

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Optimalizace přípravy
rostlinných meiotických
chromozomů pro účely
zobrazení pomocí
rastrovací elektronové
mikroskopie**

Diplomová práce

PETR JANÁS

Vedoucí práce: RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Ústav experimentální biologie
Obor molekulární biologie a genetika

Brno 2021



Bibliografický záznam

Autor: Petr Janás
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Optimalizace přípravy rostlinných meiotických chromozomů pro účely zobrazení pomocí rastrovací elektronové mikroskopie

Studijní program: Molekulární biologie a genetika

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Rok: 2021

Počet stran: 92

Klíčová slova: rastrovací elektronová mikroskopie, Arabidopsis thaliana, optimalizace, meióza, chromozom

Bibliographic record

Author: Petr Janás
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Optimalization of plant meiotic chromosome preparation for scanning electron microscopy

Degree Programme: Molecular biology and genetics

Field of Study: Molecular biology and genetics

Supervisor: RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Year: 2021

Number of Pages: 92

Keywords: scanning electron microscopy, Arabidopsis thaliana, optimalization, meiosis, chromosome

Anotace

Skenovací elektronový mikroskop je vhodným nástrojem pro studium přesné topologie a ultrastruktury chromozomů. Tak aby bylo možné nahlížet na ultrastrukturu chromozomů, je nejprve potřeba vzorek vhodně připravit. Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci přípravy rostlinných meiotických chromozomů pro účely zobrazení pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Preparáty byly připraveny z mladých prašníků huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Příprava preparátů zahrnovala fixaci, kontrastování, dehydrataci, vysoušení a následné nanesení tenké vrstvy kovu pro lepší vodivost vzorku. V rámci diplomové práce byly použity, vzájemně porovnány a kriticky zhodnoceny různé metodické přístupy. Výsledkem je navržení robustního protokolu poskytujícího vysokou kvalitu výsledného zobrazení chromozomů.

Abstract

The scanning electron microscope is a suitable tool for studying the exact topology and ultrastructure of chromosomes. In order to look at the ultrastructure of chromosomes, it is necessary to prepare the sample appropriately. This diploma thesis is focused on optimizing the preparation of plant meiotic chromosomes for imaging purposes using scanning electron microscopy. The samples were made from young anthers of *Arabidopsis thaliana*. Preparation of the samples included fixation, contrasting, dehydration, drying and subsequent application of a thin layer of metal for better conductivity of the sample. Different methodical approaches were used, compared and critically evaluated. The most appropriate protocol offering the highest possible quality of the resulting chromosome spreads for scanning electron microscopy was selected.

ZADÁNÍ
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2019/2020

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Student:	Bc. Petr Janás
Program:	Molekulární biologie a genetika
Obor:	Molekulární biologie a genetika

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Optimalizace přípravy rostlinných meiotických chromozomů pro účely zobrazení pomocí rastrovací elektronové mikroskopie
Název práce anglicky:	Optimization of plant meiotic chromosome preparation for scanning electron microscopy

Oficiální zadání:

Předmětem práce je zoptimalizovat přípravu rostlinných meiotických chromozomů pro zobrazování s vysokým rozlišením v rastrovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Budou porovnány různé způsoby přípravy suspenzí obsahující rostlinné meiotické chromozomy s ohledem na reprodukovatelnost, kvalitu vstupního materiálu a efektivitu následné přípravy vzorku pro SEM. Dále budou porovnávány různé způsoby zobrazování v SEM za účelem nalezení podmínek, které poskytnou informaci o struktuře chromozomu s co možná nejvyšším rozlišením.

Jazyk závěrečné práce:	čeština
Vedoucí práce:	RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jiří Nováček, Ph.D.
Datum zadání práce:	1. 10. 2019
V Brně dne:	20. 10. 2019

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

.....
Bc. Petr Janás
student

.....
RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.
vedoucí práce

.....
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D.
zástupce ředitele Ústavu experimentální biologie pro pedagogické záležitosti

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 10. června 2021

.....
Petr Janás

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své vedoucí diplomové práce RNDr. Terezii Mandákové, Ph.D., Mgr. Jiřímu Nováčkovi, Ph.D. a také Mgr. Martinu Polákovi za cenné rady a pomoc při vypracování této práce.

Obsah

Úvod	12
1 Chromozomy.....	13
1.1 Struktura chromozomů	13
1.2 Ultrastruktura	14
1.3 Koheziny a kondenziny	15
2 Buněčný cyklus	18
2.1 Meióza	18
2.1.1 Profáze I.....	19
2.1.2 Metafáze I.....	19
2.1.3 Anafáze I.....	20
2.1.4 Telofáze I a cytokineze	20
2.1.5 Meióza II.....	20
3 Skenovací elektronová mikroskopie	22
3.1 Skenovací elektronový mikroskop	22
3.2 Detekce elektronů a vznik obrazu	23
3.2.1 Neelastický rozptyl	23
3.2.2 Elastický rozptyl	23
4 Cíle diplomové práce.....	25
5 Materiály a experimentální metody.....	26
5.1 Materiály.....	26
5.1.1 Chemikálie.....	26
5.1.2 Roztoky	26
5.1.3 Přístroje	26
5.2 Biologický materiál	27
5.3 Metody	27
5.3.1 Sběr a fixace materiálu.....	27
5.3.2 Enzymatické trávení.....	29
5.3.3 Spread chromozomů a lyze cytoplazmy	29
5.4 Příprava vzorků pro SEM	30
5.4.1 Fixace	30
5.4.2 Kontrastování	30
5.4.3 Dehydratace	31

5.4.4	Vysoušení - Critical point drying – CPD	32
5.4.5	Zvýšení povrchové vodivosti vzorku	32
5.5	Výchozí postup	32
5.6	Metody přípravy rostlinných chromozomů	34
5.6.1	Squash technika	34
5.6.2	Drop technika	34
5.6.3	Drop/cryo technika	35
6	Výsledky	36
6.1	Meiotický atlas	36
6.2	Příprava vzorků a optimalizace postupu	37
6.2.1	Postup podle R. Martin et al.	38
6.2.2	Základní postup	42
6.2.3	Překrytí krycím sklem	52
6.2.4	Prodloužení působení kyseliny octové	56
6.2.5	Inkubace s kyselinou octovou	59
6.2.6	Fixace před lyzí cytoplazmy	70
7	Diskuze	78
7.1	Postup podle R. Martin et al.	78
7.2	Základní postup	79
7.3	Překrytí krycím sklem	80
7.4	Prodloužení působení kyseliny octové	80
7.5	Inkubace s kyselinou octovou	80
7.6	Fixace před lyzí cytoplazmy	81
8	Závěr	83
9	Zdroje:	84

Úvod

V dnešní době se pro zobrazování rostlinných chromozomů nejčastěji využívá metod fluorescenční mikroskopie. Ta může poskytovat informace o počtu, tvaru a částečně o struktuře chromozomů. Při studiu přesné topologie a ultrastruktury chromozomů se využívá elektronové mikroskopie. Výhodou elektronové mikroskopie je vysoké rozlišení a vysoká hloubka ostrosti. Při přípravě rostlinných chromozomů pro účely zobrazování pomocí skenovací elektronové mikroskopie je nutno se vyvarovat náhlým změnám prostředí, také je nezbytné se vyhnout jakýmkoliv krokům, které by mohly vést k tomu, že se na povrchu vzorku vytvoří uměle vytvořená vrstva překrývající detaily. Detekovány jsou totiž zpětně odražené a sekundární elektrony, které poskytují informace o povrchu vzorku a vznikají nejvýše několik nanometrů pod povrchem vzorku. Optimalizace přípravy rostlinných chromozomů pro účely zobrazování pomocí skenovací elektronové mikroskopie je základním krokem pro vizualizaci jednotlivých stádií kondenzace chromatinu, zkoumání vyšších struktur chromatinu a procesů během meiózy a mitózy. Nutno podotknout, že některé kroky v přípravě se mohou lišit v závislosti na studované čeledi, či rodu rostlin. Ideálním přístupem je potom optimalizace postupu pro jednotlivé druhy rostlin.

R. Martin *et al.* v letech 1994 a 1995 představili postup izolace přípravy rostlinných chromozomů pro účely zobrazování pomocí skenovací elektronové mikroskopie, který se do dnes využívá. Tento postup je však náročný na množství vstupního materiálu a během přípravy může docházet k jeho ztrátám. V mé práci se zabývám optimalizací přípravy rostlinných meiotických chromozomů pro účely zobrazování s vysokým rozlišením ve skenovacím elektronovém mikroskopu, s ohledem na efektivitu přípravy vzorku, která přinese co možná nejvyšší rozlišení.

1 Chromozomy

Chromozomy byly poprvé pozorovány Karlem Wilhelmem von Nägeli v roce 1842. Strukturu rostlinných mitotických chromozomů popsal v roce 1888 Eduard Strasburger, jejich základní funkci v roce 1902 popsali Theodor Boveri a Walter Sutton. James Watson a Francis Crick v roce 1953 objasnily strukturu dvoušroubovice DNA. F. Thoma *et al.* v roce 1979 pozoroval elementární 10nm vlákno, Finch a Klug (1976) 30nm solenoidní strukturu a v roce 1991 G. Arents *et al.* popsali „korálkovitou strukturu“ DNA, tedy nukleozomy.

1.1 Struktura chromozomů

Průlomem ve zkoumání trojrozměrné struktury chromozomů bylo použití skenovací elektronové mikroskopie (SEM) s vysokým rozlišením (Allen *et al.*, 1986; Sumner a Ross, 1989).

Chromozomy jsou složeny přibližně z 1/3 DNA, 1/3 histonových proteinů, 1/3 proteinů nehistonové povahy a asi 10 % RNA (Ball, 2003). Nukleové kyseliny jsou složeny z nukleotidů. Nukleotidy DNA jsou složeny z fosfátové skupiny, 2-deoxyribózy a dusíkaté báze (adenin, guanin, thymin, cytozin). DNA je tvořena dvěma komplementárními řetězci, které jsou propojeny vodíkovými můstky mezi řetězci. Nukleotidy jsou spojeny v řetězec kovalentními vazbami mezi sacharidy a fosfáty, tvoří tak kostru dvoušroubovice DNA (Alberts a Kotyk, 2004; Snustad *et al.*, 2017).

Centromery představují tzv. primární konstrikci (zaškrcení) na molekule DNA. Centromery zajišťují rozchod zreplikovaných chromozomů do dceřiných buněk při dělení. Na centromere se formuje kinetochor, který je na centromerické sekvenci zcela závislý. Kinetochory vznikají během pozdní profáze a zajišťují vazbu na dělicí vřeténko (Alberts a Kotyk, 2004).

Telomery se nacházejí na obou koncích chromozomů, jedná se o repetitivní sekvence umožňující replikaci konců chromozomů, také brání deoxyribonukleázám, aby odbourávaly konce lineárních molekul DNA a zabraňují fúzi konců s jinými molekulami DNA (Snustad *et al.*, 2017).

1.2 Ultrastruktura

Proteiny tvořící chromozomy se dělí do dvou tříd: histony a proteiny nehistonové povahy. Je-li chromatin izolovaný z interfázních buněk zkoumán pomocí elektronové mikroskopie, jeví se jako řada za sebou uspořádaných elipsoidních „korálků“ neboli nukleozomů propojených navzájem spojovací DNA (Snustad *et al.*, 2017). Nukleozomy jsou tvořeny komplexem osmi histonů 2x (H2A, H2B, H3 a H4). Histony jsou malé kladně nabitě proteiny, kladný náboj umožňuje vazbu na záporně nabitou cukr-fosfátovou kostru DNA. Histony jsou evolučně konzervovány, např. histon H4 se u skotu a hrachu liší pouze ve dvou aminokyselinách. Histonový oktamer tvoří proteinové jádro nukleozomu, kolem kterého je DNA stočena. Omotání DNA kolem histonu zkrátí molekulu DNA přibližně na jednu třetinu její původní délky. Za kondenzaci nukleozomů do 30-ti nm vlákna je zodpovědný histon H1, který spojuje sousední nukleozomy (Alberts a Kotyk, 2004). Struktura vysoce kondenzovaných chromozomů je uspořádána kolem proteinů nehistonové povahy, proteinového lešení. Mezi proteiny nehistonové povahy patří koheziny a kondenziny. Společným rysem kondenzovaných chromozomů jsou 10 a 30nm vlákna (Hanks *et al.*, 1983; Maruyama, 1983; Nagai *et al.*, 1982; Utsumi, 1982, 1985; Wanner a Formanek, 2000). 10-ti nm neboli elementární vlákno představuje první úroveň sbalování DNA vlivem nukleozomů (Olins a Olins, 1974; Woodcock *et al.*, 1976). 30-ti nm vlákno představuje druhou úroveň sbalování DNA/kondenzace chromatinu. Jedná se o solenoidní uspořádání elementárního vlákna (Thoma *et al.*, 1979). Solenoidní vlákno je pozorovatelné zejména během mitózy a meiózy, kdy je uspořádáno do paralelních fibril nebo agregováno do chromomerů, kondenzovaných částí chromozomů. (Iwano *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1996; Reznik *et al.*, 1991; Wanner *et al.*, 1991; Wanner a Formanek, 2000; Zoller *et al.*, 2004b). Třetí úroveň sbalování chromozomů představuje sbalování 30nm vlákna pomocí proteinového lešení. Tato kondenzace zřejmě zahrnuje separaci úseků obřích molekul DNA na nezávislé superspiralizované smyčky. Mechanismus třetí úrovně sbalování dosud není znám (Snustad *et al.*, 2017).

Během meiózy I je uspořádání chromozomů, formování heterochromatinových uzlů, vyšší komplexita morfologie chromozomů a tvorba synaptonemálního komplexu rozdílná oproti mitóze (Cuvier a Hirano, 2003; Dawe *et al.*, 1994; Loidl, 2011). Naopak meióza II je považována za shodnou s mitózou, kvůli separaci chromatid a stejné organizaci a mechanismu kondenzace DNA (Zoller *et al.*, 2004a). Meióza I a II sdílí některé ultrastrukturální detaily s detaily v mitóze; organizace do vlákna o průměru 10 nm a 30 nm, to poukazuje na univerzálnost kondenzace chromozomů. Paralelně uspořádaná vlákna se vyskytují ve dvou formách. 30 nm

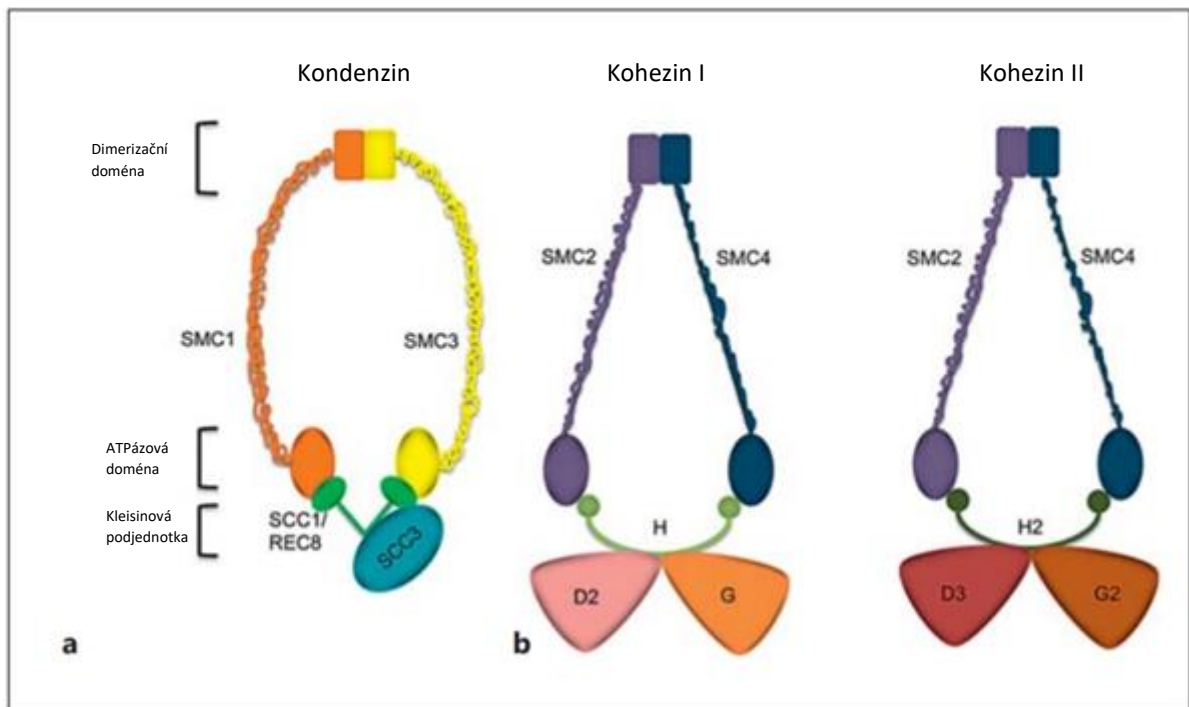
solenoidní vlákna barvitelné platinovou modří a 15–30 nm vlákna, která platinovou modří nejsou barvitelná a pravděpodobně se zapojují do dynamiky kondenzace chromozomů (Wanner a Formanek, 2000; Zoller *et al.*, 2004b). Nicméně existuje rozdíl v ultrastruktuře meiotických a mitotických chromozomů. Paralelní vlákna a chromomery jsou u meiotických chromozomů pozorovány s nižší frekvencí než u mitotických chromozomů, což může být vysvětleno tím, že chromatin během meiózy je kondenzován asi 2x více než během mitózy a tím jsou tyto struktury zakryty (Zoller *et al.*, 2004a).

1.3 Koheziny a kondenziny

Komplexy kohezinů tvoří prstencové struktury. Jsou složeny ze dvou SMC proteinů SMC1 a SMC3 a podjednotek Scc3 a Scc1/Rec8 (Klein *et al.*, 1999). Kondenziny jsou proteinové komplexy, které se podílí na kondenzaci chromozomů do samostatných jednotek. Kondenzinové komplexy se skládají z pěti podjednotek. Dvou SMC proteinů a tří CAP proteinů. U kondenzinu I a II SMC2 a SMC4 dimerizují a tvoří strukturu ve tvaru písmene V. Na druhém konci je tato struktura uzavřena proteiny kleiziny CAP-H nebo CAP-H2 a tvoří tak kruhovou strukturu obklopující chromatin (Nasmyth a Haering, 2005). Kleiziny tvoří lešení pro CAP-G a CAP-D2 v kondenzinu I a CAP-G2 a CAP-D3 v kondenzinu II (Obr. 1) (Hudson *et al.*, 2009; Nasmyth and Haering, 2005). SMC proteiny jsou ATPázy schopné měnit topologii DNA hydrolýzou ATP (Losada a Hirano, 2005).

Koheziny jsou nezbytné pro spojení sesterských chromatid až do prvního meiotického dělení, čímž je zajištěno, že během anafáze I dojde k separaci homologních chromozomů, ne sesterských chromatid. U kukuřice, rýže a *Arabidopsis* jsou potřebné pro správný průběh časně profáze, rekombinace, zarovnání bivalentů na metafázní desce a udržení správné struktury chromozomů. Komplexy kondenzinů hrají zásadní roli při kontrole sbalování chromatinu a organizaci jednotlivých chromozomů. U rostlin jsou informace o úloze kondenzinů v meióze omezené, ale je známo, že jsou vyžadovány pro úspěšné dokončení reprodukčního vývoje (Mainiero a Pawlowski, 2014). Na začátku meiózy se chromozomy kondenzují a individualizují až do vysoce kondenzovaných metafázních chromozomů. Struktura chromozomů je během časně meiotické profáze spojena s interakcemi mezi chromozomy (Yamada a Ohta, 2013). První fáze remodelace chromatinu nastává v leptotene, DNA kondenzuje do tenkých vláken a sesterské chromatidy jsou pevně drženy prostřednictvím kohezinů (Remeseiro a Losada, 2013).

Během této fáze je také zahájena rekombinační cesta, kdy protein SPO11 zavádí dvouřetězcové zlomy (DSB) do chromozomální DNA (Keeney, 2008). Na konce DNA sousedící s těmito zlomy jsou později navázány RAD51 a DMC1, které katalyzují invazi volných konců DNA do homologních chromozomů (San Filippo *et al.*, 2008). Na přelomu profáze a zygotene chromatinová vlákna expandují a jejich povrch se stává komplexnějším (Dawe *et al.*, 1994). Během párování homologních chromozomů se laterální elementy propojí prostřednictvím synaptonemálního komplexu (Fraune *et al.*, 2012). Během diplotene pokračuje zkracování chromozomů a synaptonemální komplex se rozpadá, jsou viditelná chiasmata. Modifikace histonů a epigenetické změny během meiózy ovlivňují průběh rekombinace a distribuci CO (Choi *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2013; She *et al.*, 2013). Synaptonemální komplex ovlivňuje rekombinaci i párování homologních chromozomů (Kerzendorfer *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2013; Schommer *et al.*, 2003; Stronghill *et al.*, 2010). Nicméně nejdůležitější jsou vyšší struktury sbalování chromozomů, které jsou zodpovědné za kondenzaci a reorganizaci chromozomů. Za vyšší struktury sbalování jsou zodpovědné koheziny a kondenziny. Koheziny jsou klíčové pro organizaci chromatinu a vytvoření struktury meiotického chromozomu, která je předpokladem pro párování rekombinaci a soudržnost sesterských chromatid během meiózy (Bai *et al.*, 1999; Bhatt *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2003; Golubovskaya *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2011).



Obr. 1 Struktura komplexů kohezinu a kondenzinu. Každý komplex obsahuje 2 proteiny SMC, které heterodimerizují, vytváří kruh spojením kleisinové podjednotky.
Zdroj: Mainiero a Pawlowski, 2014, upraveno

2 Buněčný cyklus

Jde o uspořádaný sled událostí, během kterého buňka zdvojí svůj obsah a pak se dělí na dvě buňky. Buněčný cyklus zahrnuje fázi G1, kdy dochází k růstu a zvýšení metabolismu buňky. Následuje fáze S, kdy dojde k syntéze DNA, duplikaci chromozomů a centrozomů. Centrozomy jsou organizátory svazku mikrotubulů, díky kterým vzniká dělicí vřeténko. Během G2 fáze se buňka připravuje na vstup do M fáze, kdy dochází ke kondenzaci chromozomů a samotnému dělení buňky – mitóza/meióza. Období během něhož se buňky nedělí a nelze rozeznat jednotlivé chromozomy, tedy G1 – S se nazývá interfáze (Alberts a Kotyk, 2004; Snustad *et al.*, 2017).

2.1 Meióza

Meióza neboli redukční dělení je proces, při němž je diploidní stádium buňky redukováno na haploidní. Jde o jednu replikaci DNA, po níž následují dvě buněčná dělení, takže z jedné diploidní buňky vznikají čtyři haploidní (Alberts a Kotyk, 2004). Tento proces je u eukaryotických organismů vysoce konzervován. Před spárováním jsou všechny chromozomy replikovány a vznikají dvě sesterské chromatidy. Úspěšné dokončení meiózy je závislé na párování homologních chromozomů, které po spárování tvoří bivalenty/tetrády a dochází ke crossing-overu. Přesné párování poté zajišťuje rovnoměrnou segregaci homologních chromozomů k opačným pólům buňky během prvního meiotického dělení. Chyby v meiotické segregaci vedou k aneuploidiím (Zhang a Han, 2017). Správná segregace chromozomů je dosažena mnoha komplexními změnami na úrovni DNA, chromozomální struktury a jaderné organizace: replikace DNA, párování homologních chromozomů, tvorba proteinového lešení a crossing-over (Scott L. Page a R. Scott Hawley, 2003).

Proces meiózy zahrnuje dvě po sobě následující buněčná dělení, I. a II. meiotické dělení (Obr. 2). Při I. meiotickém dělení se od sebe replikované chromozomy oddělují a rozcházejí se do dvou dceřiných buněk. Sesterské chromatidy zůstávají spojeny po celé dělení a chovají se jako celek, rozchází se až během II. meiotického dělení (Alberts a Kotyk, 2004). Během meiózy I je uspořádání chromozomů, formování heterochromatinových uzlů, vyšší komplexita morfologie chromozomů a tvorba synaptonemálního komplexu rozdílná oproti mitóze (Cuvier a Hirano, 2003; Dawe *et al.*, 1994; Loidl, 2011). Naopak meióza II je považována za shodnou

s mitózou, kvůli separaci chromatid, stejné organizaci a mechanismu kondenzace DNA (Zoller *et al.*, 2004a).

2.1.1 Profáze I

Během leptotene se duplikované chromozomy kondenzují. V elektronovém mikroskopu lze vidět, že každý chromozom se skládá ze dvou sesterských chromatid.

Během zygotene jsou homologické chromozomy navzájem těsně spojeny a tvoří se synaptonemální komplex. Synaptonemální komplex se skládá ze tří proteiny tvořených tyčinkovitých útvarů. Z každé strany je spojen laterálními elementy s jedním z chromozomů, uprostřed je útvar nazýván centrální element. Laterální jsou s centrálními elementy propojeny transversálními vlákny připomínající žebřík. K laterálním elementům z chromozomů vybíhá řada chromatinových smyček. Úloha synaptonemálního komplexu v procesu párování chromozomů dosud nebyla zcela objasněna.

Ve fázi pachytene se chromozomy dále kondenzují. Jsou pozorovatelné bivalenty/tetrády. Během této fáze dochází ke crossing – overu. Vznikají dvouřetězcové zlomy, které jsou opravovány cestou homologní rekombinace (Osman *et al.*, 2011). Během crossing – overu dochází k reorganizaci genetické informace každého chromozomu v gametě a napomáhá vzniku jedinců se zcela novým uspořádáním genů.

Během diplotene se spárované chromozomy oddělují, s výjimkou chiazmat míst, kde došlo během c.o. k překřížení.

V diakinezi dochází k další kondenzaci chromozomů, rozpadu jaderné membrány, mikrotubuly dělicího vřeténka se napojují na kinetochory a chromozomy se pohybují k ekvatoriální rovině (Alberts a Kotyk, 2004; Snustad *et al.*, 2017).

2.1.2 Metafáze I

Spárované chromozomy se nachází v ekvatoriální rovině a jsou orientovány k opačným pólům dělicího vřeténka. To zajistí, že se ke každému pólu buňky dostane právě jeden z párů homologických chromozomů (Snustad *et al.*, 2017).

2.1.3 Anafáze I

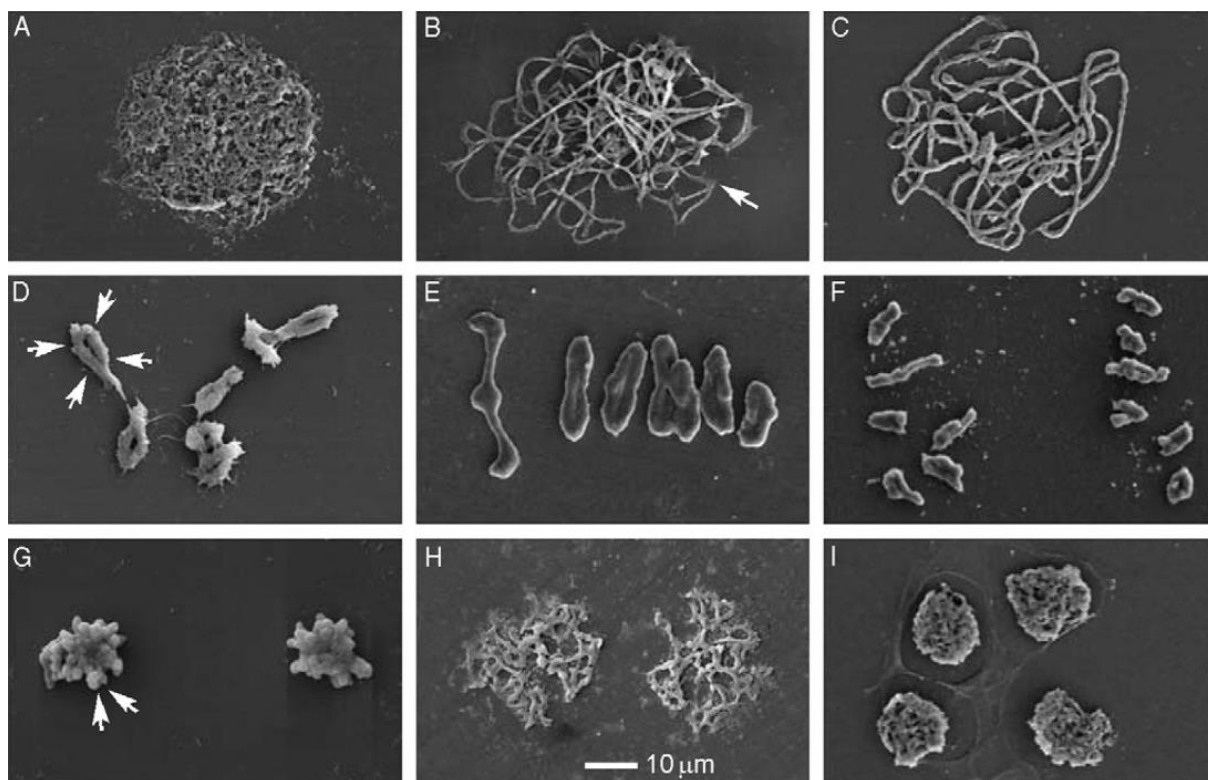
Dochází k oddělení chromozomů neboli chromozomové disjunkci a následuje pohyb chromozomů pomocí dělicího vřeténka a umístění v opačných pólech buňky (Snustad *et al.*, 2017).

2.1.4 Telofáze I a cytokineze

Dělicí vřeténko se rozpadá, je obnoven jaderný obal a dochází k dekonenzaci chromozomů. Dceřiné buňky jsou odděleny (Snustad *et al.*, 2017). U vyšších rostlin je proces cytokineze zcela odlišný od cytokineze živočišných buněk. Buňky jsou obklopeny buněčnou stěnou a uvnitř buňky vzniká nová buněčná stěna, která rozdělí dceřiné buňky. Růst nově vznikající buněčné stěny, kolem které se také tvoří plazmatická membrána, postupně odděluje buňky na dvě dceřiné. Vznik buněčné stěny je řízen fragmoplastem, který je formován ze zbytků polárních mikrotubulů v ekvatoriální rovině starého dělicího vřeténka (Alberts a Kotyk, 2004).

2.1.5 Meióza II

Během II. meiotického dělení nedochází k replikaci DNA ani významné interfázi (Alberts a Kotyk, 2004). Meióza II zahrnuje profázi, metafázi a telofázi II a je ukončena cytokinezí. Z mechanického hlediska meióza II připomíná mitózu s tím rozdílem, že takto vzniklé buňky jsou haploidní a nejsou geneticky identické (Snustad *et al.*, 2017).



Obr. 2 Fáze meiózy u žita (*Secale cereale*). A – leptotene, B – zygotene, C – pachytene, D – diakineze, E – metafáze I, F – anafáze I, G – telofáze I, H – profáze II, G – telofáze II.

Zdroj: Wanner a Schroeder-Reiter, 2008

3 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací neboli rastrovací elektronová mikroskopie umožňuje vizualizaci chromozomů jako strukturních celků. Vizualizace odlišných stádií kondenzace chromatinu s vysokým zvětšením umožňuje zkoumat vyšší struktury chromatinu a procesy během mitózy a meiózy (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008).

Elektronová mikroskopie umožňuje sledovat podjednotky chromozomů se 100krát vyšším rozlišením ve srovnání se světelnou mikroskopií (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008). Části chromozomů lze také studovat pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), nebo transmisní elektronové mikroskopie za kryo-podmínek (kryo-TEM), a to zejména za účelem strukturní charakterizace nukleozomů a strukturních elementů jako jsou solenoidy. Celková charakterizace chromozomů pomocí TEM je omezena jejich velikostí a vyžaduje přípravu tenkých řezů chromozomů s maximální tloušťkou okolo 300 nm (standartně pak 70 nm) (Ris a Witt, 1981).

