

# ORGANIZATION OF EMBRYOS IN CLUSTERS OF EARLY SOMATIC EMBRYOS OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* /L./ KARST.)

## ORGANIZACE EMBRYÍ VE SHLUCÍCH RANÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU ZTEPILÉHO (*PICEA ABIES* /L./ KARST.)

**Petřek J.<sup>1)</sup>, Vlašínová H.<sup>1)</sup>, Havel L.<sup>1)</sup>, Adam V.<sup>2)</sup>, Babula P.<sup>3)</sup>, Vítěček J.<sup>1)</sup>, Bartůšek K.<sup>4)</sup>, Potěšil D.<sup>2)</sup>, Kizek R.<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>2)</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>3)</sup> Ústav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno

<sup>4)</sup> Ústav přístrojové techniky, Akademie věd České republiky, Kotlářská 2, 611 37 Brno

E-mail: j.petrek@email.cz

### ABSTRACT

In our experiments, we studied growth and development of early somatic embryos (ESEs) cultures of Norway spruce (*Picea abies*). The growth of ESEs is influenced by sub-cultivation. It was ascertained by image analyse method that increase of SRSE area is dependent on initial size of sub-cultivated part of original ESEs and on spatial orientation of embryos. In the concrete area of ESEs less increased if the spatial orientation was not kept original. Orientation influence on ESEs growth increased together with the age of culture. On the basis of the mentioned results, embryos viability in individual ESEs parts was determined by double staining using fluorescein diacetate and propidium iodide. Embryos viability was higher in outer parts of the cluster then in inner parts of cluster. The embryos obtained from different cluster parts were sub-cultivated and their subsequent growth was monitored. Increase of ESEs clusters area sub-cultivated from outer cluster parts was higher in comparison with area increase of ESEs clusters from inner cluster parts. That is why differentiation of Norway spruce early somatic embryos culture was confirmed.

**Keywords:** Norway spruce, *Picea abies*, image analysis, early somatic embryo

### ABSTRAKT

V našem experimentu jsme studovali růst a vývoj explantátové kultury raných somatických embryí smrku ztepilého (*Picea abies*), která vytváří shluky. Růst shluků raných somatických embryí (SRSE) je ovlivněn procesem pasážování. Pomocí metody analýzy obrazu bylo zjištěno, že přírůstek plochy SRSE po pasážování je závislý na jeho počáteční velikosti a také

na prostorové orientaci embryí. Při nedodržení původní orientace byl přírůstek plochy SRSE menší. Se stářím kultury vliv orientace SRSE na jeho růst roste. Na základě tohoto zjištění byla stanovena životnost embryí v jednotlivých částech SRSE fluorescenčními barvivý fluoresceindiaceťem a propidium jodidem. Životnost embryí byla vyšší ve vnějších částech shluku. Embrya z jednotlivých částí shluku byla dále pasážována a byl sledován jejich další růst. Přírůstek plochy SRSE pocházejících z vnějších částí byl větší než přírůstek SRSE z vnitřních částí. Byla potvrzena diferenciace embryogenní kultury raných somatických embryí smrku ztepilého.

**Klíčová slova:** smrk ztepilý, *Picea abies*, analýza obrazu, rané somatické embryo

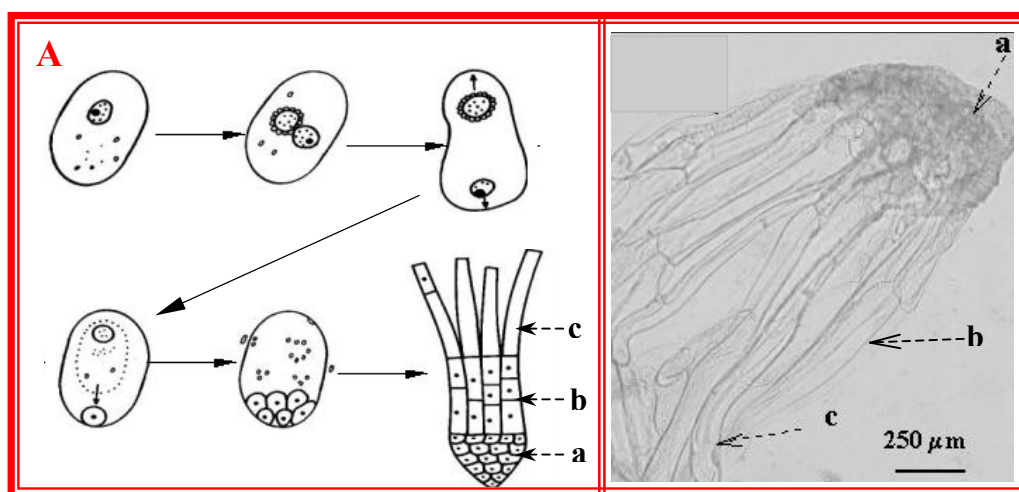
## ÚVOD

Studium vlivu cizorodých látek (např. těžkých kovů) na smrk ztepilý (*Picea abies* /L./ Karst.) je v přirozených podmínkách velmi náročné, proto se hledají možnosti, jak tento výzkum co nejvíce zjednodušit. Jednou z možností, které se v poslední době stále častěji využívá, je studium explantátových kultur raných somatických embryí smrku ztepilého [15]. Základem embrya u somatické embryogeneze jsou buňky somatické. Byla prokázána značná podobnost mezi vývojem a strukturou raných somatických embryí a raných zygotických embryí, proto je možné použít somatická embrya jako odvozenou modelovou kulturu, u které se dají předpokládat podobné fyziologické odpovědi jako je tomu u zygotické embryogeneze [7,10,24].

Explantátové kultury rostlin vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za definovaných experimentálních podmínek, spočívají tedy v oddělení určité části ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny a umístění této části rostliny do sterilního prostředí, kde se kultivuje. Pro odvození explantátové kultury je vhodné jakékoliv rostlinné pletivo, neboť všechny buňky v rostlinném organismu jsou totipotentní. Růst a vývoj explantátových kultur ovlivňují kultivační podmínky (růstové médium, světelný režim, teplota atd.), které mohou stimulovat a urychlovat průběh morfogenního procesu (organogenezi, somatickou embryogenezi, somatickou polyembryogenezi, pylovou embryogenezi či androgenezi).

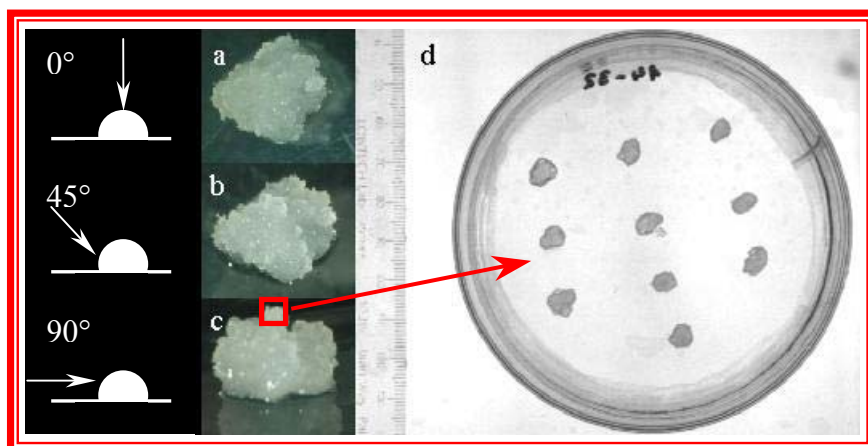
Při somatické embryogenezi vznikají embrya ze somatických buněk. Charakteristické rysy vzniku raných somatických embryí u jehličnanů byly popsány mnoha autory [5-11]. Jádro tubulární buňky (megakaryocyt) se rozdělí na dvě jádra; první postupuje k pólu a druhé se stává apoptotické a je eliminováno [9,10]. První jádro se následně několikrát dělí a vznikají tak embryonální buňky vytvářející rané somatické embryo (Obr. 1A). Raná somatická embrya

smrku (RSE) se skládají z embryonální skupiny, embryonálních tubulárních buněk a embryonálního suspensoru (Obr. 1A,B).



