linií rhizodermis – osa kořene (2x bílá úsečka). (Nomarského interferenční kontrast) E – endodermis, Ex – exodermis, F – floem, P – pericykl, R – rhizodermis, X - xylem

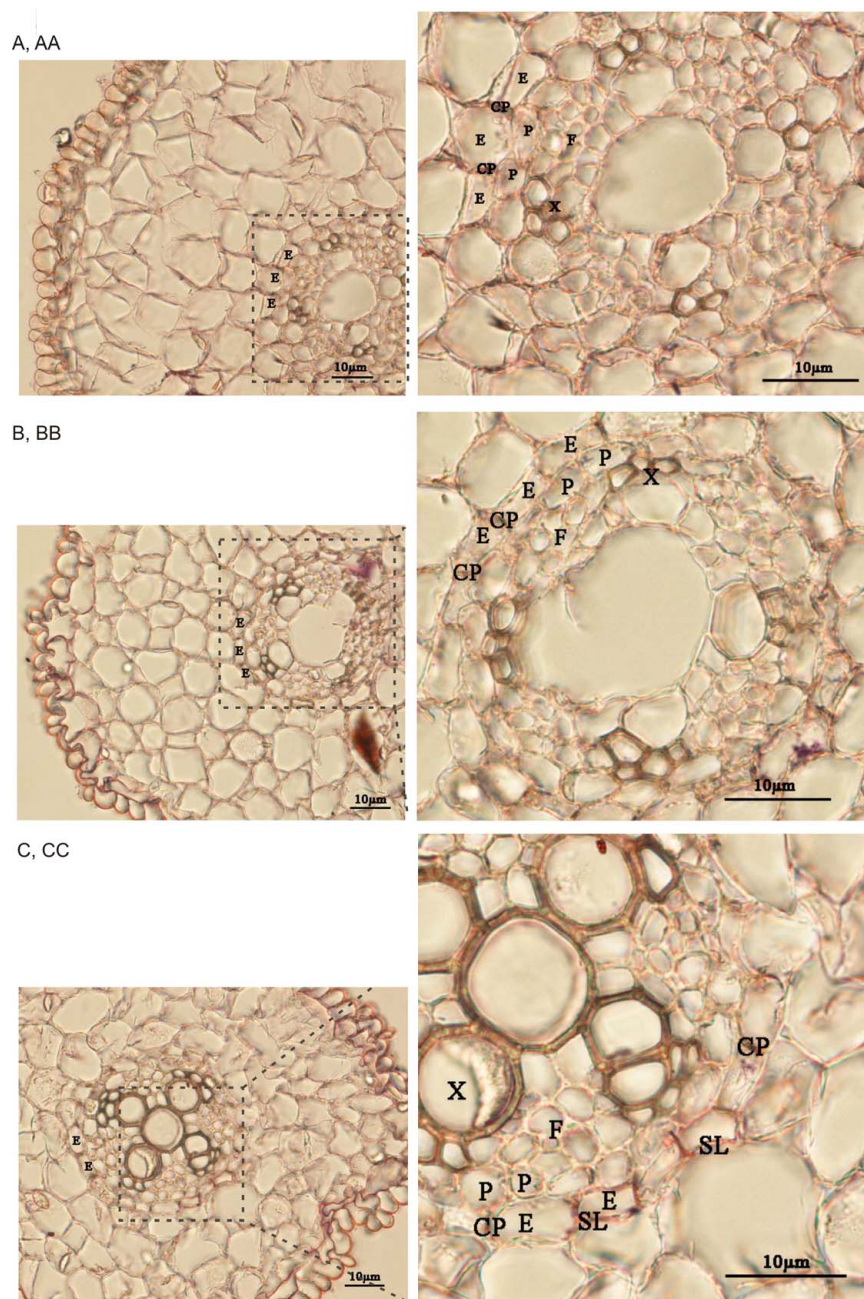
Další možností je porovnávání pozice endodermální vrstvy buněk na příčných řezech cibule se situací na podélných řezech. Otázkou, kterou jsme si položili, je, zda kořeny u jedné cibule, ale i kořeny v rámci více rostlin *Allium cepa* mají stejný počet parenchymatických buněk v linii rhizodermis – střed kořene (Obr. č. 23). Kořeny *Allium cepa* obecně vykazují různou tloušťku. Kořeny pomalu rostoucí, mají často větší průměr než kořeny rychle rostoucí. Počet parenchymatických buněk na příčných řezech v linii rhizodermis až střed kořene se pohybuje v rozmezí 5 až 6 buněk , popř. 7. Určení pozice

endodermis tímto způsobem je tedy na podélných řezech komplikováno různým počtem vrstev kortikálního parenchymu a i značně variabilní velikostí jeho buněk a jejich uspořádání (např. Obr. č. 24, Obr. č. 25).



Obr. č. 24 a až ee

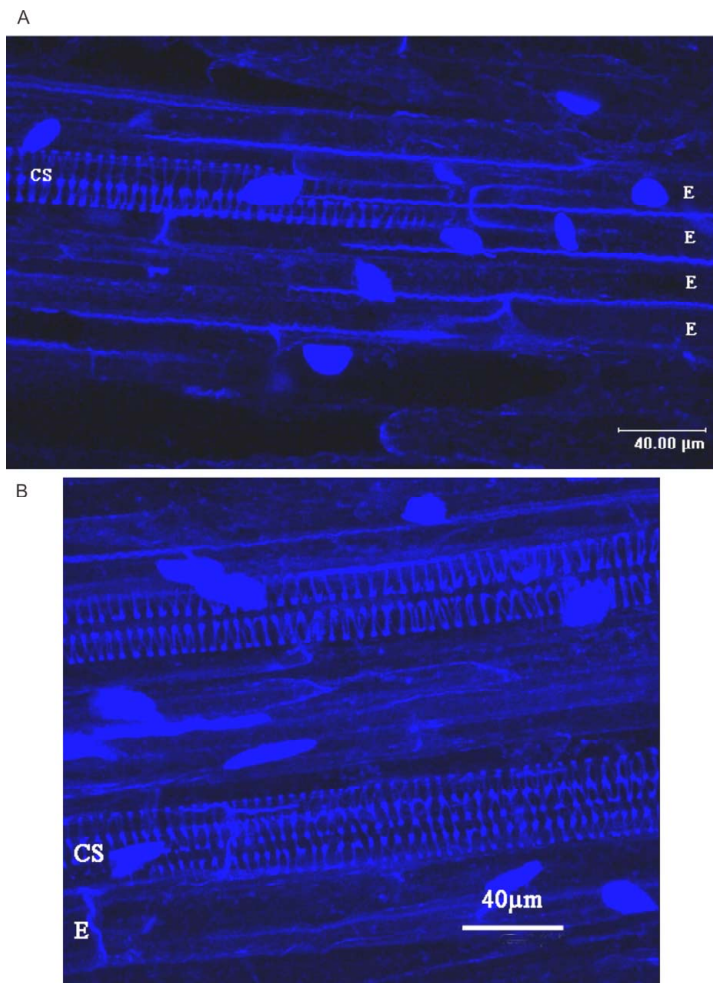
Příčné řezy segmentem kořene *Allium cepa* 4 až 5 mm od kořenové špičky (a, aa), 5 až 6 mm od kořen. špičky (b, bb), 6 až 7 mm od kořen. špičky (c, cc), 8 až 10 mm od kořen. špičky (d, dd), 12 až 14 mm od kořen. špičky (e, ee). Celý kořen (a, b, c, d, e) a detail centrální části kořene (aa, bb, cc, dd, ee). Autofluorescence buněčných stěn a modře barvená jádra (Hoechst 33258). a až cc) Casparyho proužky nejsou ještě vyvinuty. d, dd) Poprvé je možné pozorovat zakládající se Casparyho proužky, které se jeví jako „zářící“ proužky v radiálních buněčných stěnách endodermis. e, ee) Casparyho proužky vykazují již silnější autofluorescenci. CP – Casparyho proužky, E – endodermis, F – floem, P – pericykl, X – xylem.



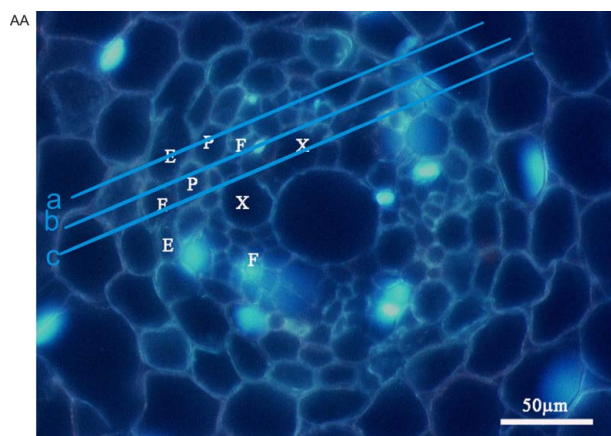
Obr. č. 25 a až cc

Příčné řezy segmentem kořene *Allium cepa* 15 až 20 mm od kořenové špičky (a, aa), 30 až 35 mm od kořen. špičky (b, bb), 45 až 50 mm od kořen. špičky (c, cc). Výšeč kořene (a, b, c) a detail centrální části kořene (aa, bb, cc). Obarvené sudanem. a až bb) Endodermis v prvním vývojovém stavu, přítomnost Casparyho proužků. c, cc) „SL“ ukazuje na endodermální buňky ve druhém vývojovém stavu, s tzv. suberinovou lamelou. CP – Casparyho proužky, E – endodermis, F – floem, P – pericykl, SL – suberinová lamela, X – xylem.

Parenchymatické buňky v primární kůře kořene *Allium cepa* jsou „nepravdělně kulovité“, v průměru mohutnější než endodermální buňky (Obr. č. 24, Obr. č. 25). Endodermální buňky mají oválný, podlouhlý tvar, někdy připomínají spíše „kvádr“. Buňky pericyklu, hlavně u starších částí kořenu, jsou menší než buňky endodermis, jejich tvar na příčném řezu je někdy bližší oválu, častěji však kruhu. Je nutné dát pozor na nejvnitřnější vrstvu parenchymu, jehož buňky mohou být velikostí podobné buňkám endodermis.



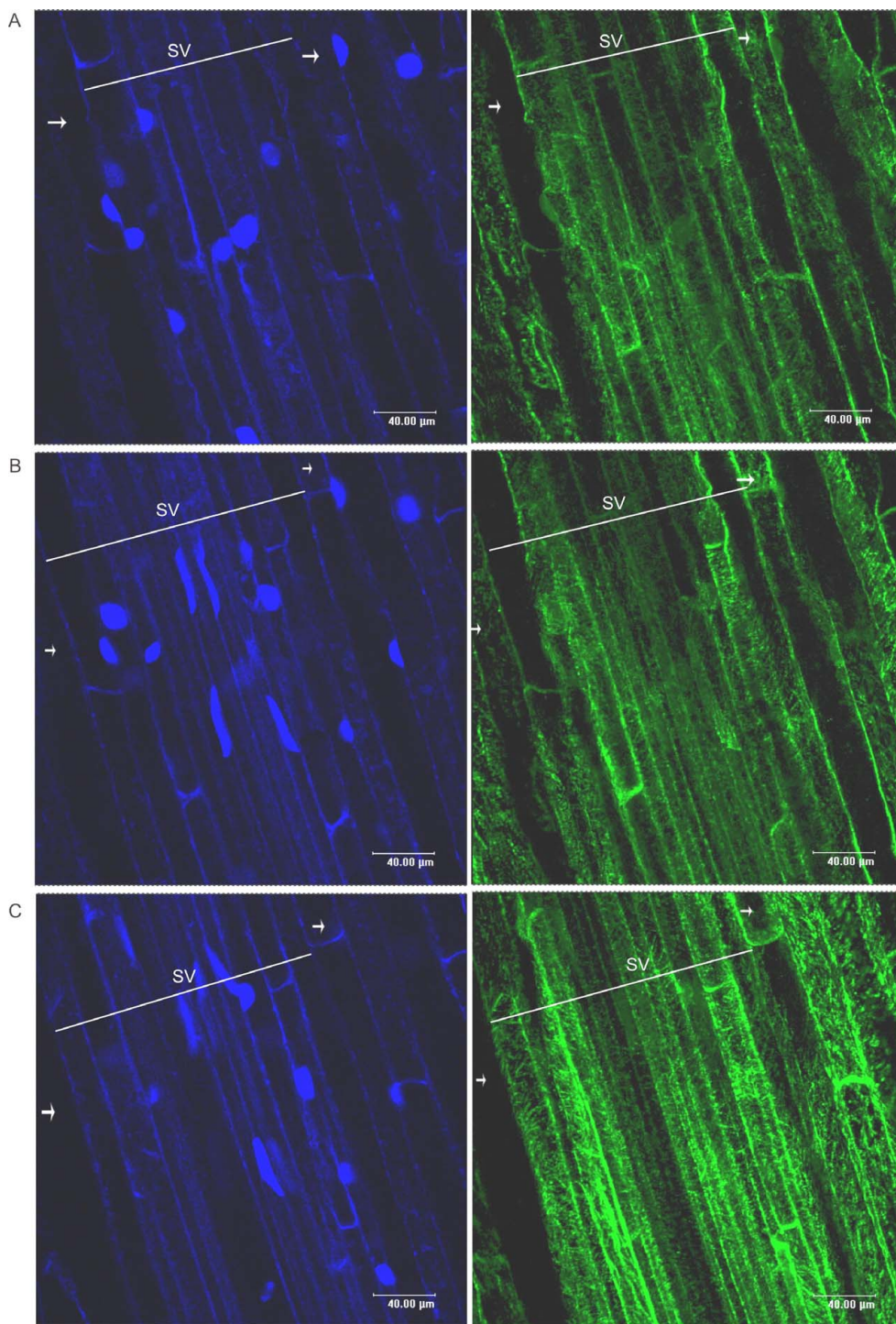
Obr. č. 26a, b Podélné řezy kořenem *Allium cepa* ze vzdálenosti 10-20 mm od kořenové špičky. Modrý signál – autofluorescence buněčných stěn a barvená jádra (Hoechst 33258). Na projekcích z konfokálního mikroskopu se může zdát, že endodermis sousedí s cévními elementy, ne s pericyklem. Důvodem je složení snímku z více optických rovin. E – endodermis, CS – cévní elementy



Endodermis je oddělena jednou vrstvou buněk (pericyklem) od dobře rozpoznatelných dvou řad cévních elementů (Obr. č. 24dd, ee, Obr. č. 25aa). Buňka pericyklu je však často na obrazu z konfokálního mikroskopu skoro neviditelná díky jejímu postavení vůči endodermis a jiným buňkám (cévním elementům či jiné endodermální buňce). Opticky se tedy často zdá, že endodermis přiléhá přímo k dvou řadám cévních elementů (Obr. č. 26).

Tyto parametry, tedy tvar a vzájemné postavení buněk, se staly rozhodující v procesu určování endodermálních buněk. Na Obr. č. 27 je ukázán příklad určování

polohy endodermálních buněk na podélném řezu kořenem *Allium cepa* ze segmentu 4 až 8 mm, kde ještě nedošlo k vytvoření Casparyho proužků, resp. kde nejeví buněčná stěna v místech Casparyho proužku zvlněný charakter.

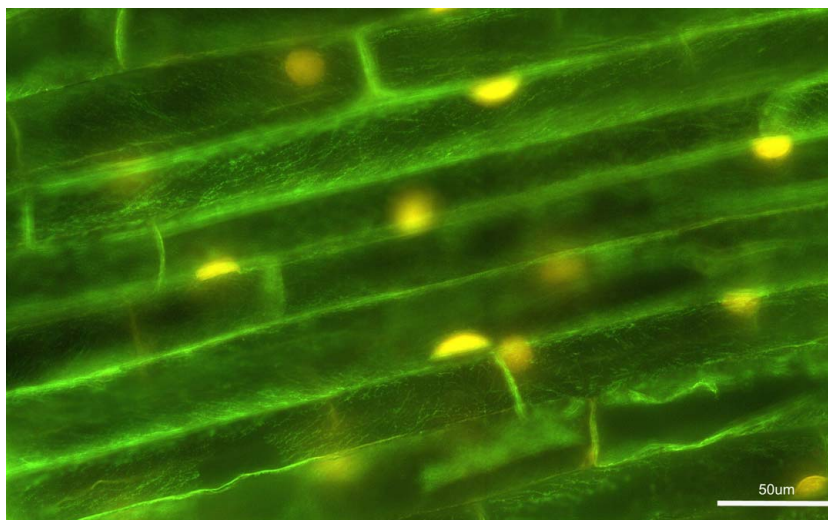


Obr. č. 27 aa, a, b, c

aa) Příčný řez segmentem kořene *Allium cepa* 6 až 7 mm od kořenové špičky. a, b, c) Optické roviny podélného řezu segmentem kořene *Allium cepa* 4 až 8 mm od kořenové špičky. Modrý signál – jádra barvená Hoechstem 33258 a autofluorescence buněčných stěn, zelený signál - protilátkou značené mikrotubuly a slabě autofluorescence buněčných stěn. Na aa) vyznačeny 3 linie (a,b,c) odpovídající optickým řezům a,b,c. Endodermis označena šipkami, střední válec (SV) označen bílou úsečkou.

4.2 Vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene *Allium cepa*

Při konvenčním způsobu fixace se podařilo zafixovat tubulin v některých buňkách

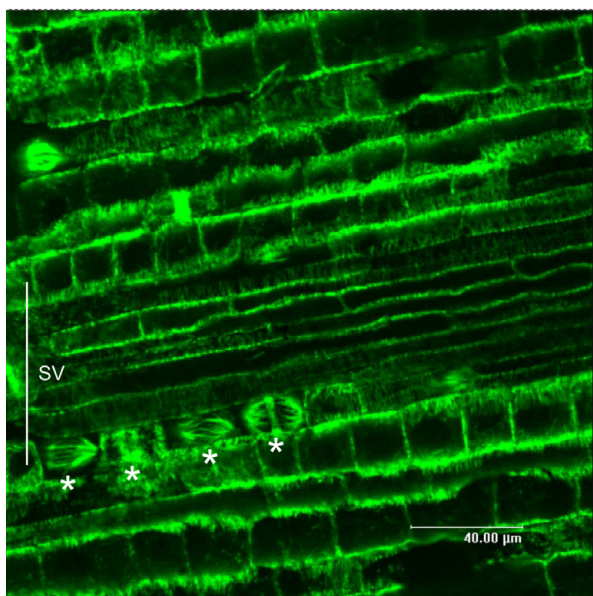


Obr. č. 28 Mikrotubuly v parenchymatických buňkách pod rhizodermis na podélném řezu kořenem cibule *Allium cepa* ze segmentu 5 až 10 mm od kořenové špičky. Zelený signál – mikrotubuly, oranžový signál – jádra obarvená propidium jodidem. Konvenční fluorescenční mikroskop

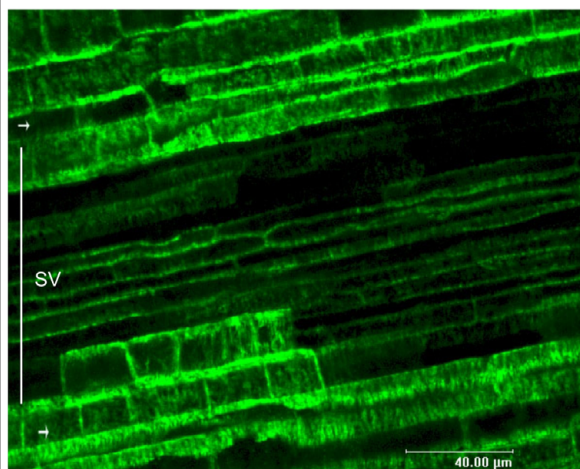
parenchymu pod rhizodermis (Obr. č. 28) či v buňkách kořenové špičky (Obr. č. 29). Dále se podařilo zafixovat mikrotubuly ve středním válci kořene (hlavně ve vznikajících vodivých elementech) blízko kořenové špičky (Obr. č. 30). Fixativum vstoupilo nejspíše „kořenovou špičkou“ do střední části

kořene a dále postupovalo cévními svazky. Po cca. 4 mm dochází k rozpadu mikrotubulů i ve středním válci, což je nejspíše důsledkem nízké rychlosti pronikání fixačního roztoku. Dále od kořenové špičky (cca. 3 mm) se nepodařilo zafixovat mikrotubuly hlouběji v primární kůře kořene, ani ve středním válci (Obr. č. 31a).

A

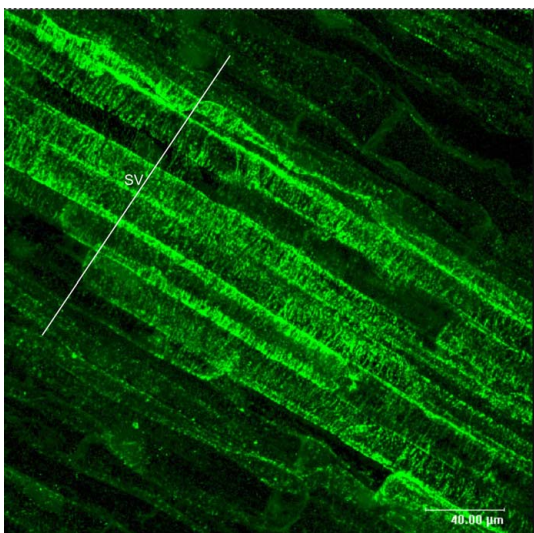


B



Obr. č. 29 a, b

Mikrotubuly a) v buňkách kořenové špičky kořene cibule *Allium cepa*, b) v blízkosti kořenového apexu (cca. 2 až 3 mm od kořenové špičky). Zelený signál – mikrotubuly a autofluorescence buněčných stěn. Hvězdičkou označené figury mitózy. Šipkou označená linie endodermálních buněk, úsečka s popiskem „SV“ označuje střední válec. Konfokální fluorescenční mikroskop.



Obr. č. 30 Mikrotubuly v buňkách středního válce kořene cibule *Allium cepa* na projekci. V okolních buňkách došlo k rozpadu cytoskeletu. Pravý dolní roh směřuje ke kořenové špičce. Konfokální mikroskop. Zelený signál – mikrotubuly a slabá autofluorescence buněčných stěn. Úsečka označuje střední válec (SV).

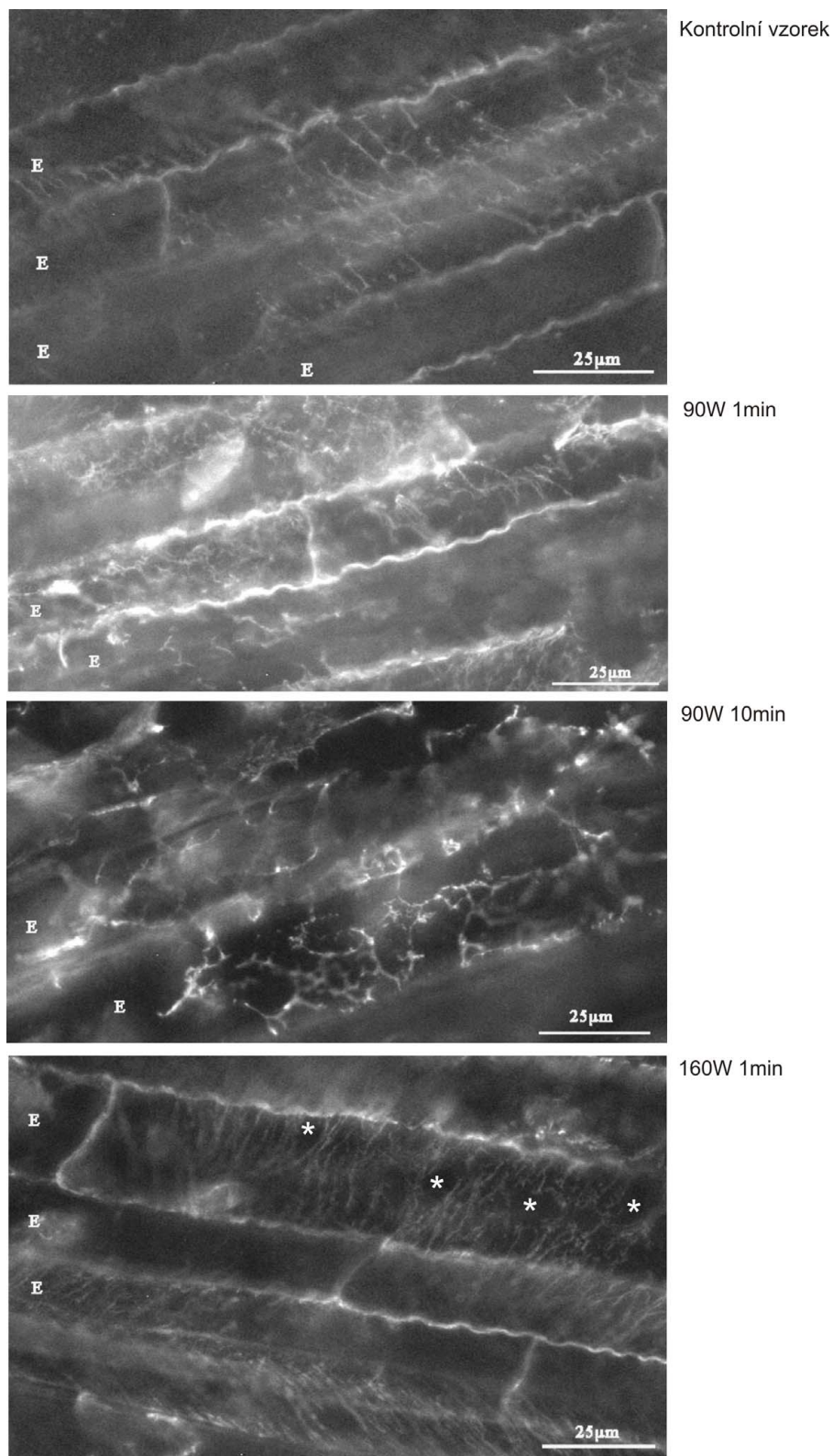
Po optimalizaci protokolu (pH, koncentrace fixačního roztoku, vakuové infiltrace, délky fixace a využití mikrovln) se podařilo vizualizovat uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu v prvních buňkách endodermis. Bylo optimalizováno působení různých výkonů a časů mikrovln (viz. tabulka č. 1). V tabulce č. 1 je uvedeno uspořádání pokusů. Byly použity 5 mm dlouhé segmenty kořenů *Allium cepa* odebrané ze vzdálenosti 10 – 15 mm od špičky kořenů. Právě od cca. 10 mm je možné u kořenů cibule relativně dobře rozpoznat endodermis na podélných řezech pomocí zvlněných buněčných stěn.

Tab. č. 1

výkon	délka působení mikrovln				
	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
kontrola	bez působení mikrovln				
90 W	x	x	x	x	x
160 W	x	x	x	x	
350 W			x	x	
500 W			x	x	

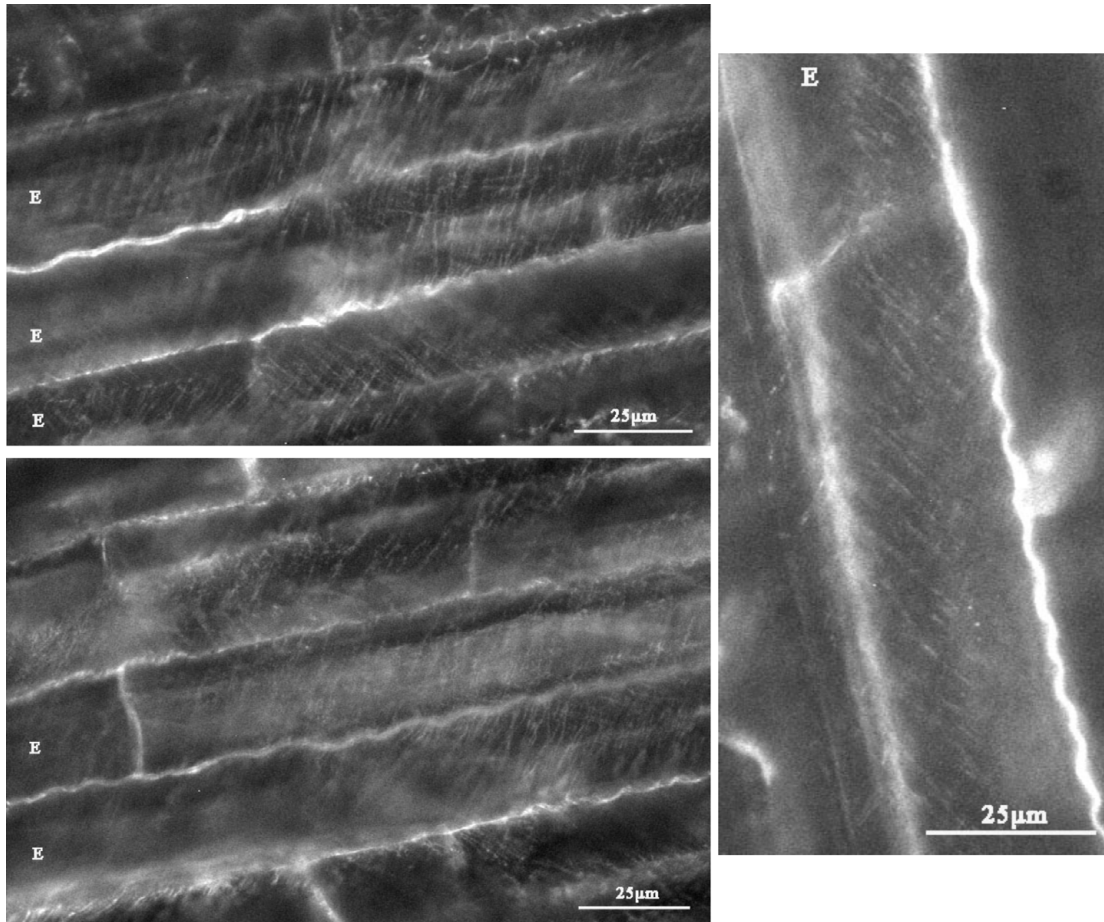
U kontrolních vzorků (Obr. č. 31a) nebyly imunolokalizací detekovány žádné mikrotubuly v endodermis, popř. se jevil cytoskelet jako rozpadlý. Při výkonu 90 W po dobu 1, 2 a 3 minut (Obr. č. 31b) byly v několika endodermálních buňkách nalezeny polorozpadlé mikrotubuly. Doba působení 3 a 5 minut zlepšovala „uspořádání“ cytoskeletu, resp. zamezovala jeho rozpad. Čas 10 minut (Obr. č. 31c) způsobil silné poškození vnějších vrstev kořene cibule. V zasažených buňkách zbyla pouze polorozpadlá architektura buněčných stěn, popř. zbytky obsahu buněk. Výkon 160 W je považován za optimální. Při působení mikrovln po dobu 1 a 2 minut (Obr. č. 31d) nebylo pozorováno přílišné zlepšení v porovnání se vzorky ošetřenými výkonem 90 W po dobu 3 a 5 minut. Při působení 3 a 5 minut 160 W byla u většího počtu endodermálních buněk nalezena uspořádaná, dobře zachovalá síť mikrotubulů,

došlo k výraznému zlepšení fixace. U působení po dobu 5 minut (Obr. č. 32) nebyl cytoskelet rozpadlý, tedy díky tomuto působení je možné detekovat mikrotubuly v endodermis v podobné kvalitě jako u parenchymatických buněk pod povrchem kořene cibule. Výkon 350 W (Obr. č. 33) a 500 W považujeme již za příliš vysoký. Po dobu 3 min způsoboval výkon 350 W poškození a rozpad podobně jako u 90 W po dobu 10 minut. Při delším časovém působení, popř. vyšším výkonu dochází i k poškození buněk směrem od okraje kořene do středu. Teoreticky by však nemělo dojít k působení tepelného účinku mikrovln na buňky z důvodu udržování teploty fixačního roztoku na hodnotě 15°C. Nejspíše je tedy toto poškození způsobeno přítomností „hot spots“, tedy "horkých bodů" s vyšší intenzitou mikrovlnného záření nebo nedostatečným odvodem tepla ze vzorků. Při vyšším výkonu dochází i k rozpadu cytoskeletu, někdy i k plasmolýze.