3.1 Skenovací elektronový mikroskop

Skenovací elektronový mikroskop se skládá z elektronové trysky, jedné až tří kondenzorových čoček, rastrovacích cívek, objektivové čočky, detektoru elektronů deflektorů, které jsou umístěny ve vakuové komoře s pohyblivým stolem. Optická soustava mikroskopu vytváří zmenšený obraz zdroje, kterým je vzorek skenován. Pro rutinní zobrazování v SEM se používá elektronová tryska s katodou z wolframového vlákna, které je procházejícím proudem zahřáto na více než 2500 °C, čímž dochází k emisi elektronů. Mezi termoemisní zdroje taktéž patří katoda lanthanum hexaboridu (LaB6), její výhodou je delší životnost. Zdrojem elektronů s nejvyšším jasnem a koherencí elektronového svazku je pak autoemisní tryska (field emission gun – FEG) (Schatten, 2011; Schatten a Pawley, 2008; Vernon-Parry, 2000). Elektronová tryska vytváří proud elektronů, který je následně akcelerován na energie v rozsahu 1 až 30 keV. V komoře rastrovacího elektronového mikroskopu interagují takto urychlené elektrony se vzorkem. V důsledku této interakce mimo jiné dochází ke zpětnému odrazu elektronů nebo vzniku sekundárních elektronů, které tvoří hlavní zdroj signálu v rastrovací elektronové mikroskopii (Khursheed, 2010; Vernon-Parry, 2000).

3.2 Detekce elektronů a vznik obrazu

Obraz vzniká skenováním vzorku úzkým vysokoenergetickým paprskem elektronů. Interakce svazku elektronů s atomy na povrchu vzorku vytváří signály, které obsahují informace o topografii a charakteristických vlastnostech povrchu. Dopadající elektronový paprsek interagující se vzorkem produkuje emise sekundárních elektronů s nízkou energií (<50 eV), zpětně odražených elektronů (BSE), Augerových elektronů, fotonů a rentgenového záření (Obr. 3) (Schatten, 2012).

3.2.1 Neelastický rozptyl

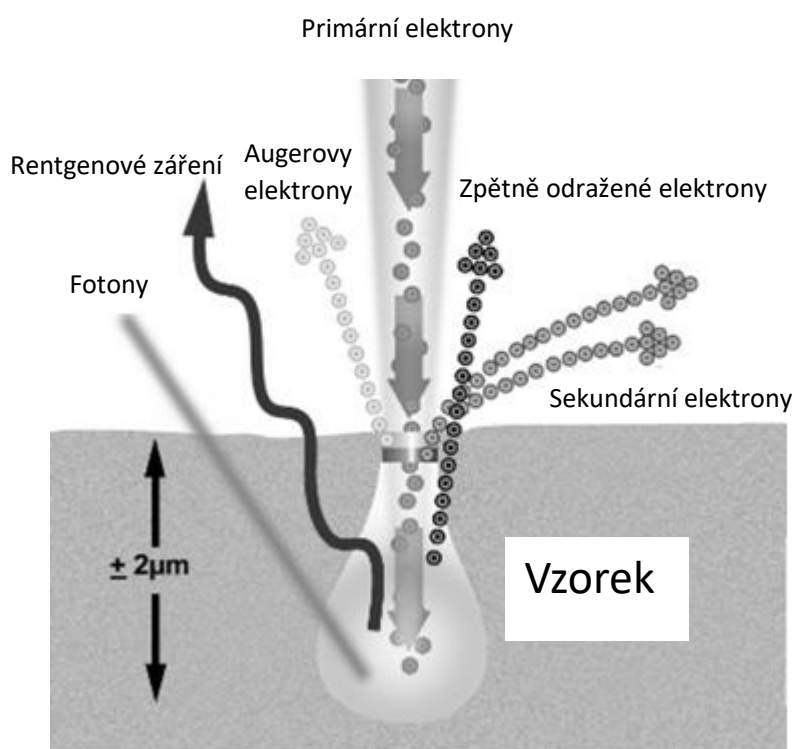
Zahrnuje procesy, které redukují energii paprsku elektronů. Tato energie je předána atomům vzorku. Dochází tak ke vzniku sekundárních elektronů (secondary electrons - SE), charakteristického rentgenového záření a Augerových elektronů. Sekundární elektrony jsou hlavním zdrojem signálu detekovaným v rastrovací elektronové mikroskopii. Kinetická energie SE je nízká, což ovlivňuje hloubku vzorku, ze které mohou uniknout. S uraženou vzdáleností se energie SE snižuje. Detekovatelné SE vznikají na povrchu vzorku, případně několik nanometrů pod povrchem vzorku a nesou primárně informaci o topografii vzorku. (Goldstein *et al.*, 2017).

3.2.2 Elastický rozptyl

Elastický rozptyl nastává, když je paprsek elektronů vychýlen. Během elastického rozptylu dochází i ke vzniku zpětně odražených elektronů (back-scattered electrons - BSE). Množství zpětně odražených elektronů závisí na atomovém čísle Z prvků, ze kterých se skládá zkoumaný vzorek a energii elektronů. Detekované BSE tak nesou informaci, jak o chemickém složení vzorku, tak i o jeho topografii (Goldstein *et al.*, 2017).

V SEM jsou pro zobrazení chromozomů nejčastěji detekovány zpětně odražené elektrony (BSE) a sekundární elektrony (SE), které poskytují informace o topografii a ultrastruktuře (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008). Pro detekci signálů SE se používá Everhart – Thornley detektor, pro detekci BSE scintilační nebo polovodičový detektor. Pro sledování

biologických struktur s vysokým rozlišením je optimální nízké napětí, pod 5 kV (Schatten, 2012).



Obr. 3 Schéma znázorňující emisi signálů po interakci primárních elektronů se vzorkem.

Zdroj: Schatten, 2012, upraveno

4 Cíle diplomové práce

- (1) Porovnání publikovaných metodických přístupů zaměřených na přípravu rostlinných chromozomů pro účely zobrazování s vysokým rozlišením v rastrovacím elektronovém mikroskopu.
- (2) Jejich zhodnocení a využití relevantních poznatků.
- (3) Optimalizace přípravy meiotických chromozomových preparátů pro účely zobrazování s vysokým rozlišením v rastrovacím elektronovém mikroskopu.
- (4) Prvotní vhled do struktury meiotických chromozomů v SEM a následné zhodnocení dosažených výsledků v průběhu optimalizace.

5 Materiály a experimentální metody

5.1 Materiály

5.1.1 Chemikálie

aceton

ethanol

citronan sodný

celuláza

pektolyáza

cytohelikáza

glutaraldehyd

kyselina octová

trihydrát kakodylátu sodného

uranyl acetát

platinová modř

5.1.2 Roztoky

Carnoyova fixáž (3:1 v/v ethanol:kyselina octová)

citrátový pufr (100 mM citronan sodný pH 7,4)

enzymatická směs (0.3% pektolyáza “Y-23” (Duchefa Biochemie, cat. no. P8004), 0.3% celuláza “Onozuka R-10” (SERVA, cat. no. 16419.03), 0.3% cytohelikáza (Sigma, cat. no. C8274) v citrátovém pufru)

kakodylátový pufr (75mM trihydrát kakodylátu sodného, pH 7,4)

fosfátový pufr (PBS) (pH 7,4)

fixační roztok (2,5% glutaraldehyd v kakodylátovém pufru/PBS)

uranyl acetát/platinová modř (2% roztok)

5.1.3 Přístroje

stereolupa

optický mikroskop (Carl Zeiss, Axio Lab.A1)

fluorescenční mikroskop (Carl Zeiss, Axio Imager Z2)
skenovací elektronový mikroskop (FEI, Versa 3D)
laboratorní třepačka
exikátor
inkubátor
sputter coater
CPD (Quorum Technologies, K850 Critical Point Dryer)
heat plate

5.2 Biologický materiál

Chromozomy byly izolovány z mladých květenství huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, čeleď *Brassicaceae*). Huseníček rolní má pět párů chromozomů ($2n = 10$) a genom o velikosti 135 Mb.



Obr. 4 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Zdroj: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Arabidopsis_thaliana.jpg

5.3 Metody

5.3.1 Sběr a fixace materiálu

Fixace je proces, při kterém jsou zastaveny všechny procesy a metabolické aktivity v buňce. Každá fáze buněčného cyklu je tedy díky fixaci zachycena v okamžiku, kde byla v

době fixace. Cílem fixace je zachovat buňku nebo její části v původním stavu, důležitá je schopnost rychlé penetrace a zachování buněčných struktur (Kashtwari *et al.*, 2017).

Nejpoužívanější fixáží je 70 – 100% ethanol, který nereaguje s makromolekulami, ale působí jako dehydratační činidlo. Odstraňuje z tkáně molekuly vody, čímž stabilizuje proteiny a tím je činí nerozpustnými. Nerozpustné proteiny poté agregují a tvoří sraženiny, podobně reaguje i s DNA (Fischer, 1899; Kashtwari *et al.*, 2017). Nevýhodou ethanolu je, že tkáň příliš smršťuje a vytvrzuje. Z tohoto důvodu je používán v kombinaci s fixativy, které tyto vlastnosti eliminují, např. s kyselinou octovou (Baker, 1933).

Kyselina octová sráží nukleové kyseliny, rozkládá histony, ale nefixuje proteiny (Pischinger, 1937). Navzdory těmto skutečnostem je ideálním fixačním činidlem pro chromozomy, nicméně způsobuje zvětšování buněčných struktur včetně chromozomů, proto se používá v kombinaci s fixativy, které naopak buněčné struktury smršťují, tedy např. s výše zmíněným ethanolem (Kashtwari *et al.*, 2017).

Carnoyova fixáž (3:1 ethanol:kyselina octová) je jednoduchý a účinný fixační prostředek pro preparáty zhotovované z jader a mitochondrií buněk. Carnoyova fixáž je jedna z nejstarších známých fixačních směsí, která byla poprvé použita J. A. Clarkem a S. Sollym v roce 1851 a její použití poprvé publikoval J. B. Carnoy v roce 1886. Jak je uvedeno výše, samotná kyselina octová nebo ethanol nejsou dobrými fixačními činidly, ale jakmile jsou smíchány ve vhodných poměrech, odstraní se jejich nevýhody. Ethanol způsobuje smršťování tkáně, fixuje cytoplazmu, ale ponechává nukleoproteiny nefixované; kyselina octová způsobuje zvětšování a změkčování buněčných struktur, nefixuje cytoplazmu, ale fixuje nukleoproteiny. Tato vzájemná kombinace dvou fixativ dává této směsi široké uplatnění jak u rostlinných, tak u živočišných vzorků (Kashtwari *et al.*, 2017). Carnoyova fixáž musí být vždy připravená čerstvá, Carnoyova fixáž není stabilní a může docházet k esterifikaci kyseliny octové (Bhat a Wani, 2017; Mandáková a Lysák, 2016).

Pro přípravu vzorků byla použita mladá květenství s většinou uzavřených pupat s bílými prašníky, která byla po odebrání z pěstovaných rostlin huseníčku rolního vložena do čerstvě připravené Carnoyovy fixáže I. Rostlinný materiál byl fixován při pokojové teplotě nebo při 4 °C (10-14 hodin). Fixáž byla několikrát vyměněna, dokud pupata nezbělala a fixativ zůstal čirý. Následně byl fixativ vyměněn za 70% ethanol a materiál byl skladován při teplotě -20 °C. Takto připravená květenství byla bílá, květy s vyvinutými pylovými zrny byly žluté (Obr. 5). (Mandáková a Lysák, 2016).



Obr. 5 Fixovaná květenství huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)

Zdroj: (Mandáková a Lysák, 2016).

5.3.2 Enzymatické trávení

Enzymatické trávení bylo provedeno působením pektolytických enzymů (0,3% pektolýáza, 0,3% celulóza, 0,3% cytohelikáza v citrátovém pufru). Pektolýáza katalyzuje štěpení pektinu. Celulóza katalyzuje štěpení celulózy a licheninu. Cytohelikáza také podporuje rozklad buněčné stěny a interaguje s chromatinem, čímž zlepšuje adhezi synaptonemálních komplexů k hydrofobním plastům. Účinkem této směsi je tedy rozložení buněčných stěn. (Baldwin a Pressey, 1989; Elbouami, 2001; Wood a Bhat, 1988).

5.3.3 Spread chromozomů a lyze cytoplazmy

Pomocí preparačních jehel byla jednotlivá květenství rozsuspendována na podložním skle, následně byly pomocí pinzety odstraněny nerozsuspendované zbytky květenství. Poté byla na preparát nakápnuta kyselina octová a došlo k lyzi cytoplazmy buněk. Po lyzi byly preparáty fixovány v Carnoyově fixáži. Alternativou pro tvorbu suspenze může být rozrušování buněčných stěn již během působení pektolytických enzymů viz. 5.6.2.

5.4 Příprava vzorků pro SEM

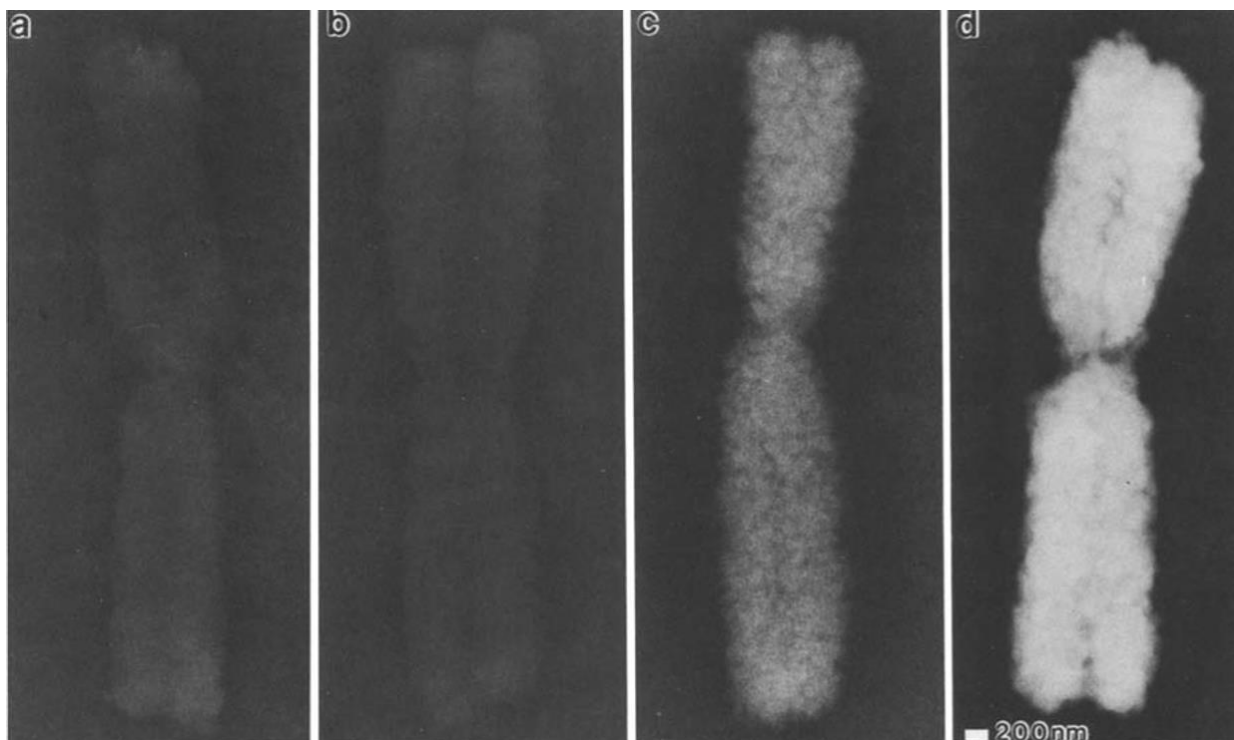
Kritické kroky pro přípravu vzorků pro SEM jsou fixace, dehydratace a zvýšení vodivosti vzorku. Adekvátní příprava vzorku je kriticky důležitá pro udržení strukturální integrity a získání spolehlivých informací o buněčných složkách a molekulárním složení. Špatná a neadekvátní příprava vzorků nepochybně způsobuje artefakty a může vést k nesprávným výsledkům a interpretaci informací (Schatten, 2012).

5.4.1 Fixace

Nejčastěji se biologické vzorky fixují aldehydy, jako je 2% paraformaldehyd, 2% glutaraldehyd v 0,1 M fosfátovém pufru (PBS) (Schatten, 2011). Aldehydy „zesítují“ volné aminoskupiny polypeptidů a amino-lipidů, a také „zesítují“ histony, tvoří s nimi kovalentní vazby, čímž fixují strukturu chromatinu v dané fázi kondenzace. Nejrychleji jsou fixovány histony bohaté na lysin (Johnson, 1985; Chalkley a Hunter, 1975).

5.4.2 Kontrastování

Uranyl acetát byl jedním z prvních kontrastních činidel, která byla použita k barvení vzorků pro elektronovou mikroskopii (Watson, 1958). Platinová modř selektivně reaguje s nukleovými kyselinami, zejména s DNA (Köpf-Maier and Köpf, 1986; Aggarwal *et al.*, 1975). Ke kontrastování se využívá i osmium tetroxid. Chromozomy ve všech fázích kondenzace obarvené platinovou modří jsou při detekci BSE v SEM kontrastní s pozadím, tedy jasně viditelné i při malém zvětšení (Obr. 6) (Wanner a Formanek, 1995).



Obr.6 Srovnání kontrastních činidel. A – bez kontrastování B – osmium tetroxid C – uranyl acetát D – platinová modř

Zdroj: Wanner a Formanek, 1995

5.4.3 Dehydratace

Dehydratace je nezbytná pro přípravu vzorků a prohlížení ve vakuu. Vzorky se obvykle dehydratují pomocí ethanolu či acetonu. Dehydratační řadou nebo 100% ethanolem / acetonem. Je nezbytné, aby během dehydratace došlo k odstranění veškeré vody. Zbytky vody ve vzorku mohou vyvolat tvorbu artefaktů (Ris, 1985). Dehydratace může být škodlivá pro biologické struktury, protože struktura makromolekuly je stabilizována vodíkovými vazbami s molekulami vody. Narušení těchto interakcí nahrazením vody za jiný solvent může vést ke smrštění nebo potrhání vzorku (Schatten, 2012). Během přípravy nesmí dojít k vyschnutí vzorku. Například při vyschnutí vzorku po fixaci Carnoyovou fixází se na povrchu vzorku vytvoří tenká vrstva. Která zcela zakryje všechny ultrastrukturální detaily chromozomů (Sumner, 1991). Tato vrstva je pravděpodobně způsobena esterifikací ethanolu a kyseliny octové (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008).

5.4.4 Vysoušení - Critical point drying – CPD

Kritický stav nastává při dané teplotě a tlaku v kritickém bodě, v tomto stavu není rozlišitelný rozdíl mezi kapalným a plynným skupenstvím látky. Povrchové napětí je zredukováno na nulové hodnoty, toho může být využito při vysoušení biologických vzorků. V biologických vzorcích je nejčastější výskyt vody, kritický bod vody je ale nevhodný, protože nastává při vysokém tlaku a teplotě. Nejčastěji se pro CPD používá oxid uhličitý, u něhož kritický bod nastává při 31 °C a 7.3773 MPa. CO₂ však není mísitelný s vodou, proto se používá přechodné médium (předchází krok dehydratace), obvykle aceton nebo ethanol (“K850 Critical Point Dryer | Quorum Technologies,”).

5.4.5 Zvýšení povrchové vodivosti vzorku

Pokovení je při přípravě biologických vzorků zásadní, protože většina biologických struktur má izolační vlastnosti. Pokovení vzorku snižuje efekt nabíjení (Hermann a Muller, 1991). Pro nanesení tenké kovové vrstvy se používají těžké kovy nebo těžké kovové sloučeniny - zlato, zlato / palladium, platina, wolfram, grafit a další (Walther, 2008). Pokovení se provádí odpařováním ve vysokém vakuu nebo naprašováním při nízkém vakuu (sputter coating). Vodivost vzorku může být také zvýšena barvicí metodou OTO (osmium, thiokarbohydrazid, osmium) (Malick *et al.*, 1975; Seligman *et al.*, 1966). Coating taktéž zvyšuje kontrast sledovaných struktur (Schatten, 2011).

5.5 Výchozí postup

Příprava skel: Skla byla nejprve očištěna pomocí destilované vody a následně ethanolu. Na skla byla poté naprášena 10 nm vrstva uhlíku, pro zvýšení vodivosti vzorku a adhezivity na povrch.

Enzymatické trávení: Fixovaná květenství byla umístěna na Petriho misku do přiměřeného množství destilované vody, následně byl pod stereolupou odstraněn přebytečný materiál (poupata se žlutými prašníky obsahující pyl). Poté byla vybraná květenství umístěna do trávící komůrky, dvakrát promyta v destilované vodě a dvakrát v citrátovém pufru na třepačce po dobu 5 minut. Citrát byl nahrazen směsí pektolytických enzymů, jejichž aktivita je nejvyšší při 37 °C, proto byla komůrka překryta sklíčkem zabraňující odparu enzymů vložena do inkubátoru

nastaveném na tuto teplotu po dobu 3 h nebo déle. Po uplynutí této doby byla směs enzymů nahrazena citrátovým pufrem (Mandáková a Lysák, 2016).

Spread chromozomů a lyze cytoplazmy: Prostřednictvím Pasteurovy pipety bylo natrávené květenství přeneseno na mikroskopické podložní sklíčko. Následně bylo květenství pod stereolupou pomocí preparační jehly rozrušeno za vzniku suspenze. Do suspenze bylo přidáno předem určené množství 60%/45% kyseliny octové. Sklíčko bylo umístěno na heat plate nastaveném na 50 °C a suspenze byla preparační jehlou krouživým pohybem jemně roztírána po předem stanovenou dobu. Kyselina octová rozpouští proteiny a cytoplazmatické složky. Příliš malý objem kyseliny octové a / nebo příliš krátká doba působení může mít za následek chromozomy a jádra obklopené cytoplazmou (Mandáková a Lysák, 2016). Poté bylo sklíčko umístěno do Petriho misky s Carnoyovou fixází I.

Fixace: Vzorky byly fixovány v 2,5% roztoku glutaraldehydu (15 min). Roztok glutaraldehydu byl ředěn v závislosti na použití kontrastního činidla. V případě použití uranyl acetátu byl roztok ředěn kakodylátovým pufrem, fosfátový pufr v tomto případě není možné použít, jelikož v přítomnosti fosfátových iontů je uranyl acetát precipitován, a je tak zamezena jeho vazba na DNA (Kuo, 2014). Při kontrastování platinovou modří byl roztok glutaraldehydu ředěn PBS pufrem.

Odmývací krok č. 1: Přenos vzorků do kakodylátového pufru/PBS (10 min).

Odmývací krok č. 2: Přenos vzorků do deionizované vody (10 min).

Kontrastování: V této práci byl ke kontrastování použit 2% vodný roztok uranyl acetátu nebo platinové modře. Kontrastování probíhalo 30 min v tmavém prostředí.

Odmývací krok č. 3: Přenos vzorků do deionizované vody (30 s).

Odmývací krok č. 4: Přenos vzorků do deionizované vody (10 min).

Dehydratace: Vzorky byly dehydratovány nejprve ve směsi ethanolu s acetonem v poměru 1:1 a následně třikrát v acetonu nebo před přenesením do směsi ethanolu s acetonem předcházela dehydratační řada (25, 50, 75, 100% ethanol). Vzorky byly dehydratovány po dobu 10 min v každém z roztoků.

Vysoušení/CPD: Pro provedení CPD bylo v této práci využito přístroje Quorum technologies K850. Bylo postupováno podle protokolu doporučeném výrobcem.

Coating: Vzorky byly pokoveny 2-3 nm platiny, zlata, či zlata/paladia.

5.6 Metody přípravy rostlinných chromozomů

V minulosti byly rostlinné preparáty pro sledování pod SEM zhotovovány mnoha technikami. Z coenocytických fází *Haemanthus katherinae* (Heneen 1981.), z izolovaných protoplastů nebo předem fixovaných chromozomů/jader (Chapman a Cooke, 1983; Hadlaczký *et al.*, 1983) nebo z hluboce zmražených a následně rozdrcených prašníků *Solanum tuberosum* a *Lilium* hybrid (Whelan *et al.* 1974). Nevýhodou těchto metod bylo zejména pozorování jednotlivě oddělených chromozomů a/nebo překrytí zbytky buněčných obalů. Pro spread chromozomů je kritická tekavost fixačního činidla (3:1) a adhezivita na povrch sklíčka během odpařování fixativu a sušení na vzduchu. Nicméně při sušení na vzduchu vzniká tenká umělejší vrstva (několik nanometrů), která kompletně překryje ultrastrukturální detaily chromozomů (Allen *et al.*, 1988; Sumner, 1991). Tato vrstva je pravděpodobně způsobena esterifikací ethanolu a kyseliny octové. Navíc sušení na vzduchu často vede ke zplošťování chromozomů, díky kapilárním silám, což brání studiu 3D struktury (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008).

5.6.1 Squash technika

Squash technikou se rozumí, kdy po působení pektolytických enzymů na rostlinné buňky, tedy po natrávení buněčné stěny, se materiál přenesení na sklíčko, kde se většinou pomocí preparační jehly rozsuspenduje. Tímto způsobem je vytvořena suspenze protoplastů přímo na sklíčku, se kterým se bude dále pokračovat v přípravě preparátu. G. Wanner *et al.* v letech 1990, 1991 po použití této techniky sledovali rostlinné chromozomy s vysokým rozlišením. Nicméně pozorování kompletních sestav chromozomů bylo opět relativně vzácné.

5.6.2 Drop technika

Zavedení nakapávací techniky P. F. Ambrosem *et al.* v roce 1986 bylo velkým pokrokem pro izolaci chromozomů. Rostlinný materiál je rozrušován již během trávení ve směsi pektolytických enzymů. Následně je pro odstranění nečistot/zbytků buněčných stěn suspenze filtrována, centrifugována a opět resuspendována. Takto připravená suspenze je následně nakapávána na sklíčko (Dillé *et al.*, 1990; Falconi *et al.*, 2006; Kättström a Nilsson, 1992).

5.6.3 Drop/cryo technika

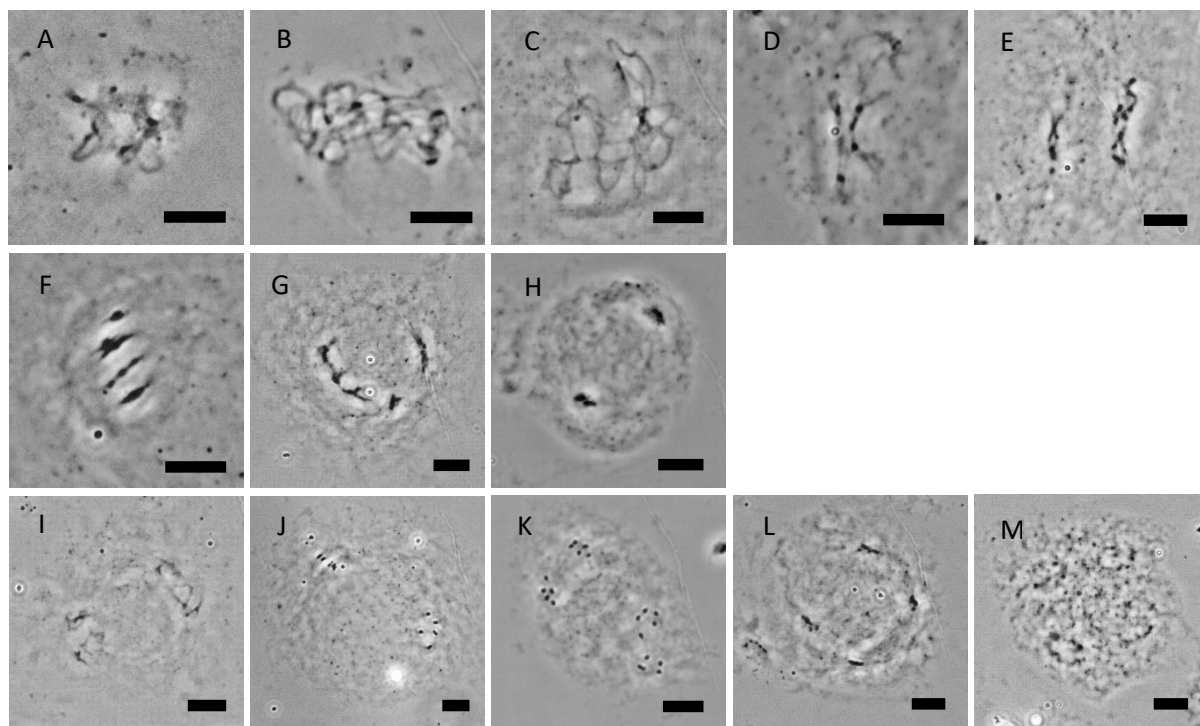
Průlomem pro SEM chromozomů byla modifikace nakapávací techniky – přidání kroku zmrazení a vynechání veškerého sušení na vzduchu. Jedná se o drop techniku upravenou podle Martin *et al.* 1994. Pro tuto techniku zůstává zásadní fixace ethanolem/kyselinou octovou. Tato technika byla použitelná pro všechny dosud studované rostliny, záleží ale na kvalitě spreadu chromozomů, množství zbytků nukleoplazmy, druhu rostliny a kondenzaci chromatinu (Luckner a Wanner, 2018; Schroeder-Reiter *et al.*, 2009; Wanner *et al.*, 2015; Wanner a Schroeder-Reiter, 2008; Zoller *et al.*, 2004b). Zdá se, že významným faktorem pro spread chromozomů je jejich velikost. Chromozomy v rozmezí 5-10 nm dispergují velmi dobře. Velmi malé nebo velké (*Arabidopsis* 1-3 nm nebo *Trillium* 20 nm) mají tendenci se shlukovat nebo překrývat. Všechny parametry pro tuto techniku proto musí být optimalizovány pro různé druhy. Tuto techniku lze také použít na živočišné chromozomy, ty ale až na několik výjimek vykazují významně větší množství nukleoplazmy než rostliny (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008). Tato metoda obchází nevýhody squash a drop techniky jako je vrstva překrývající chromozomy nebo zplošťování struktur vlivem vyschnutí na vzduchu. Naopak nevýhodou je použití velkého množství vstupního materiálu.