Obr. 1: (A) Schéma vzniku somatických embryí u smrku; z původního jádra tubulární buňky (megakaryocytu) se vytváří rané somatické embryo s embryonální skupinou (a), embryonálními tubulárními buňkami (b) a embryonálním suspensorem (c). (B) Mikroskopický snímek raného somatického embrya smrku ztepilého; klon 2/32 (Mikroskop Olympus AX 70); embryonální skupina (a), embryonální tubulární buňky (b), embryonální suspensor (c); úsečka: 250  $\mu\text{m}$ .

Buňky embryonální skupiny se stále dělí a jejich prodlužováním na distálním konci vznikají tubulární buňky, z nichž vzniká embryonální suspensor, jehož buňky jsou uvolňovány do média [2,5]. Dochází tak k neustálému oddělování nových tubulárních a suspensorových buněk směrem od embryonální skupiny a tvoří se shluky raných somatických embryí (SRSE), jak je ukázáno na Obr. 2a,b,c. Shluky raných somatických embryí jsou kultivovány v Petriho misce na kultivačním médiu. Při pasáži jsou odebírány části shluků s vyvinutými skupinami embryonálních buněk o hmotnosti cca 2,5 – 5,0 mg a jsou přenášeny na novou Petriho misku s médiem (Obr. 2d).



Obr. 2: Shluky raných somatických embryí (SRSE); klon 2/32, po dvoutýdenní kultivaci *in nature*, fotografie z různého úhlu (Fotoaparát Olympus Digital Camera C-4040 ZOOM); 0° (a), 45° (b), 90° (c); Petriho miska se SRSE napasážívanými na kultivačním médiu (d).

Mezi nejčastěji využívané metody pro stanovení růstu rostlinných kultur je vážení čerstvé hmotnosti kultury nebo počítání buněk. V případě kultur raných somatických embryí smrku je vhodné využít metody analýzy obrazu (IA - image analysis). IA je vhodným nástrojem ke sledování růstu SRSE smrku v podmínkách *in vitro*. Při experimentu probíhajícíím v čase nemusíme zasahovat (odběr vzorků) do kultivovaného biologického materiálu, čemuž při vážení nelze zabránit. Gravimetrická metoda (vážení) umožňuje pouze pozorování na začátku a na konci experimentu, neboť při vážení dochází k mechanickému poškození struktury SRSE a tím ke zpomalení jejich růstu. K vlastní analýze obrazu je využívána CCD-kamera (charge-coupled device) a počítačové programy GRAB-IT a Image-Pro. Analýza obrazu je metodou, u které lze sledovat růst i u značně heterogenních struktur SRSE bez zásahu do rostoucí kultury [16,18].

Pro stanovení životnosti buněk se využívá tzv. „test dvojitého barvení“, založený na selektivní permeabilitě cytoplazmatické membrány, a dále aktivita intracelulárních esteras. Esterasy katalyzují hydrolytické štěpení molekul jednoduchých esterů obsahujících alkoholy s krátkým uhlíkatým řetězcem [4]. Díky své souvislosti s buněčným metabolismem slouží esterasy jako marker životaschopnosti (viability) buněk [12,22,23]. Některé práce ukázaly, že aktivita intracelulárních esteras buněčné suspenze je přímo úměrná počtu živých buněk [20]. Využití aktivity intracelulárních esteras je vhodným nástrojem pro stanovení životnosti kultur ovlivněných těžkými kovy, na které se zaměřují další naše práce [1,17,21]. Kromě již zmíněných metod bylo využito barvení shluků 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridem (TTC).

Cílem práce byla optimalizace práce s kulturami raných somatických embryí smrku ztepilého. Především bylo zapotřebí optimalizovat způsob udržování kultury (pasážování), který má zásadní vliv na další růst kultury. Dále byla navozena otázka, zda jsou raná somatická embrya smrku ztepilého kultivovaná v podmínkách *in vitro* schopna organizace a tvorby struktur, které nemají v přirozených podmínkách obdoby. Při studiu tvorby struktur SRSE jsme využily nukleární magnetickou resonanci (NMR).

Princip nukleární magnetické rezonance vychází z poznatků kvantové mechaniky. Důležitou roli zde hraje spin, vnitřní stupeň volnosti dané částice. NMR využívá magnetických vlastností jader některých atomů, přesněji atomů, jejichž jádra mají spinové kvantové číslo  $I = 1$  (částice s polovičním spinem označujeme jako fermiony a vztahuje se na ně Fermiho-Diracova statistika). Významné jsou především jádra vodíku, neboť vodík je obsažený ve vodě. Jádrem vodíku je proton, který má poloviční spin. Díky tomu má i jaderný magnetický moment. Zapůsobíme-li na jádra vodíku silným magnetickým polem, dochází k excitaci jeho jader. Poněkud zjednodušeně si to můžeme představit tak, že se spin „srovná se do jednoho směru“. Když do „srovnaných jader“ následně vyšleme razantní radiofrekvenční impuls, vychýlí se jádra s různou intenzitou, ale po určité chvíli se s různou rychlostí opět znovu seřadí do jednoho směru. Návrat do rovnovážného stavu se popisuje jako tzv. FID (free induction decay, volné doznívání indukce). Právě pomocí FID lze zachytit i velice jemnou odpověď buněčných struktur. Tato elektromagnetická ozvěna je následně počítačem zpracována do digitálního formátu, který díky speciálnímu grafickému softwarovému vybavení umožňuje vytvořit přesný obraz struktury. Praktické využití v mnoha biologických disciplínách umožnila metoda NMR zobrazování (MR imaging, zkráceně též MRI) [3].

## **MATERIÁL A METODY**

### **Rostlinný materiál**

Při experimentech byla využita kultura raných somatických embryí smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.), klon 2/32 (horský ekotyp, Beskydy). Kultura byla odvozena na ústavu botaniky a fyziologie rostlin AF MZLU v Brně dle postupu [5,11] ze zygotických embryí.

### **Kultivační médium**

Všechny výše uvedené kultury byly dlouhodobě kultivovány na kultivačním médiu LP/2 [2], které bylo modifikováno 9  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinou a 4,4  $\mu\text{M}$

benzylaminopurinem [10]. Anorganické i organické složky média byly rozpuštěny v deionizované destilované vodě, pH bylo upraveno na hodnotu 5,7 – 5,8 pomocí KOH/HCl (pH metr Schott CG 842). Následně byla anorganická část média sterilizována při teplotě 121°C a tlaku 100 kPa po dobu 30 minut (Tuttnauer 3870 EA); organická část byla sterilizována membránovou filtrací (Whatman Puradisc 25 AS 0,2 µm). Embrya byla kultivována ve sterilních skleněných Petriho miskách (průměr 90 mm, 30 ml LP/2 média). Na jednu misku připadlo vždy 10 SRSE. SRSE byla pasážována pod mikroskopem (PZO, Poland) po 14 dnech za striktně sterilních podmínek (flow box Galaire HF 36). Při pasáži byly z horních partií SRSE odebírány části s vyvinutými skupinami embryonálních buněk o hmotnosti přibližně 2,5 – 5,0 mg a přenášeny na novou Petriho misku s LP/2 médiem. SRSE byly kultivovány ve tmě při teplotě  $23 \pm 2$  °C.