Obr. č. 31 a, b, c, d

Cytoskelet v endodermálních buňkách na podélných řezech segmenty kořene *Allium cepa* 10 – 15 mm od kořenové špičky. a) Kontrolní vzorek zpracovaný klasickou metodou vizualizace mikrotubulů endodermis bez působení mikrovln. b až d) Vzorky zpracované klasickou metodou vizualizace mikrotubulů endodermis po fixaci s využitím mikrovln o výkonu 90 W po dobu 1 (b) a 10 min (c) a o výkonu 160 W po dobu 1 min (d). Na obr. d) jsou označeny pomocí hvězdičky volné prostory mezi mikrotubulárními svazky. E – endodermis. Konvenční fluorescenční mikroskop

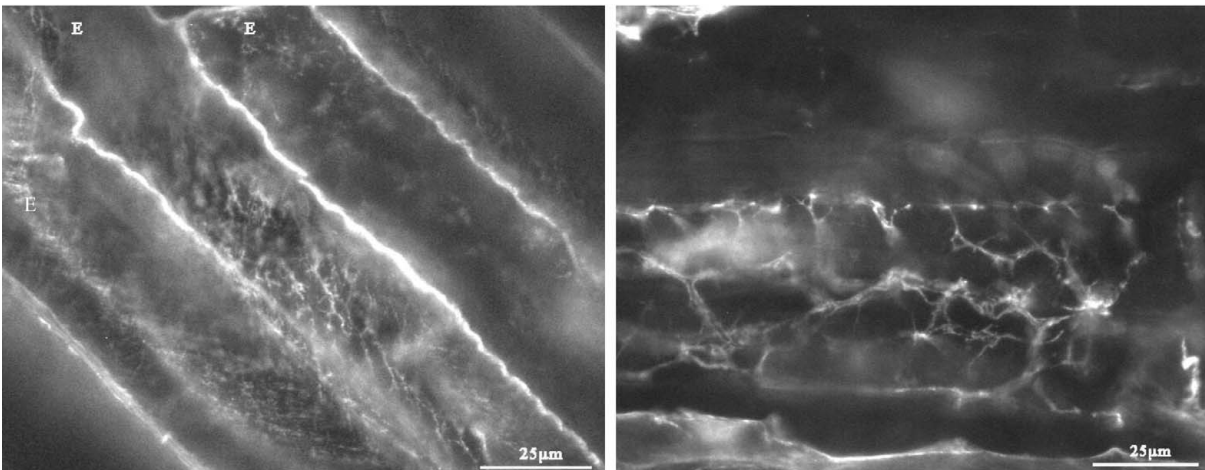


Obr. č. 32 a, b, c

Cytoskelet v endodermálních buňkách na podélných řezech segmenty kořene *Allium cepa* 10 – 15 mm od kořenové špičky. Vzorky fixované s využitím mikrovln o výkonu 160 W po dobu 5 min. E – endodermis. Konvenční fluorescenční mikroskop.

350W 3min

350W 5min



Obr. č. 33 a, b

Cytoskelet v endodermálních buňkách na podélných řezech segmenty kořene *Allium cepa* 10 – 15 mm od kořenové špičky. Vzorky fixované s využitím mikrovln o výkonu 350 W po dobu 3 a 5 min. E – endodermis. Konvenční fluorescenční mikroskop.

4.3 Aplikace metodiky fixace mikrotubulů s využitím účinků mikrovln na cytoskelet buněk kořenů *Arabidopsis thaliana*

(Spolupráce s Mgr. Ivanem Kulichem, KFR PřF UK)

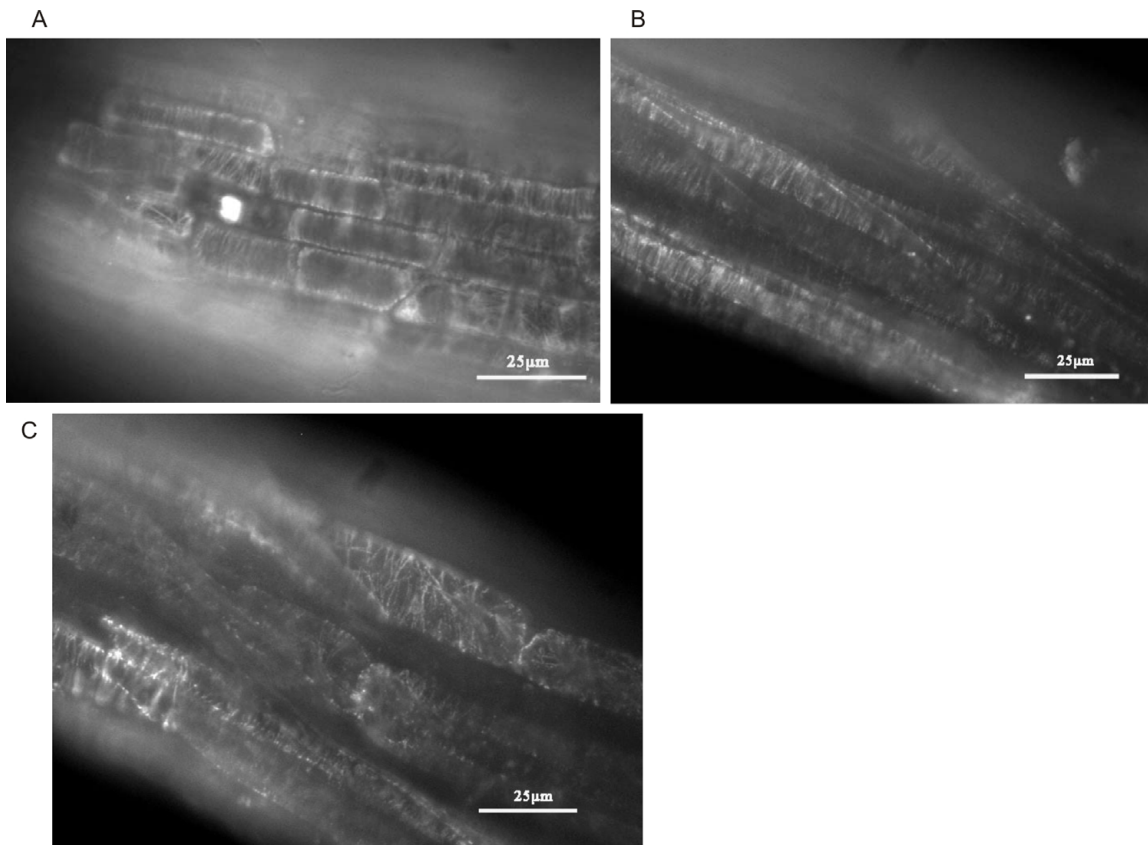
Bylo vyzkoušeno působení mikrovln o různém výkonu a času (viz. tabulka č. 2). Dle zkušeností s fixací cibule byly použity pouze výkony 90 a 160 W, a to po kratší časový úsek. Modelovým organismem je sedmidenní *Arabidopsis thaliana*. Velikost kořene, resp. tloušťka kořene huseničku umožňuje použít pro pokus celou rostlinu. Fixované vzorky byly po permeaci a imunolokalizaci pozorovány jak pod konvenčním, tak konfokálním fluorescenčním mikroskopem.

Tab. č. 2

výkon	délka působení mikrovln			
	1 min	2 min	3 min	5 min
kontrola	bez působení mikrovln			
90 W	x	x	x	x
160 W	x	x	x	x

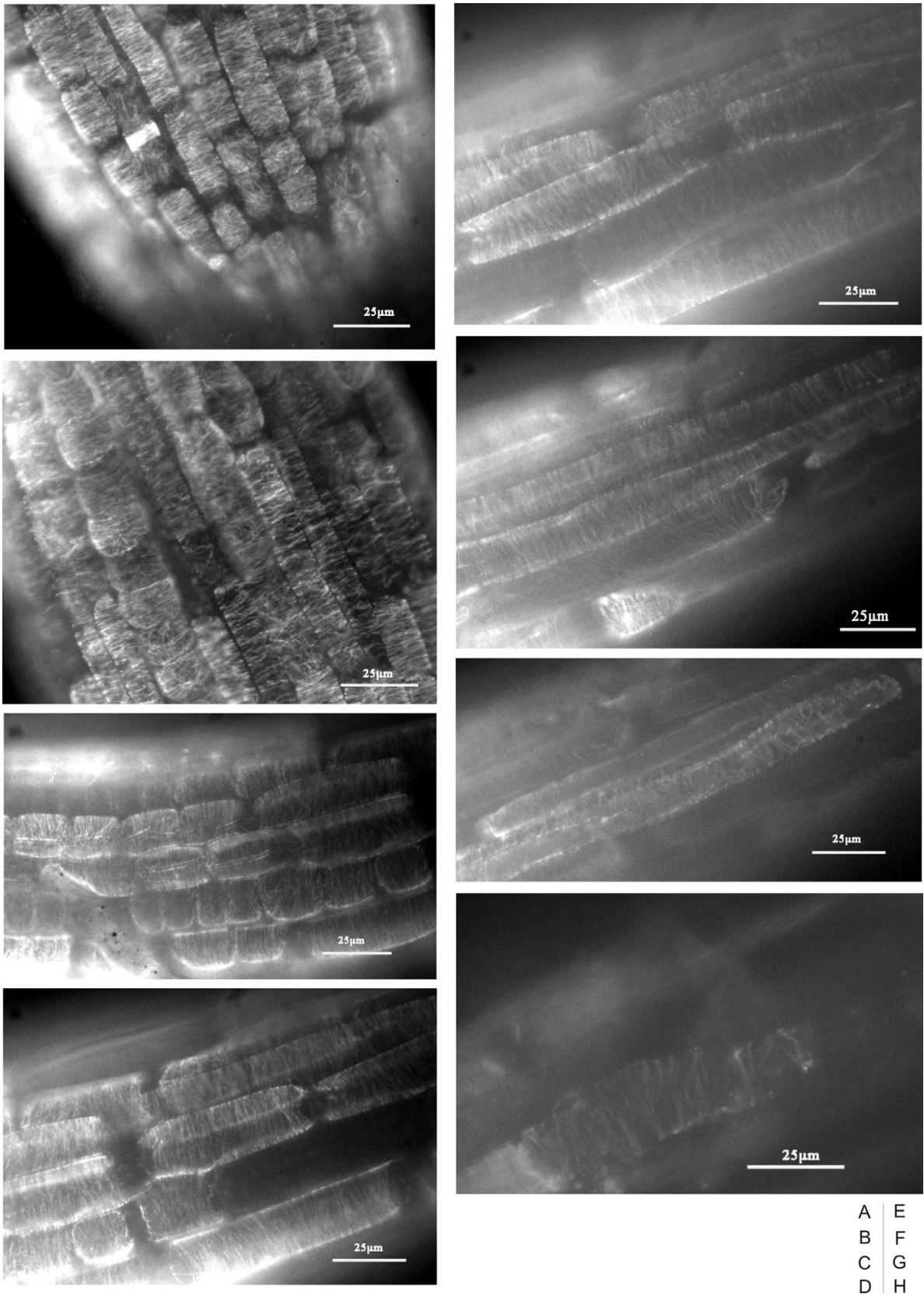
S pomocí konfokálního i konvenčního fluorescenčního mikroskopu jsme shodně detekovali u kontrolních vzorků (Obr. č. 34) dobře patrný mikrotubulární cytoskelet u kořenové špičky, dále od kořenové špičky však postupně fluorescenční signál slábl. V parenchymatických buňkách primární kůry vzdálených cca. 0,8 mm od kořenové špičky signál protilátky klesl na nedetekovatelnou úroveň. Aplikace mikrovln umožnila pozorovat mikrotubuly i dále od kořenové špičky až do úseku kořene s vytvářejícími se kořenovými vlásky, přispěla i k zvýšení kvality fluorescenčního signálu. (Dále od kořenové špičky dochází u *Arabidopsis thaliana* k vysoké vakuolizaci a mikrotubuly již nejsou dobře pozorovatelné.) Nejlépe dopadlo působení mikrovln o výkonu 160 W po dobu 2 a 3 minut (Obr. č. 35). Delší časové působení způsobovalo rozpad mikrotubulů typický pro silnější účinek mikrovln (viz. *Allium cepa*). Výkon 90 W po kratší časový úsek (1 a 2 min) způsobil kvalitnější zafixování mikrotubulů, nevedl však k posunutí hranice detekovatelnosti mikrotubulů směrem dále od kořenové špičky. Působení 5 minut tímto výkonem však přineslo výsledky podobné aplikaci mikrovln o výkonu 160 W po dobu 2 a 3 minut.

V pokusech jsem nedetekovali žádný fluorescenční signál ve středním válci a v endodermis dále od kořenové špičky (cca. od 1 mm od kořenové špičky). Důvodem je nejspíše nedostatečné pronikání protilátek intaktními pletivy kořene.



Obr. č. 34 a, b, c

Cytoskelet v buňkách kořene *Arabidopsis thaliana*. Celé rostliny zafixované bez využití mikrovln, imunodetekce mikrotubulárního cytoskeletu. Konvenční fluorescenční mikroskop. a) kořenová špička, b) a c) oblasti těsně za kořenovou špičkou.



A	E
B	F
C	G
D	H

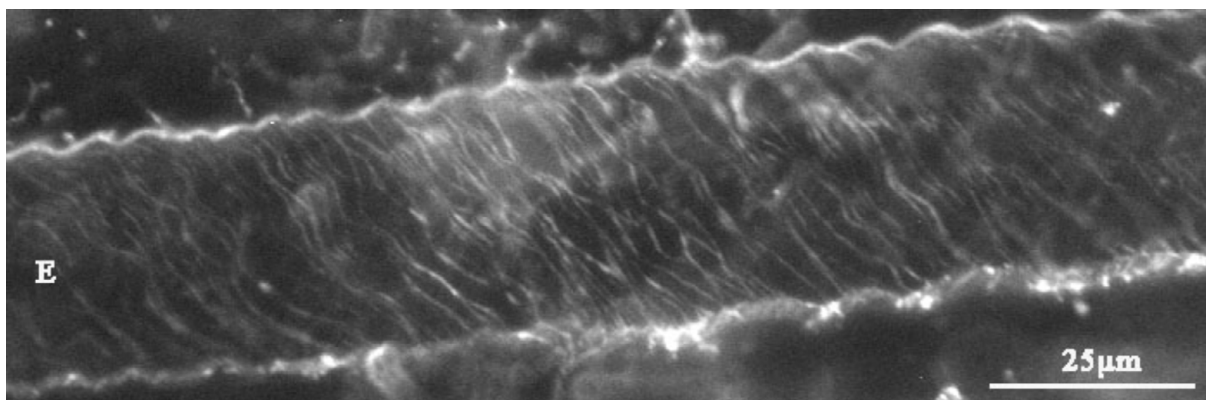
Obr. č. 35 a - h

Cytoskelet v buňkách kořene *Arabidopsis thaliana*. Fixace s využitím mikrovln o výkonu 160 W a délce účinku 2 min (c – h) a 5 min (a, b), imunodetekce mikrotubulárního cytoskeletu. Konvenční fluorescenční mikroskop. a), b) kořenová špička, c) – f) oblasti kořene se stoupající vzdáleností od kořenové špičky, g), h) oblast kořene se zakládajícími kořenovými vlásky.

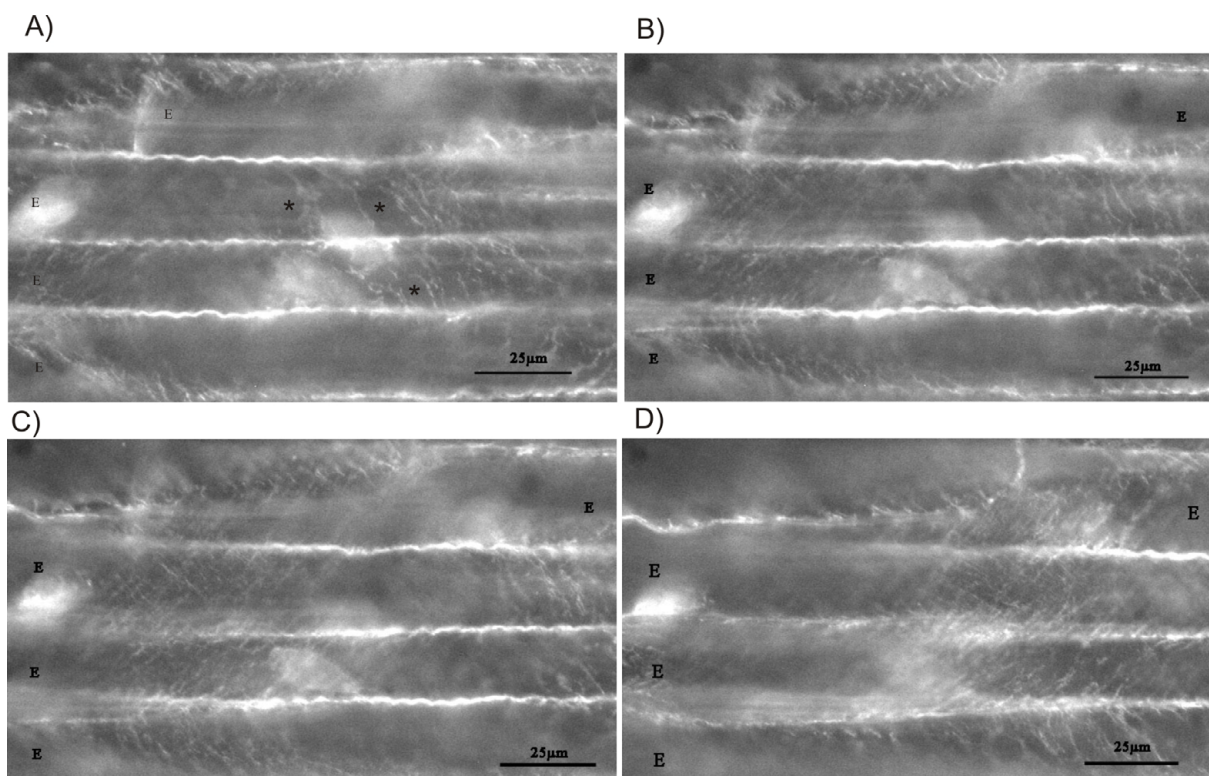
4.4 Uspořádání kortikálních mikrotubulů v endodermis kořene cibule *Allium cepa*

4.4.1 Pozorování kortikálních mikrotubulů konvenčním a konfokálním fluorescenčním mikroskopem

Kortikální mikrotubuly jsou uspořádané v endodermálních buňkách s vyvinutými Casparyho proužky svazčité, tvoří tedy jakési provazce o různé „tloušťce“, resp. nejspíše o různém počtu jednotlivých vláken mikrotubulů (Obr. č. 31d, Obr. č. 32, Obr. č. 36 až Obr. č. 38). Svazky mikrotubulů jsou navzájem orientovány rovnoběžně. Vlákná však nemají kolmou orientaci na hlavní osu kořene, nýbrž svírají s osou ostrý úhel (cca. 45°C). Mikrotubuly se zdají na fotografiích často mírně zvlňené. V některých případech je pravidelný průběh narušen zřejmě přítomností organel, jimž se vlákno vyhýbá (Obr. č. 31d, Obr. č. 37a). Mikrotubulová vlákna nejsou při těchto případech rovná, ale různě se „lámou“, někdy je možné pozorování i „ohnutí“ v ostrém úhlu. U některých endodermálních buněk jsou naopak mikrotubuly hladce zvlňené, tedy bez ostrých ohybů (Obr. č. 36). Jsou i případy, kdy jsou v endodermis detekované extrémně dlouhé a rovné mikrotubuly bez ohybů (Obr. č. 32, Obr. č. 38).



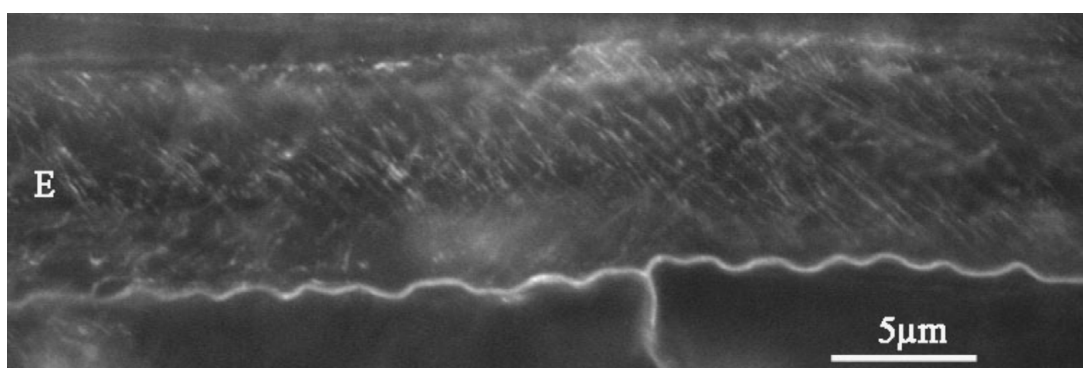
Obr. č. 36 Endodermální buňka na podélném řezu kořenem *Allium cepa* (segment 5 až 15 mm od kořenové špičky). Mikrotubulární cytoskelet je zvlňený. Časté je zvlňení bez přítomnosti ostrých úhlů. Konvenční fluorescenční mikroskop. E – endodermis.



Obr. č. 37a, b, c, d

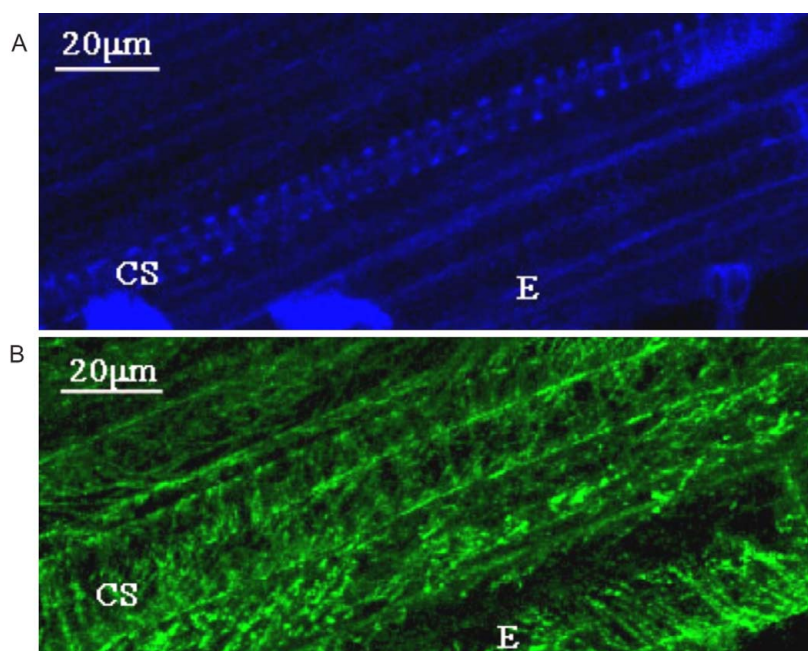
Endodermální buňky na podélném řezu kořenem *Allium cepa* (segment 5 až 15 mm od kořenové špičky) Fotografie zaznamenávají po sobě jdoucí čtyři optické roviny s endodermálními buňkami („E“). Postupně je vidět uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu v jednotlivých rovinách. Mikrotubuly jsou mírně zvlněné, svazčité. Na obr. a) jsou markantní volné prostory mezi mikrotubulárními svazky označené *. Konvenční fluorescenční mikroskop.

Uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu se mění v rámci buňky (Obr. č. 37a - d). Je patrné, že kortikální mikrotubuly pod plasmatickou membránou jsou uspořádány v paralelních svazcích, zatímco hlouběji do buňky nevykazují svazky mikrotubulů tak pravidelné uspořádání. Vznikají již výše zmíněné prostory mezi svazky mikrotubulů.



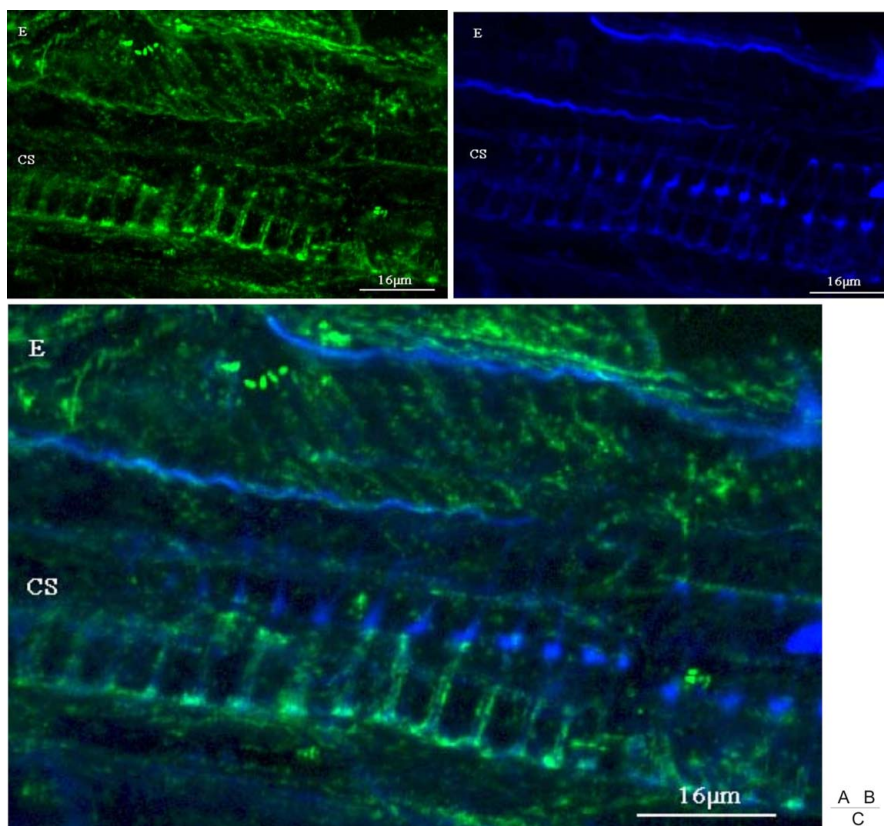
Obr. č. 38 Endodermální buňky na podélném řezu kořenem *Allium cepa* (segment 5 až 15 mm od kořenové špičky) Mikrotubuly jsou ve svazcích, které jsou dlouhé, rovné a tenké. Konvenční fluorescenční mikroskop. E - endodermis

Konfokální mikroskop „usnadňuje“ pozorování cytoskeletu, resp. umožňuje sledovat



cytoskelet ve více optických rovinách. Při pozorování mikrotubulárního cytoskeletu endodermis je nutné dát při skládání obrazů pozor na prosvěcování mikrotubulů cévních svazků (Obr. č. 39), resp. rozpoznat, že se jedná o mikrotubuly směřující k ukládající se sekundární buněčné stěně cévních svazků (Obr. č. 40).

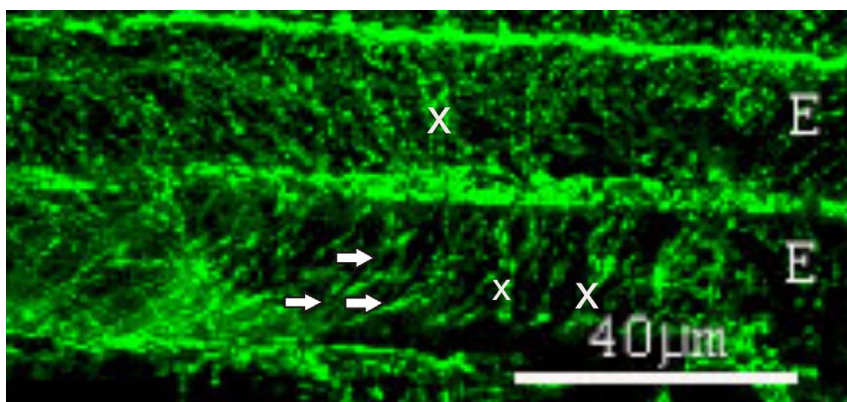
Obr. č. 39a, b Podélný řez kořenem *Allium cepa* (segment 10 až 20 mm od kořenové špičky). Lokalizace mikrotubulů v endodermis (E) a v cévních svazcích (CS). Konfokální fluorescenční mikroskop. a) modrý kanál snímající modrý signál jader barvených Hoechstem 33258 a autofluorescenci buněčných stěn, b) zelený kanál snímající zelený signál protilátkou lokalizovaných mikrotubulů a autofluorescenci buněčných stěn.



