

*Dziękuję Współpracownikom
z Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska UŚ
za życzliwe uwagi i merytoryczną dyskusję
na temat rozdziałów niniejszej pracy
oraz Pani mgr Ewie Teper
za pomoc techniczną w obrazowaniu próbek
w Laboratorium Mikroskopii Skaningowej w Instytucie Nauk o Ziemi UŚ*

Joanna Elsner

**Epiderma liścia
– metody analizy wzrostu
i kształtu komórek**

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
Katowice 2020

Recenzja
Marzena Popielarska-Konieczna

Spis treści

Streszczenia	7
Wstęp	11
Morfologia komórek właściwych epidermy liścia	12
Wybrane zagadnienia z cytologii komórek właściwych	17
Kolistość, falistość czyli jakie parametry opisują kształt komórki	24
Wzrost komórek roślinnych na przykładzie epidermy	35
Szybkość wzrostu i anizotropia wzrostu, czyli jakie parametry opisują wzrost	36
Wybrane metody analizy wzrostu komórek właściwych	38
Metoda replik	38
Przyżyciowe obrazowanie powierzchni	38
Rekonstrukcja trójwymiarowa powierzchni na podstawie obrazów skaningowych	40
Analiza wzrostu komórek	42
Mikroskop konfokalny	44
Przyżyciowe obserwacje komórek w mikroskopie konfokalnym	44
Wizualizacja komórek epidermy w programie MorphoGraphX	46
Analiza wzrostu komórek w programie MorphoGraphX	50
Metoda adhezyjnych znaczników – analiza wzrostu komórki na poziomie subkomórkowym	52
Literatura	57
Zastosowane skróty	63

Streszczenie

Fascynacja budową struktur biologicznych i chęć wyjaśnienia ich znaczenia towarzyszą człowiekowi od wieków, a z pewnością spotęgowane zostały ponad 350 lat temu z chwilą przeprowadzenia przez Roberta Hooka pierwszych obserwacji komórek roślinnych pod mikroskopem. Współcześni biolodzy, dzięki postępowi technologicznemu, mogą badać interesujące ich zjawiska i zależności korzystając z wielu różnych metod umożliwiających poznawanie budowy i funkcji określonych struktur. Metody te łączą w sobie osiągnięcia inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, fizyki (w tym optyki) z zaawansowanymi technologiami informatycznymi, pozwalając na przeprowadzenie dokładnej i szybkiej analizy oraz na wizualizację otrzymanych wyników w ciekawy i przystępny dla odbiorcy sposób. Komórka roślinna obserwowana dzisiaj pod mikroskopem może mieć cechy „zaprojektowane” przez badacza, na przykład powszechne dziś linie transgeniczne umożliwiają przyżyciową obserwację określonych struktur komórkowych bez konieczności żmudnego przygotowywania materiału (utrwalania i barwienia struktur komórkowych). Przechodząc od powiększeń makroskopowych, przez mikroskopowe do nanoskopowych, możemy obserwować komórki na różnych poziomach, a rozwój technologii informatycznych i stale wzrastająca moc obliczeniowa komputerów pozwalają na obrazowanie badanych struktur w trójwymiarze oraz na tworzenie złożonych modeli i symulacji komputerowych w oparciu o zebrane dane empiryczne.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wybranych współczesnych metod wizualizacji i analizy kształtu komórek roślinnych na przykładzie komórek epidermy, zaś praca kierowana jest do szerokiego grona studentów zainteresowanych biologią rozwoju roślin. Pierwsza część przybliży różnorodność kształtów komórek właściwych epidermy liścia – tkanki, która pełni nie tylko funkcje ochronne lecz również jest istotna dla morfogenezy całego liścia. W części tej opisano szereg metod umożliwiających obserwację i badanie struktury na poziomie komórkowym i subkomórkowym. W drugiej części przedstawiono, w jaki sposób można wykorzystać mikroskop fluorescencyjny, skanujący laserowy mikroskop konfokalny oraz skaningowy mikroskop elektronowy wraz z programami do obróbki danych cyfrowych, jako narzędzia do wizualizacji i ilościowej analizy kształtu oraz obliczania szybkości wzrostu komórek epidermy.

Leaf epidermis – methods of analyzing cell shape and cell growth

Summary

Fascination with the construction of biological structures and a desire to explain their function have been a goal of researchers for centuries. Certainly their inspiration increased when Robert Hook observed plant cells using a microscope 350 years ago. Nowadays, thanks to technological progress, biologists can study the phenomena and relationships of their interest using many different methods allowing them to learn about structures and functions of cells. These methods combine the achievements of genetic engineering, molecular biology, physics (including optics) with advanced computer science, allowing quick analysis and visualization of results in an interesting way. Currently the plant cell may have features “designed” by the researcher. For example, the commonly used transgenic lines allow *in vivo* observation of specific cell structures without the need for laborious material preparation (e.g. fixing and staining cell structures). Today researchers can also use different magnifications; from macroscopic, through microscopic to nanoscopic ones. Digital technology and constantly increasing computing power enable cell visualization in various dimensions as well as creating simulations and computer models.