## **Růstové analýzy**

### ***Vážení SRSE***

Růst SRSE byl zjištěn vážením, které bylo prováděno ve flow-boxu (Galaire HF 36) na analytických vahách (Denver Instrument APX-153). SRSE byly velmi opatrně očištěny od média pomocí fosfátového pufru (pH 7.0).

### ***Analýza obrazu SRSE***

Pro zjištění plochy SRSE byla nutná digitalizace obrazu každé Petriho misky. Digitalizace byla prováděna kamerou CCD Sony (UPV-GDS 8 000). Pro vyhodnocení jednotlivých ploch byl využit program IMAGE – PRO®.

## **Stanovení životnosti buněk**

### ***Test dvojitého barvení***

Pro sledování životnosti buněk bylo využito barvení buněčné suspenze fluorescenčními barvivy – propidium jodidem (PI) a fluoresceindiacetátem (FDA). Barvivo propidium jodid bylo propouštěno přes cytoplazmatickou membránu dovnitř buňky a způsobovalo ve fluorescenčním mikroskopu v případě mrtvé buňky červené fluorescenční zbarvení. Fluoresceindiacetát byl v živých buňkách štěpen na octan a fluorescein, který vydával zelené fluorescenční zbarvení.

Při vlastním barvení byla odebrána část shluku raných somatických embryí (podobně jako u pasáže) a byla vytvořena suspenze s 37 µl destilované vody, 10 µl propidium jodidu

a 3  $\mu$ l fluoresceindiacetátu [9]. Po pěti minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo možné připravený mikroskopický preparát sledovat pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus AX 70 při zvětšení 4 x 10 a 10 x 10. Pro pozorování bylo využito filtru WU, excitace při vlnové délce 330 – 385 nm. Při sledování preparátů byla pořízena jejich fotodokumentace digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-4040 ZOOM.

Z takto získaných digitálních obrazů bylo možné pomocí metody analýzy obrazu (za využití programu Image-Pro Plus, verze 1.3, Sony) získat přibližné procentuální zastoupení zeleně a červeně zbarvených ploch, vyjadřujících živá a mrtvá embrya.

### ***Stanovení aktivity intracelulárních esteraz***

SRSE byly promyty extrakčním pufrem (50 mM fosfát, pH 8,7) a byly uchovávány při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení byly doplněny na objem 1 ml extrakčním pufrem (250 mM fosfát, pH 8,7 + 1 mM DTT - dithiothreitol) a desintegrovány ve skleněném pístovém homogenizátoru (Kavalier, Česká Republika) uloženém v ledové lázni. Homogenát byl centrifugován (10 000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , centrifuga MR 22, Jouan, USA). Alikvot supernatantu byl přidán do reakční směsi obsahující fosfátový pufr (1 M, pH 8,7) a 10  $\mu$ M FDA, jehož zásobní roztok v bezvodém acetonu byl uchováván v dobře uzavřených nádobkách při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po 15 minutové inkubaci v termostatu (suchý blok, Major science, Taiwan) při  $45^{\circ}\text{C}$  byla změřena fluorescence (RF-551, Shimadzu Scientific Instruments Inc., USA) – excitace 490 nm / emise 514 nm. Aktivita esteraz v IU (jedna mezinárodní jednotka uvolní při výše uvedených podmínkách 1  $\mu$ mol fluoresceinu za minutu) byla přepočítána na absolutní hodnoty.

### ***Barvení 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridem***

Déle byla zjištěna životnost SRSE barvením 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridem (TTC). Barvení TTC patří mezi metody, které využívají barevných reakcí vyvolaných procesy probíhajícími v živých buňkách (oxidačně-redukční reakce při dýchání). V živých buňkách dochází ke tvorbě červených nerozpustných derivátů tetrazolia [13]. Při barvení byly SRSE inkubovány v bezbarvém 1% roztoku TTC po dobu 24 hodin. TTC byl nasán živými buňkami a byl oxidativními enzymy redukován na červený formazan [19]. Mrtvé buňky zůstaly po inkubaci s TTC bezbarvé. Inkubace probíhala ve tmě při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách inkubace byl SRSE pozorován mikroskopem Olympus (SZH 10) a pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Digital Camera C-4040 ZOOM byla pořízena fotodokumentace.

## **Nukleární magnetická resonance**

Experimenty byly prováděny na přístroji MRI system vybaveným 4,7 T magnetem s horizontálním otvorem o průměru 20 cm, který operoval při 200 MHz pro  $^1\text{H}$ .

S využitím MRI byly snímány obrazy vážené koncentrací jader  $^1\text{H}$ . Ve zvoleném místě vzorku byla excitována 2 mm tloušťka řezu a snímán obraz o velikosti 30 x 30 mm (256 x 256 pixels) s rozlišením 0.117 mm/pixel. Měřené shluky byly kultivovány v plastických Petriho miskách o průměru 50 mm. Pro zobrazení byla použita klasická spin echo technika s echo časem  $TE = 13.5$  ms, opakovací periodou  $TR = 3.8$  s a MR signál byl 2x akumulován. Data byla vyhodnocena programem Marevisi.

## **Světelná mikroskopie SRSE**

SRSE byly velmi opatrně rozředěny v destilované vodě a nakápnuty na podložní sklíčko. Mikroskopický preparát byl pozorován přístrojem Olympus (AX 70) při zvětšení 10krát.

## **Digitální fotografie SRSE**

SRSE byly fotografovány z různého úhlu přímo na LP/2 médiu pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Digital Camera C-4040 ZOOM.

## **Statistické metody**

Pro statistické hodnocení bylo využíváno tabulkového procesoru Excel (Microsoft).

## **VÝSLEDKY A DISKUSE**

### **Morfologie RSE a SRSE**

SRSE smrku jsou kultivovány na LP/2 médiu po dobu 14 dní ve tmě. Pomocí světelného mikroskopu byla pozorována jejich morfologie. RSE se skládají z embryonální skupiny, embryonálních tubulárních buněk a embryonálního suspensoru (Obr. 1B). Buňky embryonální skupiny se stále dělí a jejich prodlužováním na distálním konci vznikají tubulární buňky, z nichž vzniká embryonální suspensor, jehož buňky jsou uvolňovány do média. Neustálým oddělováním nových tubulárních a suspensorových buněk RSE směrem od embryonální skupiny se tvoří SRSE. Na Obr. 2a,b,c je ukázán SRSE při jeho snímání z různých úhlů. Jak je z obrázku dobře patrné, nejvhodnějším se zdá být úhel  $90^\circ$ , u kterého je