6 Výsledky

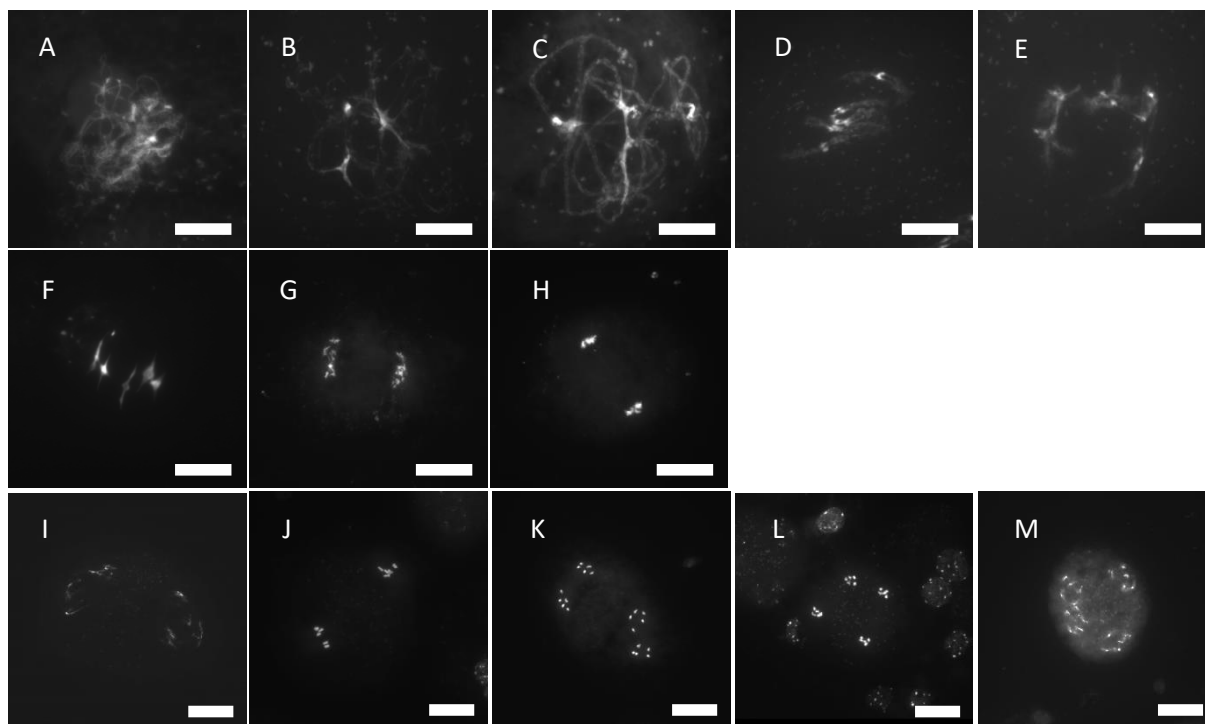
Cílem této práce bylo zoptimalizovat metodu pro přípravu rostlinných meiotických chromozomů pro účely zobrazování s vysokým rozlišením pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Kvalita preparátů a lokalizace chromozomů byla nejprve vyhodnocována pod světelným mikroskopem, tedy s nízkým rozlišením. Následně byly preparáty hodnoceny pod SEM. Vysoké rozlišení tedy odpovídalo pozorování jednotlivých vláken chromozomů, respektive chromatid a jejich povrchových struktur.

6.1 Meiotický atlas

Při přípravě meiotického atlasu jsem postupoval podle kapitoly 5.5 („fixace“ a další kroky byly vynechány). Poté jsem preparáty nafotil pod fázovým kontrastem (Obr 6.1.1). Následně jsem na sklíčka nakápnul přiměřené množství DAPI, přikryl krycím sklíčkem a nafotil pod fluorescenčním mikroskopem (Obr. 6.1.2).



Obr. 6.1.1. Fáze meiózy pod fázovým kontrastem. A – H profáze I, A – leptotene, B – zygotene, C – pachytene, D – diplotene, E – diakineze, F – metafáze I, G – anafáze I, H – telofáze I, I – profáze II, J – metafáze II, K – anafáze II, L – telofáze II, M – čtyři haploidní jádra (měřítko: 10 μm)



Obr. 6.1.2. Fáze meiózy pod fluorescenčním mikroskopem. A – H profáze I, A – leptotene, B – zygotene, C – pachytene, D – diplotene, E – diakineze, F – metafáze I, G – anafáze I, H – telofáze I, I – profáze II, J – metafáze II, K – anafáze II, L – telofáze II, M – čtyři haploidní jádra (měřítko: 10 μm)

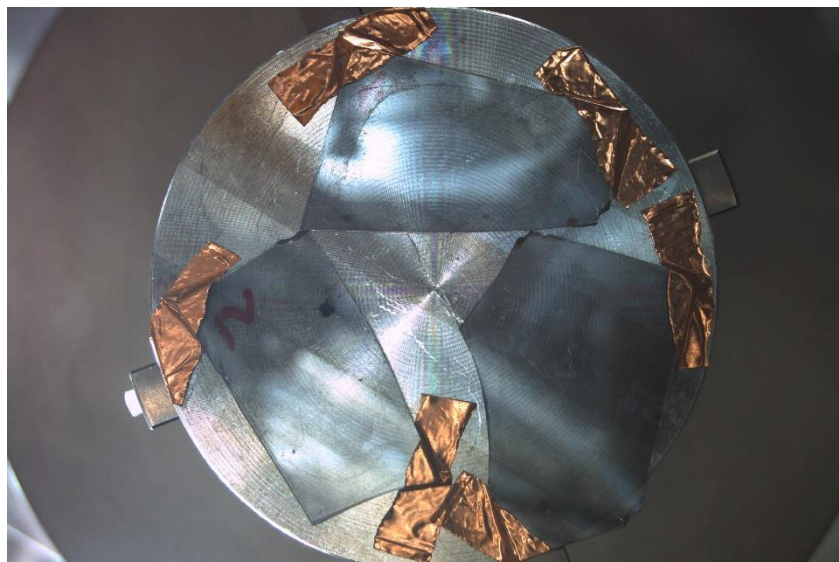
6.2 Příprava vzorků a optimalizace postupu

V roce 1994 R. Martin *et al.* přišli s protokolem poskytující relevantní výsledky. Tato metoda je dodnes úspěšně využívána v mnoha studiích. Tato práce vychází z metody popsané v T. Mandáková a M. Lysák (2016). Metoda T. Mandákové a M. Lysáka je určena především pro přípravu rostlinných chromozomů a následnou analýzu pod světelným a fluorescenčním mikroskopem. Šlo by tedy o rozšíření této metody na použití pro SEM s ohledem na využití nižšího množství vstupního materiálu oproti R. Martin *et al.* (1994).

Pro lepší orientaci na sklíčku byly preparáty připravovány na laserem značená skla se souřadnicemi. Příprava probíhala v digestoři při pokojové teplotě. Během přípravy bylo důležité, aby mezi jednotlivými kroky nedošlo k vyschnutí vzorku. Hotové preparáty byly uchovány v exikátoru se silikagelem při tlaku $6 \cdot 10^{-2}$ Pa. Důvodem byla snaha vyhnout se absorpci atmosférické vlhkosti vzorkem (Kuo, 2014).

Snímky byly pořizovány ve FIB/SEM mikroskopu FEI Versa 3D. Preparáty byly pomocí vodivé lepící pásky připevněny na stolek mikroskopu, následně byla pořízena navigační fotografie pro lepší orientaci na vzorku (Obr. 6.2.1). Po uzavření komory mikroskopu byla

vyčerpána na tlak $3 \cdot 10^{-4}$ Pa. Snímky byly pořizovány při napětí 2 kV a byly detekovány sekundární elektrony (SE).

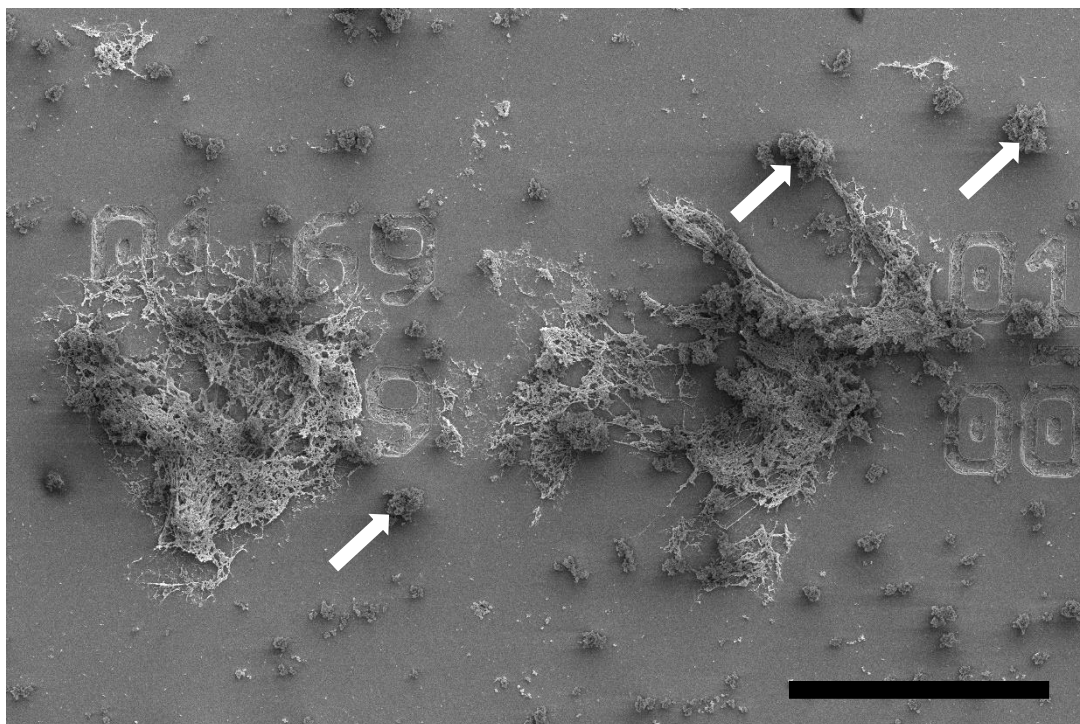


Obr. 6.2.1 Sklíčka připevněná na stolec SEM mikroskopu pomocí vodivé pásky

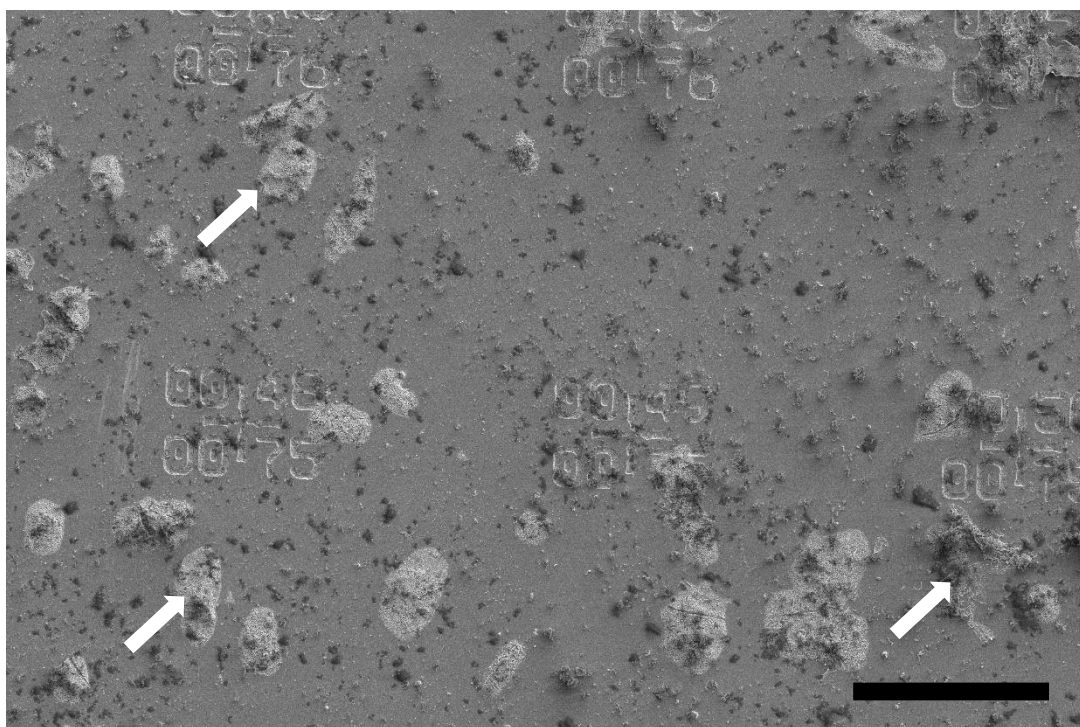
6.2.1 Postup podle R. Martin et al.

Natrávená květenství byla přenesena na sklíčka, kde byla pomocí preparační jehly rozsuspendována. Následně byla na sklíčka nakápnuta Carnoyova fixáž (40 μ l), nejprve několik kapek kolem suspenze a poslední do kapky suspenze. Těsně před odparem fixáže byla na sklíčka nakápnuta 45%/60% kyselina octová (40 μ l) a vzorek byl překryt krycím sklíčkem. Případné přebytky kyseliny octové byly odsáty papírovým ubrouskem. Po uplynutí předem stanovené doby byly takto připravené preparáty ponořeny do tekutého dusíku. Krycí sklíčko bylo poté odstraněno a vzorek byl ihned přenesen do 2,5% roztoku glutaraldehydu. Dále bylo postupováno od „odmývacího kroku č.1“ uvedeno v kapitole 5.5.

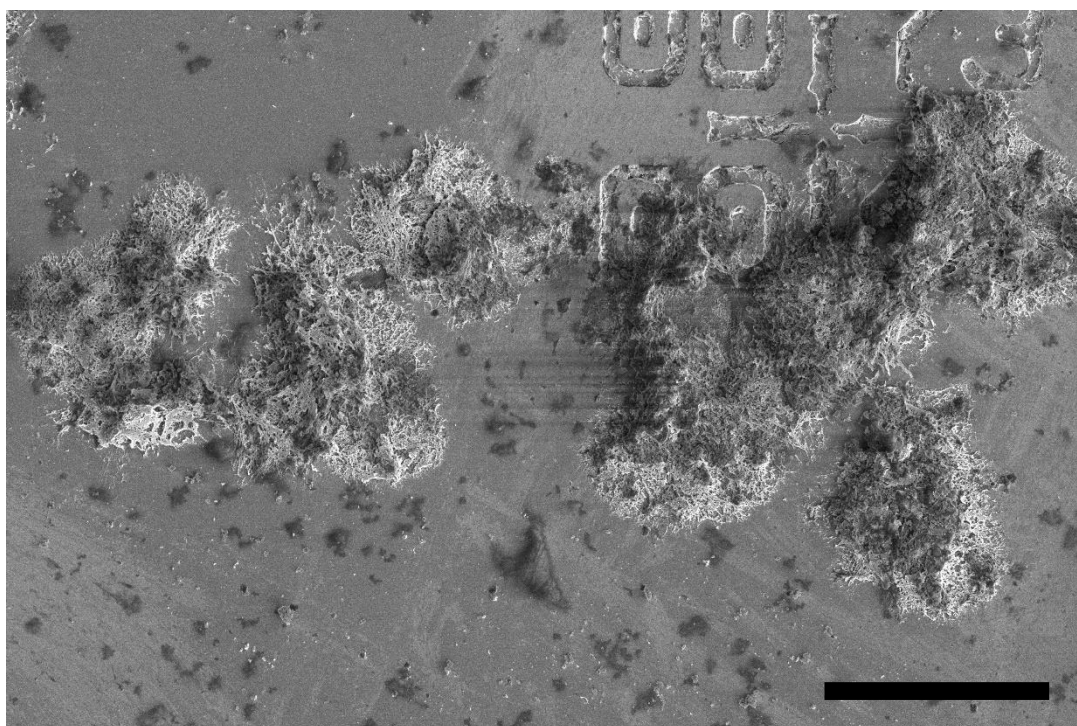
Rozdílem oproti R. Martin *et al.* 1994 bylo použití squash techniky. Suspenze buněk byla tedy vytvořena až na podložním skle. Suspenze také nebyla předem fixována v Carnoyově fixáži.



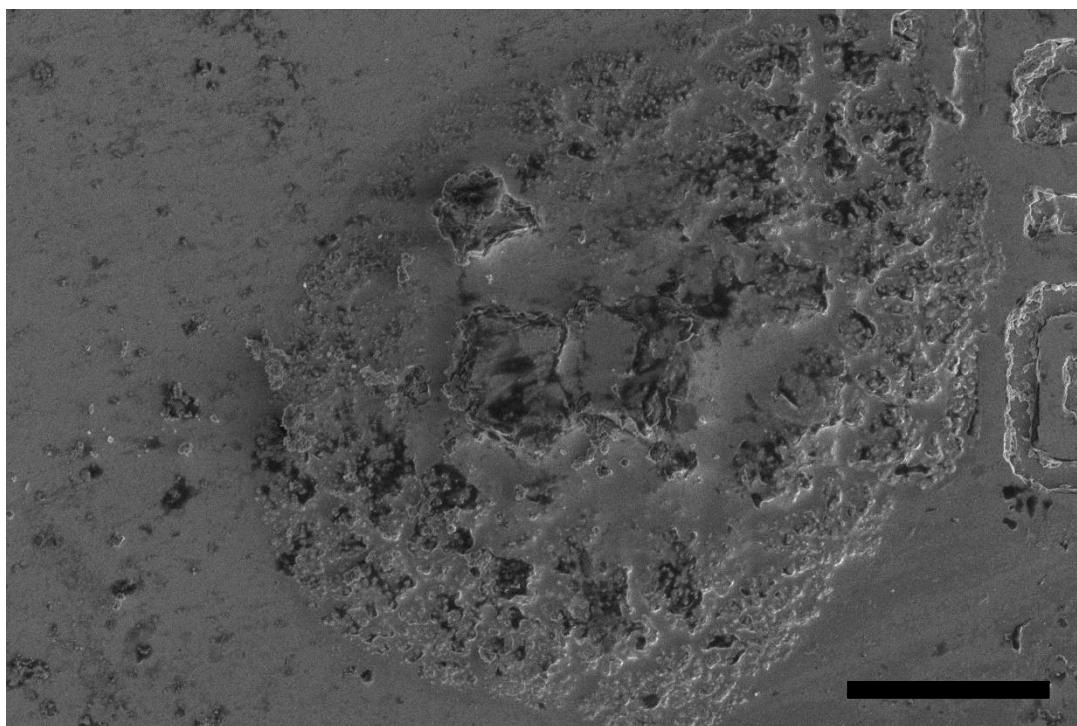
Obr 6.2.1.1 Buňky s částečně odstraněnými buněčnými obaly. Struktury jsou deformovány. Šipky označují buněčný debris/zbytky buněk, které se při tomto postupu vyskytovaly ve velkém množství. Doba působení 45% kyseliny octové: 30 s. (měřítko: 30 μm)



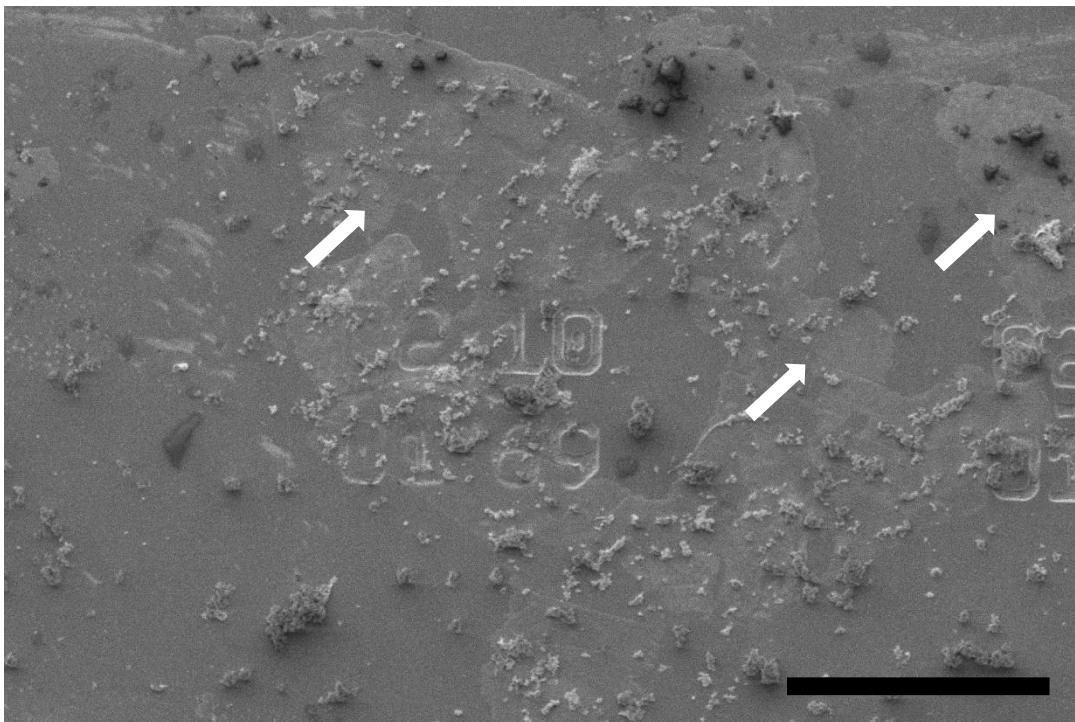
Obr 6.2.1.2 Šipky označují fixované buňky s částečně odstraněnými buněčnými obaly. Po celém povrchu preparátu se vyskytovalo velké množství zbytků buněk. Doba působení 45% kyseliny octové: 30 s (měřítko: 50 μm)



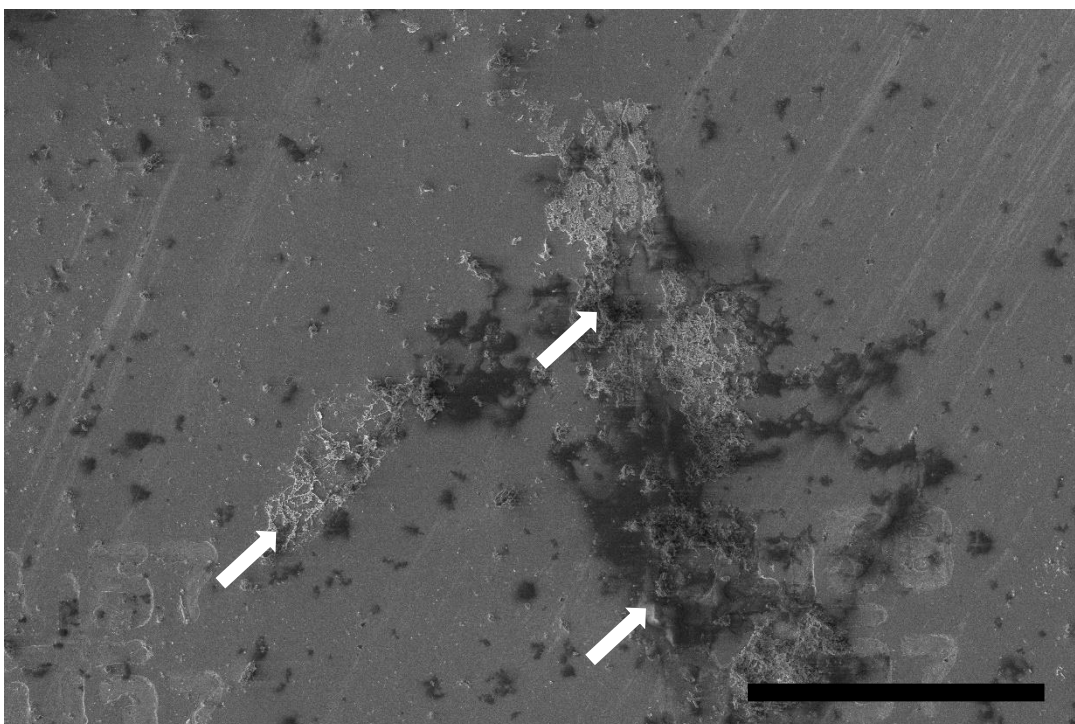
Obr. 6.2.1.3 Buňky s částečně odstraněnými buněčnými obaly. Struktury jsou také deformované. Doba působení 45% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 20 μm)



Obr. 6.2.1.4. Struktura překrytá vrstvou. Doba působení 45% kyseliny octové: 5 min (měřítko 10 μm)



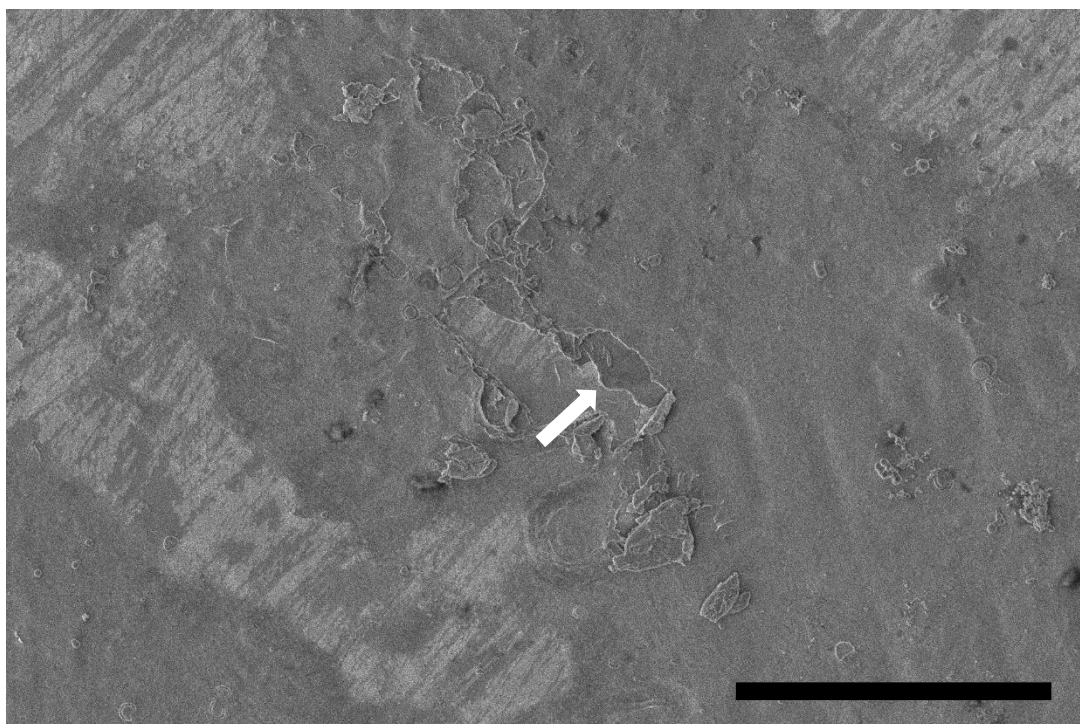
Obr. 6.2.1.5 Šipky označují buňky překryté vrstvou. Na povrchu preparátu je fixováno velké množství zbytků buněk. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko: 40 μm)



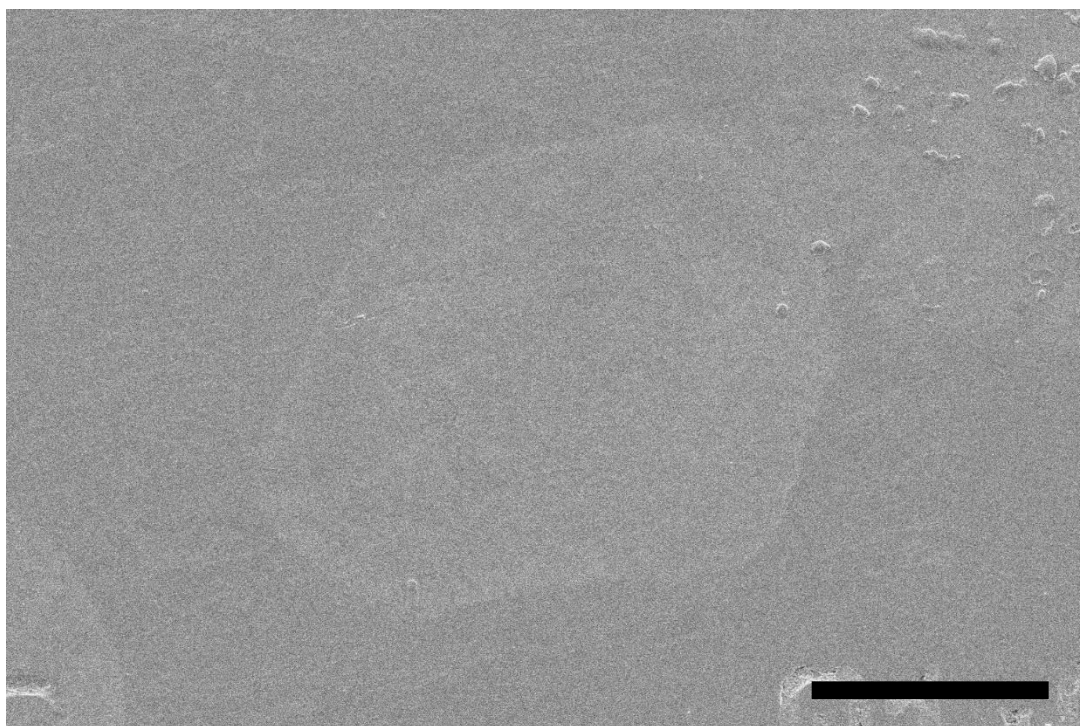
Obr. 6.2.1.6 Šipky označují deformované buňky/zbytky buněk. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko: 40 μm)

6.2.2 Základní postup

Zde bylo postupováno podle kapitoly 5.5.