Obr. č. 40a, b, c Podélný řez kořenem *Allium cepa* (segment 10 až 20 mm od kořenové špičky). Uspořádání kortikálních mikrotubulů v cévním svazku (CS) a v endodermis (E). Konfokální mikroskop. a) modrý kanál -

modrý signál jader (Hoechst 33258) a autofluorescence buněčných stěn, b) zelený kanál - signál protilátkou lokalizovaných mikrotubulů a autofluorescence buněčných stěn, c) spojení modrého a zeleného kanálu.

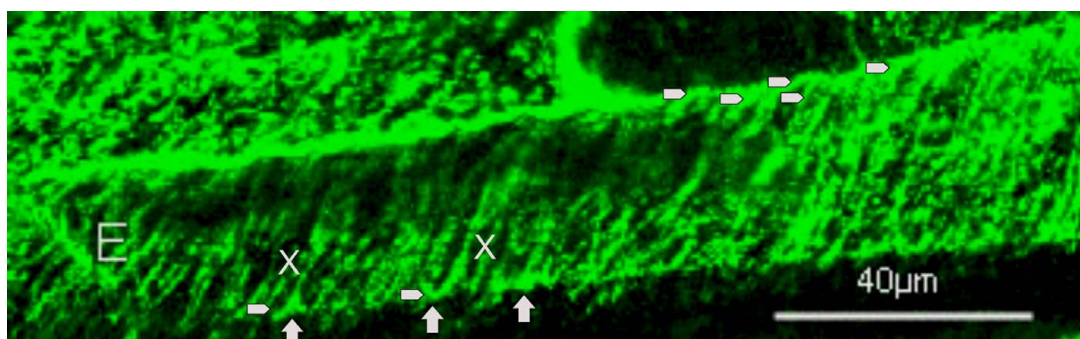
Výsledky pozorování z konvenčního fluorescenčního mikroskopu byly potvrzeny



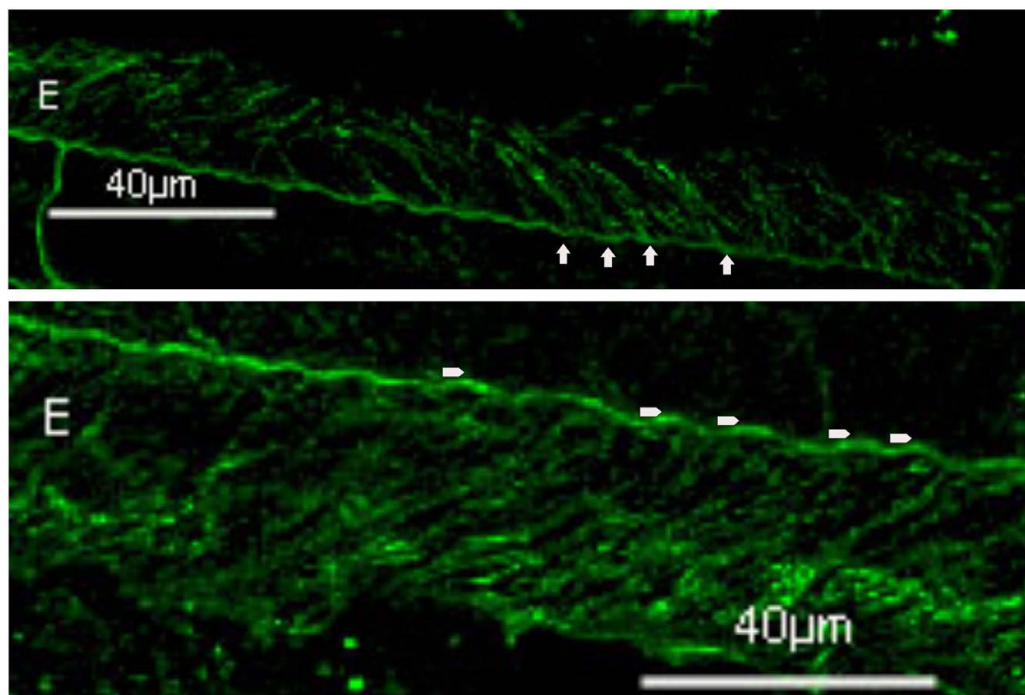
Obr. č. 41 Endodermální buňka (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. Zelený signál náleží mikrotubulárnímu cytoskeletu a slabě autofluorescenci buněčných stěn. Konfokální fluorescenční mikroskop. V endodermální buňce na fotografii dole jsou mikrotubuly paralelně uspořádány, avšak jejich tvar je mírně zaoblený (označeno šipkou). U některých svazků mikrotubulů se zdá, že se sbíhají a následně zase rozchází, struktura dvou svazků může mít pak v detailu tvar podobný písmenu X (označeno x).

mikroskopem konfokálním (Obr. č. 41 - Obr. č. 43). Mikrotubuly jsou na projekcích často zaoblené (např. Obr. č. 41). Svazky mikrotubulů se shlukují do svazků pod buněčnou stěnou (Obr. č. 42, Obr. č. 43) a směřují do určitých, více méně pravidelně

rozmístěných míst pod zvlněnou buněčnou stěnou. Tímto místem jsou nejspíše výdutě, resp. „prohlubně“ zvlněné buněčné stěny, kde byl detekován i silnější fluorescenční signál (Obr. č. 43b). Podle průběhu svazků mikrotubulů v endodermální buňce se dá usuzovat na uspořádání mikrotubulů do helixu. Na Obr. č. 42 jsou pod buněčnou stěnou Casparyho proužku vidět jednotlivé závitě šroubovice kortikálních mikrotubulů, které prochází místy výdutí zvlněné buněčné stěny. Detailnějšímu pozorování však vadí autofluorescenční signál v zeleném kanálu protilátky (např. Obr. č. 42), který nebylo možné při skenování eliminovat.

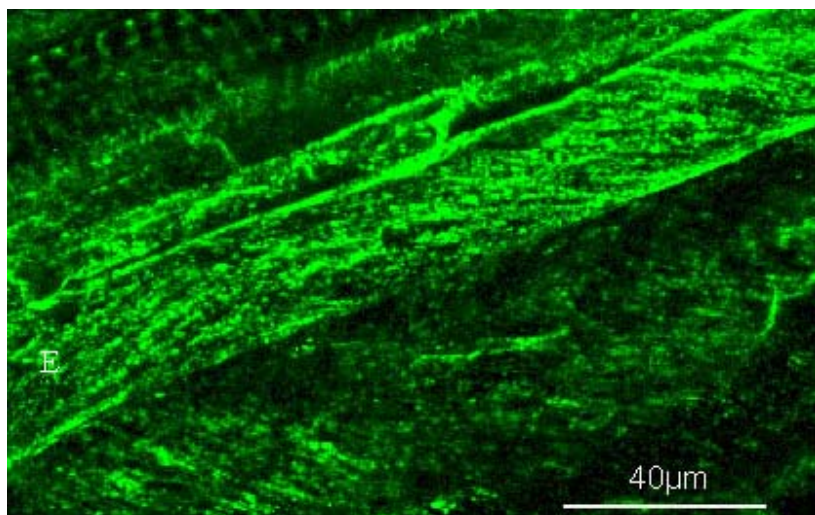


Obr. č. 42 Endodermální buňka (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. Zelený signál projekce náleží mikrotubulům a autofluorescenci buněčných stěn. Konfokální mikroskop. Svazky mikrotubulů se sbíhají do určitých míst pod buněčnou stěnou Casparyho proužku (označení šipkou). Směrovka ukazuje na zaoblení svazků mikrotubulů. Svazky tvořící písmeno X (označení x).



Obr. č. 43 a, b Detailní pohled na podélné řezy endodermálními buňkami (E). Zelený signál náleží mikrotubulům a autofluorescenci buněčných stěn. Konfokální fluorescenční mikroskop. Svazky mikrotubulů pod zvlněnou buněčnou stěnou (šipka). b) Ve výdutích zvlněné buněčné stěny (označené směřovkou) je vyšší fluorescenční signál.

V některých případech bylo pozorováno pro endodermální buňky netypické uspořádání kortikálních mikrotubulů (Obr. č. 44). Mikrotubuly jsou uspořádány ve svazcích, které jsou v rovnoběžném postavení s hlavní osou buňky. Svazky vytváří v rámci buňky v ose

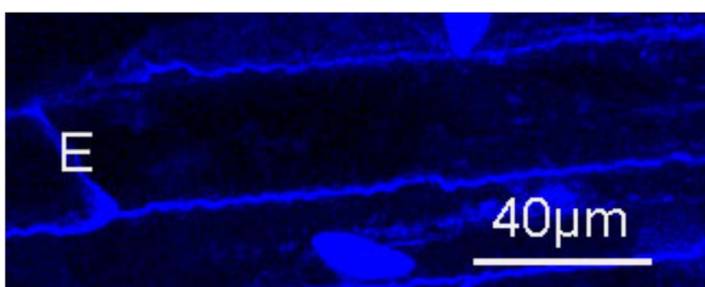
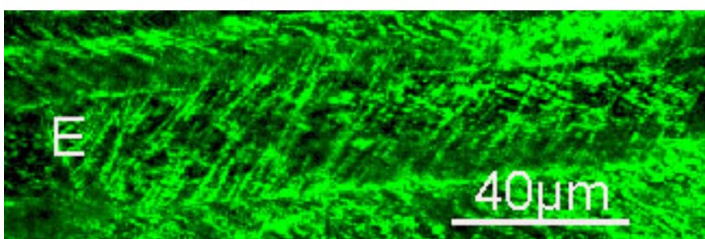
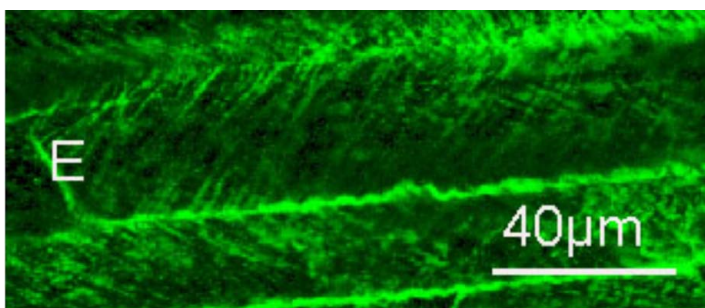


kořene dlouhé „pruhy“, které jsou mírně prohnuté. Toto postavení je typické např. pro parenchymatické buňky primární kůry, u kterých došlo k ukončení prodlužování buňky.

Obr. č. 44 Endodermální buňka (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. Zelený signál náleží mikrotubulárnímu cytoskeletu a slabě autofluorescenci buněčných stěn. Konfokální fluorescenční mikroskop.

4.4.2 Eliminace autofluorescenčního signálu buněčné stěny ze zeleného signálu protilátky při snímání konfokálním mikroskopem

(ve spolupráci s Mgr. Ondřejem Šebestou, PřF UK Praha)



Obr. č. 45a, b, c Endodermální buňky (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. a, b) Projekce složené z dvou sad (a, b) optických řezů. Zelený signál náleží mikrotubulárnímu cytoskeletu a autofluorescenci buněčných stěn, která je silná hlavně v místech uložení Casparyho proužků. c) Projekce optických řezů a. Modrý signál náleží signálu jader (Hoechst 33258) a autofluorescenci buněčných stěn. Konfokální mikroskop.

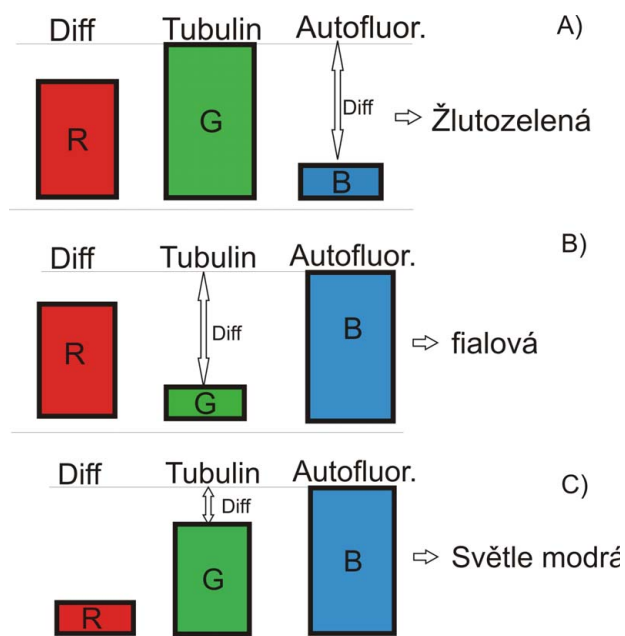
A Silná autofluorescence buněčné stěny v místech Casparyho proužků v zeleném kanálu brání detailnímu pozorování postavení mikrotubulárního cytoskeletu (Obr. č. 42 a Obr. č. 45). V případě buněčné stěny bez Casparyho proužků bylo možné autofluorescenční signál při snímání konfokálním mikroskopem víceméně eliminovat, v místech Casparyho proužků však ne. Casparyho proužky vykazují v porovnání s „normální“ buněčnou stěnou silnou autofluorescenci o širokém spektru vlnových délek. Důvodem je odlišné složení buněčné stěny, která je v místech Casparyho proužků obohacena o ligniny a

suberiny. Jejich autofluorescence se překrývá s emisním spektrem fluorescence sekundární protilátky Alexa Fluor 488. Vyzkoušeli jsme sekundární protilátku značenou fluorochromem s emisí v oblasti delších vlnových délek, tedy Alexa Fluor 546. Tato protilátka však vykazovala i přes vyšší koncentraci slabý červený signál, který byl v konfokálním mikroskopu nedostatečný.

Jedním z možných řešení se zdá být potlačení signálu autofluorescence při následném zpracování obrazu. Bylo tedy nutné najít metodu eliminace autofluorescenčního signálu („analýzy konfokálního obrazu“), která umožní rozlišit na snímcích vytvořených konfokálním mikroskopem autofluorescenci od samotné fluorescence protilátky a odečíst ji. K dispozici

byly fotografie nasnímané v zeleném kanálu protilátky a v modrém kanálu autofluorescence se signálem Hoechstu 33258 (Obr. č. 45). Předpokládá se, že modrý kanál neobsahuje informace o sekundární protilátce.

- a) První možností je prosté odečtení modrého kanálu od zeleného kanálu. Získáme tedy odečtení nahrubo. Tato metoda je jednoduchá, ale poskytuje pouze informace ano – ne. Bohužel však také vede k nemalé ztrátě potřebné fluorescenční informace. (Obr. č. 47b)
- b) Další možností je určit pravděpodobnost, s jakou je fluorescence, kterou pozorujeme v zeleném kanálu, autofluorescencí či fluorescencí „tubulinu“. Tento postup vede k nižší degradaci signálu zeleného kanálu a jeho lokalizaci. Výsledné různé barevné znázornění jednotlivých buněčných struktur nám napomáhá se lépe orientovat v projekcích (Obr. č. 47 c až e).



Obr. č. 46a, b, c Metoda eliminace autofluorescenčního signálu. Určení míry pravděpodobnosti, že fluorescenční signál v zeleném kanálu pochází z autofluorescence nebo je samotným fluorescenčním signálem sekundární protilátky. A) Slabý signál z modrého kanálu (nízká autofluorescence) je odečten od silného signálu v zeleném kanálu (oblast výskytu mikrotubulů, autofluorescence). Rozdíl vytváří červený kanál. Výsledná žlutozelená barva náleží mikrotubulárnímu cytoskeletu. B) Slabý signál ze zeleného kanálu je odečten od silného signálu modrého kanálu (vysoká autofluorescence, popř. signál Hoechstu 33258). Rozdíl vytváří červený kanál. Výsledná fialová barva znázorňuje jádra a buněčné stěny. C) Zelený i modrý kanál vykazují silný signál. Signály jsou odečteny. Výsledná informace tvoří červený kanál. Pravděpodobnost výskytu autofluorescence a fluorescence protilátky je znázorněna světle modrou barvou.

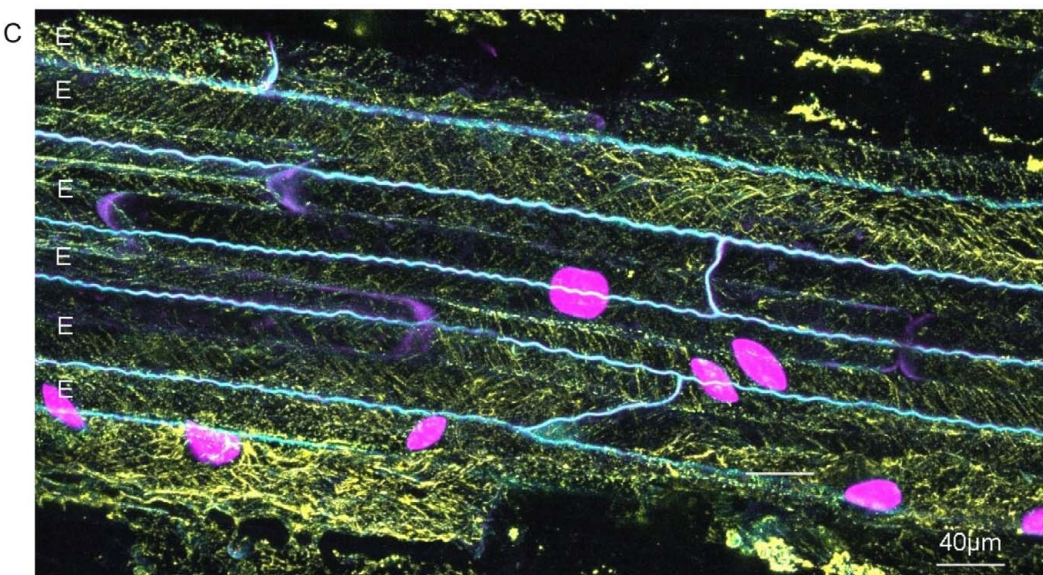
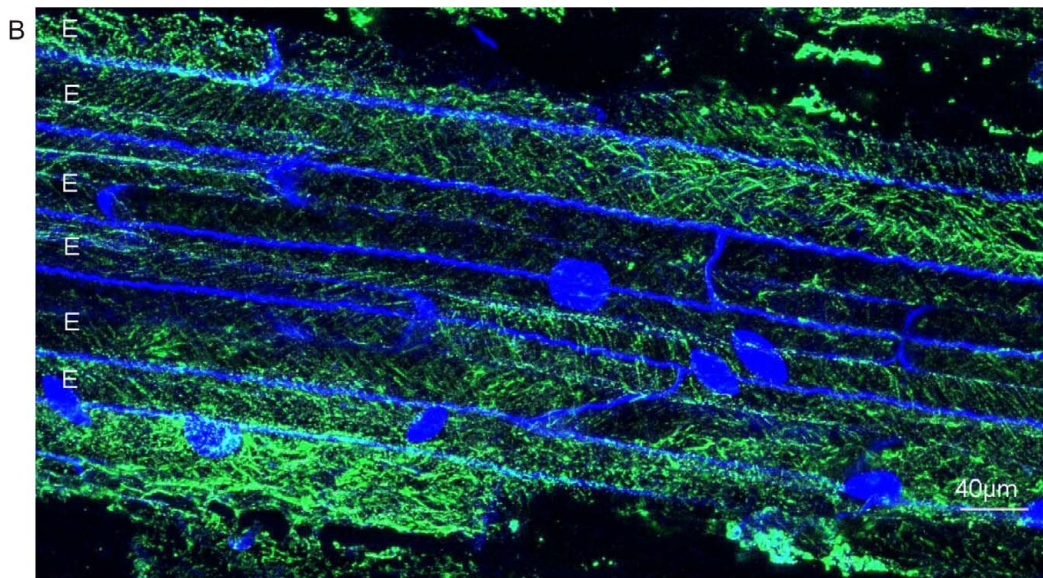
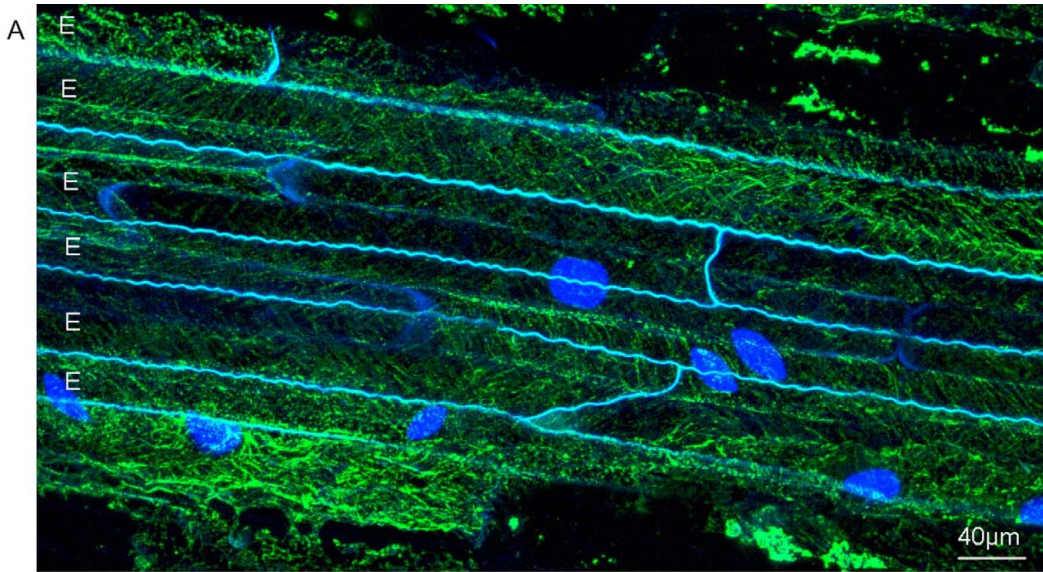
Jeden ze způsobů získání míry pravděpodobnosti je znázorněn na Obr. č. 46. Zjišťován byl rozdíl (difference) mezi modrým a zeleným kanálem, který byl uložen do červeného kanálu. Obr. č. 46 blíže vysvětluje vliv poměru intenzity signálů na výsledné barevné znázornění buněčných struktur. Obr. č. 47c) ukazuje barevné znázornění míry pravděpodobnosti při použití této metody.

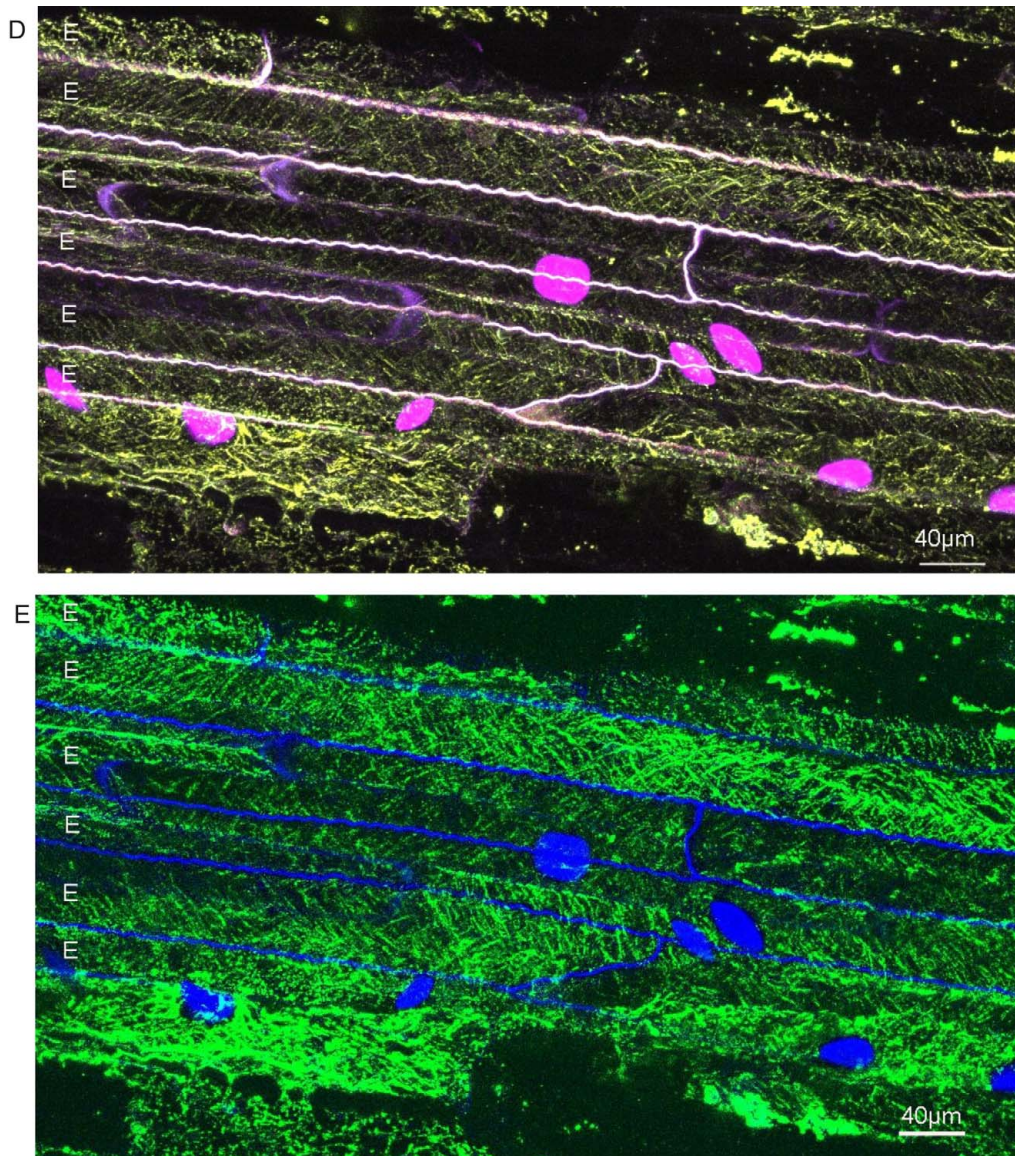
Dále je možné zvětšit škálu barevného znázornění pravděpodobnosti (tedy nejen v odstínech světle modré barvy jako v předchozím postupu), což vede k větší přesnosti rozhodování, zda signál patří fluorescenci, či autofluorescenci (Obr. č. 47d). Tato metoda

navazuje na metodu vysvětlenou v předchozím bodě (Obr. č. 46). Od modrého kanálu je odečtena informace z červeného kanálu. Získáme rozdíl č. 1 (Diff1). Od zeleného kanálu je odečten červený kanál, vznikne rozdíl č. 2 (Diff2). Tyto dva rozdíly se v absolutní hodnotě sečtou. Vzniká výsledný červený kanál. Pravděpodobnost je znázorněna škálou růžovo – červeně – oranžovo – bílou. Preference této metody či předchozí metody leží částečně na barevném vidění pozorovatele.

Makro pro všechny tři výše zmíněné možnosti eliminace autofluorescence pozadí vytvořené pro program Image J je součástí přílohy diplomové práce (kapitola 9.4).

Přesahující signál autofluorescence buněčné stěny do emisního spektra fluorescenčního signálu samotné sekundární protilátky se dá z větší části eliminovat pomocí algoritmů, tzv. spectral unmixing určený pro práci v Image J (Obr. č. 47e) (Walter 2004). Je nutné si stáhnout z internetové adresy <http://math.nist.gov/javanumerics/jama/> (20.2.2008) potřebné zásuvné modely. Princip této metody eliminace autofluorescence je určit v modrém kanále (autofluorescence buněčné stěny a signál Hoechstu 33258) a v zeleném kanále (fluorescenční signál protilátky a částečná autofluorescence buněčné stěny) míru intenzity „background“, referenční hodnoty signálu protilátky a autofluorescenčního signálu buněčné stěny. Tyto hodnoty se uloží a počítač pak na jejich základě porovnává hodnoty jednotlivých signálů obrazu v obou kanálech a určuje, zda signál náleží protilátce, či autofluorescenci. Výsledek je „dvojbarevný“, jedna barva (v našem případě zelená) ukazuje pouze fluorescenční signál tubulinu, druhá barva (u nás modrá) pak autofluorescenci buněčné stěny. Nedochozí ke ztrátě informace jako u prostého odečtení. Negativem této metody je její aplikace na každý vzorek zvlášť, tedy vždy se musí načíst nové referenční hodnoty.