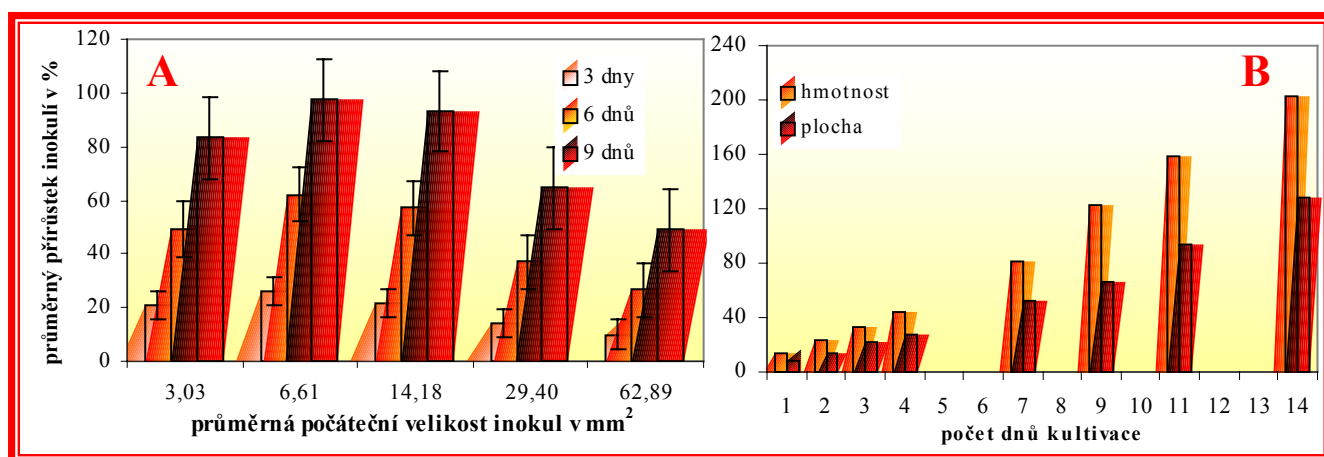
prostorová struktura SRSE velmi dobře pozorovatelná. Prostorová struktura jednotlivých SRSE byla sledována pomocí digitálního fotoaparátu Olympus 4040 Zoom.

### Subkultivace SRSE

Subkultivací nazýváme dobu, po kterou jsou shluky umístěny na stejném kultivačním médiu. Po této době následuje pasážování na čerstvé kultivační médium. Pasážovat je nutné v exponenciální fázi růstu kultury. Již předchozí pokusy [15] potvrdili, že je velmi důležité dodržovat u všech SRSE, kultivovaných na kultivačním médiu v Petriho miskách, stejnou počáteční velikost shluku při pasážování, neboť při různých počátečních velikostech SRSE, je přírůstek plochy SRSE různý, a to v závislosti na době kultivace. S rostoucí počáteční velikostí pasážovaného SRSE klesá jeho průměrný přírůstek. Při příliš malých počátečních velikostech (cca 5 mm<sup>2</sup> a menších) přírůstek SRSE rovněž klesá (Obr. 3A).

### Růstové křivky kultury RSE

Nejprve jsme stanovili základní růstové parametry studované kultury. Růstové křivky byly získány gravimetrickou metodou (vážením) a metodou analýzy obrazu (IA), která je pro kulturu RSE smrku ztepilého nejvhodnější [16,18]. Získali jsme růstové křivky vyjádřené pomocí závislosti přírůstku hmotnosti (plochy) SRSE na době kultivace. Doba kultivace byla shodná s délkou subkultivace (Obr. 3B).



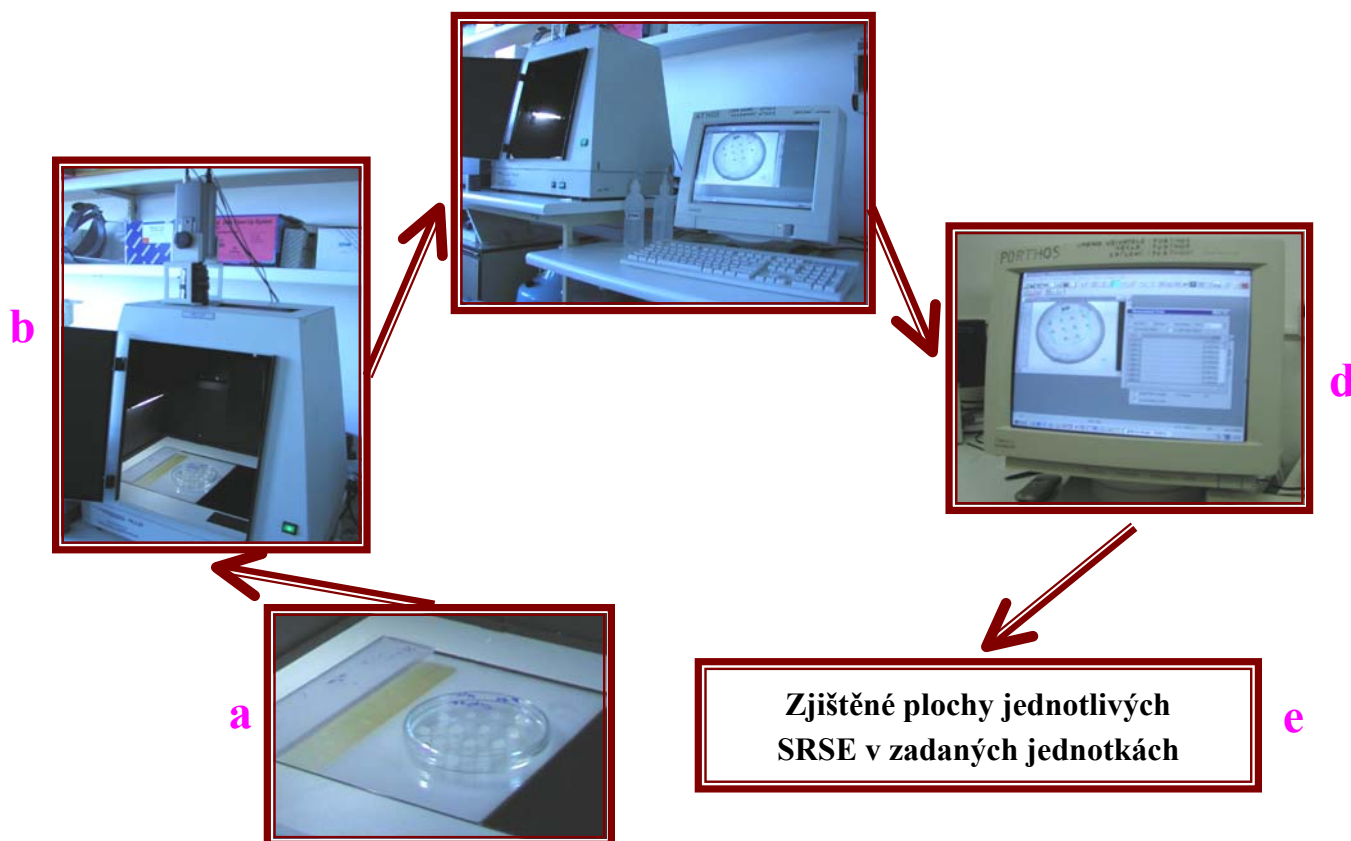
Obr. 3: (A) Závislost přírůstku SRSE na jejich počáteční velikosti; průměrnou počáteční velikost SRSE znázorňuje osa x; měřeno v 3, 6 a 9 dnech; chybová úsečka vyznačuje střední chybu. (B) Růstová křivka; 14 dnů kultivace, hodnoty vyjadřují průměr ze 40 SRSE; chybová úsečka vyznačuje střední chybu.