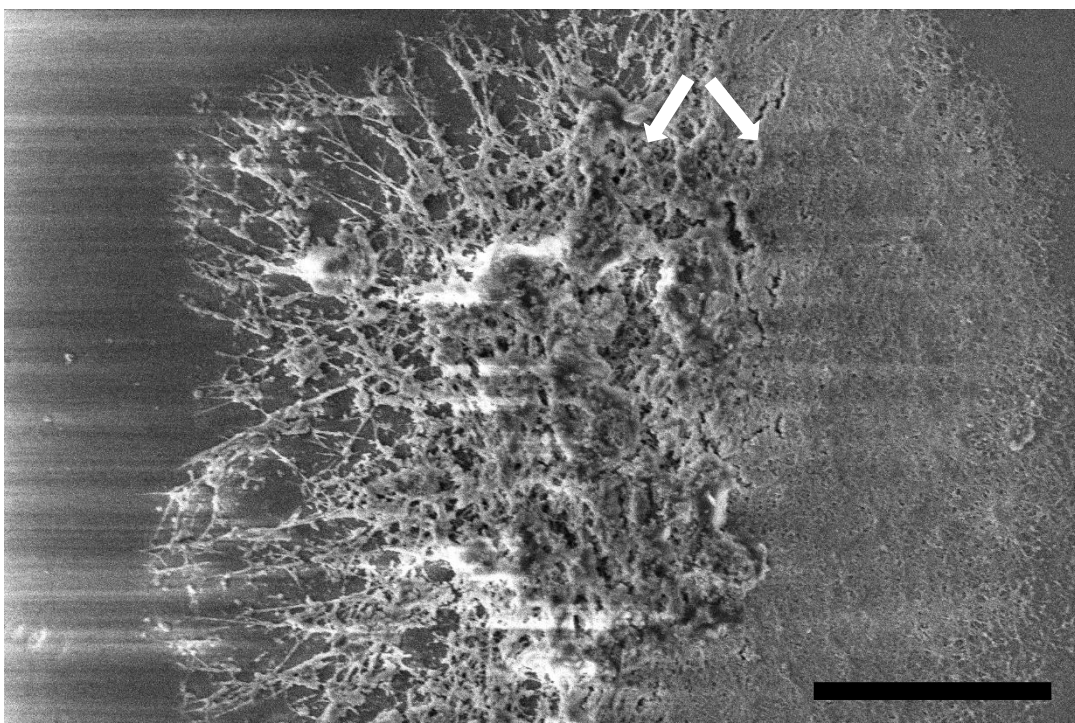
Obr. 6.2.2.1 Vrstva překrývající pozorované struktury. Narušení jasně poukazuje na mnohovrstevnost. Doba působení 60% kyseliny octové: 60 s. (měřítko 20 μm)



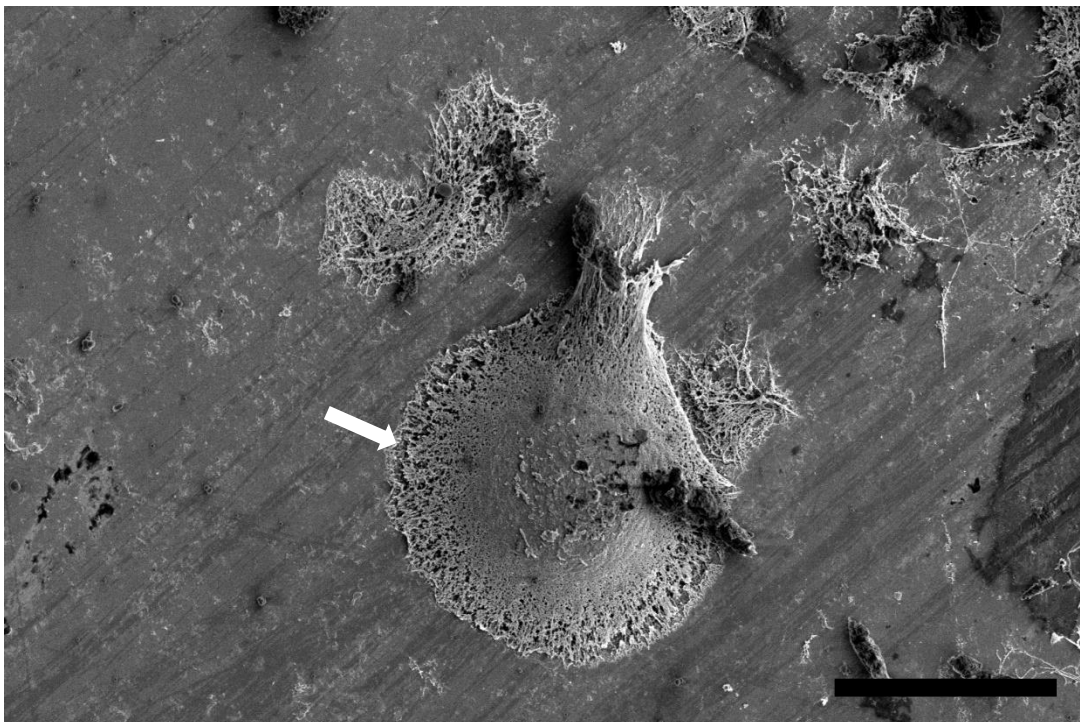
Obr. 6.2.2.2 Buňka překrytá vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 20 μm)



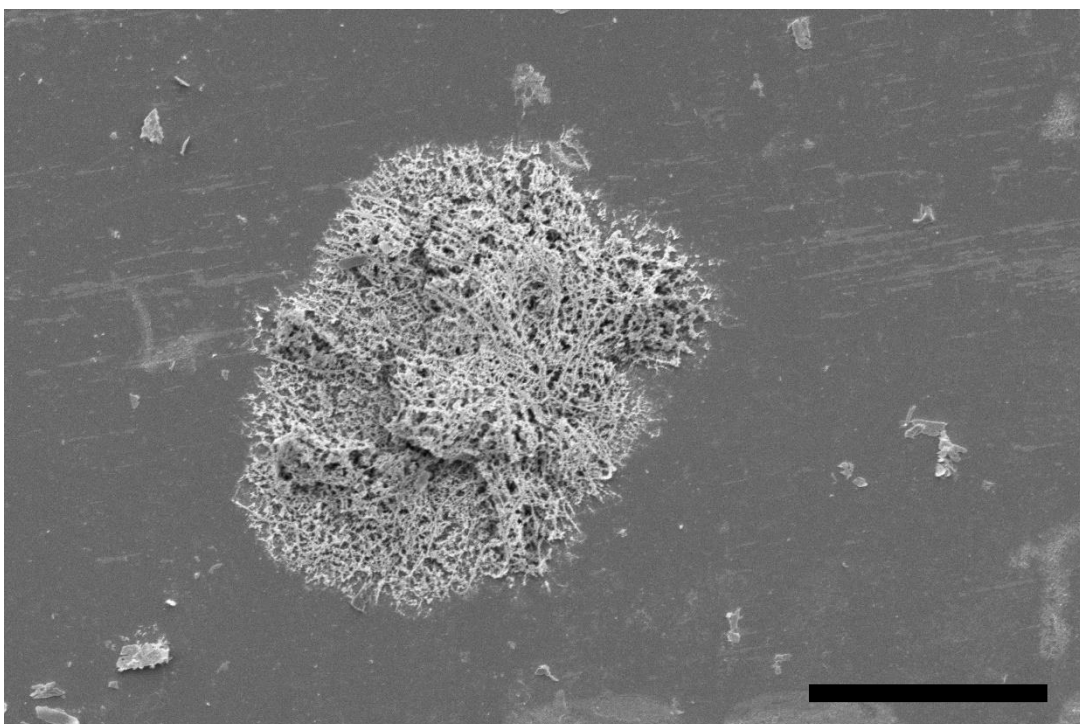
Obr. 6.2.2.3 Buňka s pravděpodobně částečně odmytou cytoplazmou. Struktura je zploštěná vyschnutím na vzduchu nebo překrytím vrstvou při kroku lyze a spread cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 20 μm)



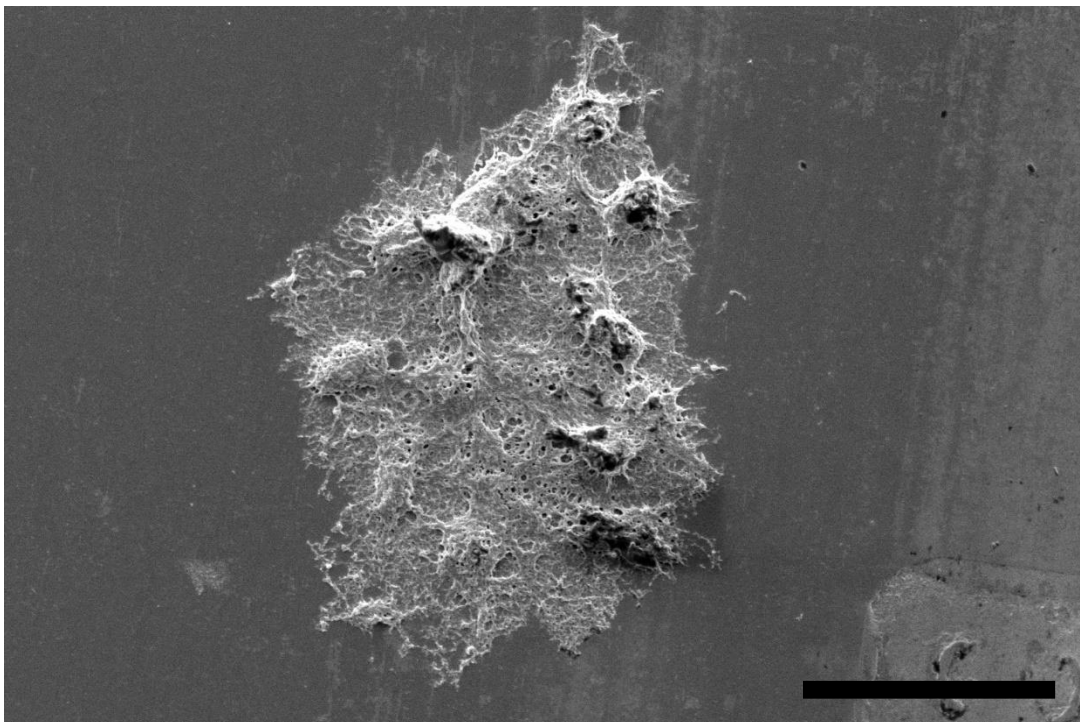
Obr. 6.2.2.4 Buňka s zčásti odmytou cytoplazmou, z části cytoplazma odmyta nebyla anebo došlo k částečnému přischnutí či překrytí vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 60 s. (měřítko 10 μm)



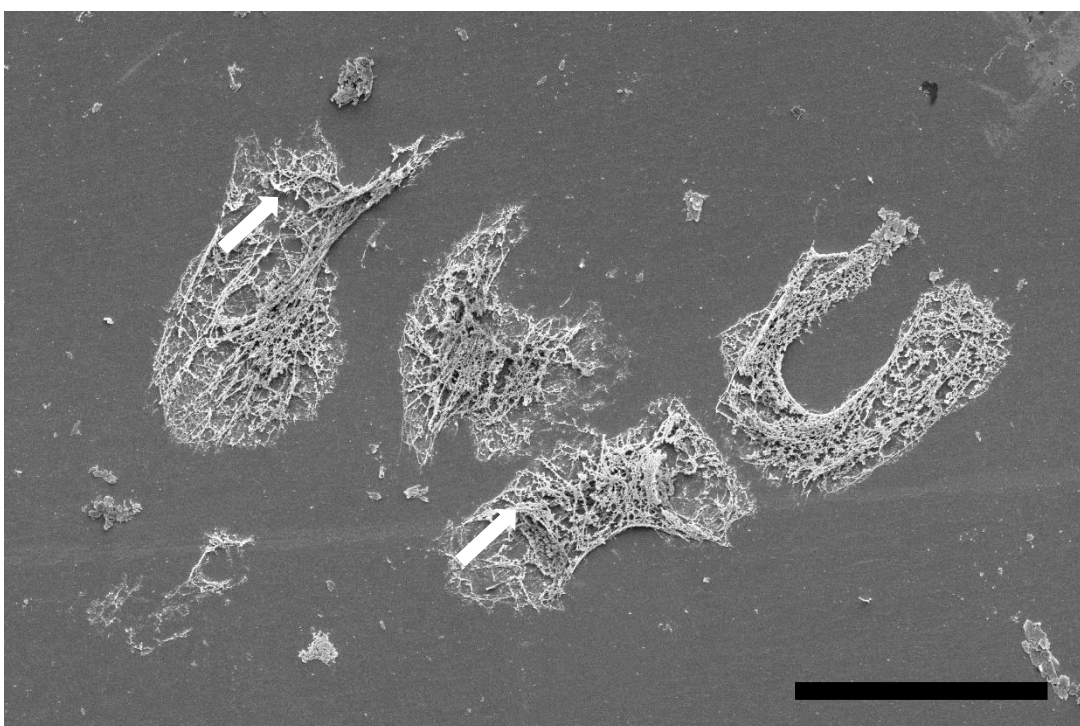
Obr. 6.2.2.5 Šipka označuje buňku, u které nedošlo k odmytí cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 20 μm)



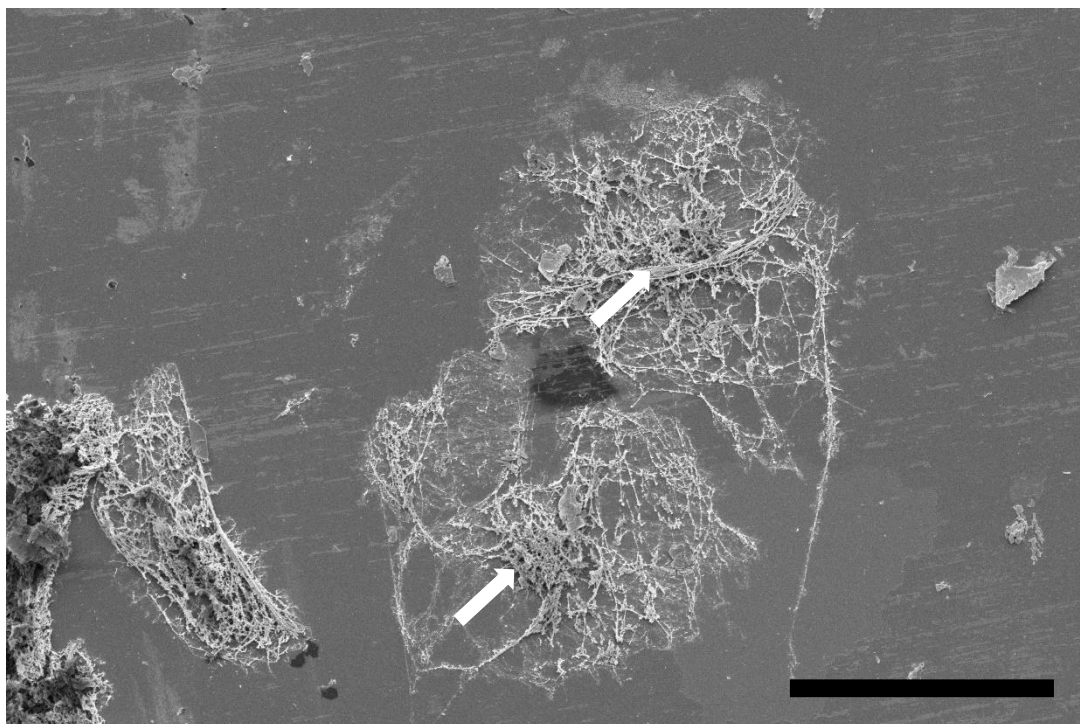
Obr. 6.2.2.6 Buňka s částečně odmytou cytoplazmou. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 10 μm)



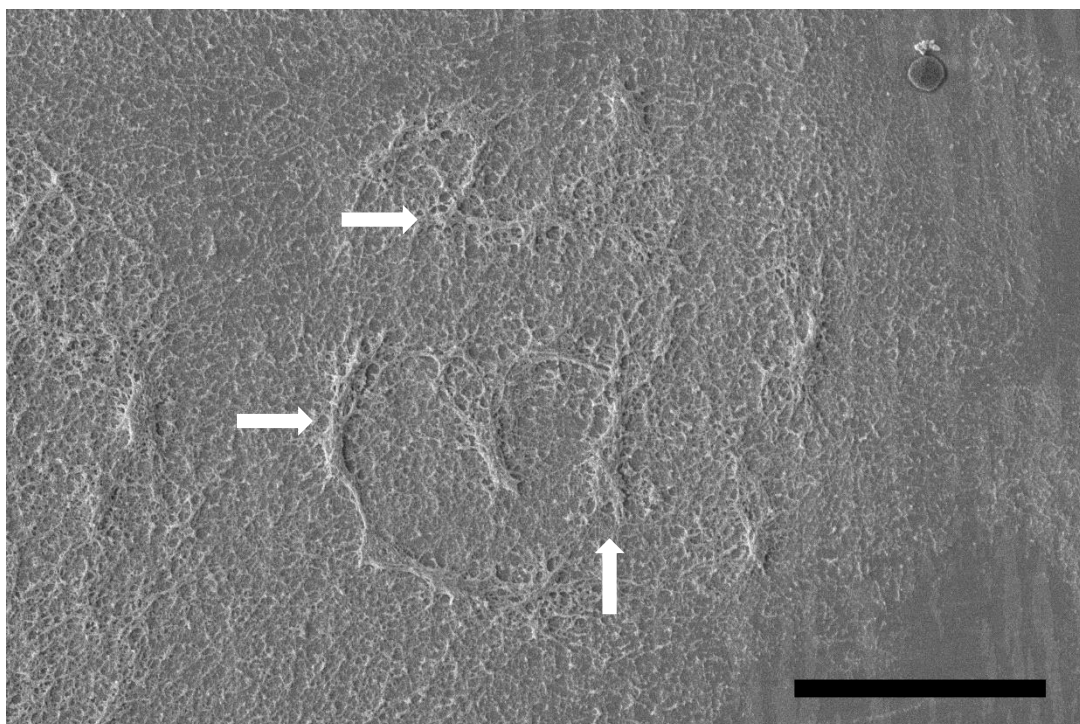
Obr. 6.2.2.7 Buňka s částečně odmytou cytoplazmou a následné zploštění struktury (u tohoto preparátu nebylo využito CPD). Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 10 μm)



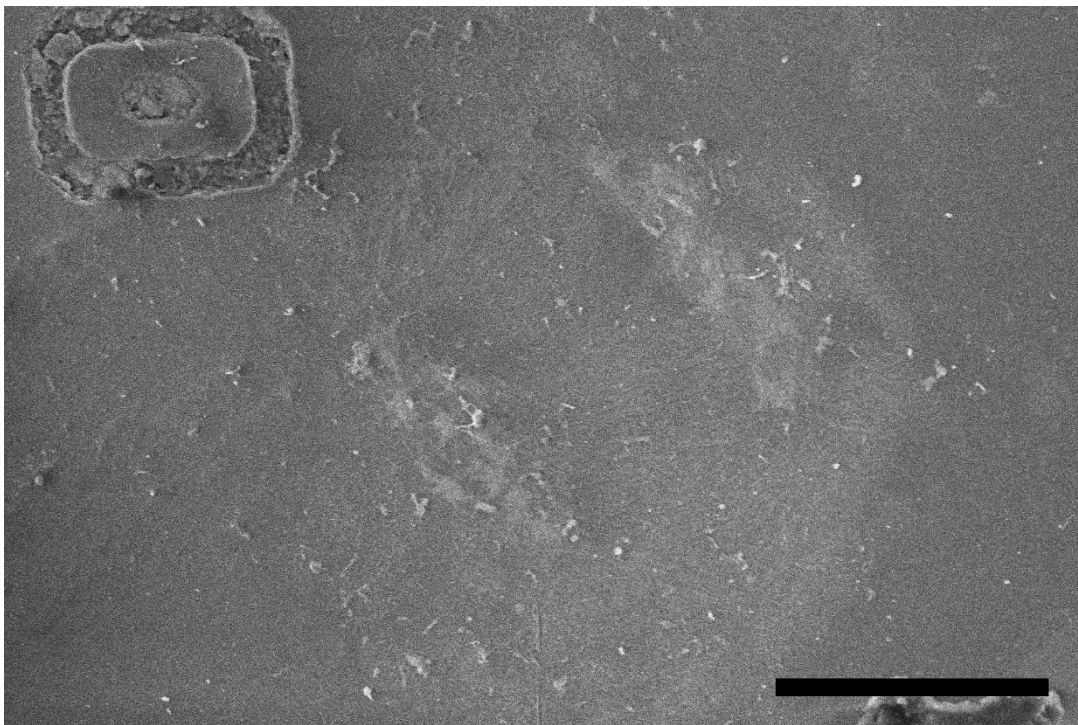
Obr. 6.2.2.8 Buňky s téměř odmytou cytoplazmou. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. Šipky ukazují na síťovitou strukturu zbytků cytoplazmy. (měřítko 20 μm)



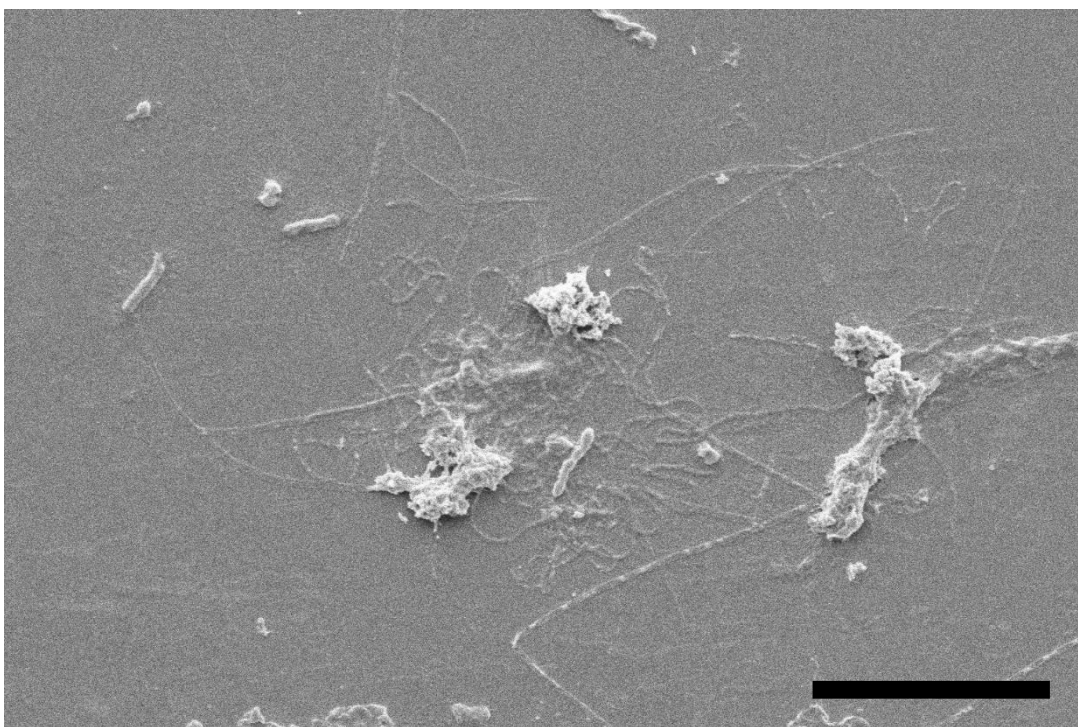
Obr. 6.2.2.9 Buňky s odmytou cytoplazmou. Šipky označují jádra buněk. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 20 μm)



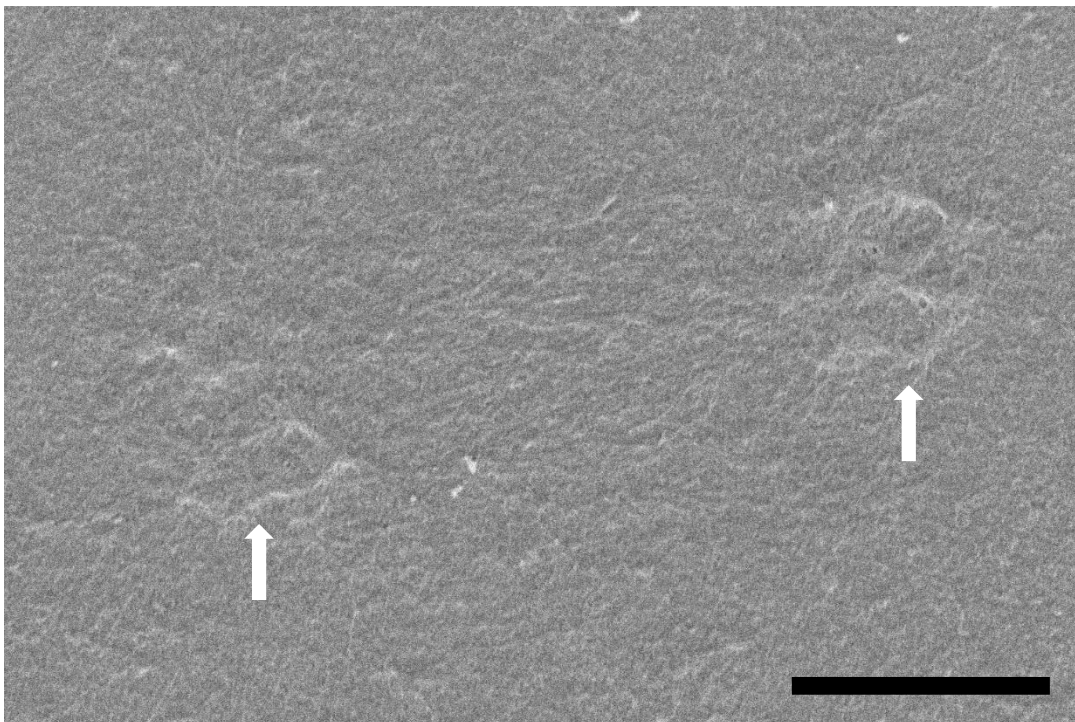
Obr. 6.2.2.10 Mitotické chromozomy, profáze. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 5 μm)



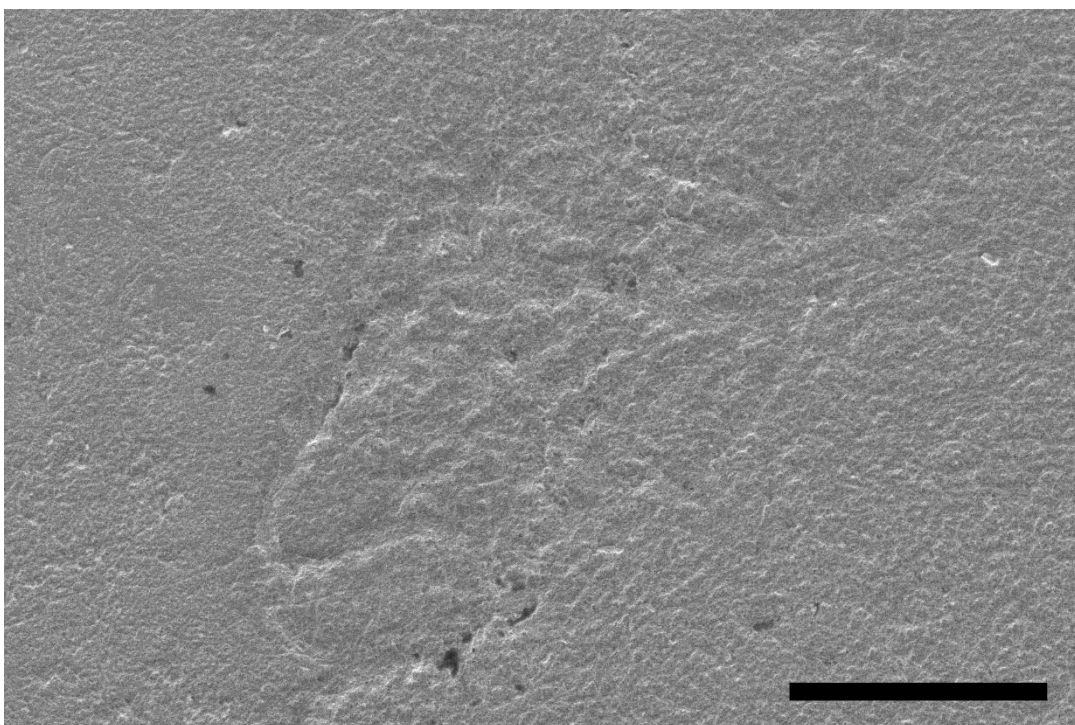
Obr. 6.2.2.11 Anafáze. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 10 μm)



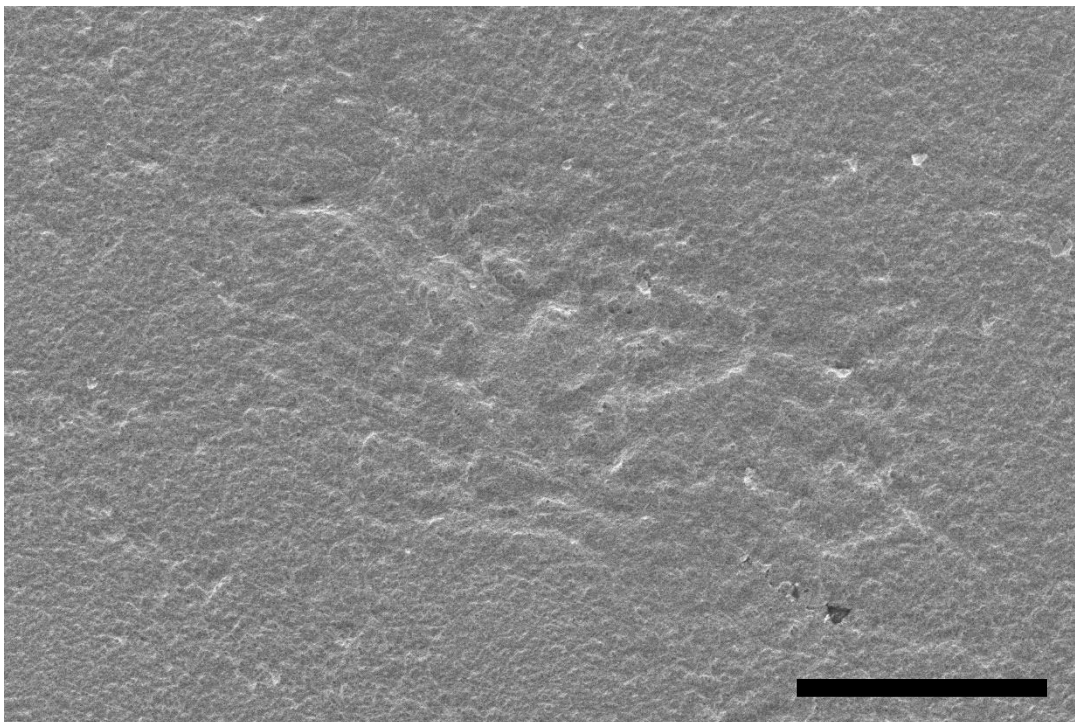
Obr. 6.2.2.12 Profáze I, pachytene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy, následnému překrytí vrstvou a poté k fixaci zbytků buněk překrývající pozorovanou strukturu. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 5 μm)



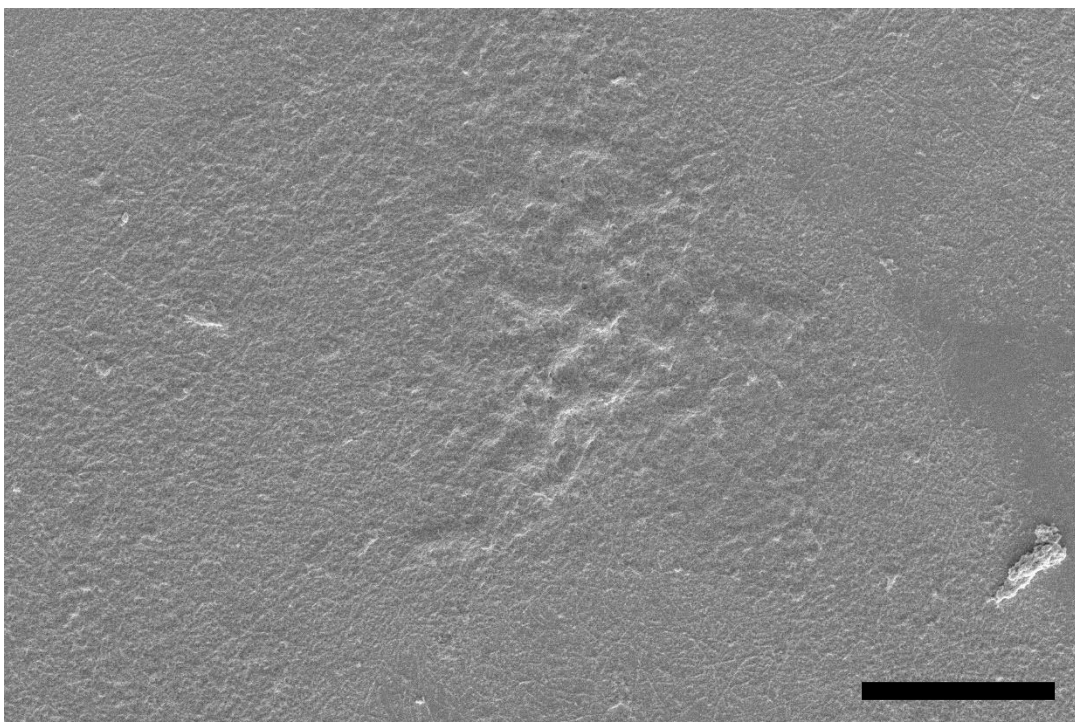
Obr. 6.2.2.13 Anafáze. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Šipky označují chromozomy v opačných pólech buňky. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 5 μm)



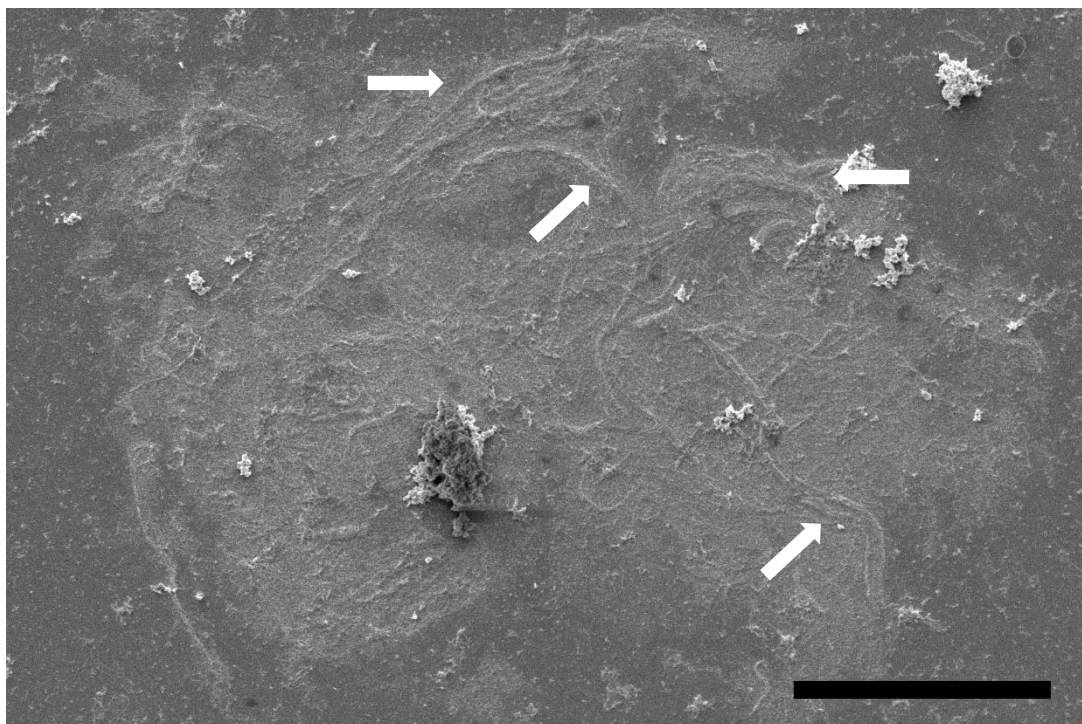
Obr. 6.2.2.14 Profáze I, zygotene/pachytene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy, následnému překrytí vrstvou. Doba působení 45% kyseliny octové: 60 s (měřítko 5 μm)