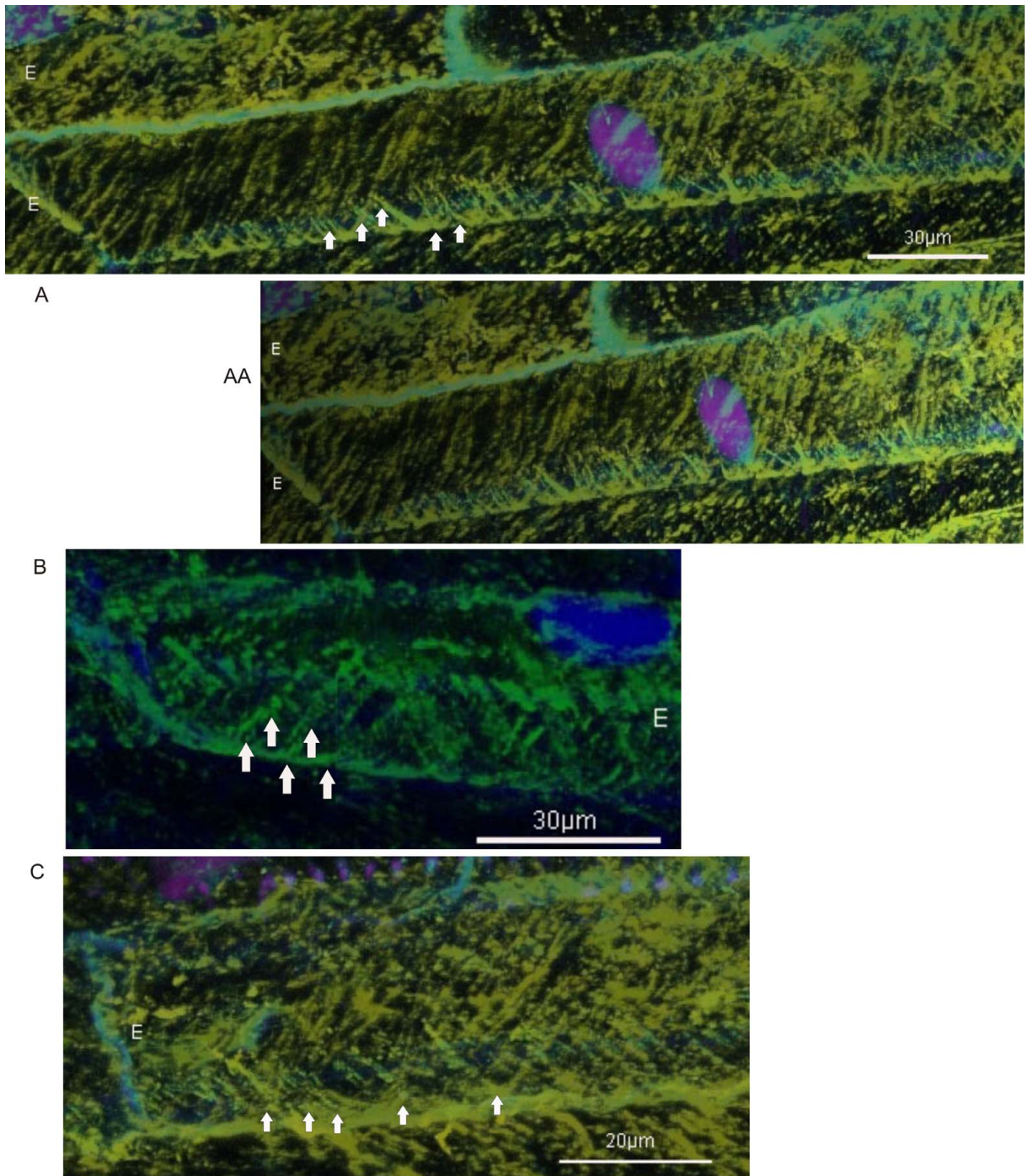


Obr. č. 47a-e Metody eliminace autofluorescence pozadí. a-e) Maximální projekce a) Prosté sloučení modrého (autofluorescence buněčných stěn a signál Hoechstu 33258) a zeleného kanálu (fluorescence „tubulinu“, resp. sekundární protilátky a autofluorescence buněčných stěn) po naskenování konfokálním mikroskopem. Tmavě modře jsou znázorněna jádra, zeleně mikrotubuly, modro zelený signál je tvořen signálem nacházejícím se v obou kanálech. Autofluorescence se tedy nachází v obou kanálech, nebyla odstraněna. b) Hrubé odečtení modrého kanálu od zeleného. Zelená odpovídá mikrotubulům, modrá buněčné stěně a jádrům. c) První znázornění míry pravděpodobnosti, že fluorescenční signál v zeleném kanálu pochází z autofluorescence nebo je samotným fluorescenčním signálem sekundární protilátky (Obr. č. 46). Žlutozelená znázorňuje mikrotubuly, růžová až fialová jádra a buněčnou stěnu. Odstíny světle modré je znázorněna výše zmíněná pravděpodobnost. Temnější modrá ukazuje na pravděpodobnost, že se jedná spíše o signál s autofluorescenčním původem, světlejší až skoro bílá pak s největší pravděpodobností ukazuje na fluorescenční původ. d) Druhé možné znázornění míry pravděpodobnosti, že fluorescence je autofluorescencí či fluorescencí „tubulinu“. Pravděpodobnost je znázorněna širší škálou barevných odstínů: růžovo – červeně – oranžovo – bílou. Tedy zde na obr. ukazuje světle růžová barva (např. zvlněné buněčné stěny) pravděpodobnost, že signál má původ nejspíše v autofluorescenci, světlá bílo – žlutá barva (např. některé úseky těsně u zvlněné buněčné stěny) pak pravděpodobnost, že se jedná spíše o fluorescenční signál. e) Eliminace autofluorescence pomocí algoritmů, tzv. spectral unmixing určený pro práci v Image J. Zelená odpovídá mikrotubulům, modrá buněčné stěně a jádrům. E – endodermis

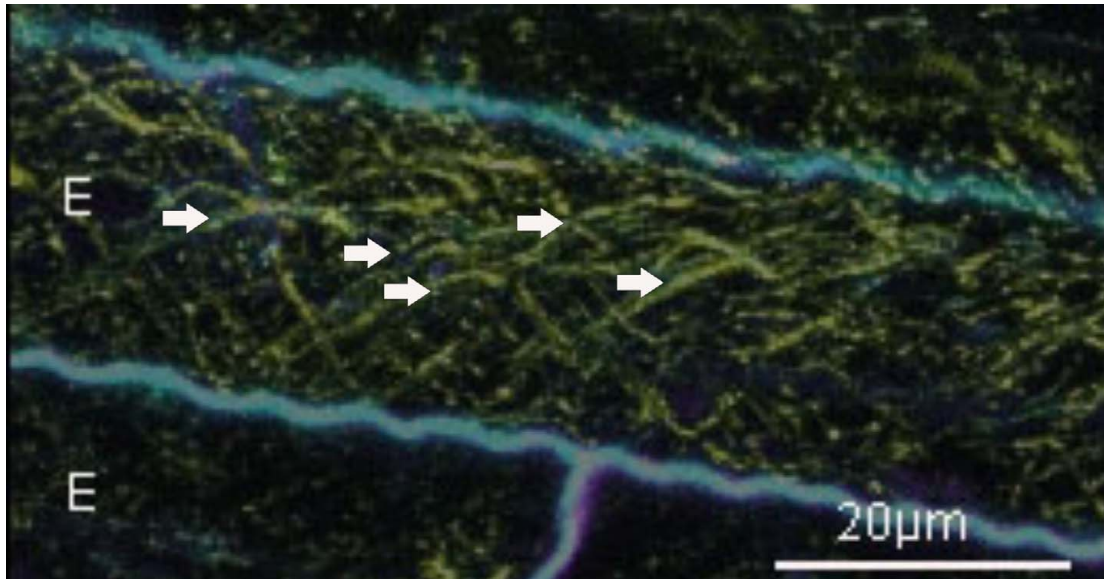
4.4.3 3D-rekonstrukce optických řezů z konfokálního mikroskopu za využití metod eliminace autofluorescence a uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu pod zvlněnou buněčnou stěnou Casparyho proužku

Separace autofluorescenčního pozadí nám umožňuje sledovat uspořádání kortikálních mikrotubulů těsně pod zvlněnou buněčnou stěnou Casparyho proužků. Na obrázky dále v textu je aplikována nejen výše zmíněná eliminace autofluorescenčního signálu (první způsob určení pravděpodobnosti – viz. Obr. č. 47c) , ale i prosté odečtení signálů (Obr. č. 47b). Často jsou uvedeny oba výsledky vždy s přesným popisem, co jaká barva znázorňuje. Důvodem tohoto dvojího uvedení je lepší orientace na projekcích z konfokálního mikroskopu. Také lze porovnat situaci na obrázku se zaznamenanou pravděpodobností s obrázkem po hrubém odečtu signálu, který je pro pozorování jednodušší, avšak u kterého došlo díky hrubému odečtu ke ztrátě signálu. Někdy tedy poskytují stejné obrázky ošetřené různou metodou „analýzy konfokálního obrazu“ přeci jen různě znatelný výsledek (např. Obr. č. 57). Dalším důvodem častého znázornění dvou verzí projekcí je umožnění sledování výsledků i pro lidi s barevnou poruchou vidění. U 3D-projekcí je často uveden nejen přímý pohled na struktury, ale i pohled z boku struktur. Pohledy z boku mají pomoci lidem bez prostorového myšlení s představou trojrozměrného uspořádání.

Již ze studia dvojrozměrných projekcí endodermálních buněk bez aplikace eliminace autofluorescenčního signálu je patrné (viz. kapitoly 4.4.1), že kortikální mikrotubuly, resp. jejich svazky vytváří v endodermálních buňkách šroubovici. Toto se potvrdilo i při studii trojrozměrných struktur endodermálních buněk, na základě kterých jsme získali přesnější informace o prostorovém uspořádání kortikálních mikrotubulů v endodermis. Helix svazků mikrotubulů je pravidelně uspořádán, vine se v rámci celé buňky těsně pod plasmatickou membránou (Obr. č. 48, Obr. č. 49). Zajímavá situace nastává v místech výskytu Casparyho proužků (Obr. č. 48 až Obr. č. 53). Zvlnění buněčné stěny je kopírováno pravidelným výskytem fluorescenčního signálu „tubulinu“. Fotografie z konfokálního mikroskopu, hlavně pak 3D – rekonstrukce (např. Obr. č. 51) potvrdily, že zvlnění buněčné stěny není pravidelné. U buněčné stěny Casparyho proužku lze nalézt oblasti o různé „amplitudě“ a „periodě“.

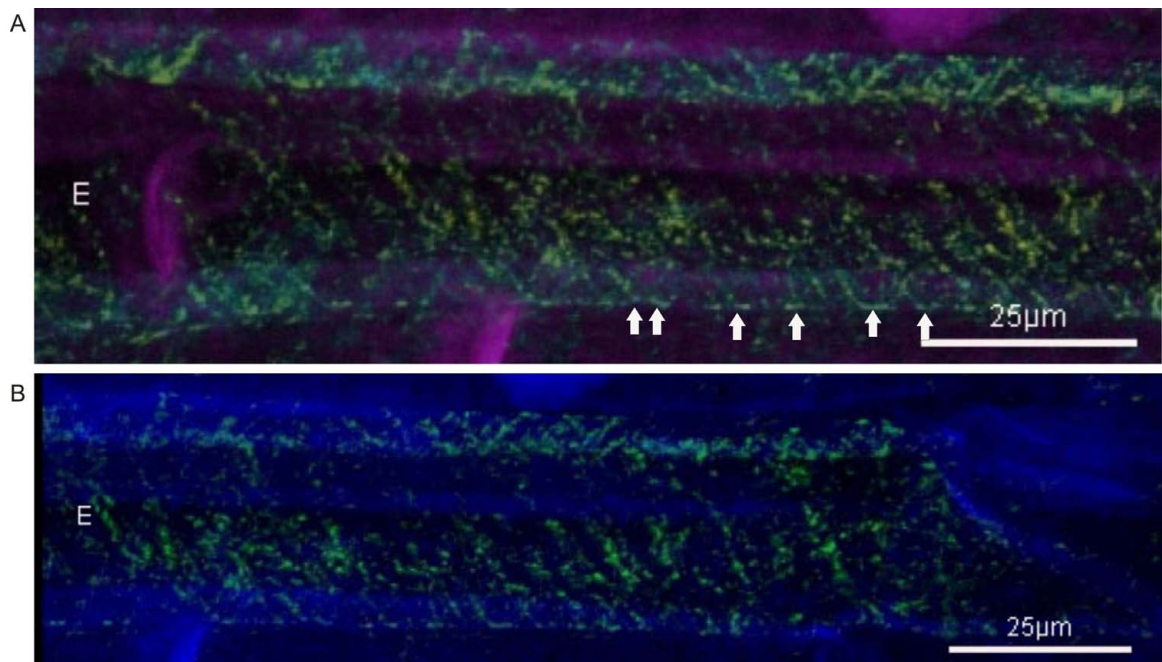


Obr. č. 48a, aa, b, c Endodermální buňky (E) na podélných řezech kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. Trojrozměrné rekonstrukce sady optických řezů z 40 μm tlustého podélného řezu kořenem pocházející z konfokálního mikroskopu. a, b, c) přímý pohled na podélně orientované endodermální buňky, aa) pohled z boku 3D-modelu. a, aa, c) Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence (určení pravděpodobnosti – viz. kap. 4.4.2). Žlutozelená barva patří mikrotubulům, růžová až fialová jádrům a buněčné stěně. Odstíny světle modré označují pravděpodobnost. Temnější modrá – signál pravděpodobně pochází z autofluorescence, světlejší modrá až bílá – signál pochází pravděpodobně z fluorescence protilátky. b) Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. Šipkami označeny jednotlivé otáčky šroubovice v místech Casparého proužku, resp. pod zvlněnou buněčnou stěnou.

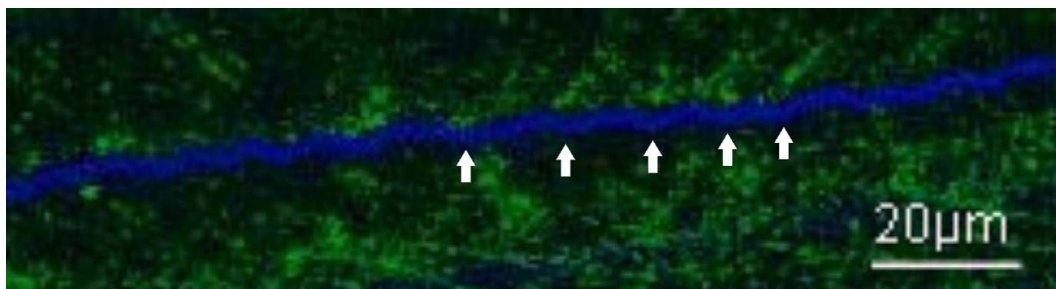


Obr. č. 49 Endodermální buňka (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. Fotografie získané z 3D-rekonstrukce sady optických řezů z 40 µm tlustého podélného řezu kořenem pocházející z konfokálního mikroskopu. Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence (popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c). Šípkami jsou označeny svazky mikrotubulů, které vytváří „klenbu“ v kortikální oblasti buňky.

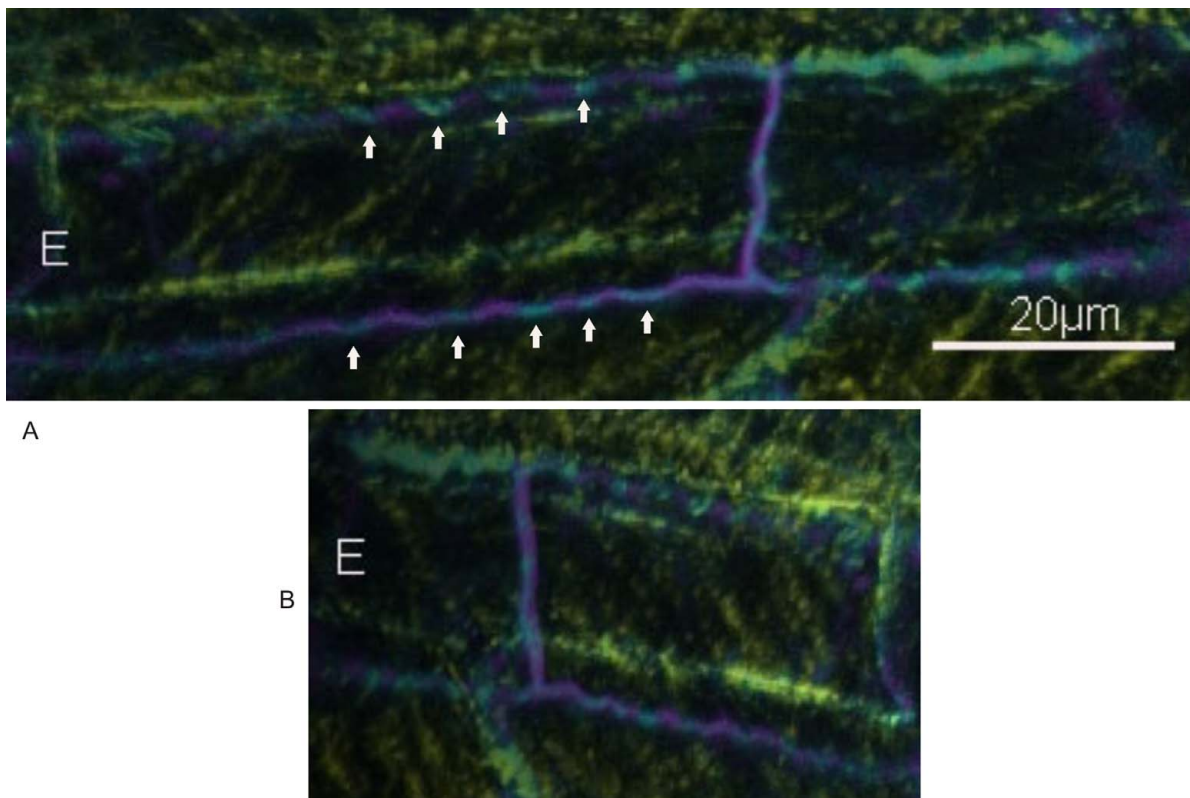
Na Obr. č. 50 je patrné střídání autofluorescence s fluorescencí sekundární protilátky. Fluorescence a autofluorescence vytváří na trojrozměrném modelu endodermis získaném po separaci signálu autofluorescence nepravidelný „čerchovaný charakter“ buněčné stěny v místech Casparyho proužků. Fluorescenční signál „tubulinu“ je širší, vytváří tedy čerchování. Mezi tímto signálem se nachází slabý signál autofluorescence vytvářející jakési vlny. Zdá se tedy, že v místech Casparyho proužků se nevyskytují svazky mikrotubulů kdekoliv, nýbrž že zde dochází k jejich organizovanému uspořádání nepravidelného vzoru, které má souvislost s nepravidelně zvlňeným charakterem buněčné stěny Casparyho proužku. Obr. č. 51, Obr. č. 52 a Obr. č. 53 ukazují výskyt fluorescenčního signálu mikrotubulů v místech prohlubní (výdutí) zvlňené buněčné stěny. Fluorescenční signál byl nalezen nejen přímo v nejhlubším bodě prohlubní, ale i na úbočí.



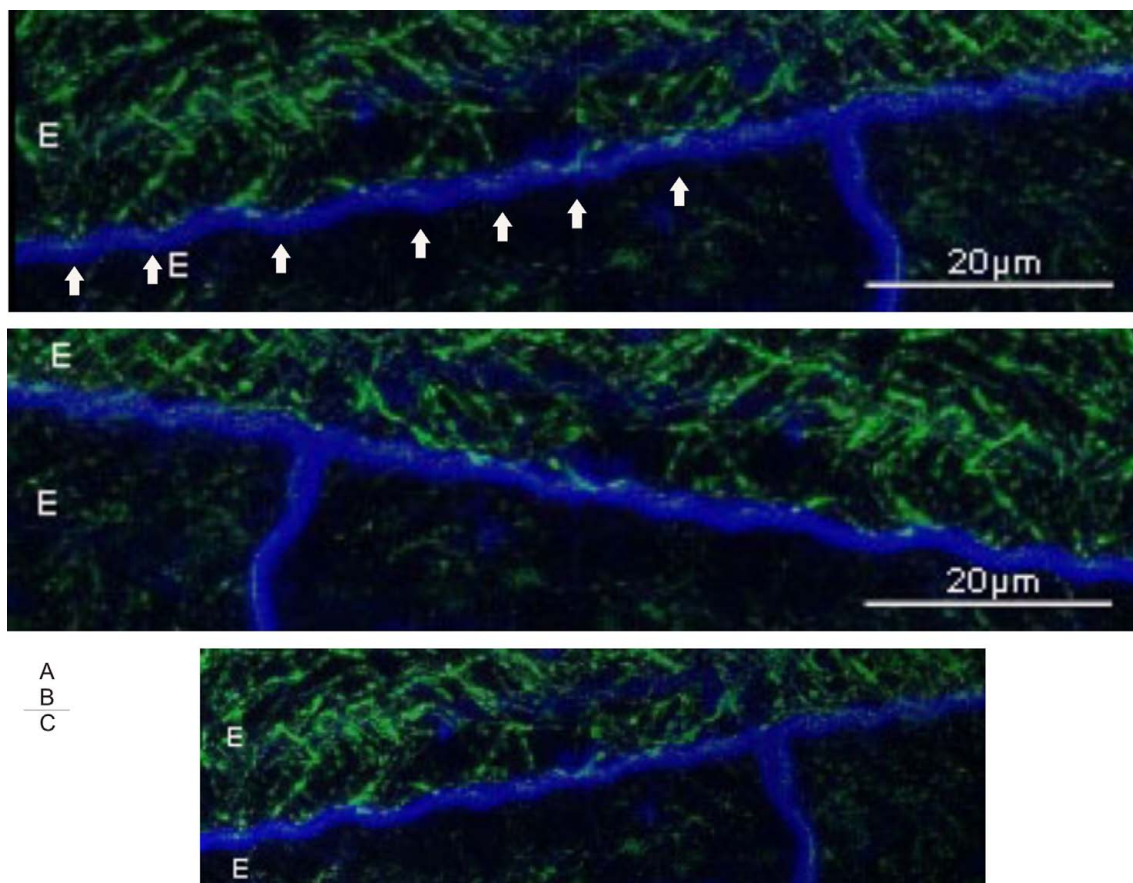
Obr. č. 50a, b Endodermální buňka (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. Přímý pohled na podélně orientovanou endodermální buňku. a) Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence (popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c). b) Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. Šipka - signál mikrotubulů v místě Casparyho proužků, resp. pod zvlněnou buněčnou stěnou. Popis obr. v textu.



Obr. č. 51 Zvlněná buněčná stěna v místech Casparyho proužků s kortikálními mikrotubuly endodermis na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. Eliminace autofluorescence pomocí spectral unmixing. Zelená odpovídá mikrotubulům, modrá buněčné stěně a jádrům. Signál mikrotubulů v místě Casparyho proužků, resp. pod zvlněnou buněčnou stěnou je označen šipkou. Je patrné, že se signál „tubulinu“ vyskytuje hlavně v místech prohlubní (výdutí) zvlněné buněčné stěny. Eliminace autofluorescence umožnila „oddělený“ pohled na mikrotubuly ležící v místech pod buněčnou stěnou Casparyho proužku o silné autofluorescenci. Buněčná stěna na projekci je nepravidelně zvlněná, je možné pozorovat různě široké a hluboké „údolí“. Podobně nepravidelný charakter sleduje i výskyt signálu mikrotubulů pod zvlněnou buněčnou stěnou.



Obr. č. 52a, b Endodermální buňka (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. a) Přímý pohled na podélně orientovanou endodermální buňku, b) pohled z boku 3D-modelu otočeného o 180°. Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence (popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c). Zvlněná buněčná stěna je dvojbarevná, její fialová barva je střídána modrozelenou barvou, která s největší pravděpodobností odpovídá signálu mikrotubulů na fialovém pozadí buněčné stěny. Tento signál se nachází v místech prohlubní buněčné stěny Casparyho proužku, popř. na jejich svahu.

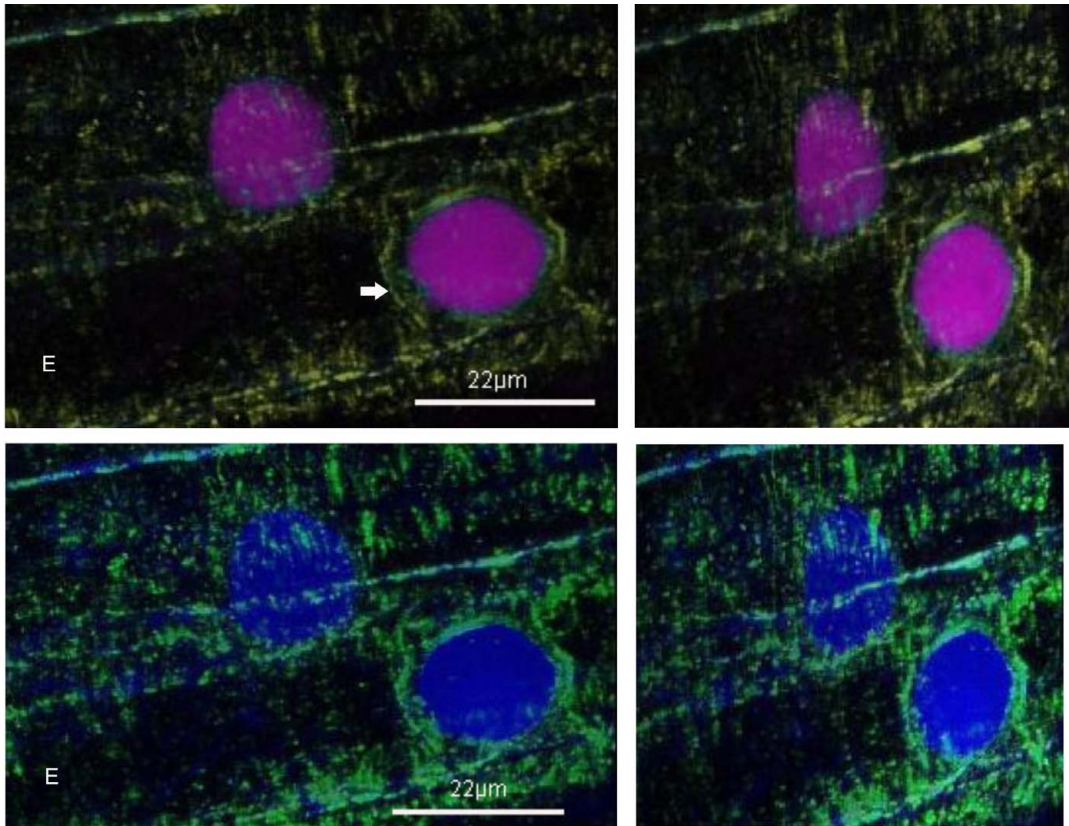


Obr. č. 53a, b, c Endodermální buňky (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa*, segmentem 10 – 20 mm od kořenové špičky. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. a) Přímý pohled na podélně orientované endodermální buňky, b) pohled otočen o 180°, c) pohledy z boku 3D-modelu. Signál mikrotubulů se nachází převážně v místech prohlubní buněčné stěny Casparyho proužku, popř. na jejich úbočí.

4.5 Změna uspořádání kortikálních mikrotubulů během vývoje proendodermis do stádia založení Casparyho proužku v prvním vývojovém stavu endodermis v kořeni cibule *Allium cepa*

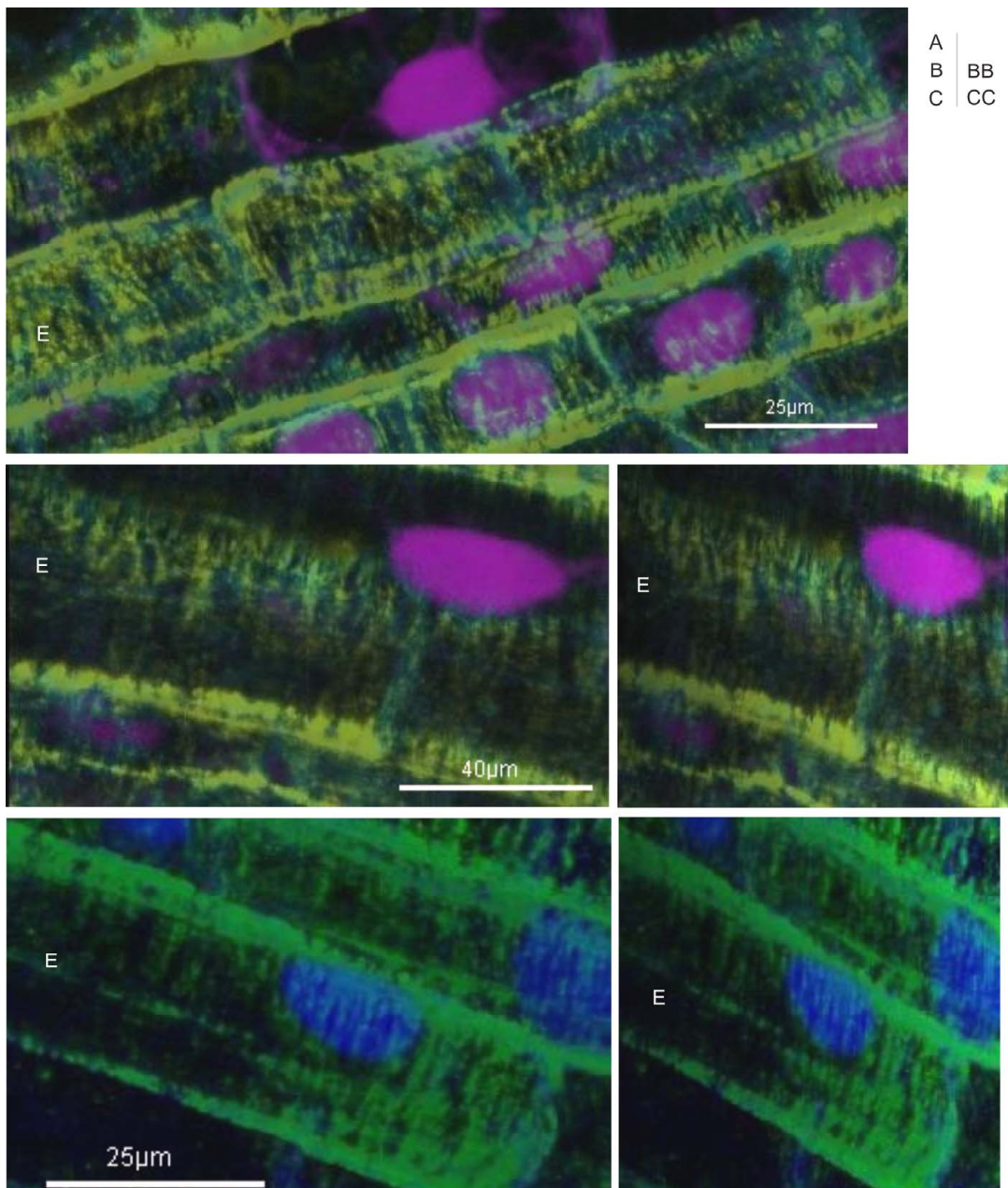
Jak ukazuje Obr. č. 54, podařilo se na projekcích proendodermálních buněk zachytit nejen kortikální mikrotubuly, ale i endoplasmatické mikrotubuly vycházející od jaderného obalu směrem k povrchu. V endodermis s vytvořenými Casparyho proužky nejsou endoplasmatické mikrotubuly detekovatelné.

Poprvé se podařilo proendodermální buňky identifikovat asi 2 mm od kořenové špičky jako krátké, menší buňky s hustou „sítí“ kortikálních mikrotubulů (Obr. č. 55a). Již takto blízko u kořenové špičky se jednotlivé mikrotubuly uspořádávaly do svazků (Obr. č. 55b, bb). Toto svazkování je u proendodermálních buněk velice rychlé a odehrává se v buňkách blízko kořenové špičky. Dále v ontogenezi proendodermis (Obr. č. 55c, cc až Obr. č. 59) se mikrotubuly vyskytovaly vždy ve svazcích, které jsou navzájem orientovány paralelně.