## Analýza obrazu

Při zjišťování plochy SRSE byly obrazy jednotlivých Petriho misek digitalizovány pomocí CCD-kamery. Petriho miska s SRSE byla nejprve umístěna pod objektiv kamery a osvětlena zářivkami ze spodu a dvou stran. Pro kalibraci digitalizovaného obrazu pomocí programu IMAGE-PRO PLUS bylo nutné nasnímat vhodné měřítko. Samotná digitalizace byla řízena PC prostřednictvím programu GRAB-IT. Pro získání kvalitního obrazu bylo nezbytné nastavit vhodnou expozici a rozlišení kritického detailu (místo nejostřejšího vidění předmětu). Získaný digitalizovaný obraz byl uložen do vytvořené složky paměti počítače. Metoda umožnila velmi rychle a snadno vypočítat plochu všech digitalizovaných SRSE při jejich automatickém načtení v programu. Při konstantním nastavení metody bylo možné studovat pouze změny plochy SRSE v čase. Pokud byly SRSE velmi malé velikosti (do 10 mm<sup>2</sup>) bylo potřeba každé digitalizované SRSE v programu ručně označit, protože automatické načtení výrazně zvýšilo chybu stanovení (více než 15%). Celý postup zjišťování ploch jednotlivých SRSE je shrnut na Obr. 4. Při výpočtu přírůstku SRSE jsme vycházeli z původní velikosti. Výsledný přírůstek představuje procento, o kolik se daný SRSE po dobu kultivace zvětšil. Pro výpočet byla využita následující rovnice:

$$P_p = ((I_n / I_o) - 1) \cdot 100 [\%], \text{ kde}$$

$P_p$  = přírůstek SRSE vyjádřený v procentech,  
 $I_n$  = plocha SRSE po  $n$  dnech kultivace [mm<sup>2</sup>],  
 $I_o$  = plocha SRSE na začátku kultivace [mm<sup>2</sup>].

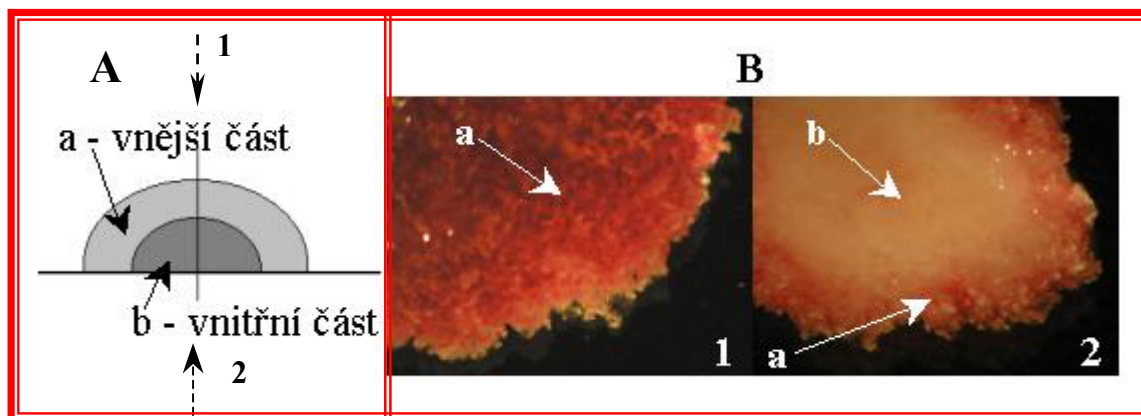


Obr. 4: Schéma analýzy obrazu SRSE; Petriho miska se shluky raných somatických embryí (a), digitalizace obrazu Petriho misky pomocí CCD-kamery (b) a programu Grab-IT (c), zjištění plochy shluků pomocí programu Image-Pro (d), zjištěné výsledky jsou dále zpracovány v programu MS Excel (e).

## Struktura SRSE

### Studium redoxní aktivity SRSE

Pro studium vnitřní struktury SRSE bylo nutné nechat shluky kultivovat po delší dobu. Při delší kultivaci tvoří shluky odlišné oblasti na povrchu a uvnitř shluku (Obr. 5A). Tyto oblasti byly rozlišeny na základě testu životnosti, kdy byl osmitýdenní SRSE obarven 2,3,5-triphenyl-tetrazolium-chloridem (TTC). Vnější část shluku se po aplikaci TTC obarvila červeně, vnitřní část zůstala bezbarvá (oxidačně-redukční reakce při dýchání) (Obr. 5B).



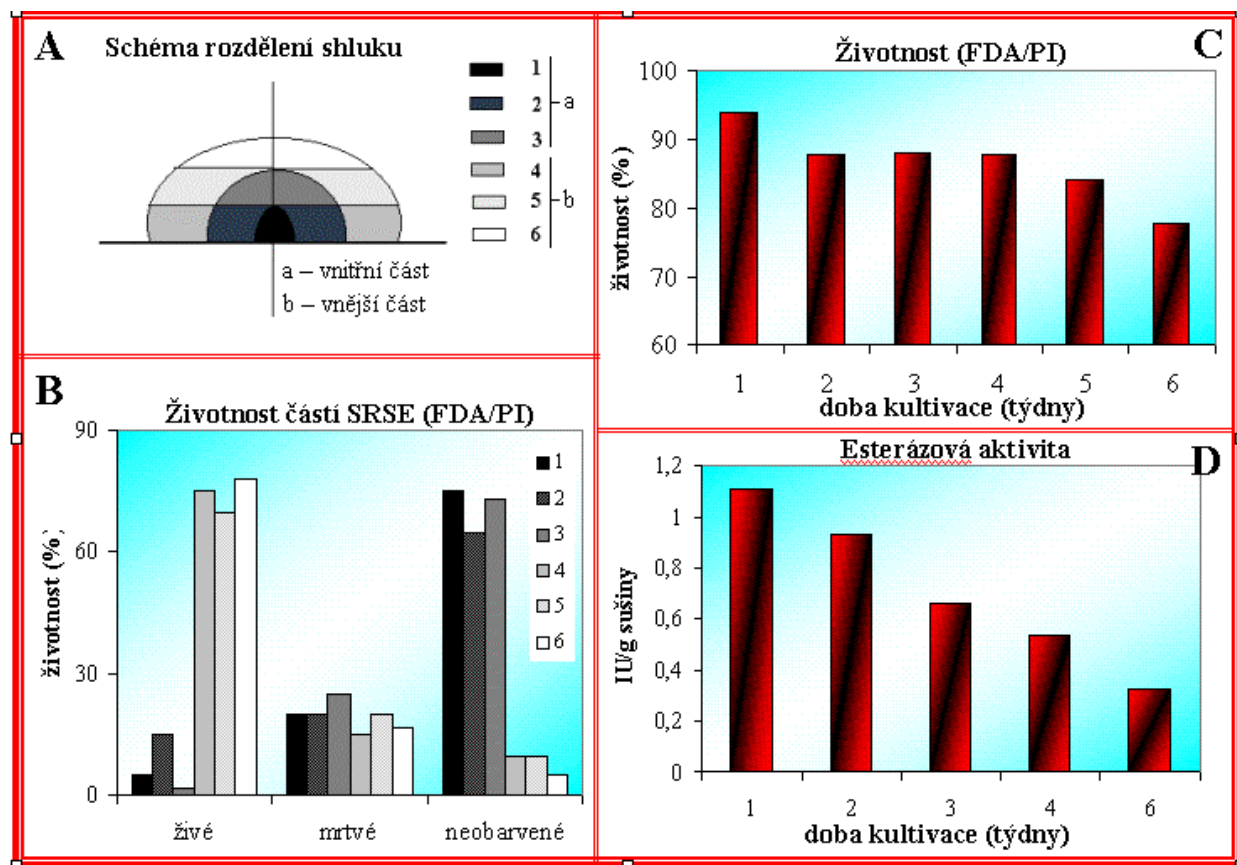
Obr. 5: (A) Znáznornění struktury SRSE.