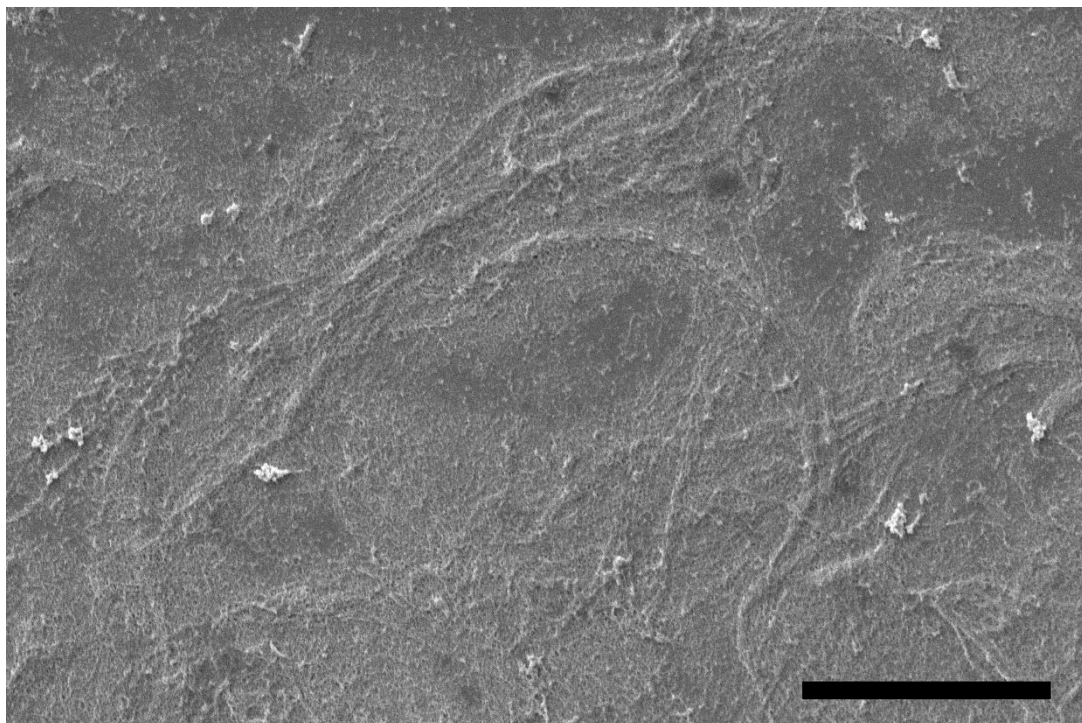
Obr. 6.2.2.15 Profáze I, zygotene/pachytene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Doba působení 45% kyseliny octové: 60 s (měřítko 5 μm)



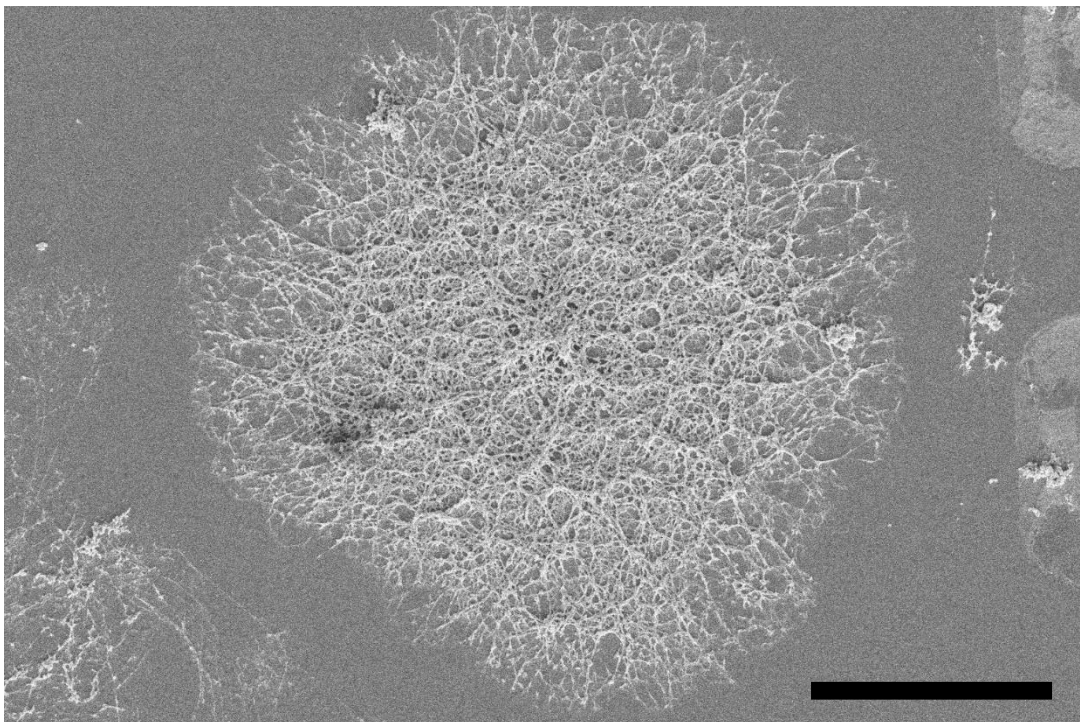
Obr. 6.2.2.16 Profáze I, leptotene/zygotene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Doba působení 45% kyseliny octové: 60 s (měřítko 5 μm)



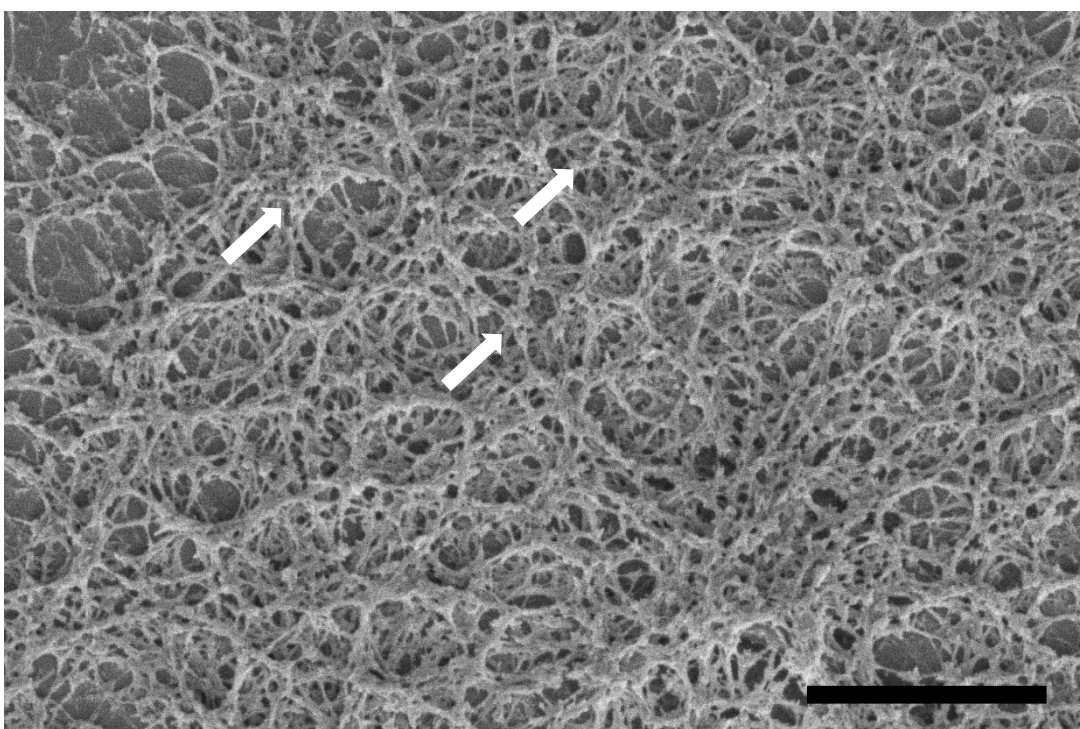
Obr. 6.2.2.17a Profáze I, diplotene. Došlo k odmytí cytoplazmy, struktura je spíše zploštěná vlivem vyschnutí na vzduchu během přípravy. Šipky označují viditelné chromozomy. Doba působení 60% kyseliny octové: 60 s (měřítko 10 μm)



Obr. 6.2.2.17b Profáze I, diplotene. (měřítko 5 μm)



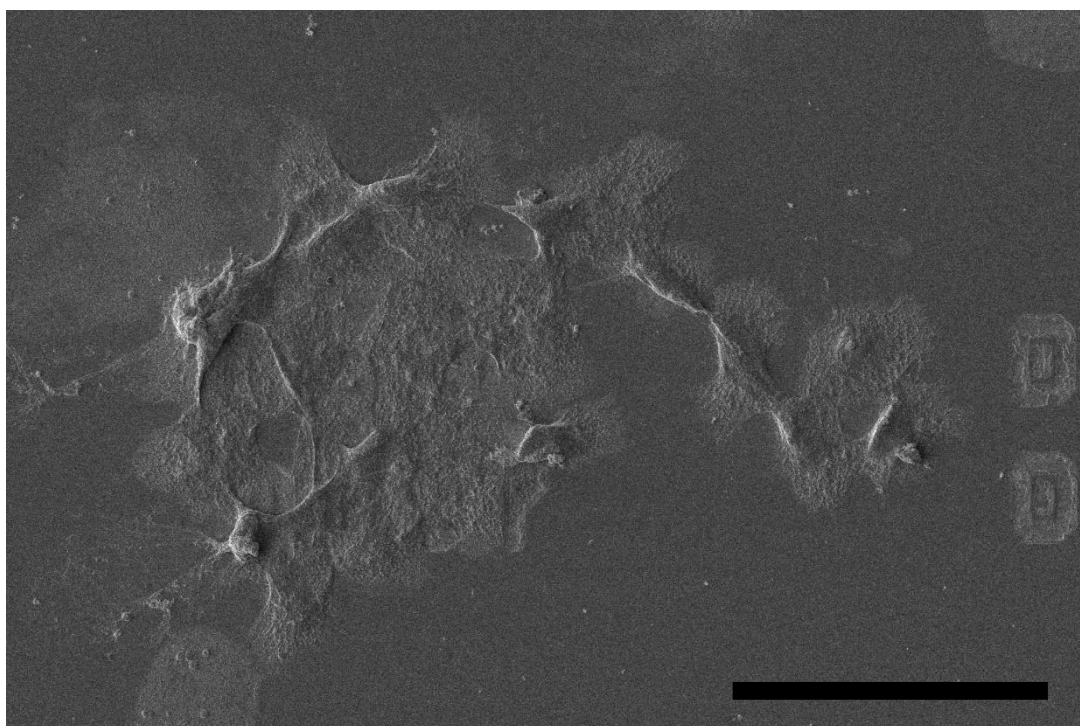
Obr. 6.2.2.18a Interfázní jádro premeiotické buňky. Doba působení 60% kyseliny octové: 30 s. (měřítko 10 μm)



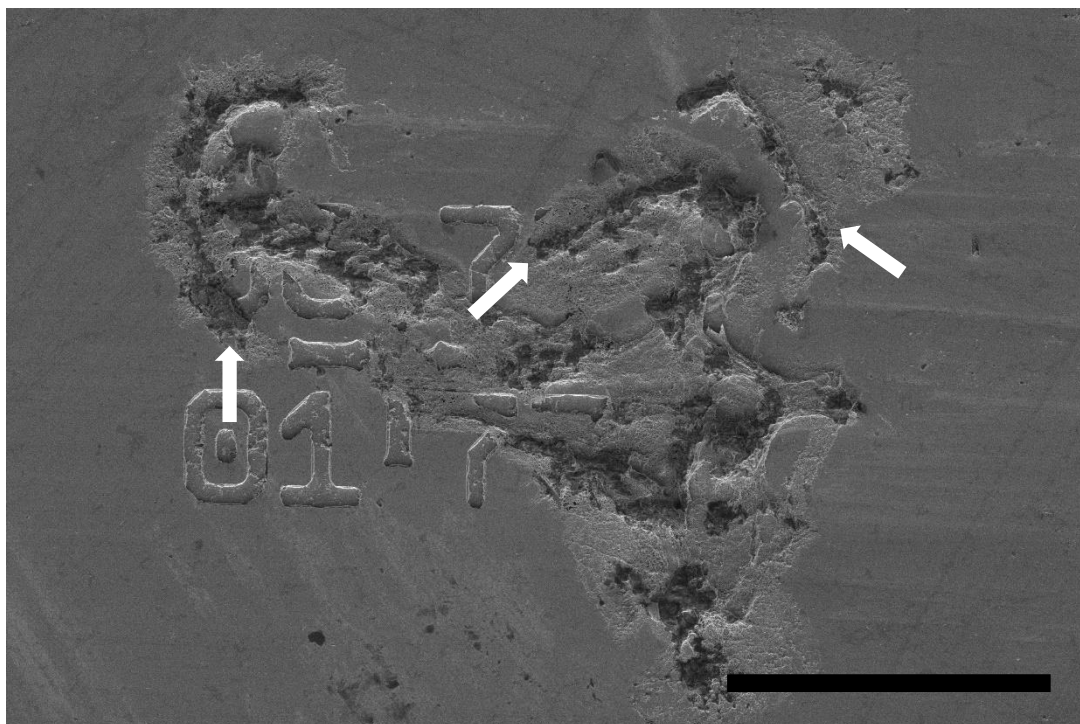
Obr. 6.2.2.18b Interfázní jádro/raná profáze premeiotické buňky. Je viditelná globulární struktura chromatinu. (měřítko 3 μm)

6.2.3 Překrytí krycím sklem

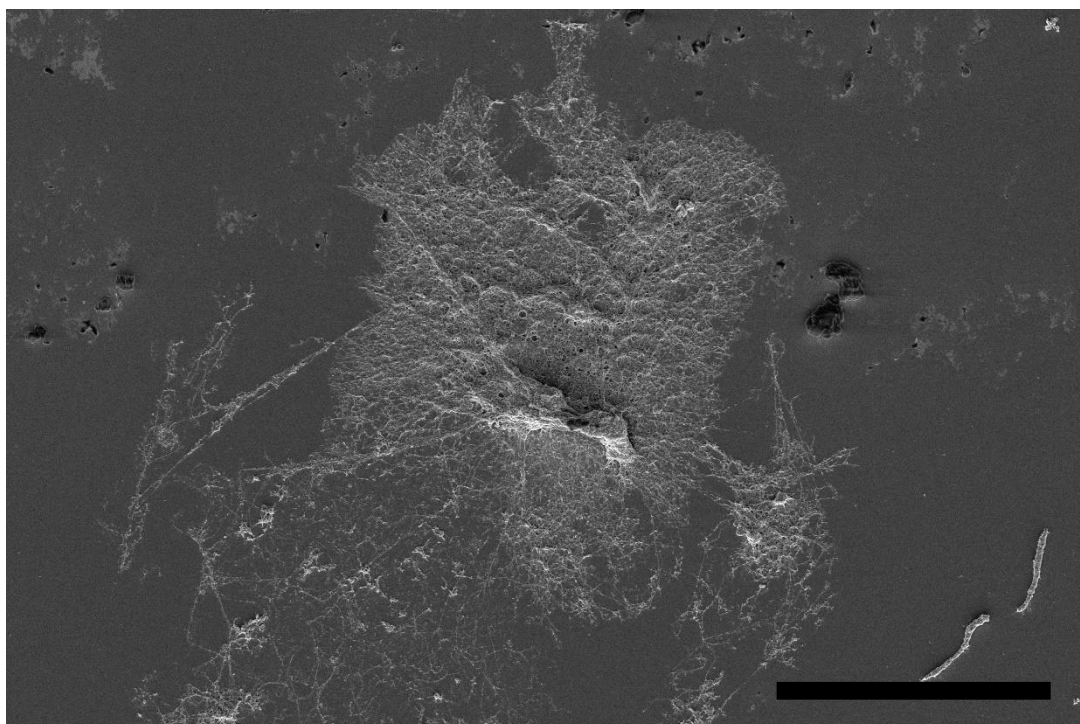
Bylo postupováno podle kapitoly 5.5. S úpravou kroku spread chromozomů a lyze cytoplazmy: suspenze nebyla preparační jehlou krouživým pohybem jemně roztírána. Na místo tohoto kroku bylo na suspenzi buněk nakápnuto 40 μ l 60% kyseliny octové, preparát byl překryt krycím sklíčkem a umístěn na ploténku při 50 °C nebo byly takto připravené preparáty ponechány při pokojové teplotě po předem stanovenou dobu. Poté bylo sklíčko umístěno do Petriho misky s Carnoyovou fixází I, kde bylo krycí sklíčko odstraněno. Dále bylo postupováno od „fixace“ uvedeno v kapitole 5.5.



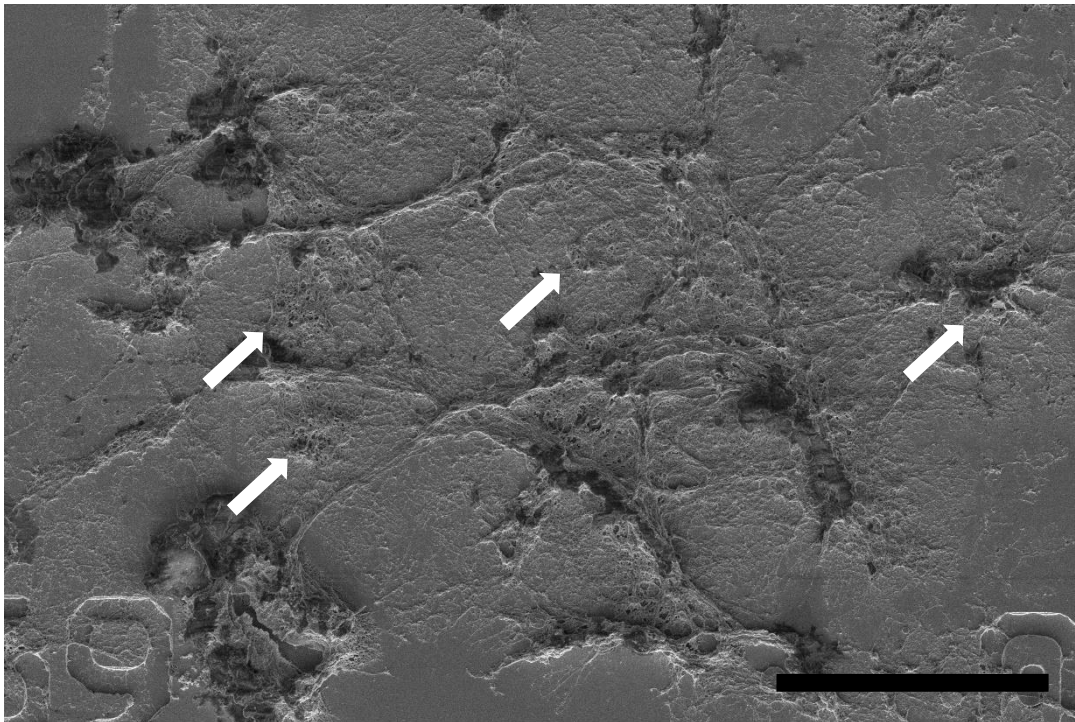
Obr. 6.2.3.1 Deformované buňky. Plazmatická membrána/cytoplazma je „srolovaná“. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min při pokojové teplotě. (měřítko 40 μ m)



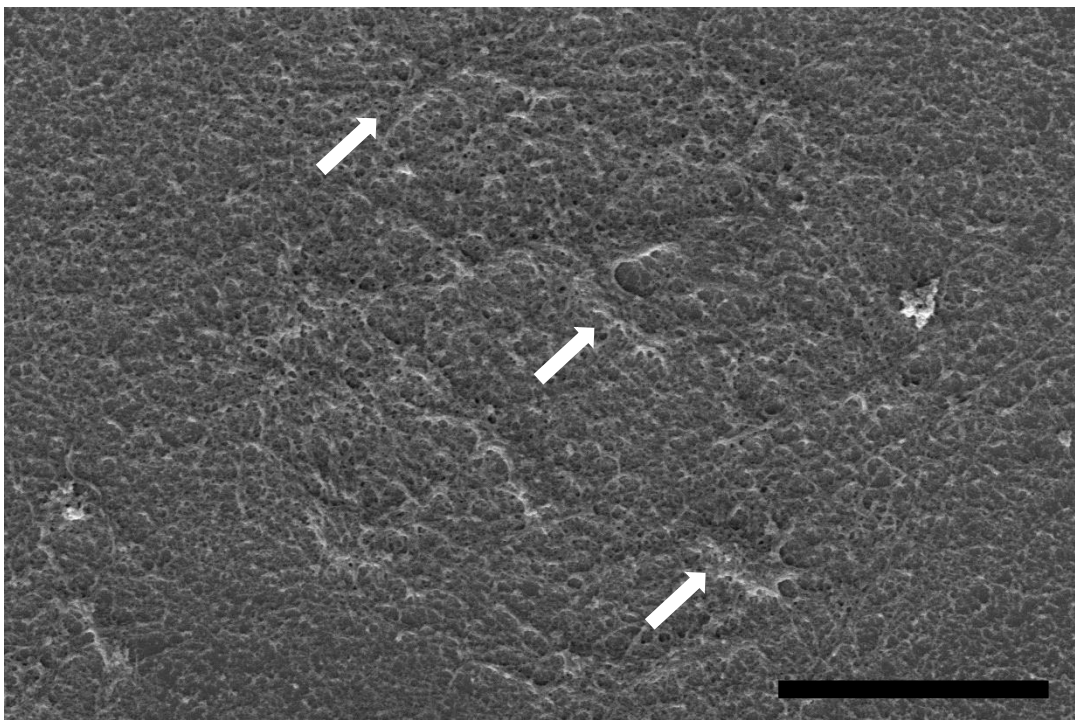
Obr. 6.2.3.2 Šipky označují „srolované“ buněčné obaly/obsah buněk. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min při 50 °C. (měřítko 30 μm)



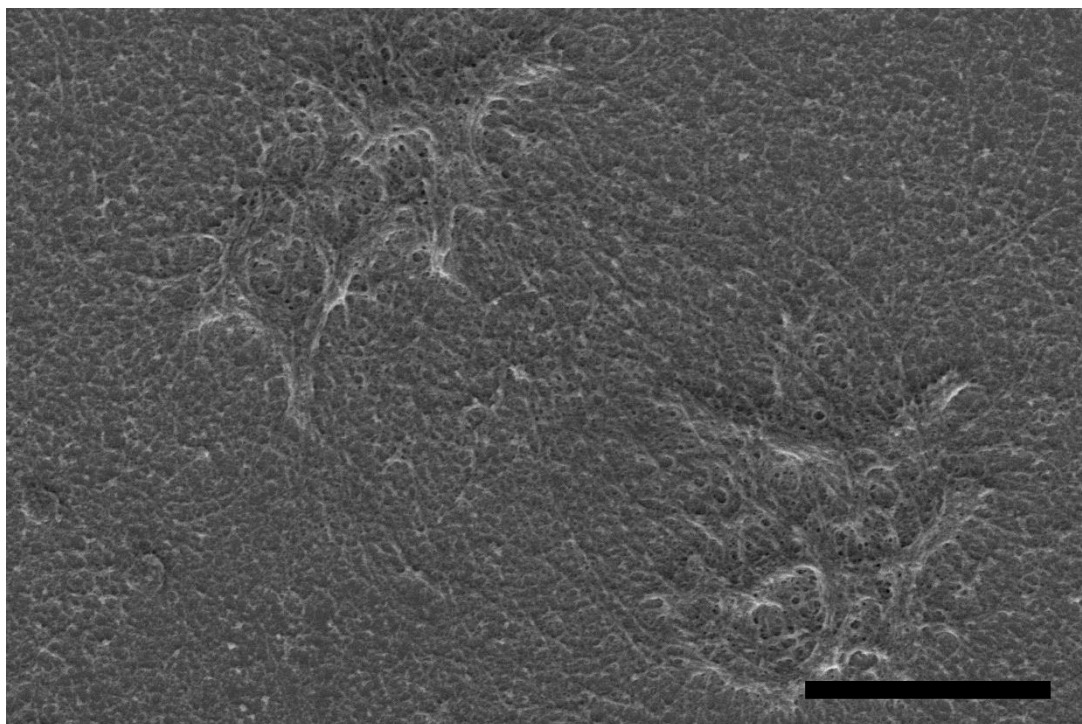
Obr. 6.2.3.3 „Srolované“ zbytky obsahu buněk. Doba působení 60% kyseliny octové: 10 min při pokojové teplotě. (měřítko 20 μm)



Obr. 6.2.3.4 „Srolované“ zbytky cytoplazmy. Šipky označují jádra buněk. Doba působení 60% kyseliny octové: 10 min při 50 °C. (měřítko 20 μm)



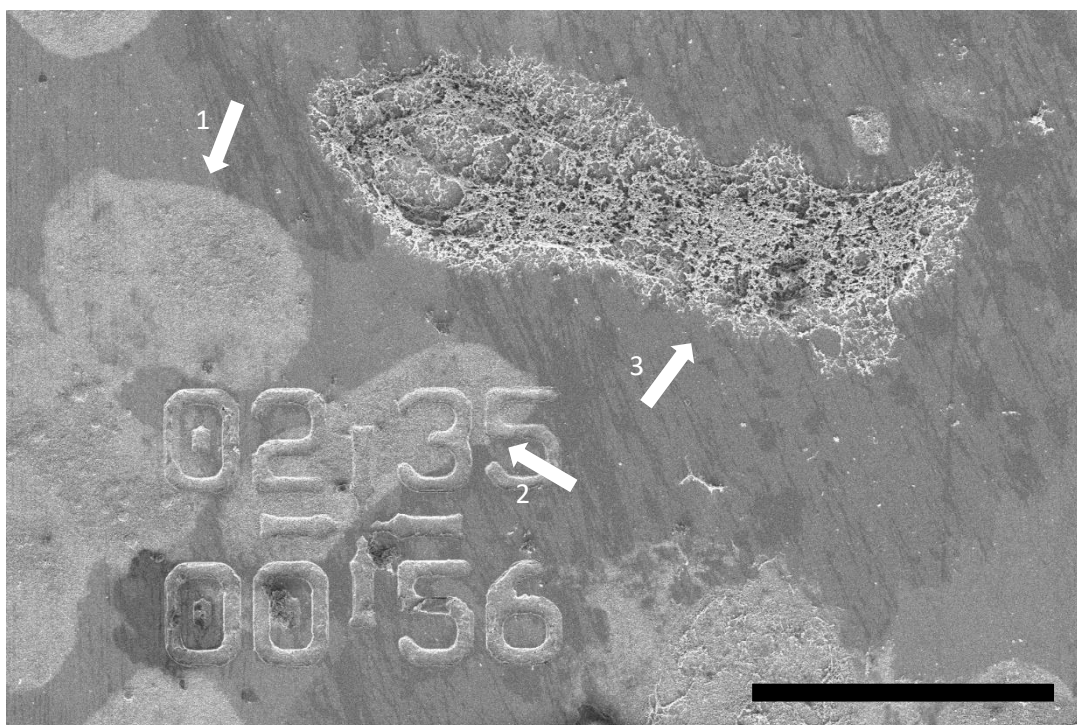
Obr. 6.2.3.5 Mitóza, profáze. Doba působení 60% kyseliny octové: 10 min při 50 °C. (měřítko 4 μm)



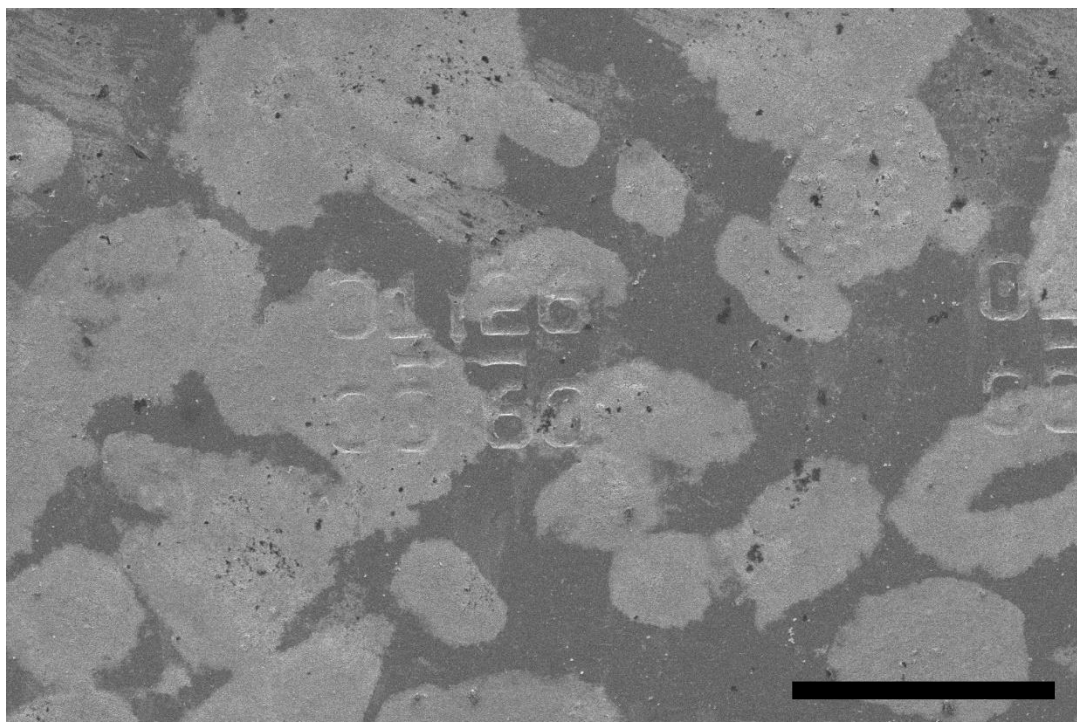
Obr. 6.2.3.6 Anafáze. Doba působení 60% kyseliny octové: 10 min při 50 °C. (měřítko 3 μm)

6.2.4 Prodloužení působení kyseliny octové

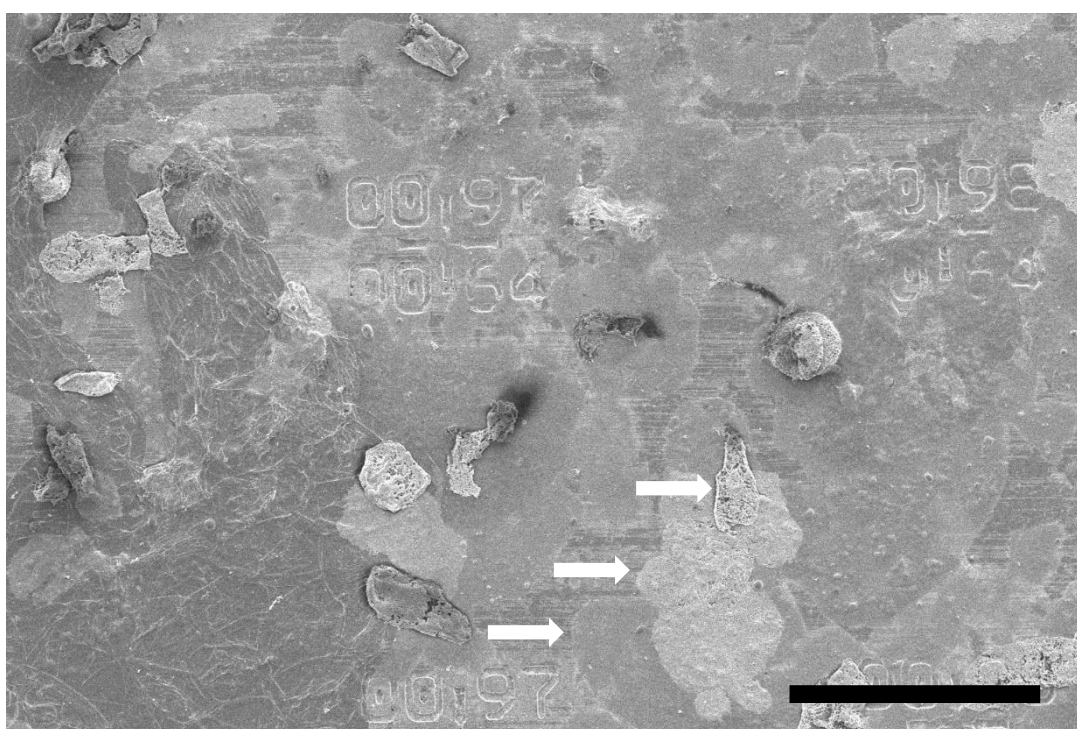
Bylo postupováno podle kapitoly 5.5. S úpravou kroku spread chromozomů a lyze cytoplazmy: suspenze byla preparační jehlou krouživým pohybem jemně roztírána ve dvojnásobném množství kyseliny octové, resp. po delší dobu při 50 °C. Poté bylo sklíčko umístěno do Petriho misky s Carnoyovou fixází I. Dále bylo postupováno od „fixace“ uvedeno v kapitole 5.5.