The purpose of this monograph is to present selected contemporary methods of plant cells’ visualization and analysis using epidermis as an example. The book is directed to a wide range of students interested in developmental biology. The first part focuses on the diversity of shapes of pavement cells of epidermis – the tissue important for morphogenesis and organ protection. This section describes methods enabling observation and analysis of plant cellular structures. The second part presents how to use microscopic techniques such as fluorescence microscopy, laser scanning confocal microscopy and scanning electron microscopy together with computer programs for visualization and quantitative analysis of cell shape and for calculations of epidermal cell growth.

Епідерміс листка – методи аналізу росту та форми клітин

Анотація

Захоплення будовою біологічних структур та бажання пояснити їх значення супроводжували людину століттями і, безумовно, посилилися понад 350 років тому, коли Роберт Гук проводив перші спостереження за клітинами рослин під мікроскопом. Завдяки технічному прогресу, сучасні біологи можуть вивчати явища та взаємозв'язки, що їх цікавлять, використовуючи безліч різних методів, які дозволяють дізнатися про будову та функції конкретних структур. Ці методи

поєднують досягнення генної інженерії, молекулярної біології, фізики (включно оптику) з передовими інформаційними технологіями, що дозволяє проводити точний та швидкий аналіз та візуалізацію отриманих результатів цікавим та доступним для реципієнта способом. Рослинна клітина, яку спостерігають сьогодні під мікроскопом, може мати ознаки «спроектовані» дослідником. Наприклад, поширені сьогодні трансгенні лінії дозволяють спостерігати за конкретними клітинними структурами без необхідної клопіткої підготовки матеріалу (наприклад, фіксація та фарбування клітинних структур). Переходячи від макроскопічного до мікроскопічного, а потім і до наноскопічного збільшення, ми можемо спостерігати клітини на різних рівнях, а розвиток інформаційних технологій і постійно зростаюча обчислювальна потужність комп'ютерів дозволяють зображувати досліджувані структури в трьох вимірах, а також створювати складні моделі та комп'ютерне моделювання на основі зібраних емпіричних даних.

Метою даної роботи є представити обрані сучасні методи візуалізації та аналізу форми рослинних клітин на прикладі епідермальних клітин. Ця робота спрямована на широку групу студентів, яких цікавить біологія розвитку рослин. У першій частині роботи представлено різноманітні форми клітин, характерні для епідермісу листя – тканини, яка не тільки виконує захисні функції, але також важлива для морфогенезу цілого листа. Цей розділ описує ряд методів спостереження та вивчення структури на клітинному та субклітинному рівні. У другій частині роботи представлено, як флуоресцентний мікроскоп, конфокальний лазерний скануючий мікроскоп та скануючий електронний мікроскоп можуть бути використані разом із програмами цифрової обробки даних, як інструменти для візуалізації та кількісного аналізу форми та розрахунку швидкості росту клітин епідерми.

Переклад на українську мову
Вахненко Альона Олегівна

Wstęp

Epiderma liścia stanowi fizyczną barierę pomiędzy organizmem rośliny a środowiskiem, która przede wszystkim pozwala na ograniczenie utraty wody i stanowi zabezpieczenie przed wnikaniem patogenów do ciała rośliny. Funkcja asymilacyjna komórek epidermy jest często bardzo ograniczona. Epiderma liścia jest tkanką niejednorodną. Tworzą ją trzy zasadnicze typy komórek: komórki właściwe, włoski (trichomy) oraz szparki. Włoski, w postaci jedno lub wielokomórkowych tworów, chronią powierzchnię liścia, a także mogą pełnić funkcję wydzielniczą. Szparki, podobnie jak bardziej złożone w swojej budowie aparaty szparkowe, są wyspecjalizowanymi strukturami, zapewniającymi organom roślinnym sprawną wymianę gazową z otoczeniem. Zmodyfikowane szparki mogą również brać udział w sekrecji nektaru czy wody (proces gutacji). Komórki właściwe natomiast tworzą ciągłą warstwę ściśle do siebie przylegających komórek, które znajdują się pomiędzy szparkami i włoskami. Zewnętrzna (peryklinalna) ściana komórek właściwych jest często grubsza od pozostałych ścian i pokryta kutykulą (dotyczy to również roślin wodnych). Zwykle epiderma liścia jest pojedynczą warstwą komórek, ale w liściach niektórych gatunków roślin, na przykład gatunków rodzaju *Peperomia*, można wyróżnić kilka warstw. Istnieje bardzo duże zróżnicowanie kształtów i rozmiarów wszystkich trzech typów komórek epidermy w liściach różnych gatunków roślin, a nawet w obrębie jednego gatunku, czy wręcz jednego liścia. Komórki właściwe, występujące po obu stronach blaszki, mogą znacząco różnić się od siebie. Wyróżniającymi się innym kształtem są z reguły komórki znajdujące się na brzegu blaszki liściowej, spajające obie jego strony, oraz komórki właściwe, znajdujące się nad wiązkami przewodzącymi.