A	AA
B	BB

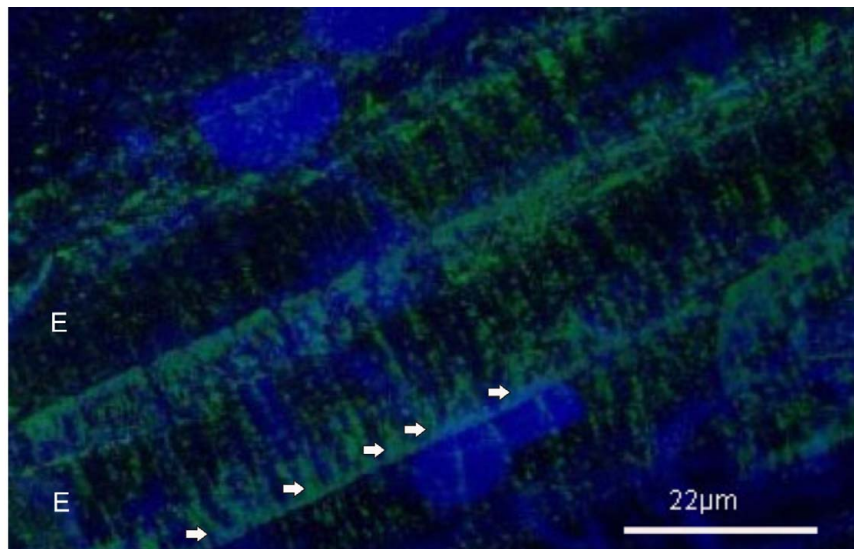
Obr. č. 54a, aa, b, bb Proendodermální buňka (E) ze vzdálenosti cca. 5mm od kořenové špičky na podélném řezu kořenem *Allium cepa*. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. A, B) Přímý pohled na podélně orientovanou endodermální buňku, AA, BB) pohled z boku 3D-modelu A, AA) Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence (popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c). B, BB) Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. Šipka ukazuje na endoplasmatické mikrotubuly nacházející se kolem jádra



Obr. č. 55 a, b, bb, c, cc

Proendodermální buňky (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa* a) rozpoznatelné nejbliže kořenové špičky, b, bb) v blízkosti kořenové špičky (navazující na proendodermis z a), c, cc) asi 3 mm od kořenové špičky. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. a, b, bb) Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence [popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c], c, cc) Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. a, b, c) Přímý pohled na podélně orientovanou endodermální buňku, bb, cc) pohled z boku 3D-modelu. a, b, bb, c, cc) Postupná ontogeneze proendodermální buňky. a) Proendodermální buňky jsou krátké, počínají se prodlužovat. Mikrotubuly jsou „nahuštěné“, vůči sobě v paralelním postavení. Již v rámci prvního prodlužování proendodermálních buněk dochází k rychlému svazkování mikrotubulů, jež je typické pro stádium endodermálních buněk s vytvořenými Casparyho proužky. b, bb, c, cc) Proendodermální buňka je ve stavu prodlužování. Mikrotubuly jsou rovné, pravidelně uspořádané. Hlavně na boční projekci je patrná jejich svazčitost. Svazky jsou vůči sobě orientované paralelně. Mikrotubuly jsou uspořádány kolmo na hlavní osu buňky, resp. hlavní osu kořene.

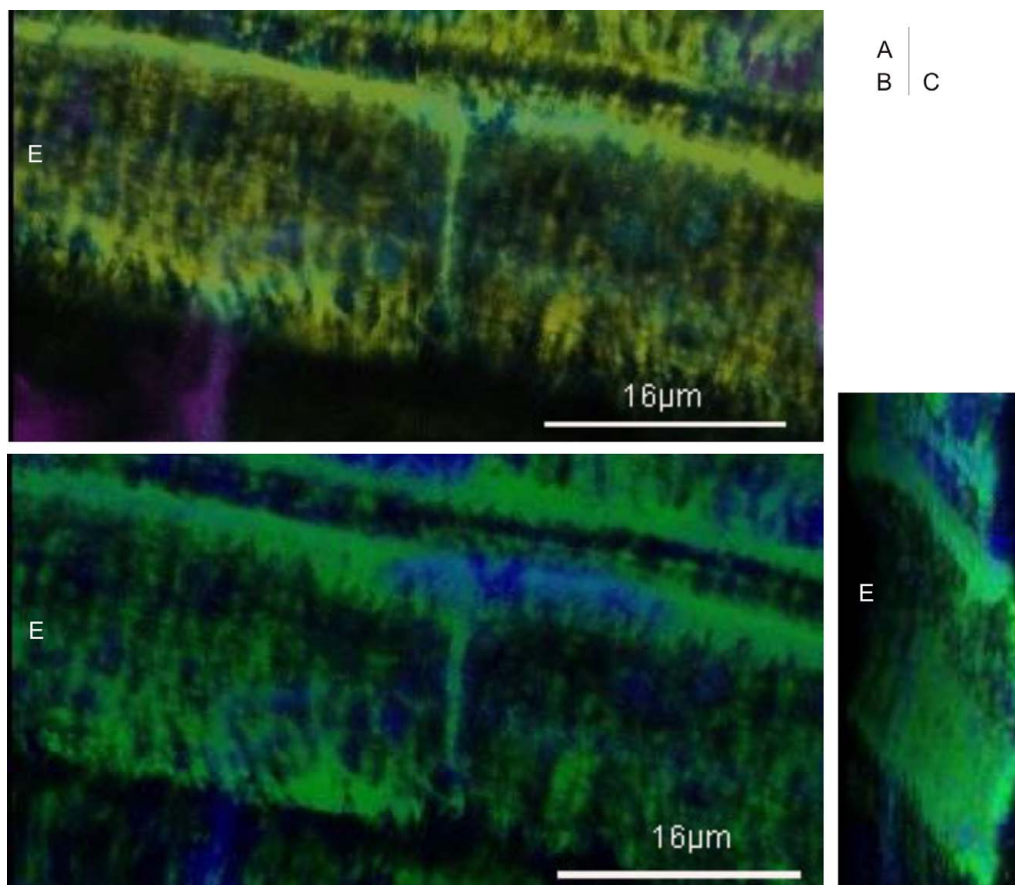
Mikrotubuly jsou i v proendodermálních buňkách stočeny do helixu, který prochází pravidelně celou buňkou. Toto uspořádání je již patrné ve vzdálenosti asi 3 až 4 mm od



Obr. č. 56 Proendodermální buňky (E) ze vzdálenosti cca. 3 – 4 mm od kořenové špičky na podélném řezu kořenem *Allium cepa*. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. Šipka ukazuje na „otáčející se“ mikrotubuly (závitě šroubovice) pod buněčnou stěnou.

kořenové špičky (Obr. č. 56). Šipkami jsou zdůrazněny svazky mikrotubulů, které se u buněčné stěny na podélném řezu „otáčejí“. V 3D-projekci se ukazuje, že tyto otáčky jsou jednotlivé závitě šroubovice, což je dobře patrné na pohledech z boku 3D – projekce (Obr. č.

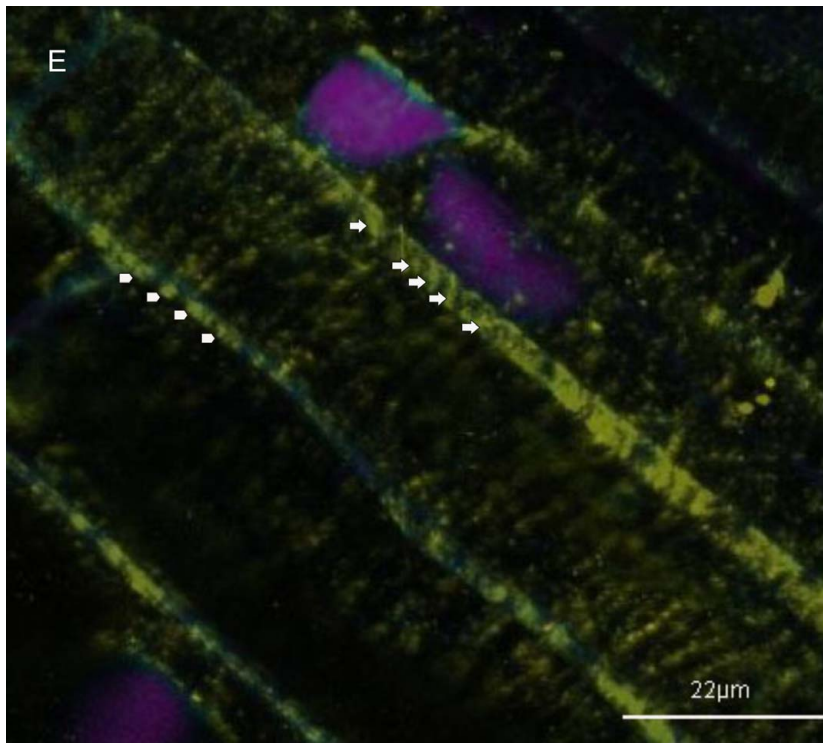
57c). Obr. č. 58 ukazuje mimo jiné řez „tečkovanou“ různobarevnou buněčnou stěnou proendodermis, kde se střídá signál mikrotubulů se signálem samotné buněčné stěny. Ukazuje tedy na více méně pravidelný výskyt závitů helixu mikrotubulů v místech podélného řezu buněčnou stěnou.



Obr. č. 57a, b, c

Proendodermální buňky (E) ze vzdálenosti cca. 4 až 5 mm od kořenové špičky na podélném řezu kořenem *Allium cepa*. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. A) Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence [popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c] B, C) Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům. A, B) Přímý pohled na podélně orientovanou endodermální buňku, C) skoro až příčný řez proendodermální buňkou. Mikrotubuly se nachází pod buněčnou stěnou, kde vytváří šroubovici, která se pravidelně vine v rámci celé buňky.

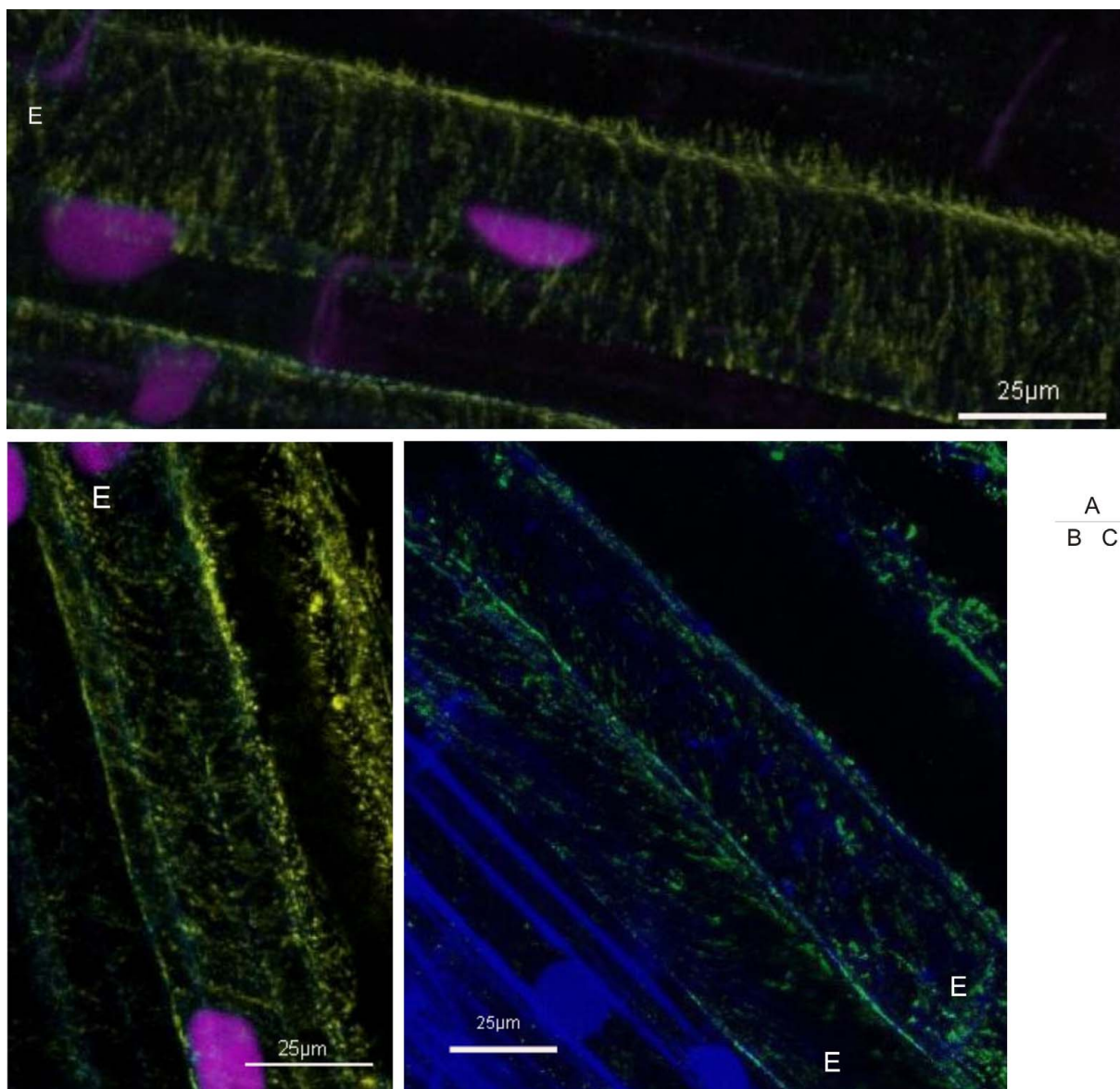
Svazky mikrotubulů jsou v prvních fázích ontogeneze proendodermis orientovány kolmo na hlavní osu buňky, resp. na hlavní osu kořene (Obr. č. 55 až Obr. č. 58). To odpovídá charakteru kortikálních mikrotubulů v prodlužujících se buňkách. Ve vzdálenosti asi 6 mm od kořenové špičky dochází k velice rychlému přeorientování celého mikrotubulárního cytoskeletu (Obr. č. 59). Kolmé postavení svazků kortikálních mikrotubulů na hlavní osu kořene se mění na šikmé postavení, které je typické pro endodermální buňky s vytvořenými Casparyho proužky. Tato změna probíhá velice rychle a v rámci úzkého úseku kořene. Zdá se, že ke změně dochází postupně přes různé mezikroky šikmého postavení (Obr. č. 59b) a že v celé proendodermis nedojde k přeorientování najednou. Je zajímavé, že se kortikální mikrotubuly pozdější fáze vývoje proendodermis neuspořádávají podélně s hlavní osou kořene, jako je tomu např. u okolních neendodermálních vrstev primární kůry.



Obr. č. 58 Proendodermální buňky (E) ze vzdálenosti cca. 5 až 6mm od kořenové špičky na podélném řezu kořenem *Allium cepa*. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence [popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c] Šípky ukazují na jednotlivé otáčky šroubovice pod buněčnou stěnou, směřovky pak na střídaní se barvu signálu u buněčné stěny proendodermální buňky indukující různé zdroje fluorescence.

Svazky jsou orientovány šikmo na hlavní osu kořene.

Lze tedy říci, že proendodermální buňky ze vzdálenosti 6 mm a více od kořenové špičky (Obr. č. 59) jeví již typické uspořádání kortikálních mikrotubulů pro endodermální buňky s vytvořeným Caspariho proužkem. Mikrotubuly jsou ve svazcích navzájem rovnoběžně uspořádány a svazky vytváří šroubovici, která se nachází v rámci celého podélného uspořádání buňky.



Obr. č. 59a, b, c,

Proendodermální buňky (E) na podélném řezu kořenem *Allium cepa* ze vzdálenosti a) cca. 6 mm od kořenové špičky, b) cca. 7 mm od kořenové špičky, c) cca. 7 – 8 mm od kořenové špičky. 3D-rekonstrukce sady optických řezů z konfokálního mikroskopu. a, b) Rekonstrukce pomocí separace signálu autofluorescence [popis shodný s popisem na Obr. č. 48a, aa, c], c) Rekonstrukce získaná hrubým odečtením modrého kanálu od zeleného. Zelený signál odpovídá kortikálním mikrotubulům, modrý buněčné stěně a jádrům a) Orientace svazků kortikálních mikrotubulů na hlavní osu buňky je stále ještě kolmá, i když na některých místech buňky dochází již k prvním změnám uspořádání kortikálních mikrotubulů vzhledem k hlavní ose kořene. b) Orientace svazků mikrotubulů na hlavní osu buňky se mění z kolmé na šikmou. c) Svazky mikrotubulů jsou umístěny šikmo na hlavní osu buňky. Casparyho proužek není ještě detekovatelný.

5 Diskuze

5.1 Vývoj endodermis v kořenech cibule *Allium cepa* se zaměřením na strukturu endodermis ve stavu proendodermis a prvního vývojového stavu

Cibule (*Allium cepa*) má uzavřené uspořádání apikálního meristému, což vysvětluje původ endodermis v podobě společné iniciály pro buňky primární kůry a endodermis. Vznikající endodermální buňky, resp. proendodermální buňky bylo možné rozpoznat od ostatních typů buněk kořene poprvé u *Allium cepa* ve vzdálenosti asi 2 mm od kořenové špičky v podobě menších krátkých buněk (Obr. č. 55a). Dále od kořenové špičky docházelo k jejich postupné elongaci. Ve vzdálenosti 8 až 10 mm od kořenového apexu bylo možné poprvé najít endodermis v prvním vývojovém stavu a pozorovat zakládající se Casparyho proužek. Ke vzniku Casparyho proužku docházelo u *Allium cepa* v rámci kořene mírně asynchronně, časové rozdíly byly u některých rostlin však skoro zanedbatelné. Na samotný průběh „synchronizace“ vzniku Casparyho proužků u *Allium cepa* nemělo vliv ani roční období, ani podmínky pěstování. Jednotlivá roční období však odlišně ovlivňovaly vzdálenost zakládání Casparyho proužků od kořenové špičky (také Enstone a Peterson 2005).

Lokalizace Casparyho proužku a míst jeho zakládání závisí na použité metodice. Zakládající Casparyho proužek bylo možné poprvé detekovat pomocí autofluorescence buněčné stěny Casparyho proužku, která je způsobena depozicí ligninu a suberinu v této části buněčné stěny. K tomuto rozpoznání stačí tedy již menší množství nově uloženého chemického materiálu do vznikajícího Casparyho proužku. Díky odlišnému chemickému složení suberinu a ligninu ukládaných v prvním vývojovém stavu endodermis od následujících stavů (Verdaguer a Molinas 1997, Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b, Schreiber a kol. 1999, Zeier a Schreiber 1999, Zimmermann a kol. 2000) jeví buněčná stěna v místech chemické modifikace silný autofluorescenční signál v širokém spektru vlnových délek. Chemické složení Casparyho proužků způsobuje např. i elektrodensní charakter místa Casparyho proužku v elektronovém mikroskopu (Bonnett 1968, Clarkson a Robards 1975). Metoda detekce pomocí autofluorescence byla tedy nejcitlivější. Teprve uložení dalšího materiálu (tedy nejdříve cca. 2 mm dále od místa první detekce autofluorescence) vedlo k nakoncentrování suberinu na limitní hodnotu, od které je možné použít barvení suberinu sudanem a následně použít na detekci Casparyho proužku pozorování ve světlém poli. Metoda barvení sudanem se jeví jako málo citlivá metoda. V našem případě však musíme vzít v úvahu, že jsme barvení sudanem aplikovali na relativně tenké příčné řezy

vytvořené ve Steedmanově vosku a že Casparyho proužek není dostatečně široký. Množství suberinu tedy nemuselo být dostatečné pro sudan. Pokud je již vývoj Casparyho proužku ukončen, je možné lokalizovat výskyt Casparyho proužku také bez předešlého barvení při pozorování ve světlém poli.

Casparyho proužek v endodermis cibule byl nejdříve v radiální buněčné stěně velice úzký, postupně se rozšiřoval (Bonnett 1968, Ma a Peterson 2001a, Enstone a kol. 2003). Endodermis v prvním vývojovém stavu byla poprvé detekována v blízkosti floémové části středního válce, následně bylo rozšiřování Casparyho proužku patrné i u buněk v sousedství xylému. Toto je na jednu stranu ve shodě s prací Verdaguer a Molinas (1997), na druhou stranu je to v protikladu s tvrzením o synchronním zakládání Casparyho proužků v endodermis (např. Clarkson and Robards 1975, Lux a Luxová 2003, Enstone a Peterson 2005). Vysvětlením může být fakt, že k zakládání Casparyho proužku v sousedství floému i xylému dochází nejspíše u mnoha rostlinných druhů skoro současně, zpoždění vytváření Casparyho proužku v buňkách v blízkosti xylému nemusí být tedy zaregistrováno a zakládání Casparyho proužků je považováno v rámci kořene za synchronní proces. O obecném procesu synchronního zakládání Casparyho proužku však nelze mluvit v případě rostlin, u kterých jsou přítomny propustné buňky, např. právě u *Allium cepa*, kde byly někdy detekovány propustné buňky již v oblasti 8 až 10mm od kořenové špičky. Propustné buňky zde charakterizují buňky, u kterých nedošlo k založení Casparyho proužků, resp. došlo, ale se zpožděním. U těchto buněk se uložila suberinová lamela také se zpožděním, jak potvrzuje i základní charakteristika propustných buněk. Počet propustných buněk se postupně s vývojem kořene cibule zmenšuje.

Zajímavá je myšlenka práce Karahara a Shibaoka (1998), která uvažuje o procesu chemické modifikace buněčné stěny v místech Casparyho proužků jako předpokladu pro následné vytvoření pevné asociace plasmatické membrány a buněčné stěny. Bylo by zajímavé potvrdit tento předpoklad u *Allium cepa* plasmolýzou endodermálních buněk v raném stádiu zakládání Casparyho proužků a stanovit, v jakém okamžiku je pevná asociace plasmatické membrány a buněčné stěny vytvářena.

Buněčná stěna v místech Casparyho proužku jeví na podélných řezech endodermis *Allium cepa* zvlněný charakter. Toto zvlnění je pozorovatelné konvenčním a konfokálním fluorescenčním mikroskopem a ve světlém poli. Zvlnění je typické pouze pro oblast buněčné stěny v místě Casparyho proužku, v ostatních částech endodermální buňky, ani u jiných typů buněk kořene již není patrné (Obr. č. 22). Při pozorování ve fluorescenci a v světlém poli se zdá, že je zvlnění relativně pravidelné a že frekvence vln je v rámci zvlněné buněčné stěny

konstantní. Při podrobnějším pozorování je ve frekvenci vln ale zřejmá variabilita. Prostorové uspořádání Casparyho proužku je dobře patrné na trojrozměrných modelech (např. Obr. č. 51), kde vykazuje zvlnění nepravidelný charakter.

Důvod zvlnění buněčné stěny v místech Casparyho proužku je dosud neznámý. Nepodařilo se najít žádnou literaturu týkající se tohoto charakteru, ve známé literatuře informace chybějí. Buněčná stěna v rámci Casparyho proužku, tedy pruh zvlněné buněčné stěny, se zdá být po celé délce stejně široký. Je však obtížné stanovit na základě pozorování fluorescenčním a konfokálním mikroskopem, zda i tloušťka (mocnost) buněčné stěny v místech Casparyho proužku je stejná jako tloušťka buněčné stěny v okolních oblastech endodermis. Oblasti buněčné stěny v okolí Casparyho proužku vykazují jinou intenzitu a vlnovou délku autofluorescence v porovnání s autofluorescenčním signálem buněčné stěny Casparyho proužku. Na přesné porovnání šířky, resp. tloušťky buněčné stěny v místech Casparyho proužku a v jeho okolí by bylo vhodné použít elektronový mikroskop. Zdá se však, že buněčná stěna Casparyho proužku je již jen kvůli chemické modifikaci tlustší než jak je tomu v okolí proužku. Karahara a Shibaoka (1998) charakterizovali plasmatickou membránu v místech Casparyho proužku také jako tlustší v porovnání s ostatními úseky plasmatické membrány endodermis. To poukazuje na odlišné chemické složení nejen buněčné stěny, ale i plasmatické membrány v místech Casparyho proužku.

Významnou částí práce bylo rozlišení proendodermálních buněk na podélných řezech kořenem cibule. Pokud se v případě *Allium cepa* pracuje se segmenty kořenů vzdálených minimálně 8 mm od kořenové špičky, není složité rozlišit endodermální buňky od okolních buněk na základě již výše zmíněného zvlněného charakteru buněčné stěny. Blíže kořenové špičce se nachází proendodermální buňky bez Casparyho proužků, tedy i bez zvlněného charakteru buněčné stěny a tedy bez rozlišovacích znaků endodermálních, resp. proendodermálních buněk. Bylo tedy nutné porovnávat anatomickou strukturu na podélném řezu se situací na příčných řezech kořenem *Allium cepa*. Zaměřili jsme se, jak je vysvětleno v kapitole 4.1, na počet a tvar jednotlivých typů buněk kořene a jejich polohu vůči endodermální vrstvě buněk. Tato metoda se jevila jako jediná, která umožnila lokalizovat endodermální buňky časných vývojových stádií na podélných řezech kořenem cibule (Obr. č. 27). Je však zřejmé, že tato metoda rozlišení proendodermálních buněk na podélných řezech je částečně založena na subjektivním pozorování a může být v některých případech chybná. Např. u tvarů buněk je třeba brát zřetel na metodu přípravy řezů. Působení mikrovln při fixaci, dehydratace a hlavně pak řezání a žehlení ve Steedmanově vosku může způsobit tvarové i velikostní změny u kořenových buněk (Obr. č. 20b). Obr. č. 39 upozorňuje také na výskyt

„klamných“ projekcí vytvořených pomocí série optických řezů pocházejících z konfokálního mikroskopu.

Ve vzdálenosti 45 až 50 mm od kořenové špičky dochází u cibule k asynchronnímu ukládání suberinové lamely mezi buněčnou stěnu a plasmatickou membránu (Obr. č. 25c, cc). Endodermis zůstává u cibule relativně dlouhou dobu ve fázi prvního vývojového stavu. Teprve asi 40 mm od místa založení Casparyho proužků začne proces uložení suberinové lamely. U *Quercus suber* vzniká suberinová lamela již asi ve vzdálenosti 10 mm od místa první detekce Casparyho proužku. Casparyho proužky u *Quercus suber* lze v porovnání s cibulí detekovat teprve v místech 20 až 25 mm od kořenové špičky (Verdaguer a Molinas 1997). *Primula acaulis* zakládá Casparyho proužek i suberinovou lamelu v porovnání s cibulí blíže kořenové špičce (Lux a Luxová 2003). Údaje o vzdálenosti zakládání Casparyho proužku a ukládání suberinové lamely však závisí i na rychlosti růstu a způsobu kultivace. Cibule patří, podobně jako *Quercus suber* a *Primula acaulis* mezi rostliny, u kterých vývoj endodermis nekončí pouze založením Casparyho proužků.

5.2 Vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene *Allium cepa* a v kořeni *Arabidopsis thaliana*

V kapitole 4.2 jsou uvedeny nejdříve fotografie mikrotubulárního cytoskeletu v buňkách kořenové špičky a jejího nejbližšího okolí (Obr. č. 29) a dále v parenchymatických buňkách nacházejících se blízko pod rhizodermis (Obr. č. 28). Pro vizualizaci tubulinu v těchto případech byla úspěšně použita klasická metoda vizualizace mikrotubulů v kořenech zahrnující chemickou fixaci pomocí 3,7% formaldehydu v MTSB (microtubule-stabilizing buffer), odvodnění, zalití do Steedmanova vosku, řezání a nepřímou imunodetekci pomocí primární a sekundární protilátky. Pro detekci mikrotubulů v buňkách dále od kořenové špičky a ležících „hlouběji“ v kořeni se jevila tato metoda, resp. postup fixace, jako nedostatečný, jak ukazuje Obr. č. 31a. Krok fixace byl nedostatečně rychlý, což vedlo k rozpadu mikrotubulů ještě před jejich zafixováním. Metoda byla proto upravena s cílem zrychlit průnik fixačního roztoku kořenem. Zrychlení fixace umožnilo až zavedení pomocného prvku fixace, tedy zavedení působení mikrovlnného záření na pletiva kořene.

V případě *Allium cepa* byla provedena škála pokusů s aplikací různého výkonu a času působení mikrovln na segmenty kořenů umístěné ve fixačním roztoku. V experimentech bylo zjištěno, že mikrovlnné záření pozitivně působí na fixaci mikrotubulárního cytoskeletu v endodermálních buňkách kořenů *Allium cepa*. Jako nejlepší se zdají být vzorky ošetřené výkonem 160 W po dobu 5 minut, u nichž jsou mikrotubuly v endodermis dobře zafixované,

tedy nerozpadlé (Obr. č. 32). U kontrolních vzorků (Obr. č. 31a) a vzorků ošetřených vyšším výkonem mikrovlnného záření (Obr. č. 33) došlo k rozpadu mikrotubulárního cytoskeletu v endodermis a středním válci. U kontrolních segmentů je nejspíše tento stav způsoben nedostatečně rychlým průnikem fixativa do středního válce kořene. Mikrotubuly v endodermis se nestihly zafixovat, začalo u nich docházet k rychlé depolymeraci, tedy k rozpadu struktury. Vyšší výkony nejspíše urychlily průnik fixačního roztoku, ale měly negativní účinek na dynamickou stabilitu mikrotubulárního cytoskeletu. Je možné, že mikrovlnné záření působí na hydratační vrstvu iontů obklopujících mikrotubuly (Pokorný 2004, Pokorný a kol. 2005b).

Obecně se v segmentech, kde byly aplikovány mikrovlny, často nalézaly poškozené buňky především parenchymatického typu. I přes snahu o udržení konstantní teploty fixačního roztoku při působení mikrovln (15°C) došlo nejspíše díky elektromagnetickému záření k přílišnému ohřevu povrchových buněk kořene. Bylo by nejspíše dobré použít u vzorků citlivý detektor teploty, např. krystal z galium-arsenitu a optické vlákno (Nebesářová a kol. 2001). Tento krystal je schopen měřit teplotu přímo v místě umístění. Jeho použití není v porovnání se standardními teploměry nebezpečné – nehrozí exploze při působení mikrovln. U některých vzorků, hlavně u vyšších výkonů, docházelo u buněk k plasmolýze. Ta může být způsobena zvýšenou permeabilitou membrány, která může mít za následek změnu osmotického stavu buněk (Zimmermann a kol. 1982, Weaver a Vaughan 1999).