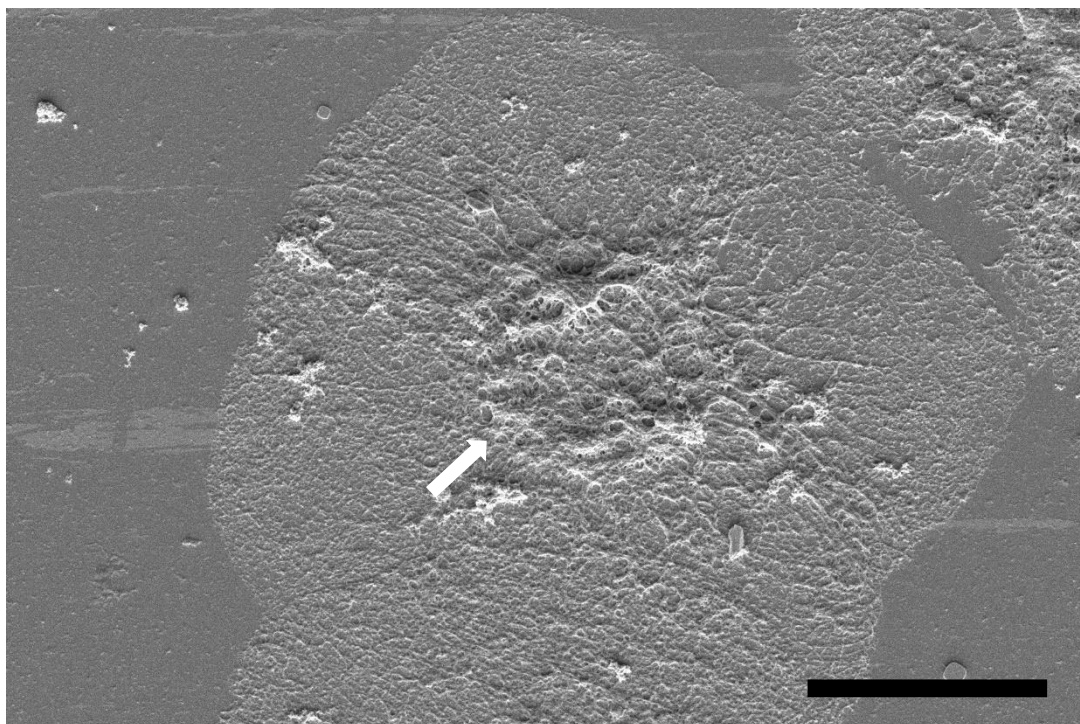
Obr. 6.2.4.1 Rozdílně viditelné buňky: 1,2 – pod vrstvou, 3 – fixace na povrchu preparátu. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 30 μ m)



Obr. 6.2.4.2 Fixované buňky pod vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 40 μm)



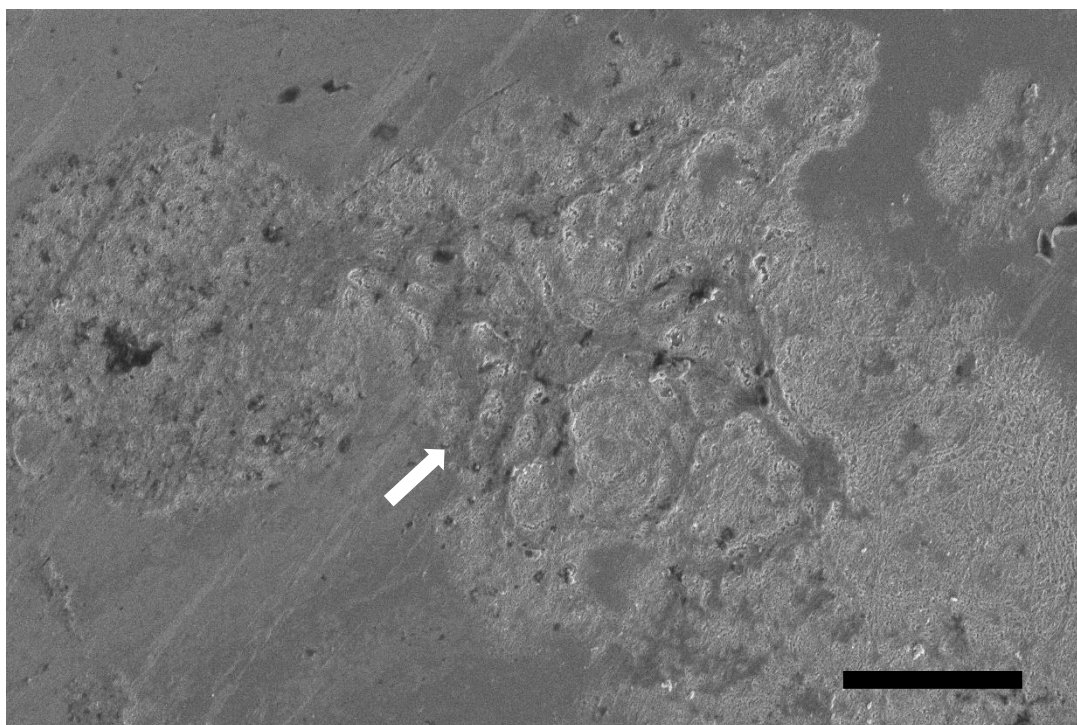
Obr. 6.2.4.3 Rozdílně fixované buňky. Je viditelné, že jsou buňky fixovány přes sebe v několika vrstvách. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 50 μm)



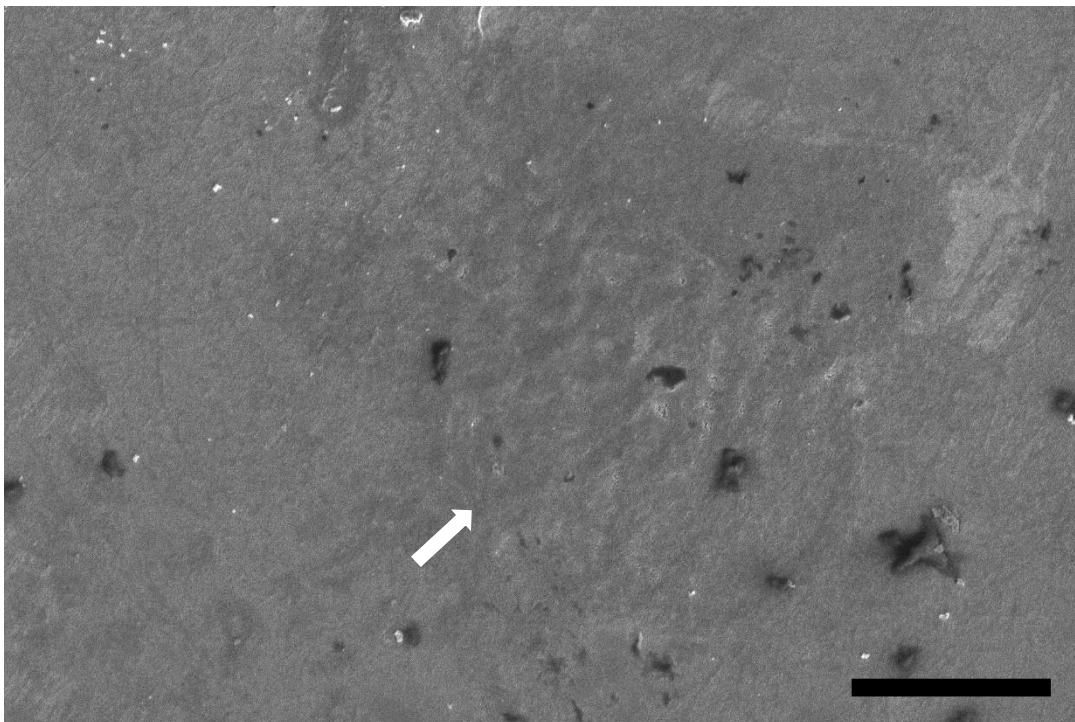
Obr. 6.2.4.4 Interfázni jádro. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 10 μm)

6.2.5 Inkubace s kyselinou octovou

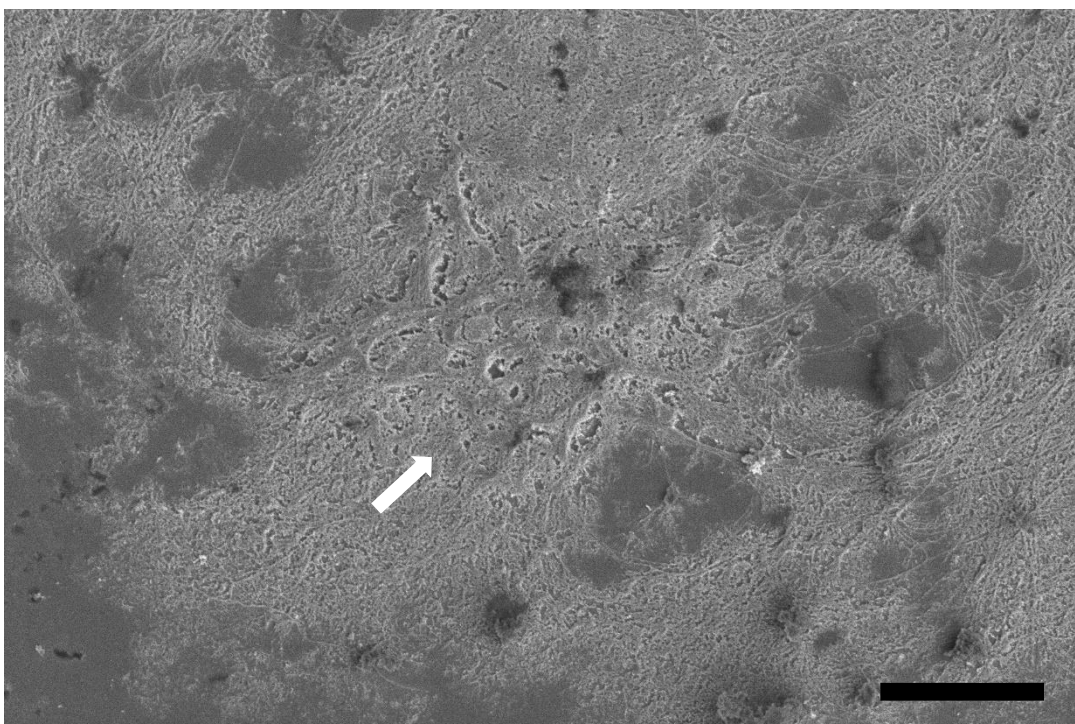
Spread chromozomů a lyze cytoplazmy: Kapka suspenze buněk s kyselinou octovou (60 μ l) byla ponechána inkubovat po danou dobu. Nebo byla po této inkubaci aktivita kyseliny octové podpořena rychlým roztěrem preparační jehlou 10 s při 50 °C. Nebo byla suspenze preparační jehlou krouživým pohybem jemně roztírána za pokojové teploty po předem stanovenou dobu vždy po 1 min působení kyseliny octové. Poté bylo sklíčko umístěno do Petriho misky s Carnoyovou fixací I. Dále bylo postupováno od „fixace“ uvedeno v kapitole 5.5.



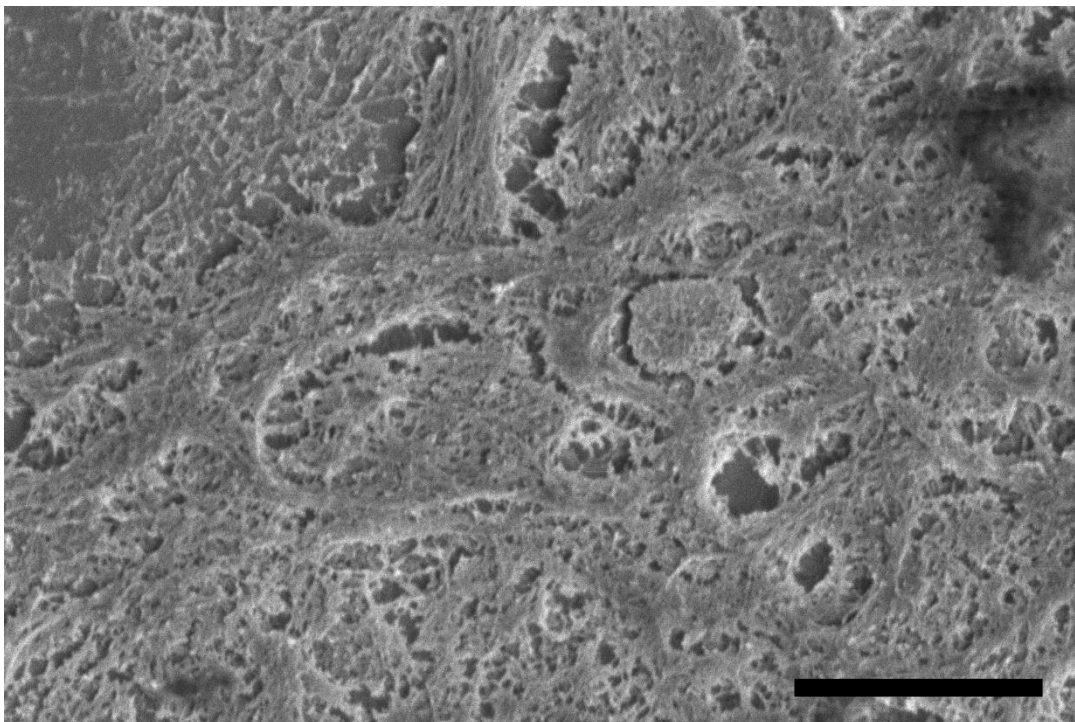
Obr. 6.2.5.1 Profáze I, pachytene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min a následný roztěr preparační jehlou při 50 °C (měřítko 5 μ m)



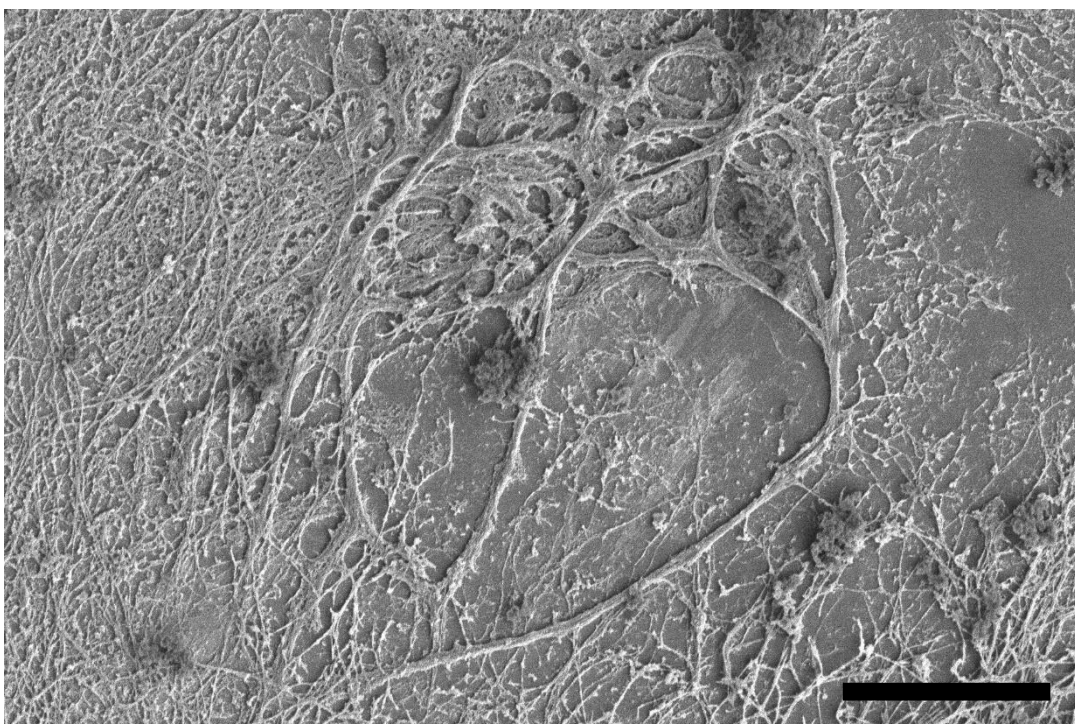
Obr. 6.2.5.2 Profáze I, zygotene/pachytene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min a následný roztěr preparacní jehlou při 50 °C (měřítko 5 μ m)



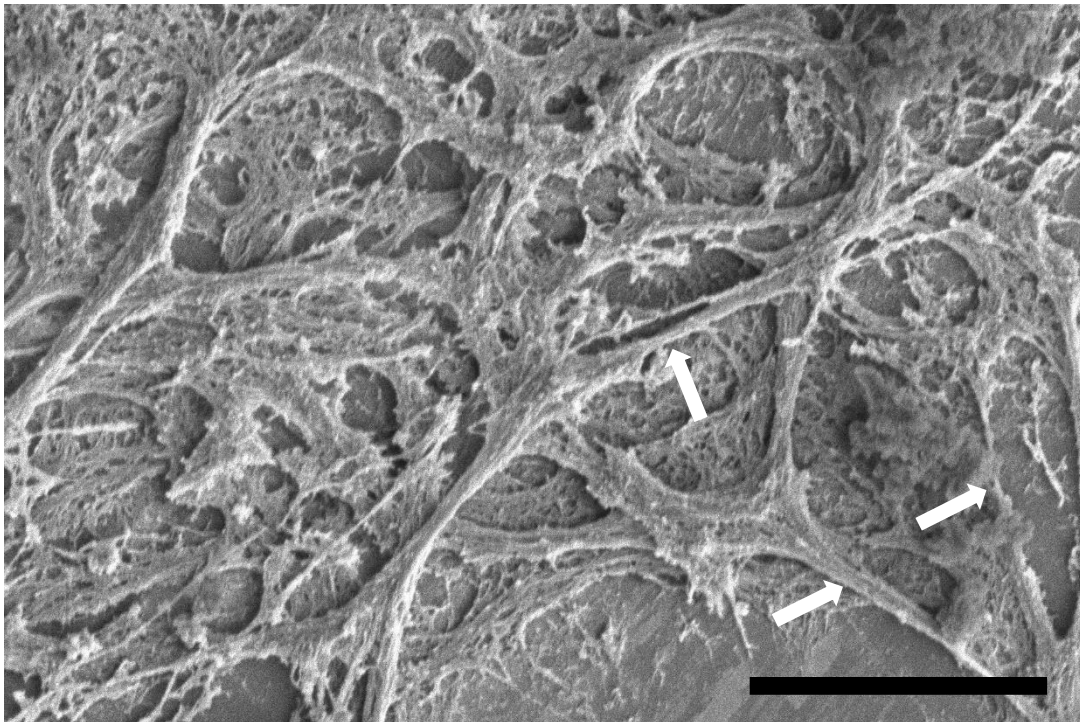
Obr. 6.2.5.3a Profáze I, leptotene/zygotene. Zde došlo k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min a následný roztěr preparacní jehlou při 50 °C (měřítko 5 μ m)



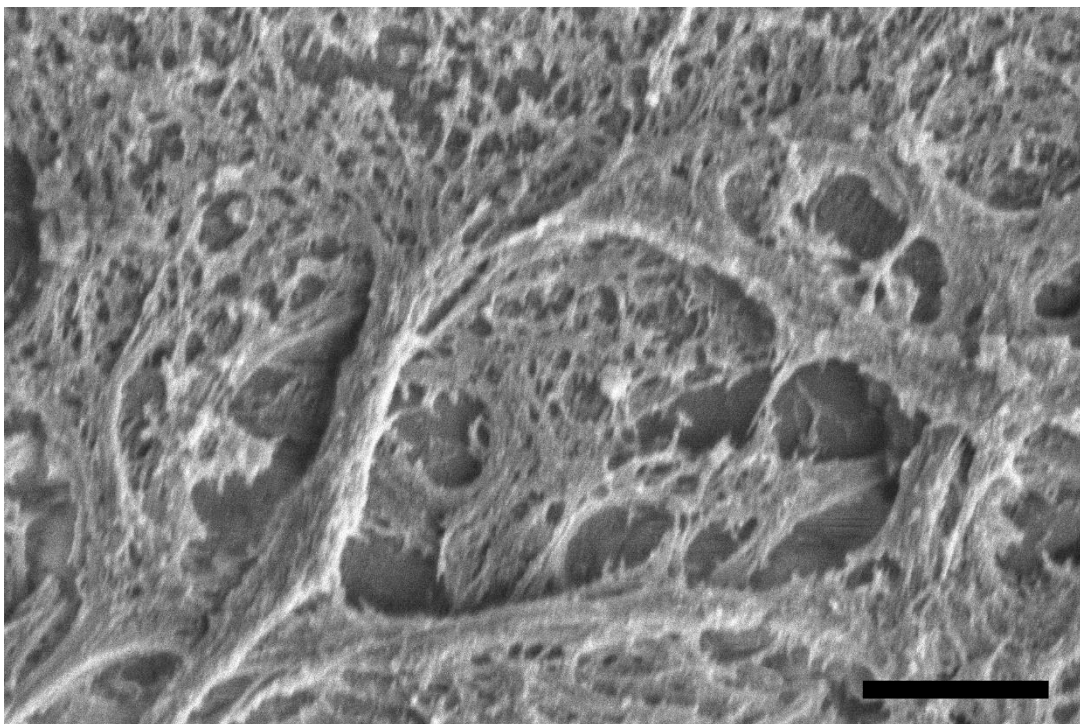
Obr. 6.2.5.3b Profáze I, leptotene/zygotene (měřítko 2 μm)



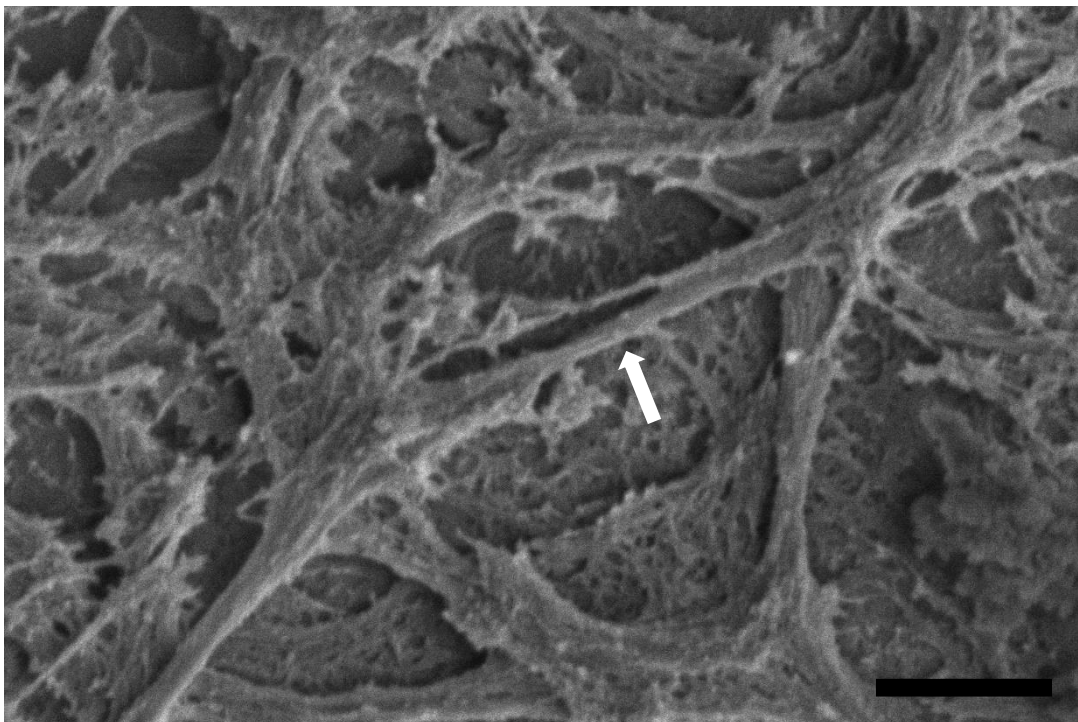
Obr. 6.2.5.4a Profáze I, pachytene. Jasně viditelné chromozomy. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min a následný roztěr preparační jehlou při 50 °C. (měřítko 5 μm)



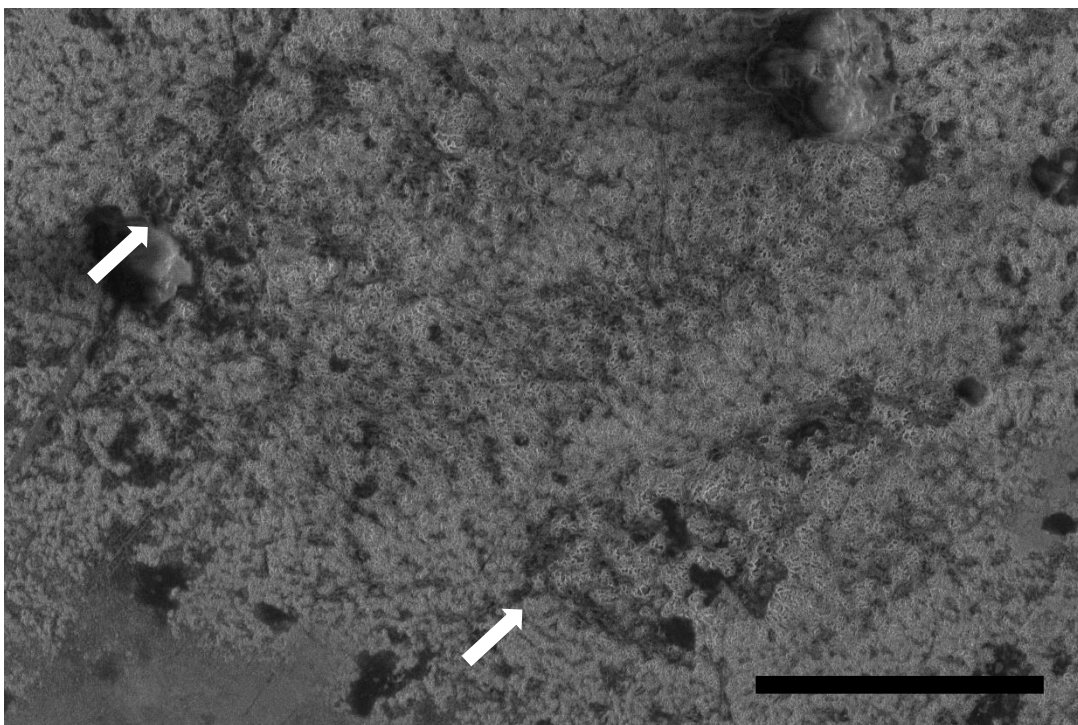
Obr. 6.2.5.4b Profáze I, pachytene. Šipky označují příčná spojení chromozomů. (měřítko 3 μm)



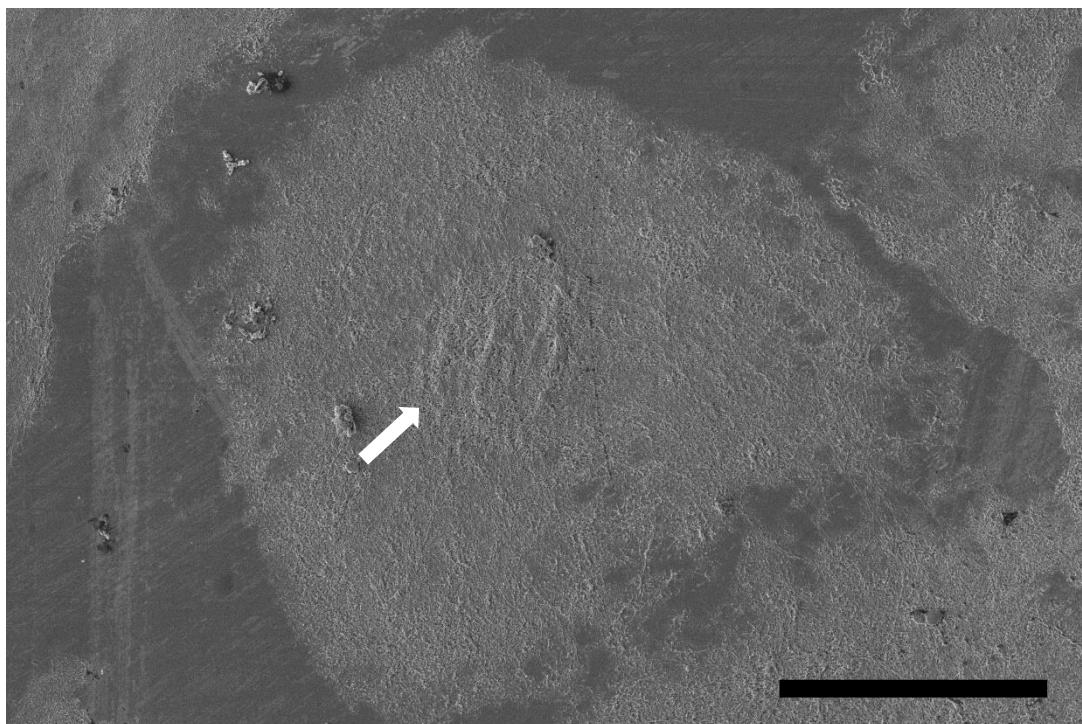
Obr. 6.2.5.4c Profáze I, pachytene. (měřítko 1 μm)