Zastosowane skróty

ACME	ang. <i>automated confocal micro-extensometer</i> ; zautomatyzowany mikro-ekstensometr konfokalny
AD, AB	strona liścia ad aksjalna; ab aksjalna
C	ang. <i>circularity</i> ; kolistość – deskryptor kształtu
CaMV 35S	ang. <i>cauliflower mosaic virus 35S enhancer</i> ; konstytutywny promotor wirusa mozaiki kalafiora
CDKA;1.N146	negatywny dominujący allel kinazy zależnej od cykliny A ulegający ekspresji w merystemie apikalnym pędu pod promotorem genu <i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
CLSM	ang. <i>confocal laser scanning microscopy</i> ; skanujący laserowy mikroskop konfokalny
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol – barwnik fluorescencyjny wzbudzany światłem ultrafioletowym
3D-Viewer	wtyczka programu ImageJ umożliwiająca projekcje trójwymiarowe obrazów z mikroskopu konfokalnego
FibrilTool	narzędzie programu ImageJ do ilościowego opisu orientacji elementów fibrylarnych
FM	Fei Mao, fluorochromy do znakowania błony komórkowej, np. FM 4-64
FV1000	system obrazowania mikroskopu konfokalnego
GFP	ang. <i>green fluorescent protein</i> ; białko zielonej fluorescencji
ImageJ Fiji	program komputerowy do analizy plików graficznych
LobFinder	program komputerowy do identyfikacji zafalowań ściany komórkowej
LTI6b	ang. <i>low temperature induced protein</i> ; białko indukowane niską temperaturą
MAPs	ang. <i>microtubule-associated proteins</i> ; białka towarzyszące mikrotubulom
Matlab	program komputerowy do tworzenia algorytmów
MBD	ang. <i>microtubule binding domain</i> ; domena wiążąca mikrotubule
MiToBo	ang. <i>microscope image analysis toolbox</i> ; wtyczka programu ImageJ umożliwiająca obliczenia w programie PaCeQuant

MorphoGraphX	program do analizy przestrzennej obrazu pochodzącego z mikroskopu konfokalnego
NaCl	chlerek sodu
PaCeQuant	program komputerowy do obliczeń parametrów kształtu komórek właściwych
PI	ang. <i>propidium iodide</i> ; jodek propidyny
RGR	ang. <i>relative growth rates</i> ; względna szybkość wzrostu
S, Cv	ang. <i>solidity, convexity</i> ; deskryptory kształtu
SEM	ang. <i>scanning electron microscopy</i> ; elektronowy mikroskop skaningowy
SIOX	narzędzie programu ImageJ służące do wyodrębnienia kształtu
stack	Z-stack; seria optycznych przekrojów z mikroskopu konfokalnego
Stack1, Stack2	zakładki w programie MorphoGraphX
SurfCut	narzędzie programu ImageJ umożliwiające analizę przestrzenną obrazu pochodzącego z mikroskopu konfokalnego
TIFF	ang. <i>tagged image file format</i> ; format plików graficznych
\vec{v}	wektorowe pole prędkości przesunięć punktów

Redakcja
Michał Noszczyk

Okładka i layout
Michał Noszczyk

Korekta
Marzena Marczyk

Łamanie
Edward Wilk

Redaktor inicjujący
Przemysław Pieniążek

Nota copyrightowa obowiązująca do 31.12.2021
Copyright © 2020 by Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego. Wszelkie prawa zastrzeżone

Sprzymyamy otwartej nauce. Od 1.01.2022, publikacja dostępna na licencji Creative Commons
Uznanie autorstwa-Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe (CC BY-SA 4.0)



Wersja elektroniczna zostanie opublikowana w formule wolnego dostępu
w Repozytorium Uniwersytetu Śląskiego www.rebus.us.edu.pl

<https://orcid.org/0000-0003-1600-9598>

Elsner, Joanna

Epiderma liścia : metody analizy wzrostu

i kształtu komórek / Joanna Elsner. - Katowice :

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, 2020

<https://doi.org/10.31261/PN.4002>

ISBN 978-83-226-3952-8

(wersja drukowana)

ISBN 978-83-226-3953-5

(wersja elektroniczna)

Wydawca

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego

ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice

www.wydawnictwo.us.edu.pl

e-mail:wydawnictwo@us.edu.pl

Druk i oprawa:

Volumina.pl Daniel Krzanowski

ul. Księcia Witolda 7-9

71-063 Szczecin

Wydanie I. Ark. druk. 8,25. Ark. wyd. 5,0.

Papier Munken Lynx 100 g. PN 4002. Cena 24,90 zł (w tym VAT)