Mechanismus účinku mikrovln je tedy zřejmě ten, že mikrovlny urychlují průnik 3,7% formaldehydu v MTSB do pletiva, resp. přes membrány. Mikrovlny způsobily u našich vzorků zrychlení difúze a nejspíše vytvoření pórů v lipidové dvojvrstvě membrán (viz. kapitola 0), což vedlo k zvýšení permeability lipidové dvouvrstvy. Indukovaný pohyb molekul způsobený mikrovlnami vytvářel jako vedlejší produkt tepelnou energii, která byla odvedena.

Mikrovlny jako pomocník při fixaci mikrotubulárního cytoskeletu v pletivu kořene *Allium cepa* uloženého hlouběji pod rhizodermis se ukázaly tedy jako velice účinné. Umožnily vizualizovat struktury mikrotubulů v endodermálních a proendodermálních buňkách, což bylo s klasickou metodou vizualizace mikrotubulů nemožné. Vyzkoušeli jsme aplikovat mikrovlny při fixaci mikrotubulů kořene i u jiného druhu rostliny. Ve spolupráci s Mgr. Ivanem Kulichem z KFR PŘF UK jsme úspěšně zafixovali mikrotubuly v buňkách kořene *Arabidopsis thaliana* i dále od kořenové špičky. Na rozdíl od kontrolních vzorků ošetřených pouze metodou imunodetekce mikrotubulů v kořenech *Arabidopsis thaliana* (Krtková 2006) bylo možné zafixovat pomocí mikrovln o výkonu 160 W po dobu 3 až 5 min i

mikrotubuly v parenchymatických buňkách v oblasti kořene *Arabidopsis thaliana*, kde se zakládají již kořenové vlásky.

Fotografie na Obr. č. 35 ukazují pozitivní efekty mikrovlnné fixace kořenů *Arabidopsis thaliana*. Na první pohled je patrné zlepšení kvality zafixovaného mikrotubulárního cytoskeletu. U *Arabidopsis thaliana* lze i bez mikrovlnného působení fixovat relativně dobře mikrotubulární cytoskelet v parenchymatických buňkách v blízkosti kořenové špičky, avšak dále od kořenové špičky není výsledek fixace uspokojivý (Obr. č. 34). Při využití mikrovln je na fotografiích na Obr. č. 35 patrný cytoskelet i v parenchymatických buňkách v zóně kořenových vlásků. Mikrovlny tedy nezlepšují u *Arabidopsis thaliana* pouze kvalitu fixace mikrotubulů, ale pomáhají i posunout hranici detekce mikrotubulárního cytoskeletu dále od kořenové špičky.

U kořene cibule, který má v porovnání s huseníčkem větší průměr, tedy větší počet jednotlivých vrstev buněk, hrály mikrovlny nezbytnou úlohu v urychlení průchodu fixačního roztoku kořenem směrem k střednímu válci a umožnily tím vůbec detekovat mikrotubuly v oblastech endodermis a středního válce. Tento fakt jsme se snažili potvrdit i u kořene huseníčku. S kořeny *Arabidopsis thaliana* je na rozdíl od cibule možné díky jejich malému průměru pracovat v nenařezané podobě, resp. lze aplikovat metodu vizualizace na celé rostliny. Bohužel se nám ale ani při použití konfokálního mikroskopu nepodařilo proniknout laserovým paprskem do buněk středního válce kořene, resp. detekovat signál protilátek ve středním válci a tím ověřit, zda mikrovlny úspěšně zafixovaly mikrotubuly i v zde se nacházejících buňkách. Důvodem je nejspíše špatný průnik protilátek do středu kořene. Řešením tohoto problému by mohlo být podélné nařezání kořene *Arabidopsis thaliana*. To je však z důvodu jeho tenkosti nesnadné.

5.3 Uspořádání kortikálních mikrotubulů v endodermis kořene cibule *Allium cepa*

Hypotézou diplomové práce je předpoklad, že cytoskelet má funkci v asociaci plasmatické membrány a buněčné stěny v místech Casparyho proužku. Otázkou, kterou jsme si proto položili, je, zda dochází při zakládání a vývoji Casparyho proužku ke změně uspořádání kortikálního cytoskeletu. Zaměřili jsme se na mikrotubulární cytoskelet.

Na fotografiích (např. Obr. č. 32, Obr. č. 36 až Obr. č. 38, Obr. č. 42, Obr. č. 43) je patrné, že mikrotubulární cytoskelet je v buňkách endodermis s vytvořenými Casparyho proužky uspořádán ve svazcích, které vykazují různou tloušťku. Svazky mikrotubulů jsou vůči sobě uspořádány rovnoběžně, tedy paralelně. Jejich orientace na hlavní osu kořene je

šikmá, svazky svírají s touto osou úhel přibližně 45°. Je otázkou, zda tento úhel má nějakou spojitost se vznikem nových mikrotubulů pomocí nukleace mikrotubulů závislé na mikrotubulech. Je známo, že nové mikrotubuly vznikají na komplexech γ -tubulinu navázaných na stávajících mikrotubulech, které mohou rychle zanikat. Nové mikrotubuly vznikají pod úhlem okolo 40° vzhledem k mateřským mikrotubulům (např. Hashimoto a Kato 2006, Murata a Hasebe 2007). Mateřskými mikrotubuly pro endodermis se vznikajícími Casparyho proužky by mohly být kortikální mikrotubuly v proendodermálních buňkách, které svírají s hlavní osou kořene kolmý úhel. Při vytváření nových mikrotubulů pod úhlem cca. 45° vzhledem k hlavní ose buňky by pak docházelo k rychlému rozpadu mateřských mikrotubulů, jejíž orientace je kolmá na hlavní osu kořene.

Svazkování mikrotubulů pozorované v endodermálních buňkách je důležitým uspořádáním mikrotubulů i v celé řadě jiných buněk (např. Wasteneys a Yang 2004, Oda a Hasezawa 2006). Zdá se, že v případě endodermis dochází ke vzniku svazků na základě příjmu jednotlivých nových mikrotubulů svazkem a ne vlastní nukleační aktivitou svazku (Lloyd a Chan 2004). Tuto myšlenku podporuje i pozorování více či méně „zvlněných“, resp. „ohnutých“ mikrotubulů. U vytváření svazků kortikálních mikrotubulů v endodermálních buňkách může hrát dle známých informací úlohu kontakt, resp. srážka mezi jednotlivými mikrotubuly, resp. mezi mikrotubulem a svazkem mikrotubulů. Hashimoto a Kato (2006) uvádí, že pokud mikrotubulus narazí na jiný mikrotubulus či svazek mikrotubulů pod úhlem menším než 30°, změni směr svého růstu a připojí se k mikrotubulu či svazku mikrotubulů za vzniku svazku mikrotubulů či jeho zesílení. Toto chování mikrotubulů může vést nejen k procesu svazkování, ale i k paralelnímu charakteru uspořádání mikrotubulů vůči sobě s minimální přítomností překřížení mikrotubulů (Hashimoto 2003).

Těsně pod plasmatickou membránou endodermálních buněk cibule je možné pozorovat skoro pravidelné uspořádání kortikálních mikrotubulů. Z literatury je známo (např. Shaw a kol. 2003, Hashimoto 2003, Lloyd a Chan 2004, Hashimoto a Kato 2006), že kortikální mikrotubuly udržují kontakt s plasmatickou membránou (přes tzv. „plasma-membrane-associated protein linkers“). Endoplasmatický typ mikrotubulů nebylo možné v endodermálních buňkách s vyvinutým Casparyho proužkem detekovat. Jejich absence je zřejmě spojena s tím, že jsou přítomny v buňkách na přechodu M a G1 fáze buněčného cyklu (Lloyd a Chan 2004, Hashimoto a Kato 2006). Endodermis v prvním vývojovém stavu patří mezi buňky, které za normálních podmínek nepodstupují buněčné dělení. Podařilo se však zaznamenat endoplasmatické mikrotubuly obklopující buněčné jádro v proendodermálních buňkách cibule ve vzdálenosti asi 5mm od kořenevé špičky (Obr. č. 54).

Kortikální mikrotubuly v endodermis vykazují dvě základní podoby, a to buď jako dlouhé, rovné vlákna (např. Obr. č. 38), či jako zvlněné vlákna (např. Obr. č. 36). Je možné pozorovat i mikrotubuly, u kterých dochází k méně či více ostrému „ohybu“. Pozorovatelné bylo též shlukování a opětovné oddělování svazků mikrotubulů mezi sebou (např. Obr. č. 42).

Organizace svazků mikrotubulů v buňkách endodermis souvisí se strukturou buněčné stěny v Casparyho proužku. Mikrotubuly, resp. jejich svazky se koncentrují do více méně pravidelně rozložených míst pod zvlněnou buněčnou stěnou (např. Obr. č. 42, Obr. č. 43). Ukázalo se, že místy shlukování svazků mikrotubulů jsou nejspíše výdutě zvlněné buněčné stěny Casparyho proužku. Odečtení autofluorescenčního od fluorescenčního signálu protilátky pomocí eliminace autofluorescence pozadí („analýzy konfokálního obrazu“) nám umožnilo sledovat chování kortikálních mikrotubulů právě pod plasmatickou membránou sousedící se zvlněnou buněčnou stěnou Casparyho proužku.

Ve spolupráci s Mgr. Ondřejem Šebestou z PřF UK jsme na fotografie z konfokálního mikroskopu aplikovali celkem čtyři metody eliminace autofluorescence pozadí (Obr. č. 47). Všechny jsou založeny na faktu, že v modrém kanálu zahrnujícím autofluorescenci buněčné stěny a signál jader barvených Hoechstem33258 není přítomen signál protilátky. Nejlepší výsledky přinesly dvě metody: metoda hrubého odečtení modrého kanálu od zeleného, který obsahuje fluorescenční signál protilátky a autofluorescenci buněčné stěny. Tato metoda usnadnila pohled na projekci, která je v tomto případě pouze dvojbarevná, tedy více přehledná. Prosté odečtení však způsobilo ztrátu části signálu. Proto jsme uvedli ve výsledcích vedle projekcí vytvořených hrubým odečtením signálů i projekce, které vznikly po aplikaci metod separace signálu autofluorescence (včetně „spectral unmixing“), které dokáží určit, s jakou pravděpodobností je signál v zeleném kanálu fluorescenčním signálem „tubulinu“ či autofluorescencí buněčné stěny (viz. kapitola 4.4.2).

Fotografie z konvenčního fluorescenčního mikroskopu a dvojrozměrné projekce z konfokálního fluorescenčního mikroskopu naznačily, že mikrotubuly jsou v endodermálních buňkách s vyvinutými Casparyho proužky stočeny do helixové struktury, tedy že vytváří v rámci celé buňky pod plasmatickou membránou pomyslnou šroubovici (např. Obr. č. 42). Tento fakt byl potvrzen na trojrozměrných projekcích optických řezů pocházejících z konfokálního mikroskopu a ošetřených eliminací autofluorescence pozadí (např. Obr. č. 48, Obr. č. 49). Podobné šroubovicovité uspořádání kortikálních mikrotubulů lze najít např. i u mezofylových buněk podstupujících diferenciaci xylému (Lloyd a Chan 2004) či u vznikajících sekundárních cévních elementů (Funada a kol. 2001), kde má toto uspořádání spojitost s ukládáním složek buněčné stěny. Zdá se tedy, že organizace mikrotubulů do svazků

v místě zvlnění Casparyho proužku může také s modifikací buněčné stěny souviset. Podle této teorie by prostory mezi svazky mikrotubulů, patrně v endodermálních buňkách (např. Obr. č. 37a), mohly být místem intenzivní depozice materiálu do buněčné stěny Casparyho proužku, podobně jako je ukládání celulóznic mikrofibril a ostatního materiálu buněčné stěny při tvoreni sekundárních cévních elementů (Funada a kol. 2001).

5.4 Změna uspořádání kortikálních mikrotubulů během vývoje proendodermis v kořeni cibule *Allium cepa*

Poprvé se podařilo rozlišit proendodermální buňky od ostatních druhů buněk asi 2 mm od kořenové špičky. Záhy po rozpoznání proendodermálních buněk docházelo již k charakteristickému svazkování mikrotubulů (Obr. č. 55), které je přítomno i v dalším vývoji proendodermálních a následně endodermálních buněk. V proendodermálních buňkách jsou jednotlivé mikrotubuly a jejich svazky navzájem uspořádány paralelně (Obr. č. 55 až Obr. č. 59). Toto paralelní postavení zůstává typické i pro endodermální buňky s již vytvořenými Casparyho proužky.

Již cca. 3 až 4 mm od kořenové špičky je poprvé patrné, že mikrotubuly jsou již v proendodermálních buňkách uspořádány do šroubovice (např. Obr. č. 56). Mikrotubuly vytváří tedy helix již ve stádiu proendodermis, a ne až po založení Casparyho proužku, resp. po zvlnění buněčné stěny právě v místech Casparyho proužku. Tento fakt může podporovat myšlenku, že kortikální mikrotubuly uspořádané do šroubovice mohou hrát roli při vytváření charakteristického vzhledu buněčné stěny v místech založených Casparyho proužků.

Do vzdálenosti cca. 6mm od kořenové špičky jsou svazky mikrotubulů orientované kolmo na hlavní osu kořene. Toto postavení je typické pro buňky ve fázi elongace. Ve vzdálenosti asi 6 mm od apexu kořene dochází k velice rychlému přeorientování kortikálních mikrotubulů z kolmé na šikmou polohu vzhledem k hlavní ose kořene (Obr. č. 59). Zdá se, že tato změna orientace probíhá přes několik kroků o různém úhlu postavení s konečným úhlem cca. 45° vzhledem k hlavní ose kořene. Zdá se také, že kortikální mikrotubuly nejspíše nemění své postavení v rámci jedné buňky najednou, ale postupně. Yuan a kol. (1994) udává, že ke změně orientace mikrotubulů vůči hlavní ose kořene nedochází v rámci celé buňky najednou, ale postupně.

Je zajímavé, jak rychle probíhá celý proces přeorientování. Již dlouho je známý velice dynamický charakter chování cytoskeletu obecně. K procesu přeorientování může přispívat následující: a) U rostlin se dynamicky chovají oba konce mikrotubulů, které neustále podléhají polymeraci a depolymeraci, tzv. procesu dynamické nestability (např. Komarova a

kol. 2002, Hashimoto 2003). b) Pokud jsou oba procesy polymerace a depolymerace v rovnováze, dochází k posunu mikrotubulů, tedy k tzv. „treadmilling“ (Shaw a kol. 2003, Paradez a kol. 2006). c) Dále přispívá k rychlé změně uspořádání kortikálních mikrotubulů i jejich polymerace *de novo*. U rostlin se jedná o již dříve zmíněnou nukleaci závislou na mikrotubulech, která vede mimo jiné k vytváření struktury stromu („tree-like organisation“) (Obr. č. 12), tedy k stromovitému vzhledu uspořádání mateřského mikrotubulu a dceřiných mikrotubulů (Murata a Hasebe 2007). d) Z jednoho iniciačního místa může vznikat i více mikrotubulů a nový mikrotubulus vzniká často pod jiným úhlem než mikrotubulus, který vznikl před ním (Obr. č. 15) (Shaw a kol. 2003). e) Proces stabilizace mikrotubulů o určité orientaci pak může vést k jejich selektivní preferenci. f) Dalším procesem vedoucím k změně orientace mikrotubulů může být samotný růst kortikálních mikrotubulů a jejich střet s mikrotubuly, které mají jinou orientaci. Po nárazu na překážku může dojít k změně směru polymerace mikrotubulu. Všechny tyto procesy tedy mohou přispívat k velice rychlé změně polohy mikrotubulárních vláken v proendodermálních buňkách (Lloyd a Chan 2004).

5.5 Vztah uspořádání kortikálních mikrotubulů a zakládání Casparyho proužků

V diskuzi byla již zmínka o diferenciaci xylému a podobnosti šroubovicovitého uspořádání kortikálních mikrotubulů při ukládání celulózových mikrofibril a před vytvářením Casparyho proužků v proendodermálních buňkách. V posledních letech vznikají první práce o diferenciaci buněk v cévní svazky demonstrující funkci kortikálních mikrotubulů při ukládání sekundární buněčné stěny. Může být tedy spojitost i mezi orientací kortikálních mikrotubulů v endodermálních buňkách a chemickou modifikací buněčné stěny v místech Casparyho proužků?

Při zakládání Casparyho proužku dochází k ukládání suberinu a ligninu do vymezené části buněčné stěny - Casparyho proužku (Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b, Schreiber a kol. 1999, Zeier a Schreiber 1999, Zimmermann a kol. 2000). Název lignin a suberin neoznačuje chemické individuum, ale velice rozsáhlou a heterogenní skupinu polymerů lišící se v zastoupení a vazebném propojení jednotlivých monomerů. Chemické složení ligninu a suberinu se liší jak mezi skupinami rostlin, tak i mezi pletivy v rámci jedné rostliny. Liší se dokonce i chemické složení ligninu, jehož tvorba byla indukovaná např. při napadení patogenem, od „přirozeně“ se tvořícího ligninu. Naleznou se i rozdíly v rámci jedné buňky. Příkladem těchto rozdílů může být právě endodermis, kde se mění během vývoje endodermis chemické složení ligninu a suberinu, a to jak v zastoupení jednotlivých

monomerů, tak i v typech chemické vazby (Verdaguer a Molinas 1997, Zeier a Schreiber 1998, Zeier a kol. 1999a, Zeier a kol. 1999b, Schreiber a kol. 1999, Zeier a Schreiber 1999, Zimmermann a kol. 2000).

Ligniny jsou polymery tvořené aromatickými monomery, tzv. monolignoly – prekurzory jsou koniferylalkohol, kumarylalkohol a sinapylalkohol. Tyto monolignoly jsou transportovány do buněčné stěny, kde jsou následně spojovány přes stav vytváření radikálů do polymerů. Suberin se skládá ze dvou částí – alifatické a aromatické. Alifatická část – tedy hlavní složka suberinů – je tvořena lipidovými látkami o dlouhém řetězci o hydrofobním charakteru, aromatická část pak stavebními jednotkami odvozenými podobně jako ligniny od metabolických produktů kyseliny hydroxyskořicové – prekurzory jsou tedy p-kumaryl CoA, p-kumaryl alkohol, feruloyl-CoA a koniferyl alkohol (Buchanan a kol. 2006).

Jak stavební kameny ligninu, tak i suberinu musí podstoupit transport do buněčné stěny. Předpokládá se, že transport je, podobně jako v případě hemicelulózy, pektinů a stěnových proteinů, uskutečněn pomocí sekreční dráhy. Je všeobecně známo, že cytoskelet hraje v transportu váčků nezbytnou úlohu. Tento fakt může být jedním z důvodů, proč dochází k specifické změně uspořádání kortikálních mikrotubulů již v proendodermálních buňkách ještě před začátkem zakládání Casparyho proužků. Mikrotubuly v endodermálních buňkách mohou uskutečňovat nejen transport váčků, ale i určovat směr pohybu vesikulů. Mohou hrát tedy rozhodující úlohu ve vymezení oblasti plasmatické membrány endodermis, kde bude docházet k exocytóze sekrečních váčků se stavebními složkami ligninu, suberinu a dalších látek. Toto vymezení je nejspíše prvním, ale zároveň i nejdůležitějším krokem pro založení Casparyho proužku. Otázkou je, co určuje, jak se kortikální mikrotubuly uspořádají. Je za to zodpovědná třeba změna polohy tzv. aktivačních domén plasmatické membrány, které jsou mimo jiné příjemci váčků s celulózasyntázou (Emons a Mulder 1998)? Je možné najít nějakou paralelu mezi ukládáním stavebních složek ligninu a suberinu do míst Casparyho proužku s procesem ukládání sekundární buněčné stěny v tracheálních buňkách?

Roberts a kol. (2004) ukázali na mezofylových buňkách *Zinnia elegans*, které podstupují diferenciaci v cévní články, že kortikální mikrotubuly vymezují tvar budoucí sekundární buněčné stěny i se všemi ostrými hranicemi. Právě mikrotubuly určují, kde pod plasmatickou membránou začne ukládání celulózových mikrofibril. Pokud je již kortikálními mikrotubuly určen tvar budoucí sekundární buněčné stěny a započal se proces ukládání celulózových mikrofibril a ostatních složek sekundární buněčné stěny, nejsou již kortikální mikrotubuly potřebné pro další proces ukládání složek buněčné stěny. Celulózasyntáza již pracuje nejspíše nezávisle na mikrotubulech a udržení tvaru budoucí sekundární buněčné

stěny vymezeného mikrotubuly přejímají celulózové mikrofibrily. Otázkou však zůstává, co je zodpovědné za transport necelulózových složek buněčné stěny po předání funkce mikrotubulů celulózovým mikrofibrilám.

K pravidelnému uspořádání kortikálních mikrotubulů dochází již před začátkem ukládání sekundární buněčné stěny a ne až během něho (Oda a kol. 2005, Oda a Hasezawa 2006). Šířka budoucí sekundární buněčné stěny je závislá na počtu kortikálních mikrotubulů, které se uspořádají do vymezených míst pod plasmatickou membránu, které sousedí s budoucí sekundární buněčnou stěnou (Oda a Hasezawa 2006). Svazky kortikálních mikrotubulů, které se uspořádaly pod místy budoucí sekundární buněčné stěny, se při procesu ukládání buněčné stěny postupně rozdělují do dvou menších svazků, které se stěhují pod okrajové oblasti sekundární buněčné stěny. Stejně jako se okraje sekundární buněčné stěny od sebe vzdalují, vzdalují se od sebe i oba rozdělené svazky kortikálních mikrotubulů.

Ačkoliv je ukládání sekundární buněčné stěny při vzniku cévních elementů odlišný proces od depozice materiálu Casparyho proužku, je pro oba procesy společné, že jde o modifikaci buněčné stěny. Role kortikálních mikrotubulů během lokalizovaného ukládání sekundární buněčné stěny bude ale zřejmě odlišná. Z výsledků vyplývá prostorová souvislost mezi zvlněním Casparyho proužku a uspořádáním kortikálních mikrotubulů. Kortikální mikrotubuly, resp. jejich svazky jsou nahromaděny v místech prohlubní zvlněné buněčné stěny, sledují tedy strukturu Casparyho proužku. Přesnou roli - důvod této závislosti však neznáme. Na rozdíl od buněčné stěny cévních elementů nejsou mikrotubuly uspořádány paralelně ke směru modifikace buněčné stěny, ale kolmo na ni. Mikrotubuly nejsou rozloženy pravidelně po celé délce modifikované stěny Casparyho proužku. Znamená to, že materiál Casparyho proužku vykazující autofluorescenci (lignin, suberin, proteiny s aromatickými aminokyselinami, atd.) je uložen rovnoměrně v celém proužku, nezávisle na uspořádání mikrotubulů. Lze hypotetizovat, že zvlnění buněčné stěny vzniká například v důsledku pozdější, na mikrotubulech závislé, a tedy nerovnoměrné depozice dalšího materiálu, nebo na periodicky se opakujícím lokalizovaném propojení s plasmatickou membránou v místě prohlubní na jedné a druhé straně buněčné stěny. Proces vzniku Casparyho proužku a jeho charakteristické vlnité struktury a též přesnou roli mikrotubulů v jeho tvorbě bude třeba více specifikovat v dalších experimentech.

Zajímavé by bylo aplikovat na endodermální buňky před začátkem vytváření Casparyho proužku a v procesu jeho tvoření inhibitor polymerace mikrotubulů, např. kolchicin. Došlo by vůbec k založení Casparyho proužku a jak by vypadal? Jaké by bylo jeho

chemické složení? Otázkou je, zda by rostliny přežily ošetření inhibitory po dostatečně dlouhou dobu.

Oda a Hasezawa (2006) se domnívají, že nejen kortikální mikrotubuly a jejich uspořádání, ale i jejich kontakt s buněčnou stěnou hraje důležitou roli při ukládání sekundární buněčné stěny. Již dříve bylo zmíněno, že kortikální mikrotubuly a jejich existence jsou závislé na jejich propojení s plasmatickou membránou. Při ztrátě tohoto kontaktu dochází často k velice rychlé depolymeraci kortikálních mikrotubulů, která vede často k jejich rozpadu (Shaw a kol. 2003). Pro endodermální buňky nemusí mít propojení kortikálních mikrotubulů k plasmatické membráně význam pouze ve smyslu stabilizace mikrotubulů a vymezení oblastí plasmatické membrány s afinitou k váčkům se stavebními kameny suberinu a ligninu, ale i následně v pevném propojení plasmatické membrány a buněčné stěny, které je typické pro Casparyho proužek. O podstatě tohoto propojení není mnoho informací.

O principu propojení jednotlivých složek buněčného kontinua (tedy cytoskeletu, plasmatické membrány a buněčné stěny) v rostlinných buňkách se ví v porovnání s živočišnými buňkami pouze málo. Analogem k těsnému spojení u živočišných buněk může být u rostlinných buněk právě Casparyho proužek v endodermis. Pevné propojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou Casparyho proužku může být zprostředkováno propojením proteinů plasmatické membrány s proteiny buněčné stěny (protein linkage hypothesis) (Clarkson a Robards 1975). Je otázkou, jakou úlohu hraje v tomto propojení cytoskelet.

Dle databáze genomu *Arabidopsis* [Arabidopsis Genome Initiative 2000, převzato z Baluška a kol. (2003) a z Lang a kol. (2004)] postrádá *Arabidopsis* integriny a kadheriny, tedy propojovací spojky mezi cytoskeletem a extracelulární matrix u živočišných buněk. Rostlinné buňky neobsahují ani proteiny asociované s aktinem, které propojují integriny s aktinovými mikrofilamenty u živočišných buněk [Hussey a kol. 2002, převzato z Baluška a kol. (2003)]. Zdá se však, že rostlinné buňky obsahují specifické integrin-like receptory (Faik a kol. 1998) a integrinům podobné proteiny (Sun a kol. 2000, Lü a kol. 2007). Úkolem výzkumu podstaty pevného propojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou v endodermálních buňkách by mohly být tedy pokusy s aplikací protilátek proti živočišným integrinům na endodermis.

Dalšími kandidáty na propojení cytoskeletu, plasmatické membrány a buněčné stěny v Casparyho proužku však mohou být i glykoproteiny, arabinogalaktanproteiny, kinázy asociované s buněčnou stěnou, pektiny, forminy, rostlinný myozin VIII, kalózasyntáza,

fosfolipáza D a celulózasyntáza (Baluška a kol. 2003). Bylo by zajímavé zaměřit se v následujícím výzkumu podstaty propojení plasmatické membrány a buněčné stěny v místech Casparyho proužku právě na výše zmíněné kandidáty a vzít zřetel i na možnou návaznost na kortikální cytoskelet.

Dalším úkolem budoucího výzkumu je zaměřit se i na druhou složku cytoskeletu, tedy na aktinový cytoskelet a zjistit jeho uspořádání během vývoje proendodermálních a endodermálních buněk, tedy před a při zakládání Casparyho proužku.

6 Závěr

Diplomová práce se zabývá zakládáním Casparyho proužku v endodermálních buňkách kořene *Allium cepa* a rolí mikrotubulárního cytoskeletu během tohoto procesu. Hypotéza diplomové práce: „Cytoskelet hraje roli při vzniku, popř. se přímo funkčně podílí na asociaci plasmatické membrány a buněčné stěny v místech Casparyho proužku“. Pokud hypotéza platí, měl by se tento fakt projevit na uspořádání cytoskeletu a jeho změnách při vývoji Casparyho proužku.

Postup vizualizace mikrotubulů v endodermis kořene *Allium cepa* byl odvozen od klasické metody imunodetekce mikrotubulárního cytoskeletu na řezech (Baluška a kol. 1992, Vitha a kol. 1997, Vitha a kol. 2000a, Vitha a kol. 2000b) zahrnující chemickou fixaci pomocí 3,7% formaldehydu v MTSB (microtubule-stabilizing buffer), odvodnění, zalití do Steedmanova vosku, řezání a nepřímou imunodetekci. Fixace byla modifikována o aplikaci mikrovln na segmenty kořenů. Mikrovlny zrychlily průnik fixačního roztoku kořenem, což umožnilo zafixovat mikrotubuly nejen v endodermis, ale i ve středním válci kořene *Allium cepa*. Tento postup fixace mikrotubulů s využitím účinku mikrovln byl úspěšně aplikován i na kořeny *Arabidopsis thaliana*. Vizualizace mikrotubulárního cytoskeletu byla kombinována s detekcí Casparyho proužku na příčných řezech kořenů *Allium cepa*. Byly využity různé techniky konvenční a konfokální fluorescenční mikroskopie a následné zpracování digitálního obrazu.

Byla zdokumentována struktura a vývoj kořene *Allium cepa* během prvních cca. 25 mm od kořenové špičky se zaměřením na vrstvu endodermálních buněk a rozlišení proendodermálních buněk od okolních vrstev buněk kořene. Proendodermální buňky kořene *Allium cepa* je možné poprvé rozlišit od okolních vrstev buněk ve vzdálenosti cca. 2 mm od kořenové špičky. Ve vzdálenosti 8 mm od kořenové špičky bylo možné poprvé detekovat Casparyho proužek, tedy endodermis v prvním vývojovém stavu. Časnou detekci vznikajícího Casparyho proužku umožnila specifická autofluorescence, barvení sudanem bylo zřetelné až později. Buněčná stěna je v místech Casparyho proužku ve směru hlavní osy zvlněná, zvlnění je mírně nepravidelné. V ostatních oblastech buněčné stěny endodermis, ani u ostatních buněk kořene *Allium cepa* nebylo zvlnění buněčné stěny pozorováno.