(B) Stanovení životnosti 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridem (TTC); 8 týdnů kultivace; pohled z vrchní části (1) pohled zespodu (2); vnější část SRSE (a), vnitřní část SRSE (b).

### Určení životnosti dvojítm barvení FDA/PI a stanovením esterázové aktivity

Pro získání více informací o životnosti RSE z jednotlivých částí shluku byly shluky kultivovány po dobu šesti týdnů, s pasážemi po dvou týdnech, a byly poté rozděleny na šest částí (Obr. 6A). U RSE z jednotlivých částí byla stanovena životnost pomocí fluorescenčních barviv - fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI). RSE z vnitřních částí shluku se velmi špatně barvila, velká část z nich zůstala neobarvená, což bylo pravděpodobně způsobeno produkcí látek zabraňujících vstupu fluorescenčních barviv dovnitř buňky. Ze získaných snímků bylo možné pomocí metody analýzy obrazu (za využití programu Image-Pro Plus, verze 1.3, Sony) získat přibližné procentuální zastoupení zeleně a červeně zbarvených ploch, vyjadřujících živá a mrtvá embrya (Obr. 6B). RSE z vnějších částí shluku měly životnost téměř stejnou jako je obvyklé u shluků starých 14 dní. Díky pasážím, které

byly prováděny každých 14 dní, byla tedy životnost vnějších částí šestitýdenních shluku podobná jako u shluků starých dva týdny. Změny životnosti RSE odebraných z vnějších částí shluku stanovené metodou „dvojitého barvení“ (FDA/PI) a esterázovou aktivitou v závislosti na délce kultivace znázorňují Obr. 6C a Obr. 6D.



Obr. 6: (A) Schéma rozdělení SRSE; 6 týdnů kultivace.

(B) Stanovení životnosti RSE pomocí IA; RSE (~1 mg) pocházela ze shluku rozděleného na šest částí; z digitálního obrazu z fluorescenčního mikroskopu Olympus AX 70 (zvětšení 10 x 10) bylo pomocí IA získáno zastoupení zelených ploch (živých embryí), ty byly programem Microsoft Excel přepočítány na procenta vyjadřující životnost RSE.

(C) Stanovení životnosti RSE v závislosti na délce kultivace; 6 týdnů kultivace.

(D) Esterázová aktivita RSE v závislosti na délce kultivace; 6 týdnů kultivace.

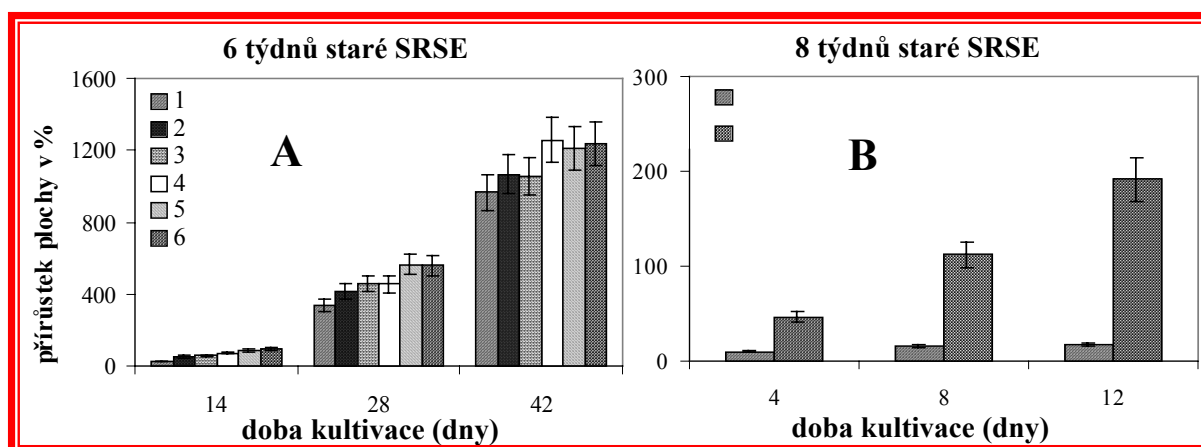
### Schopnost růstu ESE odebraných z různých částí SRSE

Abychom zjistili životaschopnost RSE, byla embrya odebrána z jednotlivých částí šestitýdenního shluku (6 částí, stejně jako u testu životnosti) přemístěna na čerstvé kultivační médium a byla kultivována po dobu šesti týdnů, s pasážemi po dvou týdnech. Cílem experimentu bylo sledování přírůstků plochy shluků (pomocí metody analýzy obrazu) z jednotlivých částí šestitýdenního shluku. Největší rozdíly mezi jednotlivými částmi byly zaznamenány v prvních 14 dnech kultivace. Vnější části měly přírůstek o 59,4 % větší, než

byl přírůstek vnitřních částí. Při dalších pasážích se rozdíly mezi vnějšími a vnitřními částmi zmenšují. Po čtyřech týdnech kultivace byl rozdíl obou částí 31,2 %, po šesti týdnech kultivace již jen 6,5 %. Největší rozdíly byly mezi částí ve středu shluku a částmi povrchovými, kde rozdíl v přírůstku byl po prvních dvou týdnech až 254,8 %, po čtyřech týdnech 36,6 % a po šesti týdnech už jen 30,1 % (Obr. 7A). Z naměřených údajů vyplývá, že čím blíže se pasážovaná embrya nachází uvnitř shluku (centripetálně ke středu shluku), tím pomaleji po pasáži přirůstají a tím delší dobu trvá, než se jejich rychlost růstu dostane na obvyklou úroveň. Z výsledku lze konstatovat, že embrya ze všech částí šestitýdenního jsou schopna pokračovat v dalším vývoji, přestože se všechny živé buňky embryí ze spodních částí shluku při zjišťování životnosti pomocí testu „dvojitého barvení“ neobarvily fluorescenčními barvivy. Byla ovšem potvrzena teorie, že jsou RSE ve shluku organizovaná, přinejmenším se tvoří rozdíly mezi vnitřní a vnější částí SRSE.