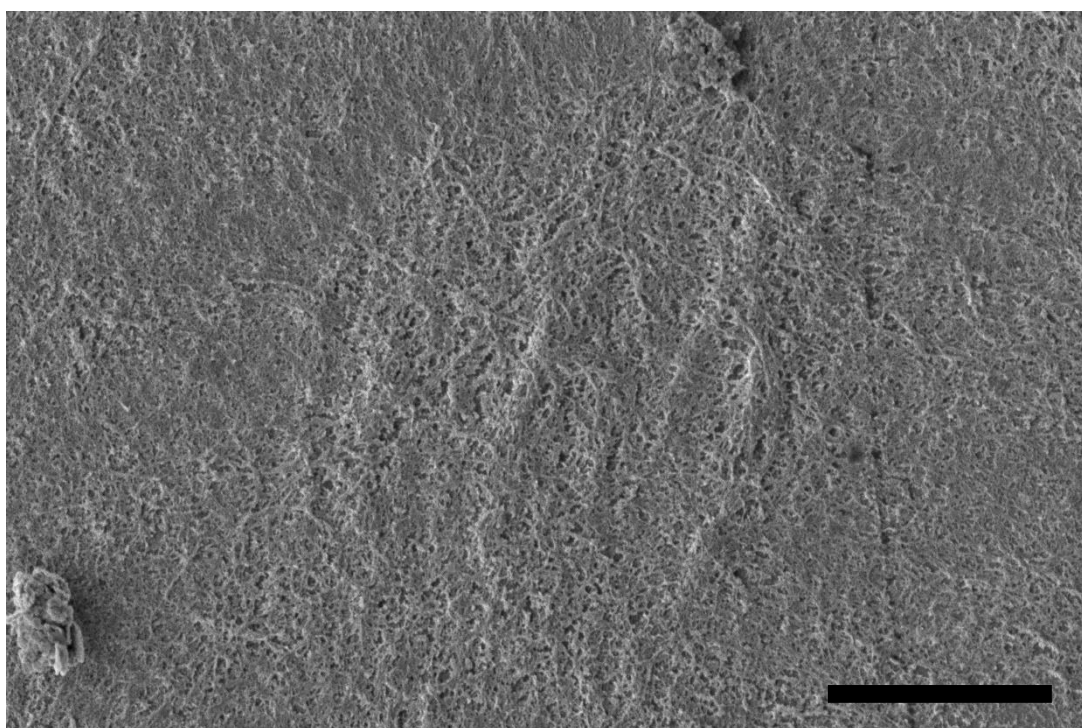
Obr. 6.2.5.4d Profáze I, pachytene. Šipka označuje příčná spojení chromozomů. (měřítko 1 μm)



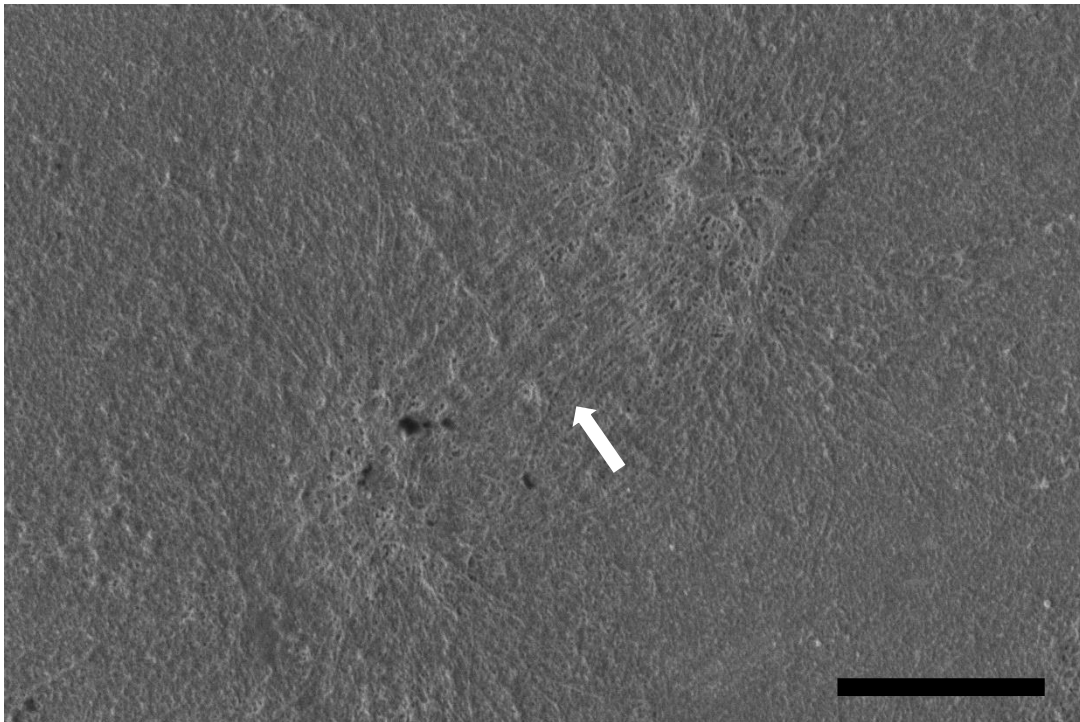
Obr. 6.2.5.5 Profáze II. Cytoplazma byla řádně odmyta a následně byla struktura překryta vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 4 min. (měřítko 10 μm)



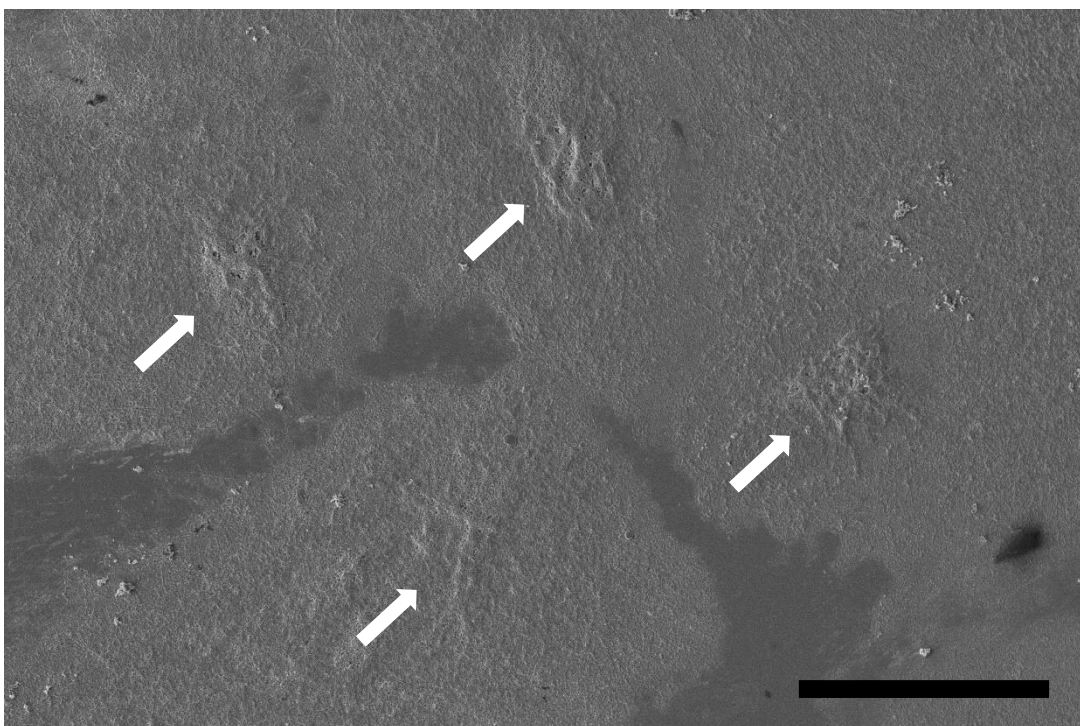
Obr. 6.2.5.6a Metafáze I. Jádru překryto zbytky cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 4 min. (měřítko 20 μm)



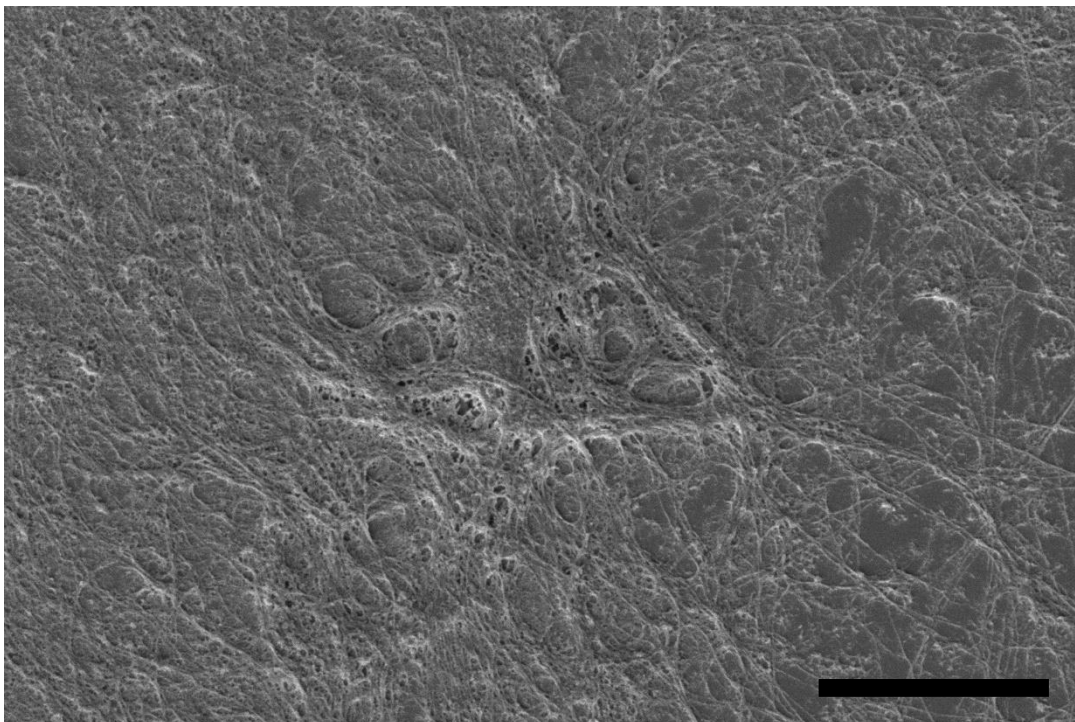
Obr. 6.2.5.6b Metafáze I. (měřítko 5 μm)



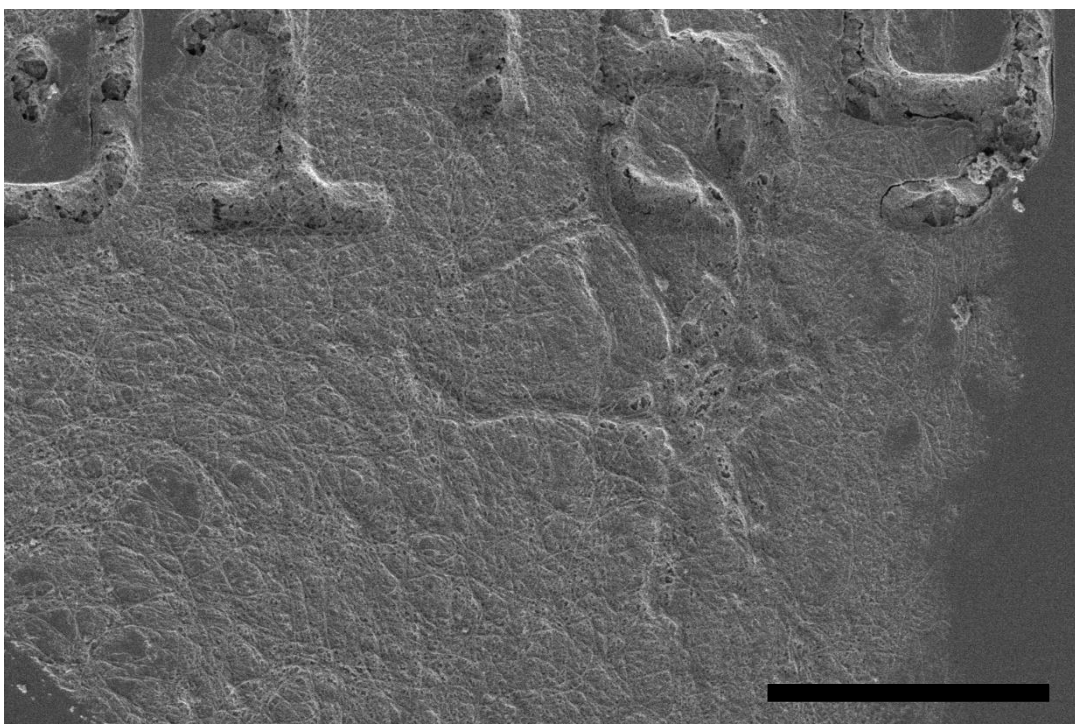
Obr. 6.2.5.7 Anafáze. Chromozomy zploštěné a překryté zbytky cytoplazmy. Mezi chromozomy c opačných pólech buňky je viditelné dělicí vřeténko. Doba působení 60% kyseliny octové: 4 min. (měřítko 5 μm)



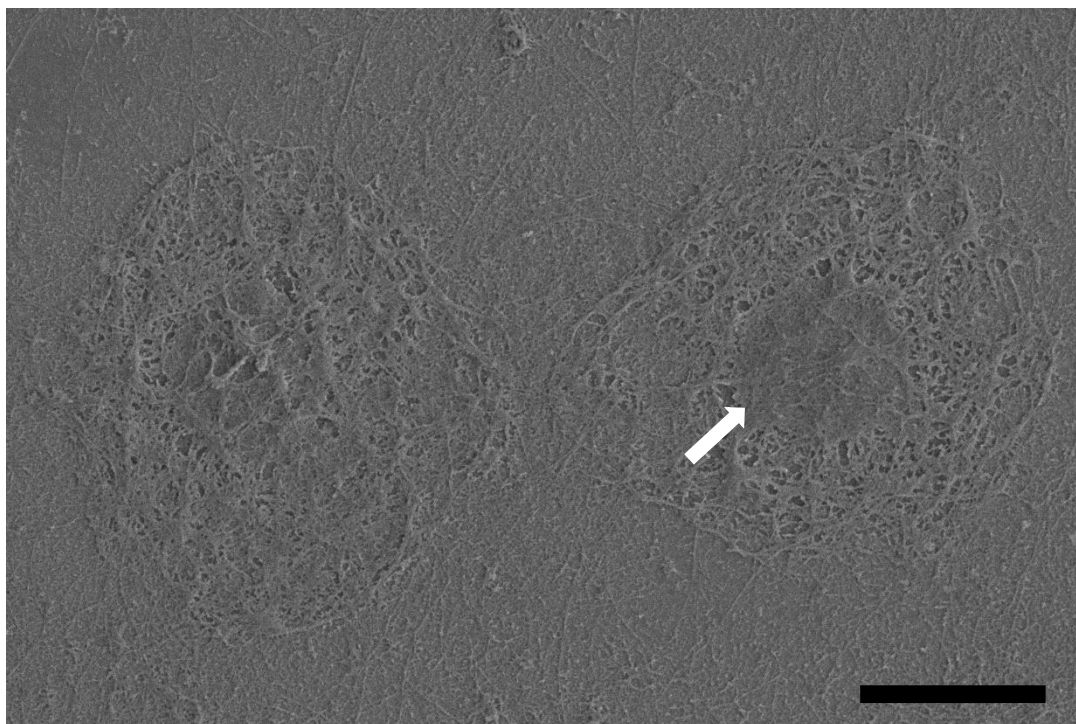
Obr. 6.2.5.8 Profáze I, leptotene/zygotene. Čtyři meiotická jádra překrytá zbytky cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 4 min. (měřítko 20 μm)



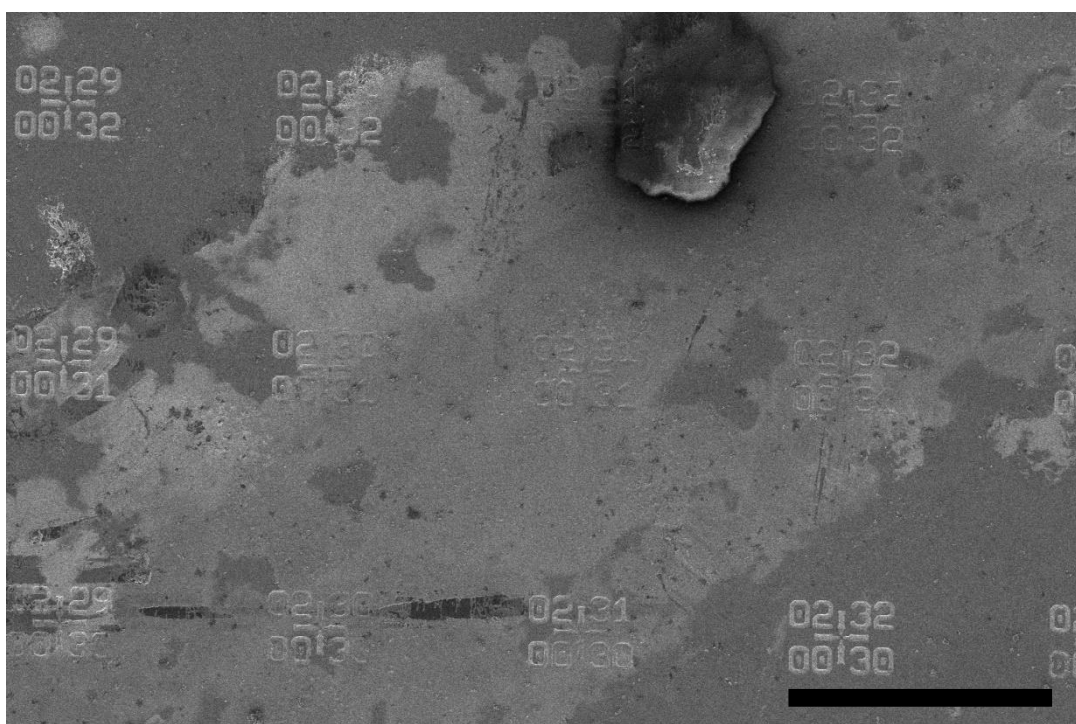
Obr. 6.2.5.9 Profáze I, leptotene/zygotene. Chromozomy částečně zploštěné a překryté zbytky cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min. (měřítko 5 μm)



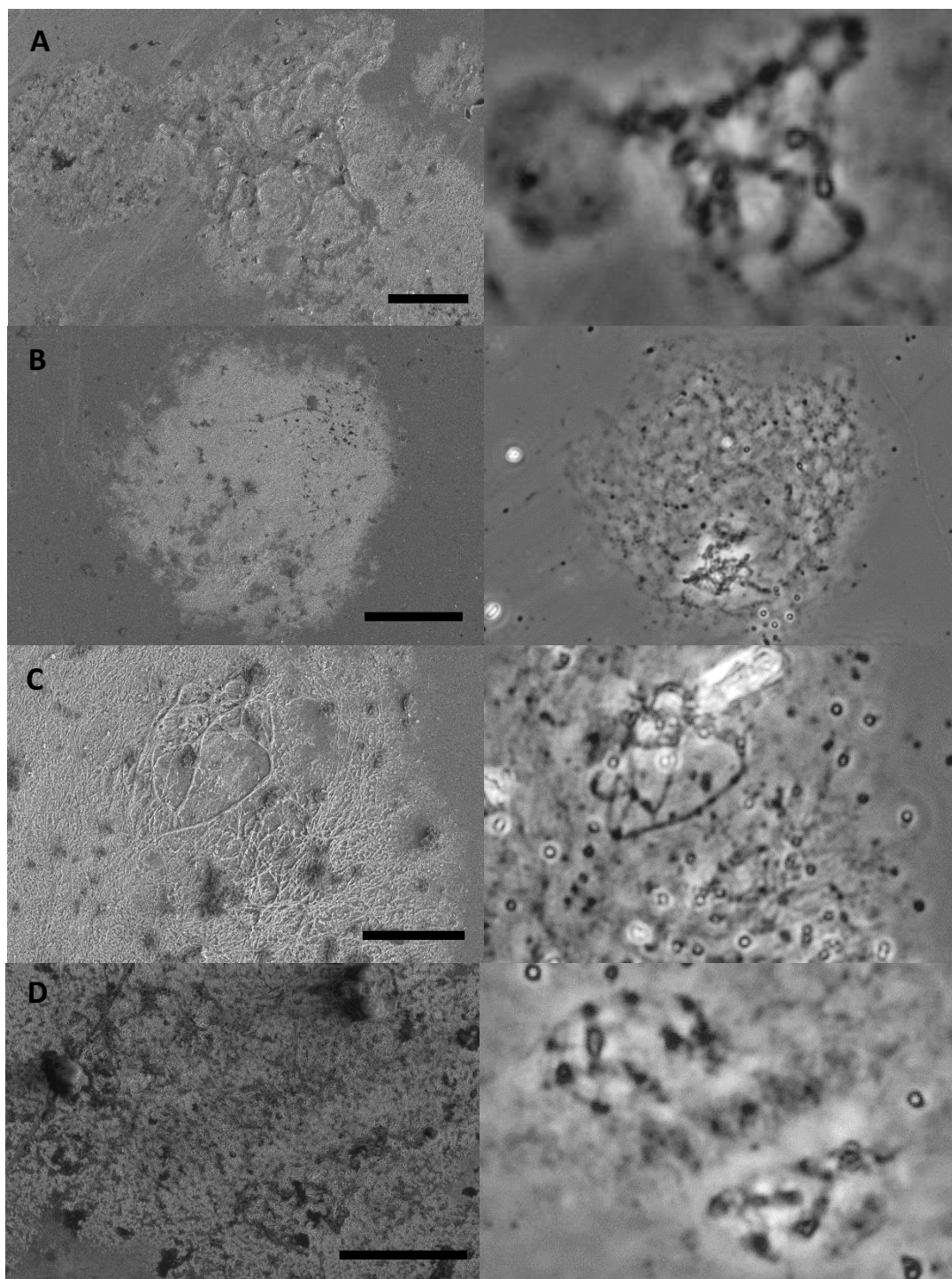
Obr. 6.2.5.10 Profáze I, pachytene. Chromozomy částečně zploštěné a překryté zbytky cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min. (měřítko 10 μm)



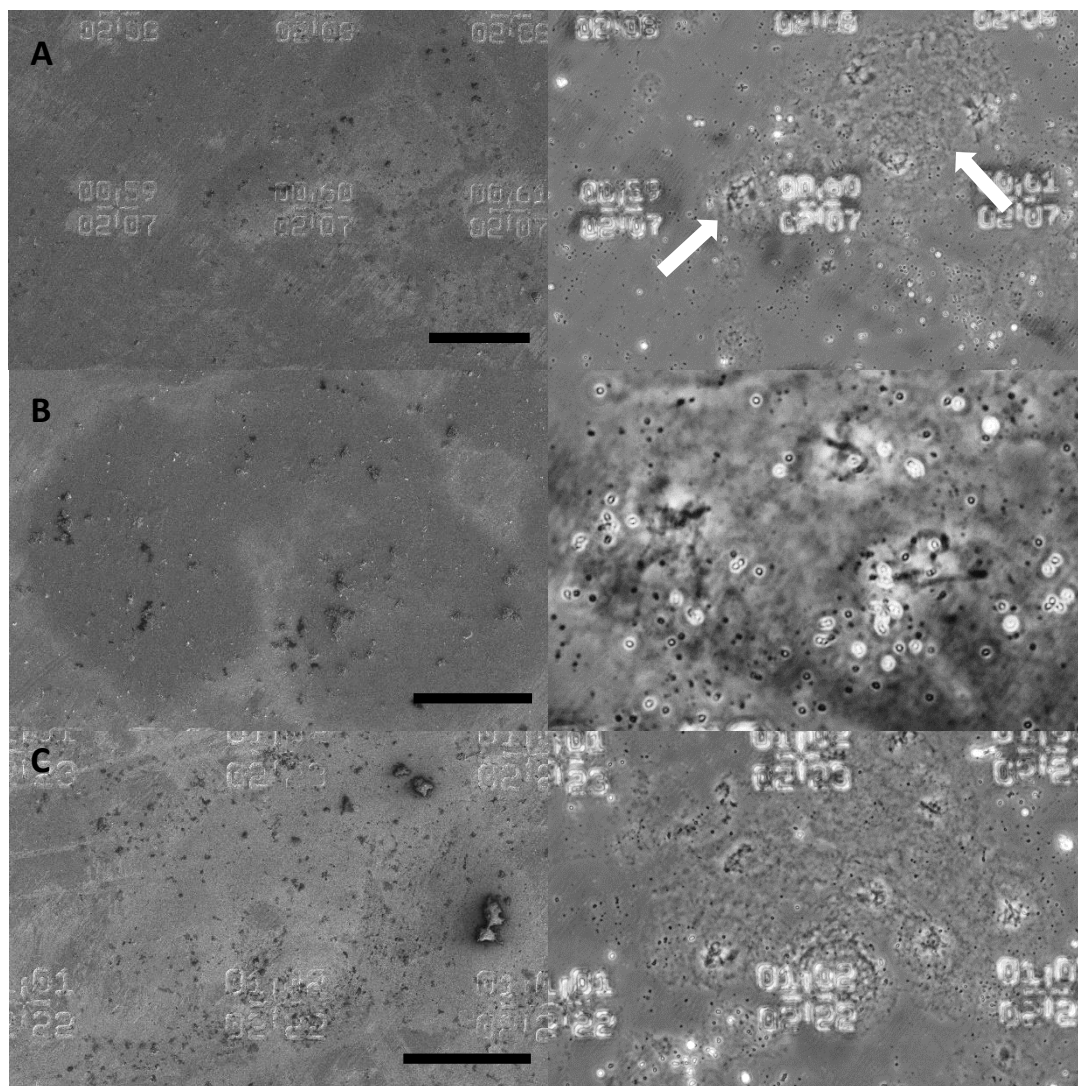
Obr. 6.2.5.11 Cytokineze/diády. V jádrech jsou viditelná jadérka. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min. (měřítko 5 μm)



Obr. 6.2.5.12 Rozhraní kapky, kde bylo fixováno nejvíce buněk. Jejich struktura byla plochá a překrytá vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 7 min. (měřítko 100 μm)



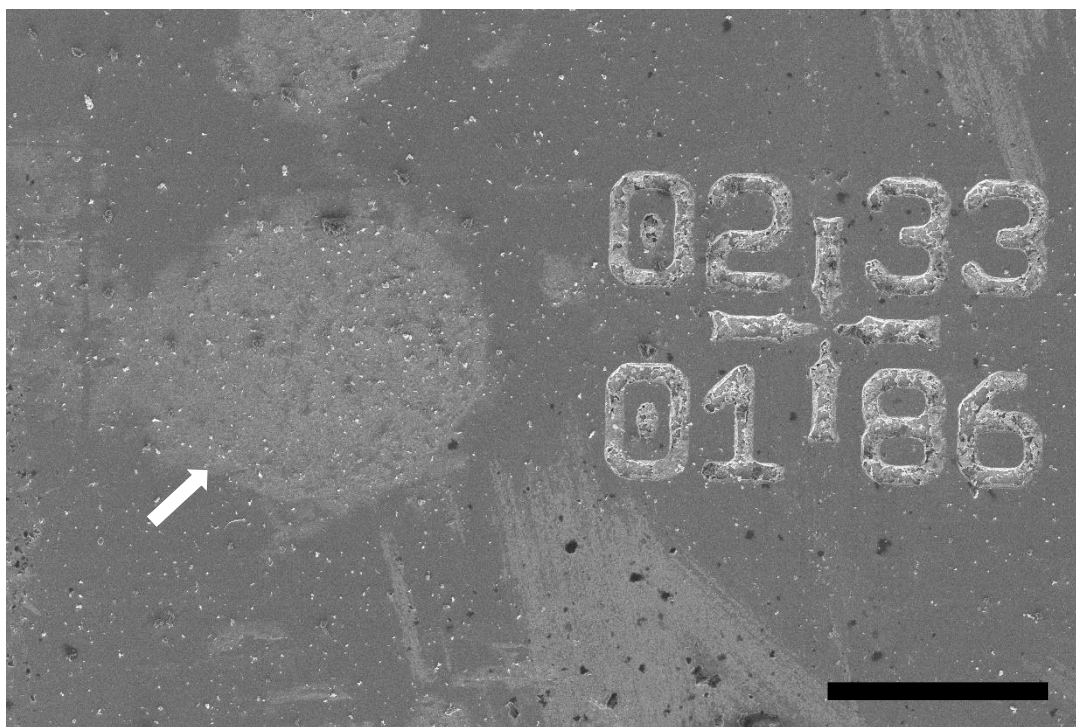
Obr. 6.2.5.13 Srovnání SEM (vlevo) a fázového kontrastu. A – obr. 6.2.5.1, B – obr. 6.2.5.3, C – obr. 6.2.5.4, D – obr. 6.2.5.5 (měřítko A 5 μm , B 20 μm , C, D 10 μm)



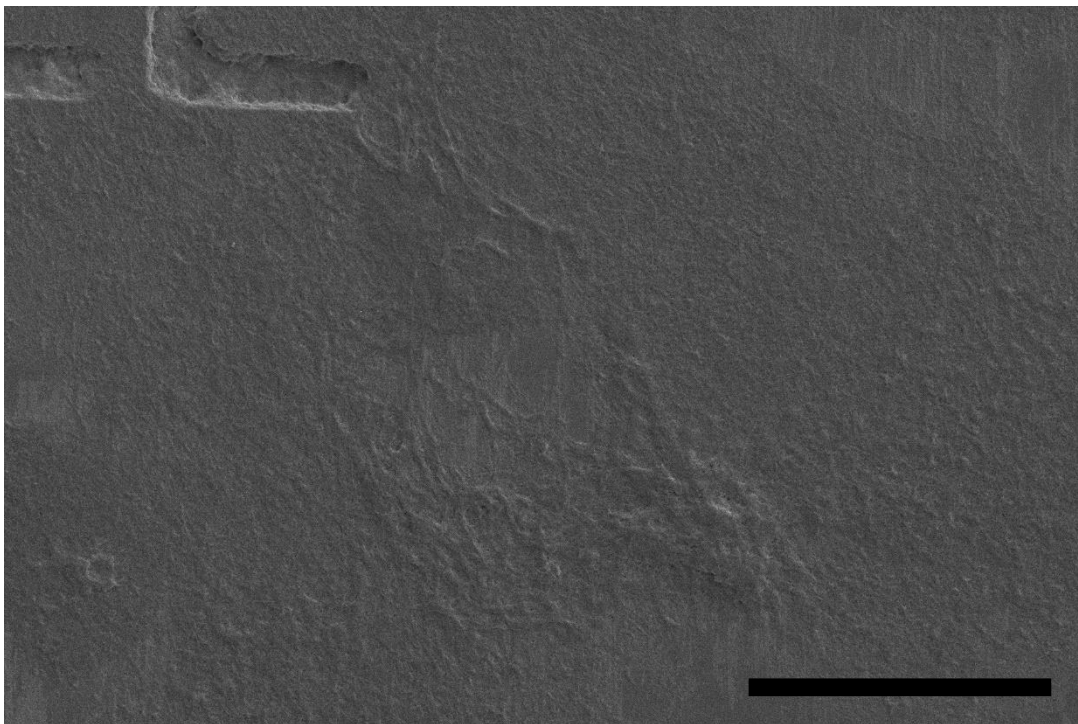
Obr. 6.2.5.14 Srovnání SEM (vlevo) a fázového kontrastu. Meiotická jádra (profáze I) nejsou díky překrytí struktur pod SEM viditelná (měřítko A, C 50 μm , B 20 μm)

6.2.6 Fixace před lyzí cytoplazmy

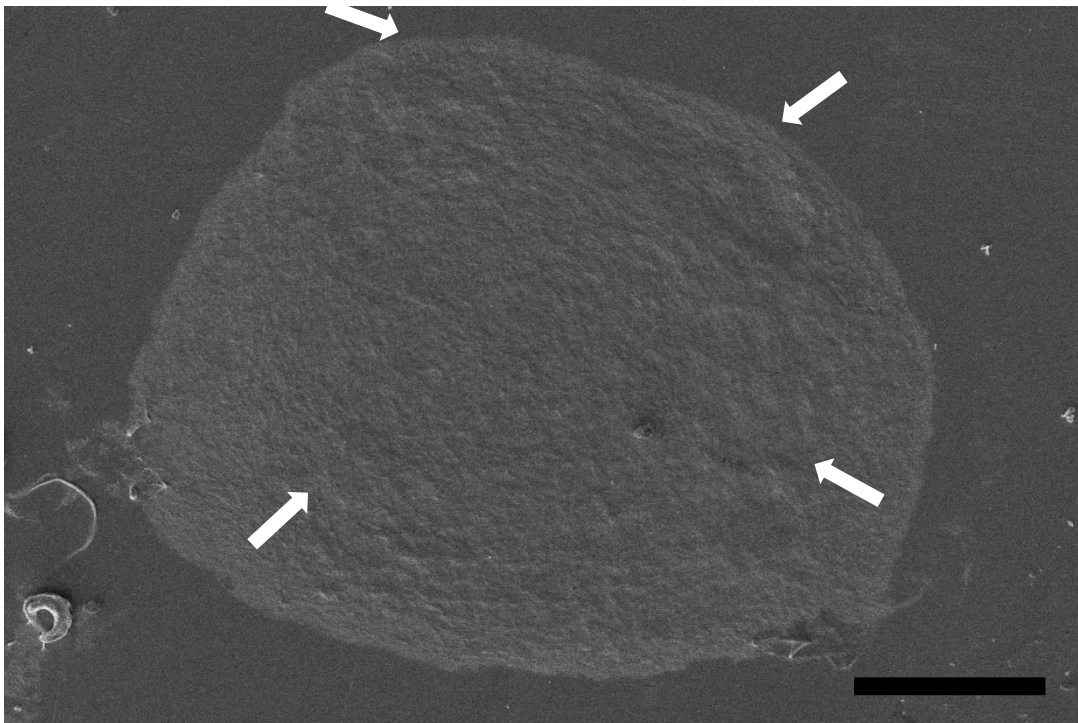
Spread chromozomů a lyze cytoplazmy: Natrávená květenství byla přenesena na sklíčka, kde byla pomocí preparační jehly rozsuspendována. Následně byla na sklíčka nakápnuta Carnoyova fixáž (20-50 μ l), nejprve několik kapek kolem suspenze a poslední do kapky suspenze. Těsně před odparem fixáže byla na sklíčka nakápnuta 45%/60% kyselina octová, tak aby byla většina sklíčka kapkou překryta. Následoval roztěr kapky jako v kapitole „základní postup“ nebo byla kapka kyseliny octové ponechána na buňky působit jako v kapitole „inkubace s kyselinou octovou“. Poté byl vzorek ihned přenesen do 2,5% roztoku glutaraldehydu. Dále bylo postupováno od „odmývacího kroku č.1“ uvedeno v kapitole 5.5.