Uspořádání kortikálních mikrotubulů v endodermis kořene *Allium cepa* se mění během vývoje endodermis, resp. proendodermis a zakládání Casparyho proužku. Pro proendodermální buňky, stejně jako pro endodermální buňky s vyvinutým Casparyho proužkem je typické svazkování mikrotubulů, ke kterému dochází již asi ve vzdálenosti 2 mm

od kořenové špičky. Svazky mikrotubulů jsou vůči sobě uspořádány paralelně. Ve vzdálenosti asi 3 až 4 mm od kořenové špičky bylo možné poprvé rozpoznat uspořádání kortikálních mikrotubulů do šroubovice. Jednotlivé svazky kortikálních mikrotubulů jsou v raných fázích proendodermis uspořádány kolmo na hlavní osu kořene. Ve vzdálenosti asi 6 mm od apexu kořene však dochází k velice rychlému přeorientování kortikálních mikrotubulů z kolmého na šikmé postavení vzhledem k hlavní ose kořene. Nově přeorientované svazky mikrotubulů svírají s hlavní osou kořene úhel cca. 45°, který je typický i pro orientaci mikrotubulů v endodermálních buňkách, které podstupují zakládání Casparyho proužku. Proces přeorientování je velice rychlý, neprobíhá však v rámci jedné buňky najednou, ale postupně.

V endodermálních buňkách s vyvinutými Casparyho proužky jsou kortikální mikrotubuly stočeny do šroubovice, která se nachází těsně pod plasmatickou membránou v rámci celé buňky. Zajímavá je situace pod zvlněnou buněčnou stěnou Casparyho proužku. Kortikální mikrotubuly, resp. jejich svazky se shlukují v místech výdutí zvlněné buněčné stěny. Trojrozměrné projekce ukázaly přítomnost jednotlivých závitů šroubovice mikrotubulů právě v těchto prohlubních zvlněné buněčné stěny. V literatuře se nepodařilo najít žádné informace o uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu v endodermálních buňkách, ani informace o změně tohoto uspořádání během vývoje proendodermálních buněk v buňky endodermální. Přítomnost svazků mikrotubulů v místech výdutí zvlněné buněčné stěny Casparyho proužku je popsána v této diplomové práci nejspíše poprvé.

7 Summary

Organization of the Microtubule Cytoskeleton during the Formation of a Casparian Band in Root Endodermal Cells of *Allium cepa*

This thesis is focused on the process of Casparian bands initiation in radial and transverse cell walls of the root endodermis of *Allium cepa*. The Casparian band is characterized by a chemical modification of the cell wall in the position of the Casparian band followed by the formation of the tight binding of a plasma membrane to the cell wall. We assume that cortical microtubules can play an important role in both processes searching for changes of cortical array during the development of proendodermis and during the foundation of the Casparian band in the endodermis.

The classical method of the microtubules visualisation in roots was modified by the application of microwaves during the process of fixation. The tissues were observed with the fluorescence and confocal microscopy. Image postprocessing and construction of 3D-models were subsequently used.

Proendodermal cells in *Allium cepa* are recognized for the first time among other root cells in the distance of about 2 mm from the root tip. The Casparian band is firstly detected in the distance of about 8 mm from the root apex by means of autofluorescence of the Casparian band. The cell wall of the Casparian band appears wavy on the longitudinal section.

The arrangement of the cortical microtubules during the development of the proendodermal cells, i.e., the endodermal cells was studied. In the distance of about 2 mm from the root tip of *Allium cepa*, extensive bundling of microtubules was observed. Microtubular bundles are arranged parallelly to each other and oriented perpendicularly to the main axis of the root in the early differentiation of the endodermis. In the distance of about 6 mm from the root apex, the cortical microtubular array is reorganized. The bundles are oriented obliquely to the main axis, which is typical for the endodermis with the Casparian band.

The cortical microtubules of the endodermis with created Casparian band are arranged in parallel bundles, which are oriented obliquely to the main axis of the root, forming a helix beneath the plasma membrane. Bundles of the cortical microtubules are concentrated just in the site of depressions of the wavy cell wall. To our knowledge, no information concerning the arrangement of cortical microtubules and its changes during the development of the endodermis was found in literature. The presence of the microtubular bundles in the

depressions of the wavy cell wall of the Casparian band is described in this thesis rather for the first time.

Key words:

Allium cepa, Casparian band, chemical modification, cortical array, cortical microtubules, endodermis, microtubule bundles, proendodermis, tight binding of plasma membrane and cell wall

8 Seznam použité literatury

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1998) Cytoskelet. Buněčné dělení. Extracelulární matrix a pojivové tkáně. Epitely a mezibuněčné spoje. In Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, eds, *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, str. 513-569, 594-613
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) Cell junctions. In Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds, *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York and London, str. 950-963
3. Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815 [převzato z Baluška a kol. (2003) a z Lang a kol. (2004)]
4. Baluška F, Parker JS, Barlow PW (1992) Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays* L.). *J Cell Sci* 103: 191-200
5. Baluška F, Šamaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiology* 133:482-491
6. Barrowclough DE, Peterson CA, Steudle E (2000) Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. *J Exp Bot* 51: 547-557
7. Bonnett HT (1968) The root endodermis: fine structure and function. *J Cell Biol* 37: 199-205
8. Brown HS, Comprehensive study on the Sigma-Aldrich H2100 Microwave Processor. http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/7361/handh_h2100_microwave2.pdf, 28.6.2007
9. Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluorol Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* 66(3):111-116
10. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2006) The cytoskeleton. In Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, str. 202-259
11. Caspary R (?) Die Hydrilleen (Anacharideen Endl.).?: 437-513
12. Caspary R (1866) Bemerkungen über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik Band 4*: 101-123

13. Cholewa E, Peterson CA (2004) Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots. *Plant Physiology* 134: 1793-1802
14. Clarkson DT, Robards AW, Sanderson J (1971) The tertiary endodermis in barley roots: fine structure in relation to radial transport of ions and water. *Planta* 96: 292-305
15. Clarkson DT, Robards K (1975) The endodermis, its structural development and physiological role. In Torrey JG, Clarkson DT, eds, *Structure and function of roots*. Academic Press, London, str. 415-436
16. Cvrčková F (2000) Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biology* 1(1):research001.1-001.7 (<http://genomebiology.com/2000/1/1/research/001.1>)
17. Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TW, Munnik T (2003) Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell* 15(11):2666-2679
18. Eckardt NA (2006) Function of γ -tubulin in plants. *The Plant Cell* 18: 1327-1329
19. Emons AMC, Mulder BM (1998) The making of the architecture of the plant cell wall: How cells exploit geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7215-7219
20. Enstone DE, Peterson CA, Ma FS (2003) Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351
21. Enstone DE, Peterson CA (2005) Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant Cell and Environment* 28: 444-455
22. Esau K (1960) The root: primary state of growth. In Esau K, eds, *Anatomy of Seed Plants*. John Wiley and Sons, New York, str. 170-189
23. Faik A, Laboure AM, Gulino D, Mandaron P, Falconet D (1998) A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *Eur. J. Biochem.* 253: 552-559
24. Fuka J, Klimeš B, Lepil O, Rudolf V, Široký J, Vanýsek V (1965) Elektřina a magnetismus. Elektromagnetické spektrum. In Fuka J, Klimeš B, Lepil O, Rudolf V, Široký J, Vanýsek V, eds, *Fyzika pro III. ročník střední všeobecně vzdělávací školy*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, str. 3-55, 123-130
25. Fukuda H, Kobayashi H (1989) Dynamic organization of the cytoskeleton during tracheary-element differentiation. *Dev Growth Differ* 31:9-16 [převzato z Oda a kol. (2005)]
26. Funada R, Miura H, Shibagaki M, Furusawa O, Miura T, Fukatsu E, Kitin P (2001) Involvement of localized cortical microtubules in the formation of a modified structure of wood. *Journal of Plant Research* 114: 491-497

27. Galvez JJ, Adamson G, Sanders MA, Giberson RT (2006) Microwave tissue processing techniques: their evolution and understanding. *European Microscopy and Analysis* 20(6): 23-24
28. Gardiner JC, Harper JDI, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, Marc J (2001) A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *The Plant Cell* 13:2143-2158
29. Hájek M (2006) Mikrovlny v akci. In sborník kurzu Podzimní škola, 10. ročník, Praha, říjen 2006, str. 116-125
30. Hamada T (2007) Microtubule - associated proteins in higher plants. *J Plant Res* 120:79-98
31. Hashimoto T (2003) Dynamics and regulation of plant interphase microtubules: a comparative view. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 568-576
32. Hashimoto T, Kato T (2006) Cortical control of plant microtubules. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 5-11
33. Hogetsu T (1991) Mechanism for formation of the secondary wall thickening in tracheary elements of *Pisum sativum* L. and *Commelina communis* L. and the effects of amiprophosmethyl. *Planta* 185:190-200 [převzato z Roberts a kol. (2004) a Oda a kol. (2005)]
34. Hussey PJ, Allwood EG, Smertenko AP (2002) Actin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Philos Trans R Soc Lond B* 357:791-798 [převzato z Baluška a kol. (2003)]
35. Inouye I (1993) Flagella and flagellar apparatuses of algae. In: Berner T, eds, *Ultrastructure of microalgae*. CRC Press, Boca Raton, str. 99-133 [převzato z Murata a Hasebe (2007)]
36. Ishida T, Thitamadee S, Hashimoto T (2007) Twisted growth and organization of cortical microtubules. *Journal of Plant Research* 120(1):61-70
37. Janson ME, Setty TG, Paoletti A, Tran PT (2005) Efficient formation of bipolar microtubule bundles requires microtubule – bound γ -tubulin complexes. *J Cell Biol* 169: 297-308 [převzato z Murata a Hasebe (2007)]
38. Johnson KL, Jones BJ, Schultz CJ, Bacic A (2003) Non-enzymic cell wall (glyco)proteins. In Rose JKC, eds, *The plant cell wall*. Blackwell Publishing, CRC Press, str. 111-154

39. Kamiya N, Itoh JI, Morikami A, Nagato Y, Matsuoka M (2003) The *SCARECROW* gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *The Plant Journal* 36:45-54
40. Karahara I, Shibaoka H (1992) Isolation of Casparian strips from pea roots. *Plant Cell Physiol* 33: 555-561 [převzato z Karahara a Shibaoka (1998), Zeier a Schreiber (1998)]
41. Karahara I, Shibaoka H (1998) Effects of brefeldin A on the development of the Casparian strip in pea epicotyls. *Protoplasma* 203: 58-64
42. Karahara I, Ikeda A, Kondo T, Uetake Y (2004) Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219: 41-47
43. Kohorn BD (2000) Plasma membrane - cell wall contacts. *Plant Physiology* 124:31-38
44. Komarova YA, Vorobjev IA, Borisy GG (2002) Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *Journal of Cell Science* 115: 3527-3539
45. Krtková J (2006) Role mikrotubulárního cytoskeletu za toxického působení hlinitých iontů. Diplomová práce, UK Praha
46. Lang I, Barton DA, Overall RL (2004) Membrane - wall attachments in plasmolysed plant cells. *Protoplasma* 224:231-243
47. Laurenzio LD, Diller JW, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-433
48. Ledbetter MC, Porter KR (1963) A „microtubule“ in plant cell fine structure. *J Cell Biol* 19(1): 239-250
49. Lee SH, Chung GC, Steudle E (2005) Gating of aquaporins by low temperature in roots of chilling-sensitive cucumber and chilling-tolerant figleaf gourd. *Journal of Experimental Botany* 56 (413): 985–995
50. Lee YRJ, Liu B (2004) Cytoskeletal motors in *Arabidopsis*. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiology* 136: 3877-3883
51. Lim J, Helariutta Y, Specht CD, Jung J, Sims L, Bruce WB, Diehn S, Benfey PN (2000) Molecular analysis of the *SCARECROW* gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *The Plant Cell* 12: 1307-1318
52. Lloyd C (1999) How I learned to love carrots: the role of the cytoskeleton in shaping plant cells. *BioEssays* 21: 1061-1068
53. Lloyd C, Chan J (2004) Microtubules and the shape of plants to come. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5: 13-22

54. Login GR, Ku T, Dvorak AM (1995) Rapid primary microwave-aldehyde and microwave-osmium fixation: improved detection of rat parotid acinar cell secretory granule α -amylase using a post-embedding immunogold ultrastructural morphometric analysis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43(5): 515-523
55. Login GR, Leonard JE, Dvorak AM (1998) Calibration and standardization of microwave ovens for fixation of brain and peripheral nerve tissue. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 15: 107-117
56. Lü B, Chen F, Gong ZH, Xie H, Zhang JH, Liang JS (2007) Intracellular localization of integrin-like protein and its roles in osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis in *Zea mays*. *Protoplasma* 232(1-2):35-43 (pouze abstrakt)
57. Lux A, Luxová M (2003) Growth and differentiation of root endodermis in *Primula acaulis* Jacq. *Biologia plantarum* 47(1): 91-97
58. Ma FS, Peterson CA (2001a) Development of cell wall modifications in the endodermis and exodermis of *Allium cepa* roots. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 79: 621-634
59. Ma F, Peterson CA (2001b) Frequencies of plasmodesmata in *Allium cepa* L. roots: implications for solute transport pathways. *J Exp Bot* 52, 1051-1061
60. Ma F, Peterson CA (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Can. J. Bot.* 81: 405-421
61. Macháčová K (2005) Struktura, vývoj a funkce endodermis kořene. Seminární práce, UK Praha
62. Macháčová K, Soukup A (2007) Využití mikrovln při fixaci mikrotubulů v endodermis kořenů *Allium cepa*. *Bulletin ČSEBR* 2:37
63. Maitra SC, De DN (1971) Role of microtubules in secondary thickening of differentiating xylem element. *J Ultra Res* 34:15-22 [převzato z Oda a Hasezawa (2006)]
64. Marha K, Musil J, Tuhá H (1971) *Electromagnetic fields and the life environment*. San Francisco Press, Inc, San Francisco, str. 53-56
65. Mineyuki Y (2007) Plant microtubule studies: past and present. *Journal of Plant Research* 120(1):45-51
66. Miyamoto N, Steudle E, Hirasawa T, Lafitte R (2001) Hydraulic conductivity of rice roots. *J Exp Bot* 52: 1835-1846
67. Murata T, Hasebe M (2007) Microtubule – dependent microtubule nucleation in plant cells. *J Plant Res* 120: 73-78

68. Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307-311
69. Nebesářová J, Vancová M, Nebesář M (2001) Mikrovlny v přípravě preparátů pro TEM. In Nebesářová J, Vancová M, Nebesář M, eds, *Elektronová mikroskopie pro biology*. Elektronická podoba: <http://www.paru.cas.cz/lem/book>, 19.3.2007
70. Nothnagel EA (1997) Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol* 174:195-291 [převzato z Baluška a kol. (2003)]
71. Oda Y, Mimura T, Hasezawa S (2005) Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology* 137: 1027-1036
72. Oda Y, Hasezawa S (2006) Cytoskeletal organization during xylem cell differentiation. *J Plant Res* 119:167-177
73. O'Neill MA, York WS (2003) The composition and structure of plant primary cell walls. In Rose JKC, eds, *The plant cell wall*. Blackwell Publishing, CRC Press, str. 1-54
74. Paradez A, Wright A, Ehrhardt DW (2006) Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 571-578
75. Pastuglia M, Azimzadeh J, Goussot M, Camilleri C, Belcram K, Evrard JL, Schmit AC, Guerche P, Bouchez D (2006) γ -tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1412-1425
76. Peterson CA, Enstone DE (1996) Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum* 97: 592-598
77. Pokorný J (2001) Endogenous electromagnetic forces in living cells: implications for transfer of reaction components. *Electro- and magnetobiology* 20(1): 59-73
78. Pokorný J (2004) Excitation of vibrations in microtubules in living cells. *Bioelectrochemistry* 63: 231-326
79. Pokorný J, Hašek J, Jelínek F (2005a) Endogenous electric field and organization of living matter. *Electromagnetic Biology and Medicine* 24: 185-197
80. Pokorný J, Hašek J, Jelínek F (2005b) Electromagnetic field of microtubules: effects on transfer of mass particles and electrons. *Journal of Biological Physics* 31: 501-514
81. Prát V, Vanbever R, Jadoul A, Regnier V (1999) Comparison of iontophoresis and electroporation: mechanisms and tolerance. In *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, str. 145-147
82. *Radiation, Elektromagnetická pole*. Státní zdravotní ústav Praha, nakladatelství Fortuna, 1999

83. Ranathunge K, Steudle E, Lafitte R (2003) Control of water uptake by rice (*Oryza sativa* L.): role of the outer part of the root. *Planta* 217: 193-205
84. Riese J, Ney J, Kohorn BD (2003) WAKs: cell wall associated kinases. In Rose JKC, eds, *The plant cell wall*. Blackwell Publishing, CRC Press, str. 223-236
85. Roberts AW, Frost AO, Roberts EM, Haigler CH (2004) Role of microtubules and cellulose microfibril assembly in the localization of secondary-cell-wall deposition in developing tracheary elements. *Protoplasma* 224:217-229
86. Sardar HS, Yang J, Showalter AM (2006) Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in Bright Yellow-2 tobacco cultured cells. *Plant Physiology* 142:1469-1479
87. Sattelmacher B (2001) Tansley review no. 22 - The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol* 149: 167-192
88. Schreiber L, Breiner HW, Riederer M, Duggelin M, Guggenheim R (1994) The Casparian strip of *Clivia miniata* Reg. roots: Isolation, fine structure and chemical nature. *Bot Acta* 107: 353-361 [převzato z Zeier a Schreiber (1998), Enstone a kol. (2003)]
89. Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J Exp Bot* 50: 1267-1280
90. Scott MG, Peterson RL (1979) The root endodermis in *Ranunculus acris*. I. Structure and ontogeny. *Can J Bot* 57: 1040-1062 [převzato z Verdaguer a Molinas (1997), Ma a Peterson (2001a)]
91. Seago JL Jr., Peterson CA, Enstone DE (2000a) Cortical development in roots of the aquatic plant *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *American Journal of Botany* 87(8):1116-1127
92. Seago JL Jr., Peterson CA, Kinsley LJ, Broderick J (2000b) Development and structure of the root cortex in *Caltha palustris* L. and *Nymphaea odorata* Ait. *Annals of Botany* 86: 631-640
93. Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW (2003) Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300:1715-1718
94. Smith LG, Oppenheimer DG (2005) Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:271-295

95. Stavroulakis P (2003) Electromagnetic field bioactivity characteristics. In Stavroulakis P, eds, Biological effects of electromagnetic fields. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, str. 21-26
96. Steudle E, Peterson CA (1998) How does water get through roots? J Exp Bot 49: 775-788
97. Steudle E (2000a) Water uptake by plant roots: an integration of views. Plant and Soil 226: 45-56
98. Steudle E (2000b) Water uptake by roots: effects of water deficit. J Exp Bot 51: 1531-1542
99. Stoppin V, Vantard M, Schmit AC, Lambert AM (1994) Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly: the nuclear surface in higher plants has centrosome – like activity. Plant Cell 6: 1099-1106 [převzato z Murata a Hasebe (2007)]
100. Sun Y, Qian H, Xu X, Han Y, Yen L, Sun D (2000) Integrin-like proteins in the pollen tube: detection, localization and function. Plant and Cell Physiology 41(10):1136-1142
101. Šauliová J (2005) Užitečné mikrovlny. CHEMagazín 1(15): 8-10
102. Šottníková A, Lux A (2003) Development, dilation and subdivision of cortical layers of gentian (*Gentiana asclepiadea*) root. New Phytologist 160:135-143
103. Taiz L, Zeiger E (2006) The cytoskeleton. In Taiz L, Zeiger E, eds, Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, str. 23-27
104. van Fleet DS (1961) Histochemistry and function of the endodermis. The Botanical Review 27: 165-220
105. Vanovič J, Sokol E, Thern L, Vlach B (1969) Elektrický náboj a elektrické pole. In Vanovič J, Sokol E, Thern L, Vlach B, eds, Fyzika pro II. ročník střední všeobecně vzdělávací školy. Státní pedagogické nakladatelství Praha, str. 155-180
106. Verdaguer D, Molinas M (1997) Development and ultrastructure of the endodermis in the primary root of cork oak (*Quercus suber*). Can J Bot 75: 769-780
107. Verica JA, He ZH (2002) The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. Plant Physiology 129:455-459 [převzato z Baluška a kol. (2003)]
108. Vitha S, Baluška F, Mews M, Volkmann, D (1997) Immunofluorescence detection of F-actin on low melting point wax sections from plant tissues. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 45, 89-96
109. Vitha S, Baluška F, Braun M, Šamaj J, Volkmann D, Barlow PW (2000a) Comparison of cryofixation and aldehyde fixation for plant actin immunocytochemistry: Aldehydes do not destroy F-actin. The Histochemical Journal 32, 457-466

110. Vitha S, Baluška F, Jasík J, Volkmann D, Barlow PW (2000b) Steedman's wax for F-actin visualization. In Vitha S, Baluška F, Jasík J, Volkmann D, Barlow PW, eds, *Actin: a Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 619-635
111. von Guttenberg H (1968) *Der Primäre Bau der Angiospermenwurzel*. Gebrüder Borntraeger, Berlin
112. Walter J (2004) Spectral unmixing for Image J v 1.2 – Documentation. <http://math.nist.gov/javanumerics/jama/> (20.2.2008)
113. Wasteneys GO (2002) Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *Journal of Cell Science* 115:1345-1354
114. Wasteneys GO, Yang Z (2004) New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiology* 136: 3884-3891
115. Weaver JC, Pliquett UF, Zewert TE, Vanbever R, Herndon TO, Gowrishankar TR, Chen T, Prausnitz MR, Vaughan TE Chizmadzhev Y, Pr at V Langer R (1999) Recent advances in skin electroporation: mechanism and efficacy. In *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, str. 149-152
116. Weaver JC, Vaughan TE (1999) Injury associated with high voltage pulsing for transdermal drug delivery. In *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, str. 153-156
117. Williams BC (1954) Observation on intercellular canals in root tips with reference to the Compositae. *Amer Jour Bot* 41: 104-106 [převzato z Esau (1960)]
118. Yokoyama M, Karahara I (2001) Radial widening of the Casparian strip follows induced radial expansion of endodermal cells. *Planta* 213: 474-477
119. Yuan M, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW (1994) Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6050-6053
120. Zeier J, Schreiber L (1998) Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206: 349-361
121. Zeier J, Schreiber L. (1999) Fourier transform infrared-spectroscopic charakterisation of isolated endodermal cell walls from plant roots: chemical nature in relation to anatomical development. *Planta* 209: 537-542

122. Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999a) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209: 1-12
123. Zeier J, Goll A, Yokoyama M, Karahara I, Schreiber L (1999b) Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. *Plant, Cell and Environment* 22: 271-281
124. Zimmermann U, Scheurich P, Pilwat G, Benz R. (1981) *Angew. Chem.* 93: 332-351; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20: 325-344 [převzato z Zimmermann a kol. (1982)]
125. Zimmermann U, Pilwat G, Pohl HA (1982) Electric field-mediated cell fusion. *J. Biol. Phys.* 10: 43-50
126. Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210: 302-311
127. <http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/112.pdf>, 20.4.2007
128. http://www.ebsciences.com/papers/mw_tech.htm, duben 2007

9 Přílohy diplomové práce

9.1 Pracovní protokoly (ke kapitole 3.1.1)

9.1.1 Fixace a zalévání kořenových špiček *Allium cepa* pro vizualizaci mikrotubulů v buňkách endodermis

Pokusný materiál: pětidenní kořeny cibule kuchyňské (*Allium cepa*)

a) Příprava vzorků na fixaci

1. umístění cibule sazečky do hrdla zkumavky naplněné pitnou vodou a zakořenění za občasného zalévání při pokojové teplotě po dobu 5 dnů (*Použití semen, dostupných na rozdíl od „sazečky“ po celý rok, se ukázalo jako nevýhodné vzhledem k velice tenkým kořenům.*)
2. odebrání kořenových segmentů (kořen od špičky do 20 mm, od kořen. špičky rozdělit na 4 segmenty po 5 mm, či na 2 segmenty po 10 mm), **rychlé** umístění segmentů do 4, resp. 2 skleněných lékovek (objem cca. 12 ml) s fixačním roztokem (**fixace v 3,7% formaldehydu v MTSB, pH 7,85**) (*naplnit lékovky fixačním roztokem max. do poloviny – důvodem je infiltrace za sníženého tlaku*)

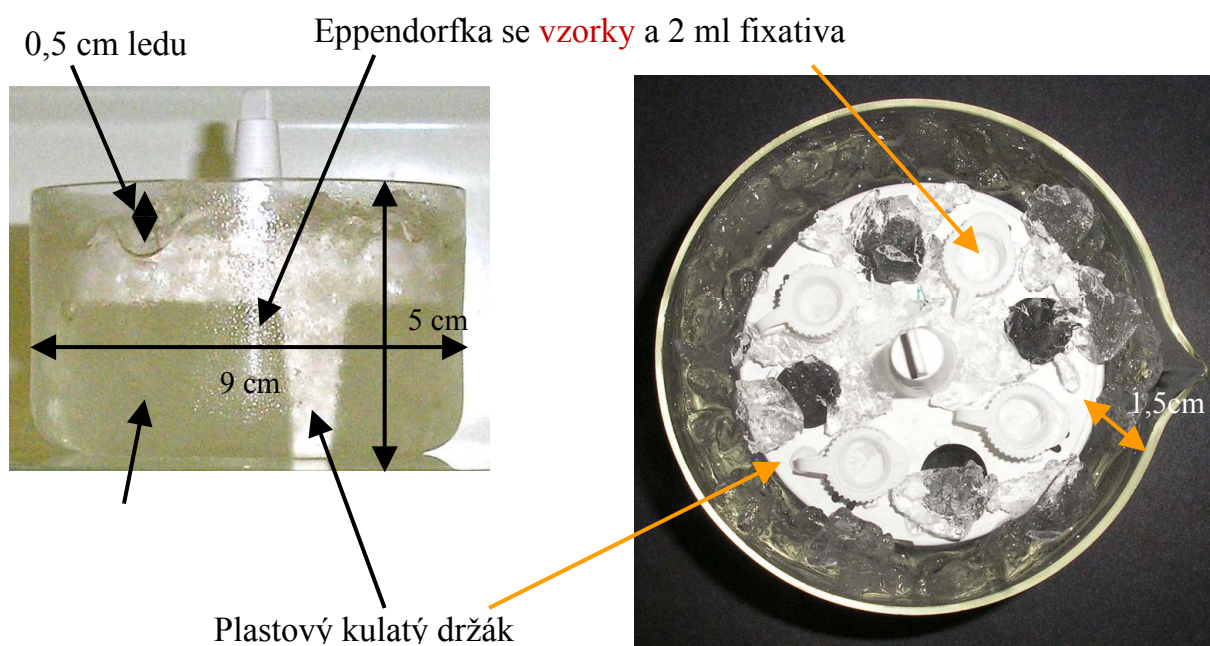
*!k vzorkům je dobré přidat papírové cedulky s popiskem
(psát tužkou – nesmyje se následným etanolem)!*

b) Fixace (celkový čas 2 hod)

3. **infiltrace za sníženého tlaku** formaldehydem pomocí rotační vývěvy (celkem 60min - včetně velice **pomalého** poklesu tlaku na cca. 50 mbar, aplikace této hodnoty tlaku po dobu cca. 20 min, a následného pomalého navrácení tlaku na původní hodnotu)
4. **opatrné** přendání vzorků do popsaných eppendorfek (2 ml) naplněných fixačním roztokem, jejich uzavření
*(Slovo „eppendorfka“ je v protokolech použito pro označení mikrozkuvek většinou o objemu 2 ml od firmy Eppendorf AG, Hamburg.)
Při nižších výkonech zůstávají eppendorfky uzavřené. Pozor, při vyšších výkonech mikrovln (≥ 350 W) je nutné mít eppendorfky otevřené, jinak vzniká nebezpečí exploze z důvodu nahromadění plynu v eppendorfce a možnosti vzniku utajeného varu (i přes chlazení).*
5. umístění vzorků do kulatého plastového držáku, vložení držáku do nízké kádinky s ledem a studenou vodou, ledem přikrýt i uzavřené eppendorfky (Obr. č. 60, Obr. č. 61)

Velice důležitá je vzdálenost vzorků od stěny kádinky, resp. množství vody a ledu obklopující vzorky. Voda, jak bylo již dříve zmíněno, absorbuje mikrovlnné záření. Tedy čím více bude vody kolem vzorků, tím nižšímu výkonu mikrovlnného záření budou vzorky vystaveny. Na doporučení Doc. Ing. Jana Macháče, DrSc. (FEL ČVUT, ústní sdělení) používáme pouze 1,5 centimetrovou vzdálenost eppendorfky, resp. vzorku od stěny kádinky. Tedy mikrovlnné záření prochází 1,5 cm vody, resp. ledu na své cestě k vzorkům.

6. umístění nízké kádinky s víčkem naplněné 1l vody (zátěž) na otočný talíř kuchyňské mikrovlnné trouby, na víčko umístit kádinku se vzorky z předcházejícího bodu (Obr. č. 60, Obr. č. 61)
7. **působení mikrovln** (pozn. č. 1 v kapitole 9.1.4) – 160 W 5 min
8. přenesení vzorků zpět do lékovek naplněných 3,7% formaldehydem v MTSB, umístění vzorků ve fixačním roztoku do dosažení celkového času fixace 2 hodin



Obr. č. 60 Uspořádání pokusu v mikrovlnné troubě značky Whirlpool typu MD 113: otočný talíř, přikrytá skleněná miska s cca. 700 ml vody jako zátěž, nízká kádinka se vzorky (popis viz. Obr. č. 61). Nízká kádinka je umístěná uprostřed mikrovlnné trouby, její vzdálenost od boční stěny trouby je cca. 12 cm, od otočného talíře cca. 9 cm a od stropu trouby cca. 4 cm.