### ***Vliv stáří na SRSE růst***

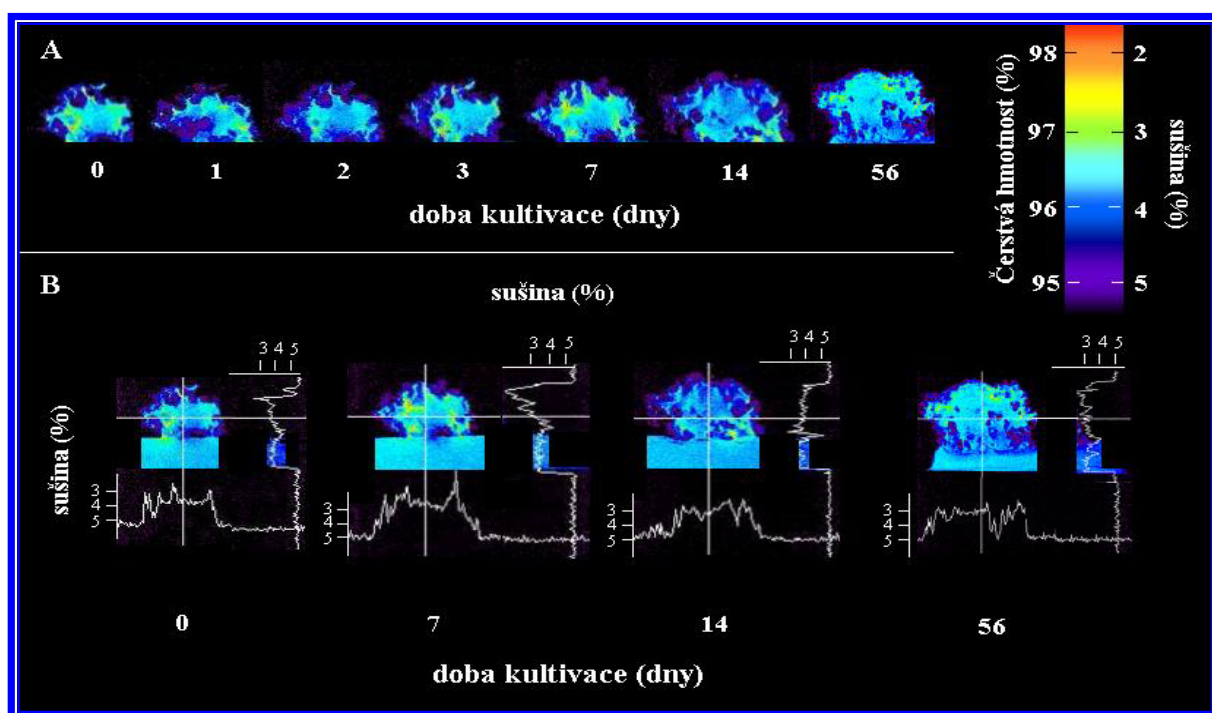
Snažili jsme se zjistit, jak staré musí být shluky, aby již nedošlo k obnovení růstu. Při studiu oxidačně-redukční reakce při dýchání pomocí TTC bylo zjištěno, že se vnitřní část osmitýdenního shluku neobarvila, tzn. že buňky embryí z vnitřní části shluku byly již mrtvé. Byl tedy proveden podobný pokus jako u šestitýdenního shluku, kdy byl shluk vypreparován na šest částí. Byl sledován rozdíl v přírůstcích plochy částí ve středu shluku a částmi povrchovými. Intervaly zvolené pro tento pokus byly 4, 8 a 12 dní (Obr. 7B). Po 12 dnech byl přírůstek plochy vnější části 86 %, což opět odpovídá přírůstku plochy u dvoutýdenních shluků. Naproti tomu byl přírůstek plochy vnitřní části po 12 dnech pouze 7,7 %. Byl tedy potvrzen výsledek životnosti s TTC, většina buněk embryí z vnitřní části původního osmitýdenního shluku byla mrtvá a nebyla tedy schopna dalšího růstu.



Obr. 7: (A) Růst RSE z jednotlivých částí shluku starého 6 týdnů; hodnoty vyjadřují průměr ze 4 SRSE; chybová úsečka vyznačuje střední chybu. (B) Růst RSE z jednotlivých částí shluku starého 8 týdnů; hodnoty vyjadřují průměr ze 15 SRSE; chybová úsečka vyznačuje střední chybu.

## ***Studium SRSE pomocí nukleární magnetické rezonance***

Po zjištění odlišností ve struktuře shluku byla nastolena otázka, jestli vnitřní struktura shluku nesouvisí s transportem látek z kultivačního média do shluku. Pro zjištění transportu látek bylo využito koncentrace jader  $^1\text{H}$ , která byla sledována za pomoci metody NMR (nuclear magnetic resonance). Zároveň byla u shluků zjištěna hmotnost sušiny. Na základě známého množství sušiny v kultivačním médiu, byla stanovena barevná stupnice, která nám ukazuje množství sušiny, a tím tedy i množství vody, v každé části shluku. Množství vody v jednotlivých částech jsou ukázána graficky (Obr. 8). Pro zobrazení byla použita klasická spin echo technika s echo časem  $TE = 13.5$  ms, opakovací periodou  $TR = 3.8$  s a MR signál byl 2x akumulován.



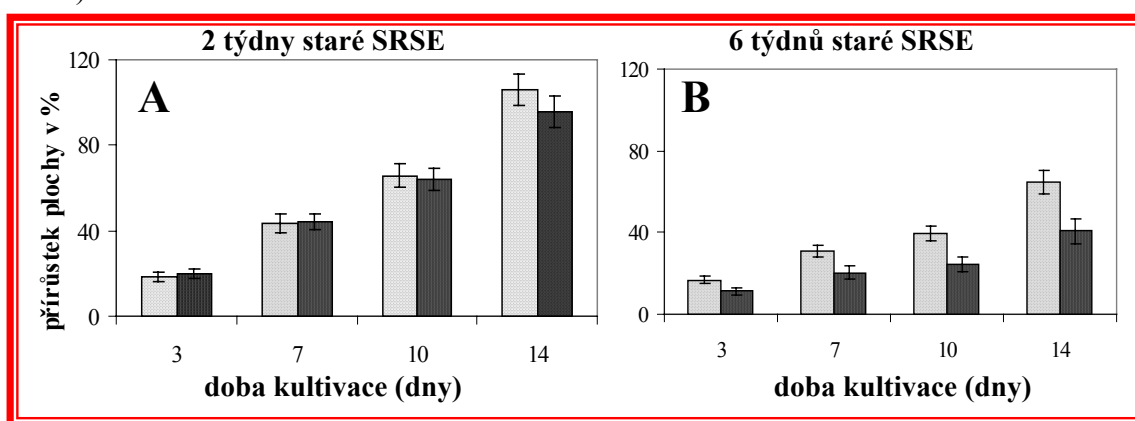
Obr. 8: (A) Množství vody ve SRSE zjištěné pomocí NMR; koncentrace jader  $^1\text{H}$  koresponduje s množstvím vody ve SRSE. (B) Množství sušiny ve SRSE; hodnoty přepočteny porovnáním barevné stupnice z obsahu sušiny obsažené v kultivačním médiu; doba kultivace 56 dní.

Z naměřených údajů lze vysledovat, že ve vnější části shluku je koncentrace jader  $^1\text{H}$  větší, než ve vnitřní části. Jak bylo dále zjištěno, rozdíl koncentrací jader  $^1\text{H}$  ve vnější a vnitřní části se s dobou kultivace spíše zvětšuje. V prvních čtyřech týdnech se jeví shluk RSE jako jednolitý útvar, s další dobou kultivace se rozdíly v koncentracích jader  $^1\text{H}$  uvnitř shluku zvyrazňují, a tak nelze již hovořit o jednolitém útvaru. Spolu s množstvím koncentrace jader  $^1\text{H}$  se mění i vizuální vzhled embryí uvnitř a na povrchu shluku; zatímco na povrchu jsou RSE zřetelně rozlišitelná a embryonální skupina je orientována centrifugálně, uvnitř

shluku se tvoří těžko definovatelná hmota složená z RSE a látek slizovitého charakteru, která pravděpodobně zabraňuje proniknutí fluorescenčních barviv do RSE, a tím znemožňuje zjistit životnost RSE za pomoci testu „dvojitého barvení“, jak již bylo uvedeno výše.