Obr. č. 61 Detail uspořádání pokusu v mikrovlnné troubě, pohled shora na nízkou kádinku s vzorky. Vzorky jsou umístěny ve špičce 2 ml eppendorfky naplněné 3,7% formaldehydem v MTSB. Eppendorfky jsou umístěné v plastovém kulatém držáku, který je vložen do ploché kádinky (průměr 9 cm, výška 5 cm) naplněné ledem a studenou vodou. Kvůli focení nejsou eppendorfky shora překryty cca. 0,5 cm vrstvou ledu. Eppendorfky jsou od okraje kádinky vzdáleny cca. 1,5 cm.

c) Promytí a dehydratace

9. promytí v MTSB 2x 10 min

!pozor! pracovat jemně, pozor na mechanické poškození, segmenty nepřendávat z nádoby do nádoby pinzetou ani štětcem, ale opatrně odsát roztok pipetou a nalít nový

10. promytí v PBS 2x 10 min
11. 30%
12. 50%
13. 70% ETOH v PBS a'30 min
14. 90%
15. 96%
16. 100% ETOH
17. 0,01% toluidinová modř v 100% ETOH (*snadnější orientace materiálu v bločku*)
10min
18. 100% ETOH - promytí 10 min

d) Infiltrace a zalévání do Steedmanova vosku (pozn. č. 2 v kapitole 9.1.4)

19. zahřátí vzorků v 100% ETOH na 37°C (v termostatu)
20. nalití roztaveného Steedmanova vosku (*roztavit již s předstihem*) k vzorkům v ETOH
Steedmanův vosk:ETOH 1:1, nechat při 37°C přes noc, lze i přes víkend
(*pozn. lze použít Steedmanův vosk z minulého zalévání, tedy 100% vosk již použitý dříve v bodu 21*)
21. výměna za čistý 100% Steedmanův vosk 2x 1 hod
(*pozn. pozor na teplotu, nepřehřát*)
+ již na začátku první hodiny dát do termostatu nahřát zalévací silikoné formy, Petriho misky, hodinová sklíčka, jehly, pinzetu...
22. vložení segmentů do jamek (pokud jsou objekty malé, lze položit dva vedle sebe)
v zalévací silikonové formě, dolití čistým voskem, ztuhnutí při pokojové teplotě
následně možno skladovat vzorky v dobře uzavřených igelitových sáčkách v lednici

e) Řezání a žehlení

použití: a) rotační mikrotom (pokud je v místnosti chladněji), úhel nastavení kolébky držáku nože je pro Steedmanův vosk 3 – 4°
b) kryotom (např. v létě) (teplota v komoře 14°C, vzorků 0°C; *problém: po čase začne být vzduch v komoře vlhký, řezy se začnou ještě u nože roztahovat, nejdou již přendat na sklíčko*)

tloušťka řezů:

- a) podélné řezy (snažit se o rovnoběžnost) – 35 – 40 μm
- b) příčné řezy – 50 μm

podložní skla potažená: a) Poly-L-lysin
b) kamencová želatina

řezání a lepení (pozn. č. 3 v kapitole 9.1.4):

- 1) připevnění voskových bločků se vzorky na dřevěné špalíčky pomocí horké střenky nože (pozor na teplotu)
- 2) po dostatečném zatuhnutí lze začít řezat, pomalejší rychlost řezání
- 3) snažit se docílit při řezání o vytváření pásky
- 4) shromáždit si na černém papíře řezy, resp. pásku v pořadí sériových řezů
- 5) na podložní sklíčko umístit větší kapku vody
- 6) přendat všechny řezy **naráz** na kapku vody
- 7) počkat **pár sekund** a následně odsát vodu filtračním papírem
- 8) řezy nechat alespoň půl dne sušit při pokojové teplotě

9.1.2 Nepřímá imunodetekce tubulinu v buňkách endodermis kořenů *Allium cepa*

Materiál: „přilepené“ podélné a příčné řezy kořenem *Allium cepa* na sklíčkách potažených poly-L-lysinem či kamencovou želatinou (viz. protokol o fixaci)

!pozor! v celém experimentu pracovat opatrně, sklíčka nepřendávat z kyvety do kyvety, ale raději v kyvetě opatrně měnit roztoky

!pozor! na příliš vysokou či nízkou teplotu roztoků (hlavně v případě čerstvě připraveného MTSB), nejlépe používat roztoky o pokojové teplotě

V experimentu používat nízkou kyvetu (objem cca. 90 ml, asi na cca. 15 skel)

100% ETOH	3x 10 min	<i>pozn.: - vyndat z mrazáku casein - nechat vychladit v mrazáku potřebné množství metanolu a prázdnou kyvetu (pozor na nebezpečné výpary metanolu, raději pracovat v digestoři)</i>
90% ETOH v PBS	10 min	
50% ETOH v PBS	10 min	
PBS	10 min	
MTSB	30 min	
Metanol (-20°C) (permeační činidlo)	10 min	
MTSB (lze použít MTSB před metanolem)	30 min	
1% casein v PBS (potlačení nespecifické vazby protilátek)	30 min	
(popř. lze použít místo caseinu hovězí albumin v PBS)		

Primární protilátka	2 hod	<i>Potlačit autofluorescenci lze i použitím speciálních fluorescenčních filtrů– např. U-MNIBA (kapitola 3.1.2), které ořezou částečně signál autofluorescence.</i>
MTSB	10 min	
Sekundární protilátka	2 hod (ve tmě)	
PBS	10 min	

Toluidinová modř 0,005% v PBS (potlačení autofluorescence)

	10 min	
PBS	10 min	
a) Hoechst 33258 v PBS (4μl/3ml)	10 min	
b) Propidium jodid	5 min	
PBS	10 min	

Zalít (pozn. č. 4 v kapitole 9.1.4):

a) 5% propylgalát v glycerol:PBS (7:3)

+ následné oblepení bezbarvým lakem na nehty

b) VECTASHIELD Mounting Medium (Vector laboratories)

+ následné oblepení bezbarvým lakem na nehty

Uchování preparátů v lednici za tmy

Jako negativní kontrola slouží řezy, na které byl místo primární protilátky aplikován 1% casein v PBS (phosphate buffered saline).

Aplikace protilátek:

Na velké Petriho misky s vloženými navlhčenými filtračními papíry pokrytými parafilmem („vlhká komůrka“) položit podložní sklička se vzorky, na ně pomalu a opatrně pipetou po kapkách aplikovat cca. 200 μ l protilátky. (Pozor, tlak roztoku může odlepit řezy.) Petriho misky je nutné následně přiklopit většími miskami. V případě sekundárních protilátek se umístí Petriho misky do tmy. V průběhu imunolokalizace je nutné kontrolovat vlhkost v Petriho miskách, případně znovu navlhčit filtrační papíry.

9.1.3 Složení a příprava chemikálií pro imunodetekci mikrotubulů

PBS (phosphate buffered saline):

pozn. uchovávat v lednici

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,158 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,31 g/l

MTSB (microtubule-stabilizing buffer):

pozn. připravovat vždy čerstvý

50 mM PIPES

5 mM MgSO₄.7H₂O

5 mM EGTA

pH = 6,9

PIPES	1,512 g/100 ml
EGTA	0,1902 g/100 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1232 g/100 ml

1. rozpustit PIPES (pokud „free acid“) v daném množství vody s přidáním malého množství 2M KOH – zahřívát, míchat
2. po rozpuštění přidat EGTA, MgSO₄.7H₂O
3. upravit pH na 6,9 (pomocí 2M KOH)
4. nechat zchladnout

3,7% formaldehyd v MTSB

pozn. připravovat vždy čerstvý roztok, na přípravu používat čerstvý paraformaldehyd

3,7 g....100 ml MTSB

1. rozpustit paraformaldehyd v daném množství MTSB s přidáním *pouze malého* množství 2M KOH – zahřívát na 65°C, míchat

paraformaldehyd vážit s dýchací rouškou, do rozpuštění pracovat stále v digestoři

!pozor! šetřit s KOH, aby se pH příliš nevychýlilo

2. po rozpuštění upravit pH na 7,8 pomocí 1M H₂SO₄

100% etanol

Pro získání 100% etanolu z 96% etanolu je nutné použít molekulární síto, jehož indikační kuličky mají modrou barvu. Při změně na vínovou, hnědou či fialovou barvu je nutná

regenerace molekulárního síta v sušárně při teplotě $\leq 160^{\circ}\text{C}$ na skleněné Petriho misce do doby, než kuličky zmodrají. K získání 100% etanolu je také možné použít vyžíhanou modrou skalici (*pozor, nesmí se vdechovat prach!*).

Toluidinová modř 0,01% v PBS

0,01 g/ 100 ml PBS

Steedmanův vosk

9 dílů Poly(ethylene glycol) distearate 400 + 1 díl 1-hexadekanol

tedy např. 500 ml:

1. 450 g PEG 400 distearate zahřívát na „míchačce“ na cca. 65°C
2. po rozpuštění přidat 50 g 1-hexadekanol
3. míchat další 3-4 hod.
4. uchovávat Steedmanův vosk v lednici v igelit. sáčku, aby neabsorboval vodu
5. před použitím vosku jeho rozpuštění v termostatu při 37°C (*je dobré rozpouštět vždy pouze potřebné množství, tedy zabránit opětovnému rozpouštění – nebezpečí absorpce vody*)

Poly-L-lysin

na skla použít 1x koncentrovanější Poly-L-lysin (aby tlustší řezy lépe držely, neuplavaly)

tedy např. 200 ml roztoku:

1. rozpustit 40 ml Poly-L-lysinu v 160 ml destil. H_2O
2. po rozpuštění ponořit vyčištěná skla (96% ETOH) na 5 min do roztoku
3. 1 den sušit za pokojové teploty, popř. 1 hod. při teplotě 60°C v sušárně

Kamencová želatina

1. rozpustit 0,5% želatiny ve vodě, zahřívát, cca. 3-4 hod.
2. po rozpuštění přidat 0,05% kamence (= podvojně soli síranů, lze použít jakékoliv, používala jsem $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
3. za tepla ponořit do roztoku vyčištěná skla (96% ETOH) na několik sekund a nechat několik minut chladnout
4. znovu ponořit skla na několik sekund do roztoku
5. alespoň 24 hod. sušit při 50°C v sušárně

roztok kamencové želatiny lze skladovat v lednici po dobu jednoho dne, pak je nutné znovu roztok zahřát

1% casein (mléčný protein) v PBS: *pozn. místo hovězího albuminu, levnější*

zmražené aliquoty: 1,5% casein v PBS (10 ml)

tedy 15 ml 1% caseinu v PBS = 10 ml 1,5% casein + 5 ml zřed. PBS

příprava 1 l **1,5% caseinu v PBS:**

1. smíchat 16,5 g caseinu s 400 ml destil. vody
2. cca. 20 min. zahřívát (40°C) a míchat
3. dotitrovat *malým* množstvím KOH na pH 10
4. nechat rozpouštět casein – 3-4 hod., 40°C
5. připravit si 500 ml naředěného PBS
6. navážít si chemikálie na 500 ml naředěného PBS a rozpustit je v 100 ml destil. vody
7. smíchat rozpuštěný casein a PBS z bodu 5 a 6, výsledný objem roztoku je 1 l
8. upravit pH na 7 pomocí malého množství HCl
9. zamrazit 10 ml aliquoty

pozn. důvodem přípravy pouze 1,5% caseinu jako aliquotu a ne caseinu ve vyšších koncentracích je jeho srážení při úpravě pH na 7

PBSA:

1 g albuminu/100 ml PBS

lze také zamrazit aliquoty

Primární protilátky:

1 sklíčko = cca. 200 µl protilátky

Monoclonal Anti- α -Tubulin from mouse, Sigma, č. produktu: T6199

Konečné ředění 1:1000, aliquot v mrazáku 1:10, tedy výsledně ředit (z aliquotu) 1:100

- tedy na 1 ml zředěné prim. protilátky (1:1000): 10 µl protilátky (aliquot – 1:10) + 990 µl 1% caseinu v PBS, popř. 1% PBSA

(Protilátky jsou ředěny v roztoku caseinu, či hovězího albuminu. Důvodem je ochranný efekt.)

Monoclonal Anti- α -Tubulin from mouse, Amersham, č. produktu: N 356

Konečné ředění 1:1000, aliquot v mrazáku 1:10, tedy výsledně ředit (z aliquotu) 1:100, používám 2x koncentrovanější: tedy 1:50 (z aliquotu)

- tedy na 1 ml zředěné prim. protilátky (1:500): 10 µl protilátky (aliquot – 1:10) + 490 µl 1% caseinu v PBS, popř. 1% PBSA

Monoclonal Anti- α -Tubulin from mouse, klon TU-01, Exbio, č. produktu: 11-250

Konečné ředění 1:500, v mrazáku bez ředění, používám 2x koncentrovanější: tedy 1:250

- tedy na 1 ml zředěné prim. protilátky (1:250): 10 µl protilátky + 2490 µl 1% caseinu v PBS, popř. 1% PBSA

! negativní kontrola: nepoužít prim. protilátku, pouze dát na sklíčka 1% casein v PBS (pokud použit casein, jinak 1% PBSA) !

Sekundární protilátky: *Manipulace a příprava roztoku sekundárních protilátek by měla být co nejrychlejší. Čím déle je sekundární protilátka na světle, tím více její signál bledne.*

Anti-mouse Alexa Fluor 488 from rabbit, Molecular Probes, č. produktu: A-11059

(Abs. 495 nm, Em. 519 nm)

Konečné ředění 1:1000, aliquot v mrazáku 1:10, tedy výsledně ředit (z aliquotu) 1:100, používám ale 2x koncentrovanější: tedy 1:50

- tedy na 1 ml zředěné sek. protilátky (1:500): 10 µl protilátky (aliquot – 1:10) + 490 µl 1% caseinu v PBS, popř. 1% PBSA

Anti-mouse Alexa Fluor 546 from rabbit, Molecular Probes, č. produktu: A-11060

(Abs. 556 nm, Em. 573 nm)

Konečné ředění 1:1000, aliquot v mrazáku 1:10, tedy výsledně ředit (z aliquotu) 1:100, používám ale 2x koncentrovanější: tedy 1:50

- tedy na 1 ml zředěné sek. protilátky (1:500): 10 µl protilátky (aliquot – 1:10) + 490 µl 1% caseinu v PBS, popř. 1% PBSA

Toluidinová modř 0,005% v PBS

0,005 g/ 100 ml PBS

Hoechst 33258 v PBS

4 µl Hoechst 33258.....3 ml PBS

aplikace stejná jako u protilátek – na sklíčko

Propidium jodid

příprava aliquotů:

10 mg propidium jodid + 10 ml destil. vody

zmrazit 200 ml aliquoty (aliquot se může při používání uchovávat několik měsíců v lednici)

následné ředění: 1:400

5% propylgalát v glycerol:PBS (7:3)

5% propylgalát: tedy 5 g/100 ml

uchování v lednici

9.1.4 Poznámky k pracovním protokolům

(ke kapitole 9.1.1, 9.1.2)

1. Využití mikrovln při fixaci mikrotubulů v endodermis kořenů *Allium cepa*

*Od mikrovln jsme očekávali, že by mohly urychlit průnik fixačního roztoku kořenem, resp. k buňkám endodermis. Mikrovlny stimulují pronikání glutaraldehydu rostlinným pletivem. Velice krátké působení mikrovln ovlivňuje pozitivně ultrastruktury preparátů v elektronové mikroskopii (Nebesářová a kol. 2001). Mikrovlny také díky svému tepelnému účinku zkracují čas potřebný na fixaci, tedy urychlují průběh fixace (Login a kol. 1995, Login a kol. 1998, Galveze a kol. 2006). Tyto důvody byly podnětem pro vytvoření metodiky pro fixaci cytoskeletu v kořenech *Allium cepa* pomocí mikrovln.*

V pokusech je používána kuchyňská mikrovlnná trouba značky Whirlpool typu MD 113. Kuchyňské mikrovlnné trouby pracují pulzně, tedy výkon se mění skokově. Jejich výkon je nastaven na maximum. Nižší výkony jsou dosaženy vypínáním a zapínáním magnetronu. Kuchyňská mikrovlnná trouba tedy na rozdíl od „laboratorních“ mikrovlnných trub neumožňuje kontinuální zvyšování a snižování výkonu (http://www.ebsciences.com/papers/mw_tech.htm, duben 2007). Magnetrony mikrovlnných trub využívaných v domácnostech mohou být také charakterizovány rozdílnými ohřívacími časy (Login a kol. 1998).

Dalším problémem při práci s mikrovlnnou troubou je respektování přítomnosti „hot a cold spots“ v prostoru mikrovlnné trouby. Mikrovlnné pole v troubě je nehomogenní, tedy lze najít místa s nižší a vyšší intenzitou pole (Galvez 2006, Hájek 2006), tedy místa o rozdílné teplotě (Login a kol. 1998). Tento fakt může přispět k špatné standardizaci pokusů. V experimentech byl tudíž používán otočný talíř, jež může alespoň trochu omezit nehomogenitu mikrovlnného pole. Tuto nehomogenitu lze ještě snížit stejným umístěním vzorků v rámci mikrovlnné trouby při všech pokusech. Kvůli dobré reprodukovatelnosti pokusů jsou přiloženy k diplomové práci fotografie s popisky (Obr. č. 60, Obr. č. 61), které přesně zaznamenávají polohu vzorků v mikrovlnné troubě.

Dalším problémem je udržení stálé teploty vzorků, tedy zamezení jejich spálení. Z tohoto důvodu bylo aplikováno chlazení pomocí ledu a studené vody, které byly při vyšších výkonech a časech průběžně měněny. Teplota vzorků po celou dobu působení mikrovln je cca. 15°C (měření pomocí elektrického teploměru).

Během pokusů je třeba myslet i na potřebnou zátěž mikrovlnné trouby (Nebesářová a kol. 2001, Hájek 2006, <http://www.otvorena-veda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/>

[MultiObSem/112.pdf](#), 20.4.2007). Pokud je mikrovlnná trouba v provozu bez přítomnosti materiálu s absorpční schopností, mikrovlnné záření se dostává zpět na magnetron, tím se riskuje jeho zničení.

2. Steedmanův vosk

Jako zalévací médium je použit Steedmanův vosk (Vitha a kol. 2000b), který je vhodný díky svému nízkému bodu tání (35°C) pro uchování mikrotubulů v nerozpadlém stavu. Problematická je však práce s tímto voskem. Steedmanův vosk má tendence absorbovat vodu, i např. ze vzduchu. Rozpouštět doporučuji tedy pouze takové množství, které je nutné pro provedení pokusu.

3. Řezání a žehlení:

Řezání vzorků zalitých ve Steedmanově vosku není nejjednodušší v porovnání s parafínem. Ráda bych zmínila několik triků, které mohou ulehčit práci při řezání:

- Nejdůležitější roli u řezání hraje teplota vosku, resp. teplota místnosti. Dobře se dá řezat při pokojové teplotě okolo 18°C . Pokud přesáhne teplota v místnosti 25°C , je řezání na rotačním mikrotomu skoro nemožné. Je třeba použít kryotom. Pokud je teplota v místnosti nízká, lze zvýšit teplotu vosku se vzorkem a nože mikrotomu pomocí lampičky. Pozor ale na přehřátí obou předmětů, vzniknou pak „vodově“ průhledné řezy, které se při zavodnění odlepi.
- Trochu problematické se může zdát připevnění vzorku s voskem na dřevěný špalíček určený pro držák objektů mikrotomu. Připravený kvádřík vosku přiložíme na krátkou chvíli k horké střeňce nože. Tím dojde k roztavení vrstvičky vosku, která poslouží jako „lepidlo“ při připevnění na dřevo. Je nutné dát si pozor na zahřátí vosku. Snadno se může v případě Steedmanova vosku celý voskový bloček roztavit.
- Nejlépe je po „přilepení“ voskových kvádříků se vzorky na dřevěný špalíček chvíli počkat, než vosk dostatečně utuhne. Pak ořežeme pouze sporadicky (v porovnání s parafínem) strany voskového kvádříku do tvaru pyramidy, protilehlé strany by měly být rovnoběžné. Je ale nutné, aby nám kolem vzorku zůstalo dostatečné množství Steedmanova vosku jako opora! Jinak se nám nepodaří nakrájet dobré řezy.
- U Steedmanova vosku oproti parafínu je složité vytvořit při řezání pásku (Vitha a kol. (2000b) píše opak.). Řezy se buď různě rolují či odpadávají jednotlivě. Často pomůže změna teploty vzorků a nože mikrotomu. Dobré je také pomoci prvním několika řezům se narovnat pomocí jemných štětečků. U podélných řezů je lepší jejich řezání „na

stojato“. Osobně preferuji pomalejší řezání na mikrotomu. Vitha a kol. (2000b) však doporučují opak.

- Nařezané řezy je dobré shromažďovat na černé suché čtvrtce a pak je následně všechny rychle přenést na kapku na podložním skle potaženém poly-L-lysinem nebo kamencovou želatinou. Po cca. 10 sekundách odsajeme přebytečnou vodu na sklíčku filtračním papírem. Vzorky nenecháme ležet déle ve vodě. Steedmanův vosk začne ihned nasávat vodu, jejíž větší objem může způsobit roztrhání pletiva. Nesmíme ale zase šetřit s vodou v případě kapky. Může se snadno stát, že pod částí řezu bude vzduch. Řez uschne, ale při dalších krocích se odlepí. Častým indikátorem přítomnosti vzduchu pod řezem je jeho bílé zbarvení po uschnutí.
- Ve svých experimentech jsem zkoušela nejrůznější způsoby potahování podložních skel. Vyčištěná podložní skla jsem ponořila jednou či dvakrát do kamencové želatiny, či do jedenkrát či dvakrát koncentrovaného poly-L-lysinu. Nejlépe držely řezy na sklech potažených dvakrát kamencovou želatinou či dvakrát koncentrovaným poly-L-lysinem.
- Řezy necháme alespoň půl dne sušit při pokojové teplotě. Není dobré urychlit sušení pomocí zahřáté ploténky pod sklíčky. Steedmanův vosk taje již při 35°C!

4. Zalití vzorků po imunodetekci

Propylgalát zabraňuje předčasnému vyblednutí fluorescence. Běžně se rozpouští v roztoku glycerol:PBS v poměru 9:1. Roztok v poměru 7:3 je více tekutější a lépe se tedy nanáší. Následně jsou krycí sklíčka oblakována bezbarvým lakem na nehty. Ten zabrání vysoušení. Pro jeho správné uchycení je nutné odstranit vyteklé zbytky roztoku propylgalátu.

I přes upravení metodického postupu docházelo k rychlému vysvěcování vzorku při pozorování v konvenčním či konfokálním fluorescenčním mikroskopu. Zkusili jsme použít jiné zalévací médium, a sice komerčně prodávaný Vectashield Mounting Medium od firmy Vector laboratories. Po aplikaci Vectashieldu slábl fluorescenční signál u vzorků pouze velice pomalu. I po několika měsících uchování preparátů v lednici bylo možné pozorovat “svítící” mikrotubulární cytoskelet.

9.2 Aplikace metodiky fixace mikrotubulů s využitím účinků mikrovln na cytoskelet buněk kořenů *Arabidopsis thaliana*

(Spolupráce s Mgr. Ivanem Kulichem, KFR PŘF UK)

Pokusný materiál: sedmidenní *Arabidopsis thaliana*, wildetype vypěstovaná na obohaceném ½ Murashige a Skoog médiu.

Následující protokol popisuje metodiku sterilizace a vysetí semen na plotny (Krtková 2006).

1) Příprava vzorků na fixaci

a) Sterilizace

Vše ve flow-boxu

1. rychlé promytí semen 70% etanolem méně než 1 min
2. 50% SAVO 10 min
3. promytí semen vyklávanou destilovanou vodou 4x
4. semena ve vyklávanou destilovanou vodě 2 až 3 dny *v lednici!*

(důvodem je dosažení jednotné klíčivosti semen, tedy jednotné délky kořenů)

b) Vysetí semen na plotnu s obohaceným ½ MS médiem

Na připravené tuhé médium ve velkých čtverhranných Petriho miskách byla pomocí pipety přenášena jednotlivá semena do řady vedle sebe. Petriho misky byly následně uzavřeny parafilmem a ponechány po dobu 7 dní v kultivační místnosti.

2) Fixace rostlin *Arabidopsis thaliana* a imunolokalizace

1. opatrné odebrání celých rostlin z ploten a jejich umístění do skleněných lékovek s fixačním roztokem (3,7% formaldehydu v MTSB, pH 7,8)
2. infiltrace za sníženého tlaku formaldehydem pomocí rotační vývěvy
3. *opatrné* přendání vzorků do popsaných eppendorfek (2 ml) naplněných fixačním roztokem, jejich uzavření
4. umístění vzorků do kulatého plastového držáku, vložení držáku do nízké kádinky s ledem a studenou vodou (Obr. č. 60, Obr. č. 61)
5. působení mikrovln (kuchyňská mikrovlnná trouba značky Whirlpool typu MD 113) – 90 W nebo 160 W po dobu 1, 2, 3 nebo 5 min
6. přenesení vzorků zpět do lékovek naplněných 3,7% formaldehydem v MTSB, umístění vzorků ve fixačním roztoku do dosažení celkového času fixace (2 hod)
7. přenesení rostlin do košíčků s propustným dnem
8. promytí v MTSB 3x 10 min

- | | |
|---|-----------|
| 9. enzymová lázeň | 20 min |
| 10. promytí v MTSB | 3x 10 min |
| 11. metanol (-20°C) | 15 min |
| 12. PBS | 10 min |
| 13. 1% BSA v PBS | 30 min |
| 14. Prim. protilátka (4°C) | přes noc |
| 15. Promytí v PBS | 3x 5 min |
| 16. Sek. protilátka (ve tmě při 37°C) | 3 hod |
| 17. Promytí v PBS | 5x 5 min |
| 18. Zalití do 50% glycerolu a oblepení lakem na nehty | |

3) Složení a příprava chemikálií pro imunodetekci mikrotubulů

Složení kultivačního média

MS (Sigma)	2,2 g/l
Sacharóza	10 g/l
Myo-inozitol	50 mg/l
Thiamin	5 mg/l
Pyridoxin	0,5 mg/l
Kys. nikotinová	0,5 mg/l
Agar (Agar – Agar Roth)	16 g/l

Příprava kultivačního média a jeho aplikace na Petriho misky

1. MS smíchat se sacharózou, myo-inozitem, thiaminem, pyridoxinem a k. nikotinovou v daném množství destilované vody
2. upravit pH na pH 5,8
3. přidat agar
4. ohřát v mikrovlnné troubě do vzniku vzduchových bublin
! pozor na explozi, nutné hlídat!
5. klávkovat při 120°C
6. uchovávat v uzavřených lahvích
7. ohřát do tekutého stavu v mikrovlnné troubě
8. rozlít na připravené sterilní čtverhranné Petriho misky
9. zavření misek parafilmem a uchování v lednici

Enzymová lázeň:

0,05% pektolyáza Y-23

0,4 M manitol v MTSB

inhibitory proteáz 0,3 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin a 1,25 μ M Pepstatin

Primární protilátka:

Monoclonal Anti- α -Tubulin from mouse, firma Sigma, č. produktu: T6199

Konečné ředění 1:1000, aliquot v mrazáku 1:10, tedy výsledně ředit (z aliquotu) 1:100

- tedy na 1 ml zředěné prim. protilátky (1:1000): 10 μ l protilátky (aliquot – 1:10) + 990 μ l 1% caseinu v PBS

Sekundární protilátka:

Anti-mouse Alexa Fluor 488 from rabbit, firma Molecular Probes, č. produktu: A-11059

(Abs. 495 nm, Em. 519 nm)

Konečné ředění 1:1000, aliquot v mrazáku 1:10, tedy výsledně ředit (z aliquotu) 1:100

- tedy na 1 ml zředěné sek. protilátky (1:1000): 10 μ l protilátky (aliquot – 1:10) + 990 μ l 1% caseinu v PBS

9.3 Protokol pro obarvení řezů ze Steedmanova vosku sudanem

Fixace a zalití vzorků do Steedmanova vosku (podle protokolů v kapitole 9.1.1)

Nařezání segmentů (tloušťka příčných řezů 50 μm , podélných 40 μm)

100% ETOH	3x10 min
90% ETOH v PBS	10 min
50% ETOH v PBS	10 min
PBS	10 min
Sudan Fat Red 7B	30 – 75 min (závisí na tloušťce řezu) <i>(aplikace způsobem jako protilátky)</i>
Destil. H ₂ O	10 min
Zalití do glycerolu	

Chemikálie:

Sudan Fat Red 7B

2 podobné roztoky, oba barví obdobně

- a) 0,2% sudan rozpustit v polyethylenglykolu 400 za stálého míchání a teploty 90°C (rozpuštění trvá několik hodin).
- b) 0,2% sudan rozpustit v polyethylenglykol 400/glycerol (1:1)
 1. rozpustit 0,2% sudan v polyethylenglykolu 400, dobře míchat, 90°C
 2. po rozpuštění přidat glycerol

9.4 Makro pro eliminaci autofluorescenčního signálu buněčné stěny (ke kapitole 4.4.2)

Makro je vytvořeno pro program Image J a lze ho aplikovat v obdobné formě na soubory fotografií z konfokálního mikroskopu, kde je rušivým elementem silná autofluorescence buněčné stěny přesahující i do fluorescenčního kanálu samotné protilátky.

```
RGBpath1="D:\\Konfokal-Zaloha\\machacova\\RGB1a\\"
RGBpath2="D:\\Konfokal-Zaloha\\machacova\\RGB1b\\"
NAHRUBOpath="D:\\Konfokal-Zaloha\\machacova\\NAHRUBO\\"
ImageName=getTitle();

//rozdelit na dva obrazky
run("RGB Split");
close();

//prejmenovat inteligentne
selectImage(1);
rename("Blue");
run("Set Scale...", "unit=um");
selectImage(2);
rename("Green");
run("Set Scale...", "unit=um");

//vytvorit obrazek Difference
imageCalculator("Difference create stack", "Blue", "Green");
rename("Diff");
imageCalculator("Difference create stack", "Blue", "Diff");
rename("Blue diff");
imageCalculator("Difference create stack", "Green", "Diff");
rename("Green diff");
imageCalculator("Add create stack", "Blue diff", "Green diff");
rename("Diff diff");
```

```
//1a. Vytvorit barevny obrazek s naznacenou mirou presvecovani autofluorescence  
run("RGB Merge...", "red=Diff green=Green blue=Blue keep");  
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name="+ImageName+" start=0 digits=2  
save="+RGBpath1);  
close();
```

```
//1.b  
run("RGB Merge...", "red=[Diff diff] green=Green blue=Blue keep");  
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name="+ImageName+" start=0 digits=2  
save="+RGBpath2);  
close();
```

```
//3. Odecist nahrubo G-B  
imageCalculator("Subtract create stack", "Green", "Blue");  
rename("G-B");  
run("RGB Merge...", "red=*None* green=G-B blue=Blue keep");  
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name="+ImageName+" start=0 digits=2  
save="+NAHRUBOpath);  
close();
```

```
closeAll();
```