### ***Vliv prostorové orientace SRSE na jeho růst***

Pomocí NMR bylo zjištěno, že obsah vody ve shluku není ve všech jeho částech stejný, to by mohlo znamenat, že uvnitř shluku existují cesty pro transport živných látek z kultivačního média. Snažili jsme se zjistit, jaký vliv má orientace shluku na kultivačním médiu a jaký vliv bude mít změna prostorové orientace shluku na jeho růst. Předpokládali jsme, že změna orientace bude mít větší vliv u starších shluků, neboť již budou pevněji vytvořeny transportní cesty pro přesun živných látek. Pro experiment byly využity shluky staré dva a šest týdnů, polovina shluků byla na Petriho misku umístěna stejně jako byla kultivována před pokusem, druhá polovina byla otočena o 180°. Rozdíl v přírůstku byl zaznamenán již mezi dvou- a šestitýdenními shluky, které byly na kultivační médium umístěny stejně jako byly kultivovány před pokusem. Dvoutýdenní shluky měly přírůstek plochy průměrně o 41,1 % větší než shluky šestitýdenní. Tento rozdíl je způsoben různým vývojovým stádiem, ve kterém se různě staré shluky nacházejí. Shluky pasážované z vývojově starších embryí rostou pomaleji než shluky pasážované z dva týdny starých embryí. Cílem experimentu bylo hlavně sledovat rozdíl mezi různě orientovanými shluky. V případě dvoutýdenních shluků byl rozdíl mezi shluky umístěnými stejně a shluky otočenými vzhůru nohama po 14 dnech 10,3 % (Obr. 9A), u šestitýdenních shluků byl rozdíl 24,3 % (Obr. 9B).



Obr. 9: (A) Vliv prostorové orientace SRSE při pasážování; 2 týdny staré shluky, hodnoty vyjadřují průměr ze 15 SRSE; chybová úsečka vyznačuje střední chybu.

(B) Vliv prostorové orientace SRSE při pasážování; 6 týdnů staré shluky, hodnoty vyjadřují průměr ze 4 SRSE; chybová úsečka vyznačuje střední chybu.

Z výsledků vyplývá, že je nutné při pasážování dbát nejen na dodržení stejné velikosti SRSE, ale také na dodržení stejné prostorové orientace. U starších shluků je vliv orientace na růst větší. Z toho lze vyvozovat, že u starších shluků jsou již pevněji vytvořeny transportní cesty pro transport látek z kultivačního média a jejich porušení má za následek zpomalení růstu shluku a nutnost vytvoření nových transportních cest.

## **ZÁVĚR**

Cílem práce byla optimalizace práce s kulturami raných somatických embryí smrku ztepilého. Z výsledků vyplývá, že je nutné při pasážování dbát nejen na dodržení stejné velikosti SRSE, ale také na dodržení stejné prostorové orientace. U starších shluků je vliv orientace na růst větší. Z toho lze vyvozovat, že u starších shluků jsou již pevněji vytvořeny transportní cesty pro transport látek z kultivačního média a jejich porušení má za následek zpomalení růstu shluku a nutnost vytvoření nových transportních cest. Při zkoumání vlivu pasážování a délky kultivace na růst kultury jsme zjistili, že je kultura RSE smrku ztepilého schopna se v podmínkách *in vitro* organizovat do struktur, které ještě nebyly podrobněji popsány.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Príspevek vznikl za podpory FRVŠ 180/2004 a 164/2004, IGA MZLU 3/2004, IGA FaF VFU IG342012, GAČR č. 525/04/P132 a Národního výzkumného centra LN00A081.

## **SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- Adam V, Kizek R, Vacek J, Klejdus B, Trnkova L, Havel L, 2003: Analysis of cysteine, glutathione and phytochelatins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *CHEMagazín*, 16: 8-11.
- Arnold S., 1987: Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Journal of Plant Physiology*, 128: 233-234.
- Bartusek K., Puczok V., 1993: An NMR multifid method for measurement of magnetic-field gradient. *Measurement Science & Technology*, 4 (3): 357-361.
- Bornscheuer U.T., 2002: Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (1): 73-81.
- Durzan D.J., Jokinen K., Guerra M.P., Santerre A., Chalupa V., Havel L., 1994: Latent diploid parthenogenesis and parthenote cleavage in egg-equivalents of norway spruce. *International Journal of Plant Sciences*, 155: 677-688.

- Durzan D.J., 1996: Protein ubiquitination in diploid parthenogenesis and early embryos of Norway spruce. *International Journal of Plant Sciences*, 157 (1): 17-26.
- Gupta P.K., Durzan D.J., 1986: Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio-Technology*, 4 (7): 643-645.
- Gupta P.K., Dandekar A.M., Durzan D.J., 1988: Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in douglas-fir and loblolly-pine protoplasts. *Plant Science*, 58 (1): 85-92.
- Havel L., Durzan D.J., 1996: Apoptosis in plants. *Botanica Acta* 109 (4): 268-277.
- Havel L., Durzan D.J., 1996: Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway spruce. *International Journal of Plant Sciences*, 157 (1): 8-16.
- Havel L., Durzan D.J., 1999: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. In: Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (Editors), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, p. 125.
- Jokinen K.J., Durzan D.J., 1994: Properties of rescued embryonal suspensor mass of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) determined by the genotype and environment in vitro. *Silva. Fenn.*, 28: 95-106.
- Jones K.H., Senft J.A., 1985: An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33 (1): 77-79.
- Khatun S., Flowers T.J., 1995: The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany*, 46 (282): 151-154.
- Mlejnek P., Prochazka S., 2002: Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 215 (1): 158-166.
- Petřek J., 2003: Vliv iontů olova na raná somatická embrya smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.) a smrku pichlavého (*Picea pungens* Engelm.). Diplomová práce, MZLU s. 88.
- Petřek J., Vacek J., Víteček J., Vlášínová H., Kizek R., Havel L., 2004: Application of computer image analysis for study of lead (Pb-EDTA) effect on growth and viability of early somatic embryos of the Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). *Plat Cell Report*, in press.
- Petřek J., Vacek J., Kizek R., Víteček J., Havel L., 2004: The influence of heavy metals (Pb-EDTA, Cd-EDTA) on growth and viability of early somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(3):207.
- Petřek J., Vlášínová H., Kizek R., Vacek J., Víteček J., Havel L., 2003: Computer processing for image analysis of early somatic embryos growth of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). MendelNET, MZLU Brno.
- Songstad D.D., Duncan D.R., Widholm J.M., 1990: Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension-cultures. *Journal of Experimental Botany*, 41 (224): 289-294.

- Steward N., Martin R., Engasser J.M., Goergen J.L., 1999: Determination of growth and lysis kinetics in plant cell suspension cultures from the measurement of esterase release. *Biotechnology and bioengineering*, 66 (2): 114-121.
- Vacek J., Petřek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnková L., Jelen F., 2004: Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture. *Bioelectrochemistry*, 63:347-351.
- Víteček J., Adam V., Kizek R., Petřek J., Novotná P., Babula P., Havel L., 2004. *Chem. Listy* in press.
- Víteček J., Adam V., Petřek J., Vacek J., Kizek R., Havel L., 2004. *Plant Cell Organ and Tissue Culture* in press.
- Vlašínová H., Havel L., 1999: Continuous somatic embryogenesis in Japanese maple (*Acer palmatum* Thunb.). *Journal of Plant Physiology*, 154: 212-218.