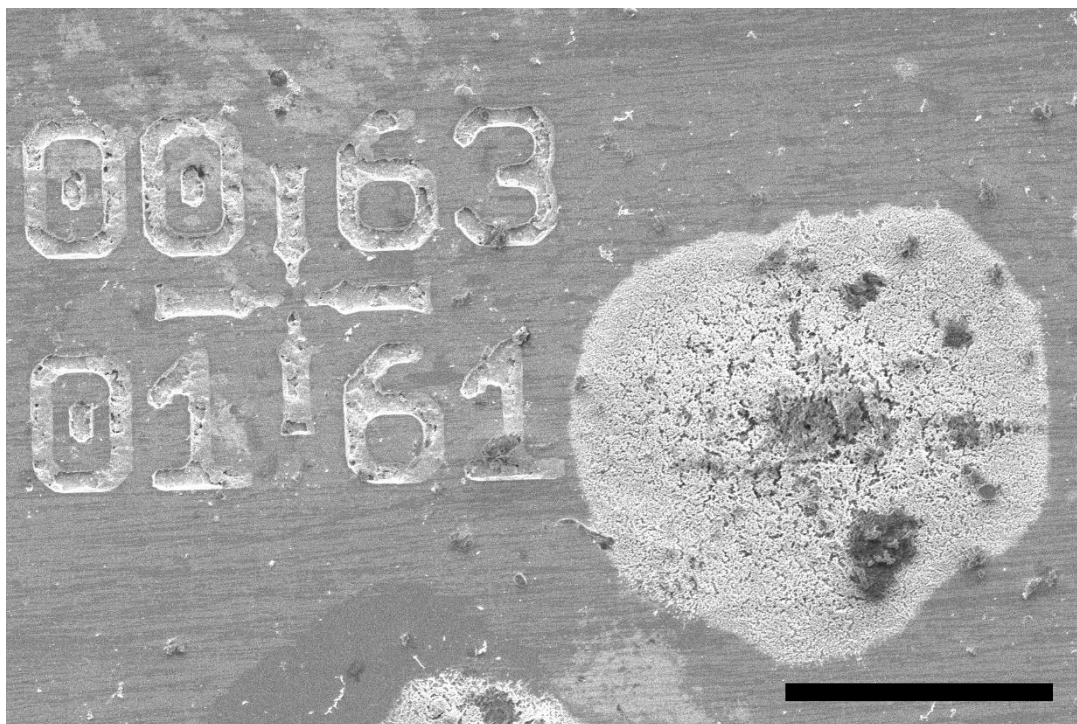
Obr. 6.2.6.1 Buňka fixovaná pod vrstvou. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min (měřítko 20 μ m)



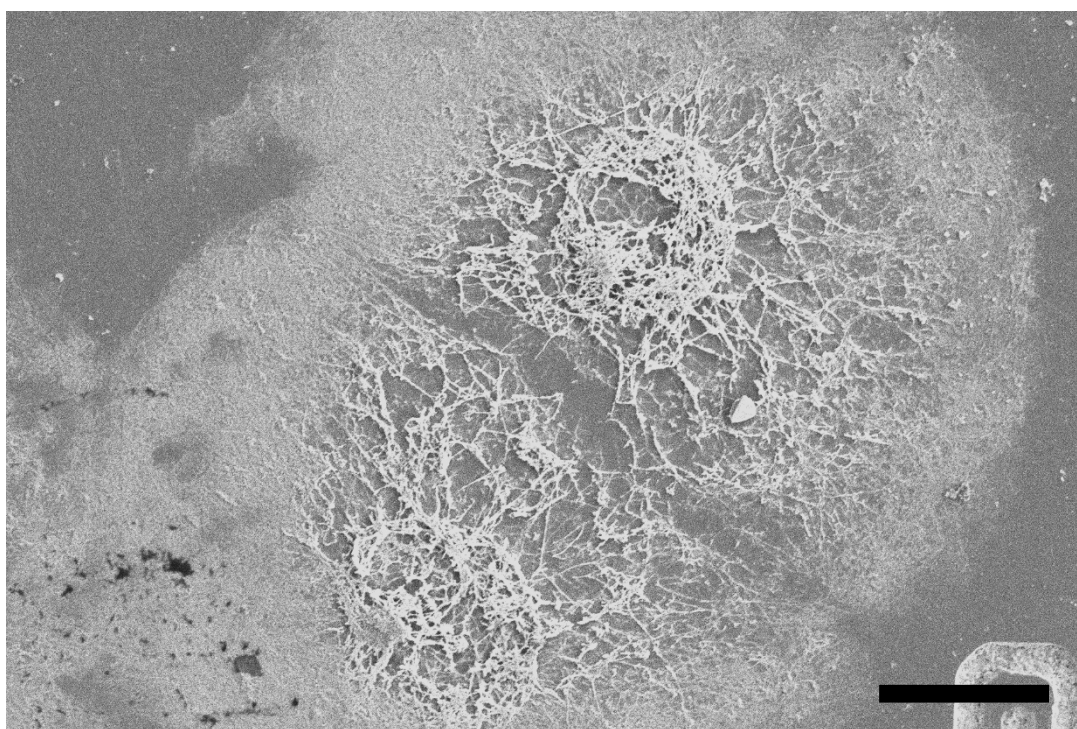
Obr. 6.2.6.2 Profáze I. Chromozomy jsou pod vrstvou a silně zploštěné. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min. (měřítko 10 μm)



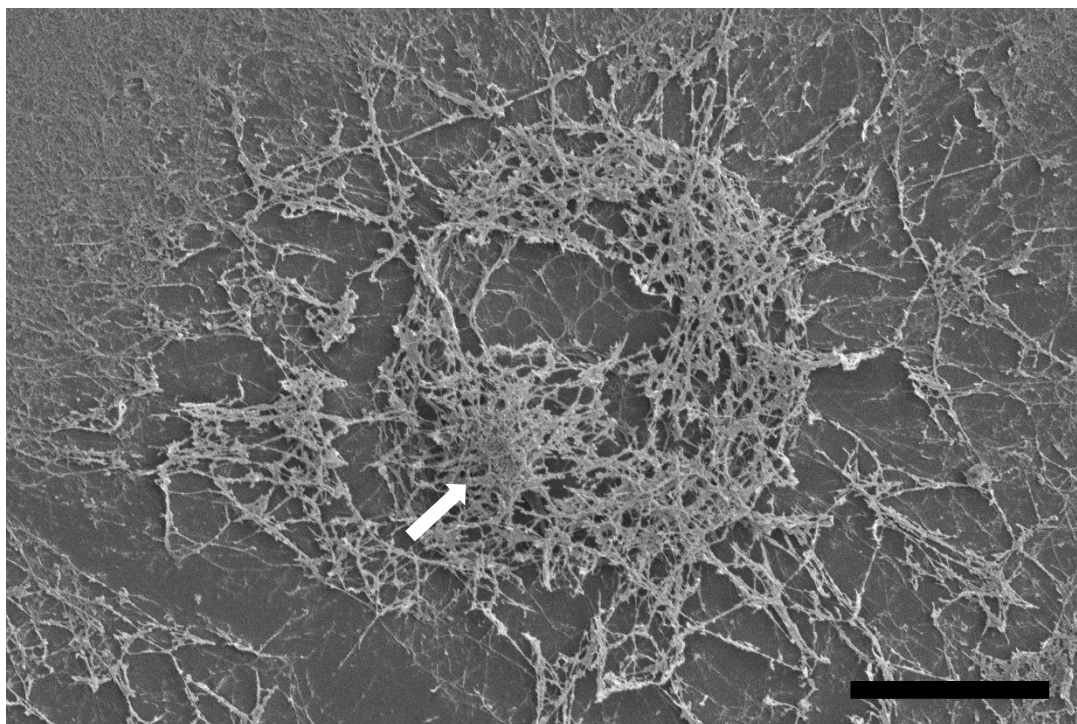
Obr. 6.2.6.3 Cytokineze II, čtyři haploidní jádra překryta cytoplazmou. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min (měřítko 10 μm)



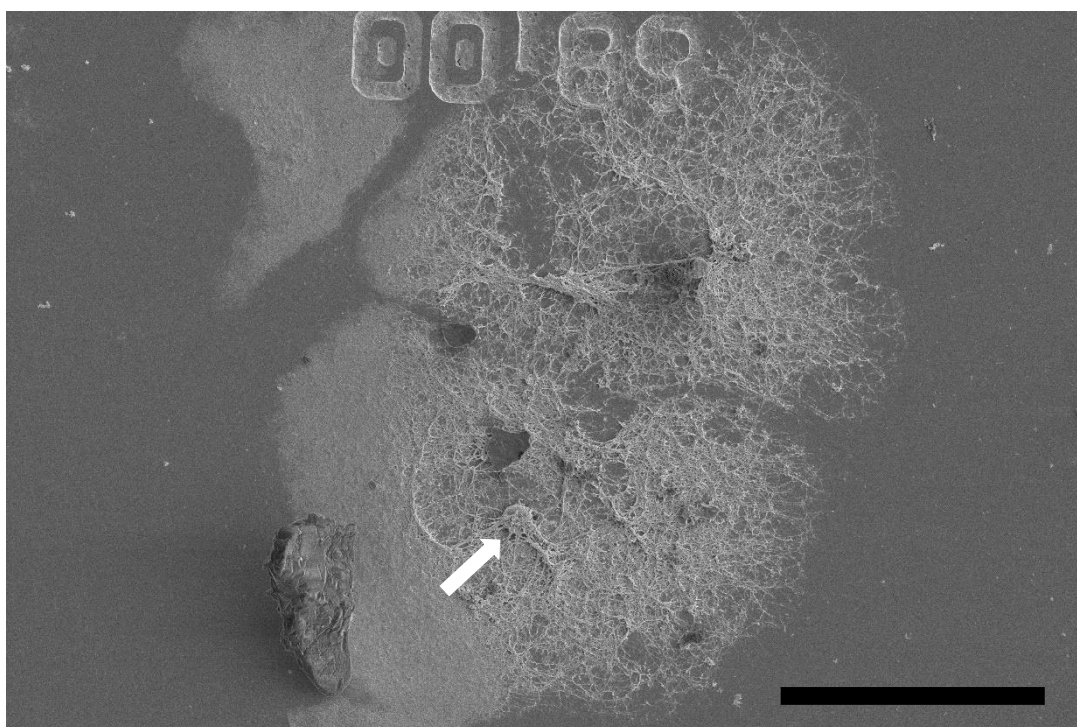
Obr. 6.2.6.4 Buňka bez odmyté cytoplazmy. Doba působení 60% kyseliny octové: 5 min (měřítko 20 μm)



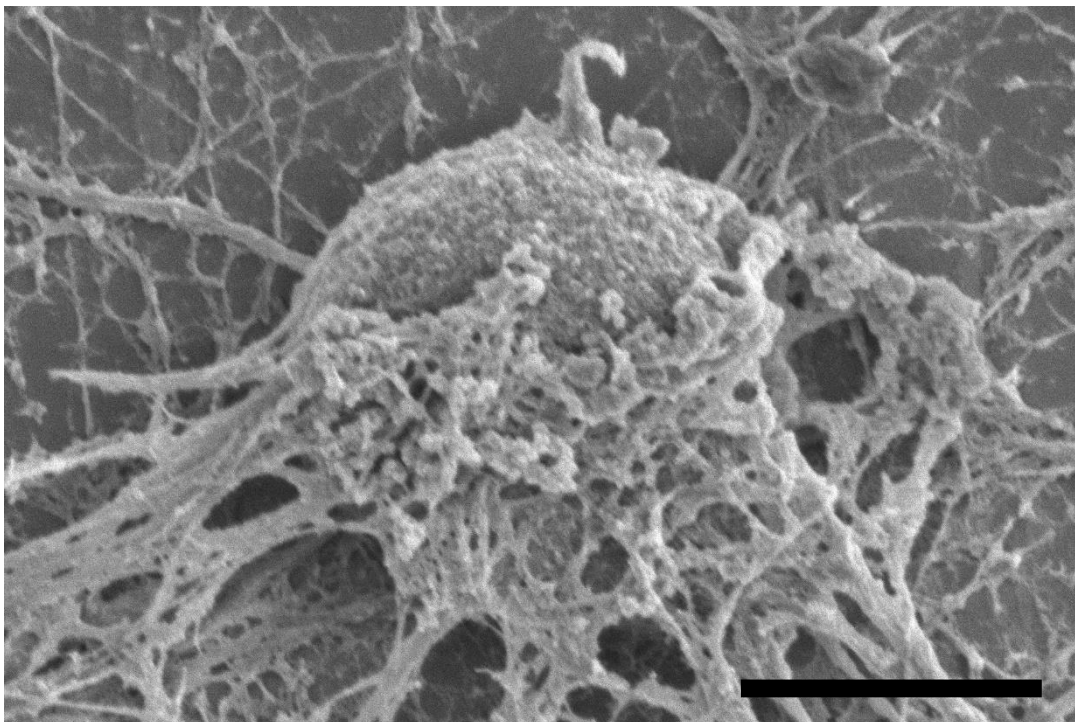
Obr. 6.2.6.5a Diády, v jádrech jsou viditelná jádérka. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 10 μm)



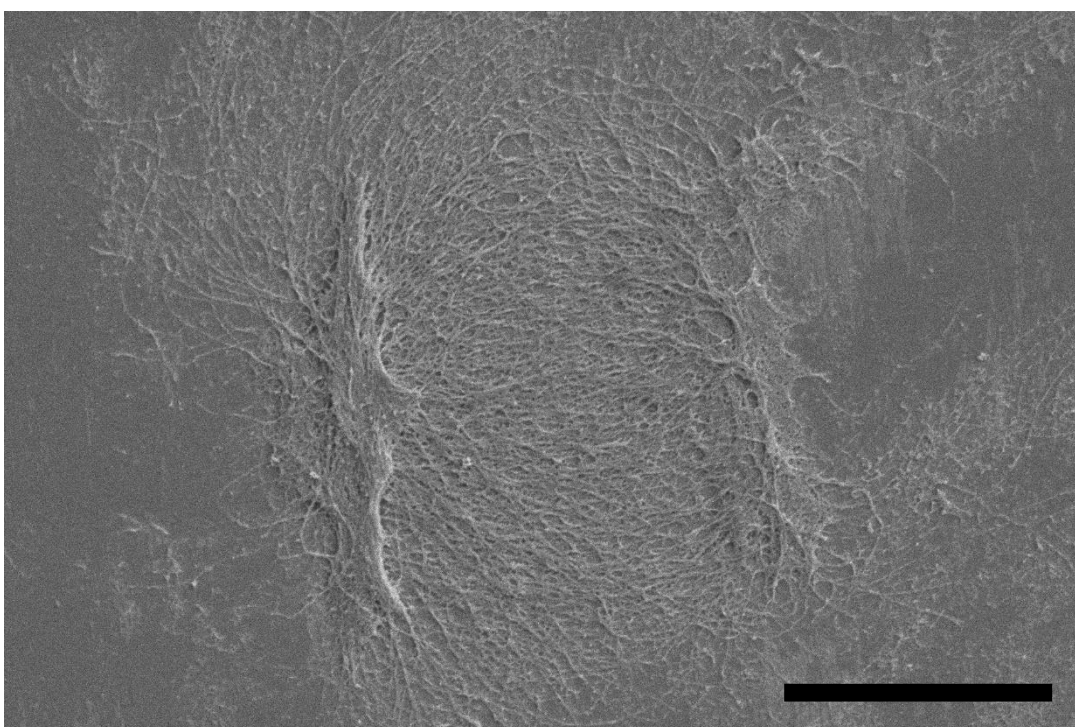
Obr. 6.2.6.5b Diády, v jádrech jsou viditelná jadérka. (měřítko 5 μm)



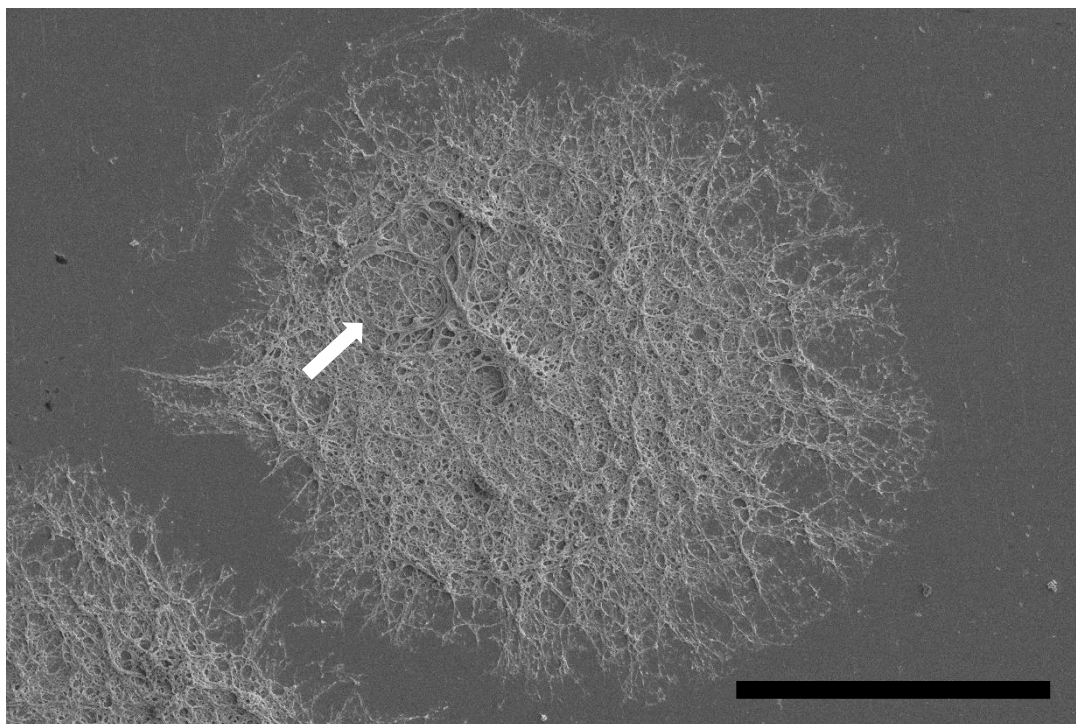
Obr. 6.2.6.6a Diády, v jádrech jsou viditelná jadérka. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 30 μm)



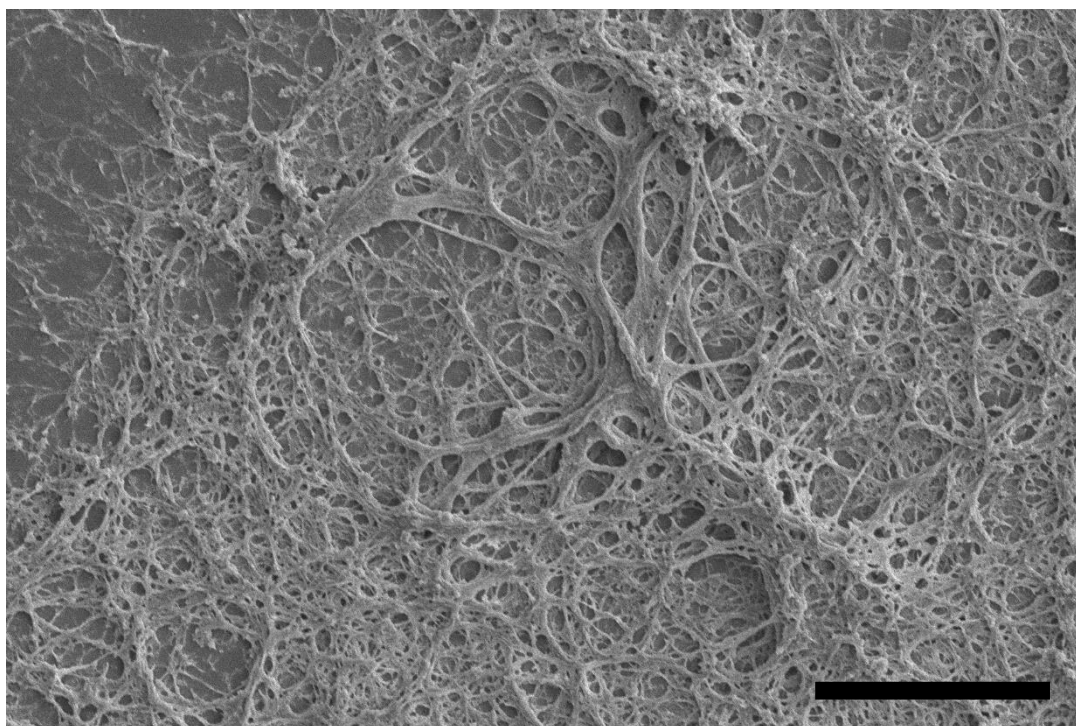
Obr. 6.2.6.6b Jadérko. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 2 μm)



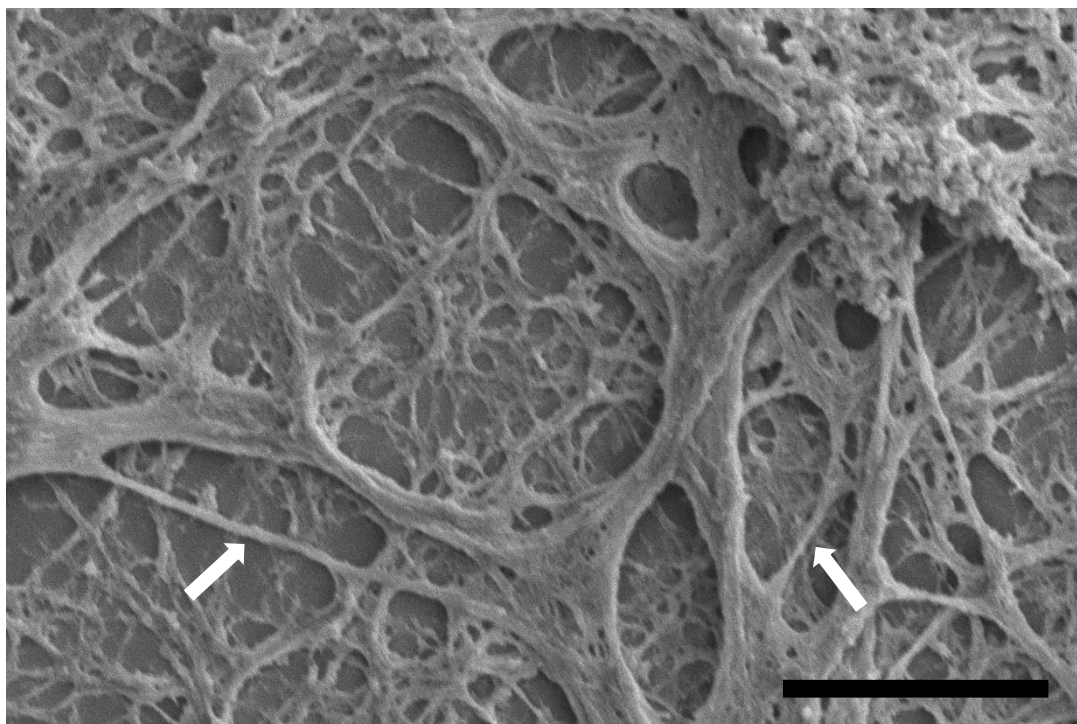
Obr. 6.2.6.7 Anafáze. Mezi chromozomy v opačných pólech je jasně viditelné dělicí vřeténko. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 5 μm)



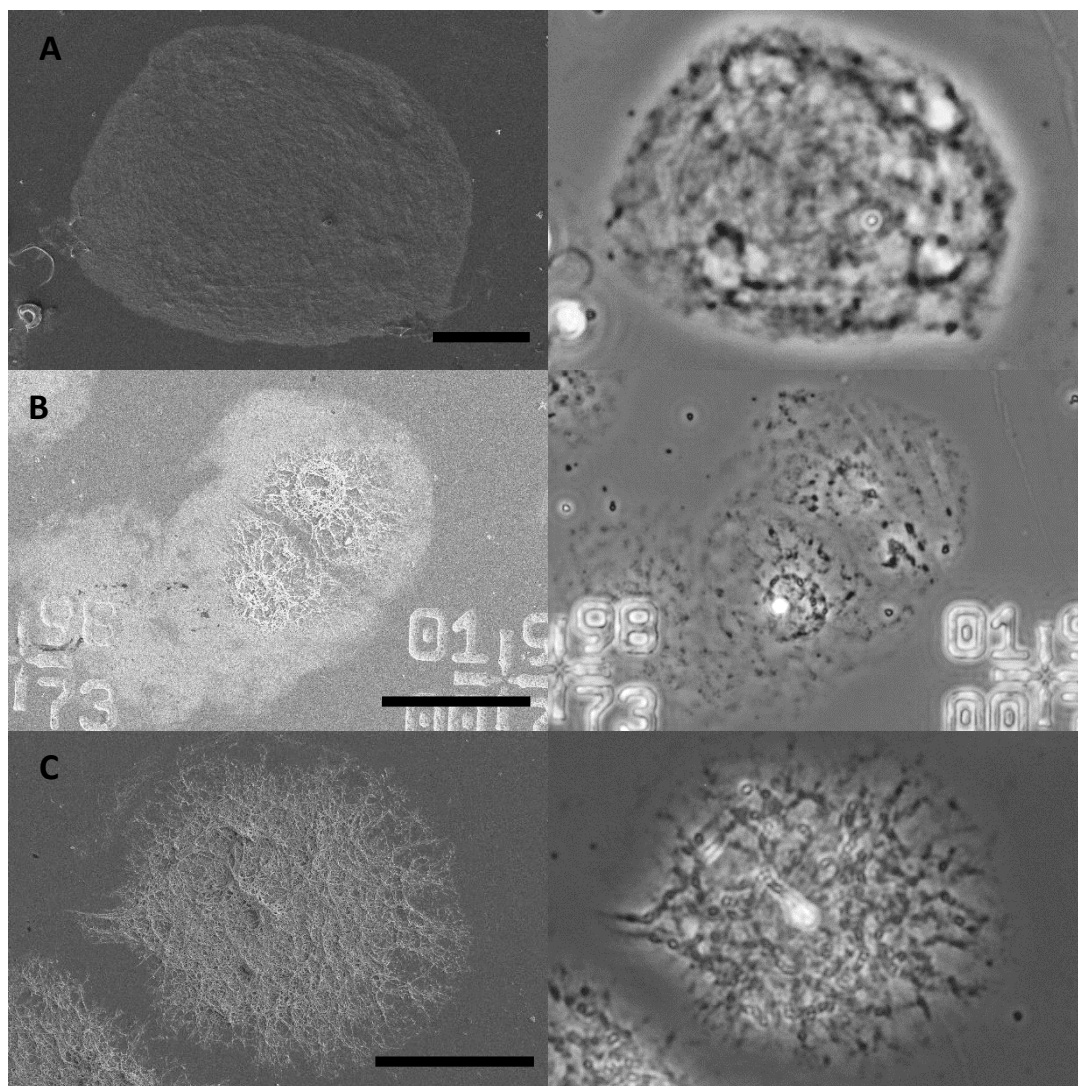
Obr. 6.2.6.8a Interfázní jádro s počátkem kondenzace chromatinu. Doba působení 60% kyseliny octové: 2 min. (měřítko 20 μm)



6.2.6.8b Kondenzace chromatinu. (měřítko 5 μm)



6.2.6.8c Jsou viditelná příčná spojení mezi chromozomy. (měřítko 2 μm)



Obr. 6.2.6.9 Srovnání SEM (vlevo) a fázového kontrastu. A – obr. 6.2.6.3, B – obr. 6.2.6.5, C – obr. 6.2.6.8 (měřítko A, 10 μm , B 30 μm , C 20 μm)

7 Diskuze

Během optimalizace se ukázalo, že nejproblematictějšími kroky jsou ty, během kterých dochází k překrytí pozorovaných struktur vrstvou. Pouze několika nanometrová vrstva může znemožnit pozorování struktur pod SEM. Pro vznikání vrstev jsou nejkritičtější kroky, během kterých dochází k nechtěnému vyschnutí, respektive chtěnému (během fixace) v kroku spread a lyze cytoplazmy. Při vysychání vzorků na vzduchu také dochází ke zploštění sledovaných struktur (Sugiyama *et al.*, 2004; Wanner a Schroeder-Reiter, 2008). Proto jsem v popisu jednotlivých obrázků v kapitole výsledky zdůrazňoval detaily týkající se tohoto kroku. Zjistil jsem, že takto mohou vznikat dva až tři typy vrstev. První a druhý typ vzniká při odparu fixačního činidla, kyseliny octové nebo Carnoyovy fixáže. Třetím typem jsou nedokonale odstraněné buněčné obaly (Allen *et al.*, 1988; Sumner, 1991). U všech zvolených postupů docházelo ke vzniku alespoň jednoho typu z těchto vrstev. Při sledování pod SEM bylo často obtížné určit, o který typ vrstvy se jedná. I když se během lyze cytoplazmy lišil čas působení kyseliny octové, zdá se, že pro některé buňky byla dostatečná doba 30 s, u některých buněk nedošlo k lyzi cytoplazmy ani po 5 min. Delší působení na strukturu chromozomů pravděpodobně nemělo vliv, nicméně se tak zvyšovala pravděpodobnost vzniku vrstvy/vrstev.

Z počátku práce na diplomové práci se mi nedařilo připravit preparáty s fixovanými meiotickými buňkami, nebyly pozorovány ani pod fázovým kontrastem. Problémem bylo krátké působení pektolytických enzymů při trávení buněčných stěn (3 h). Suspenze z takto připravených květenství sice vznikala, ale pravděpodobně pouze ze zbytků květních obalů. Pro trávení buněčných stěn prašníků, tak aby z nich vznikala suspenze, bylo potřeba tento krok prodloužit (3,5-5 h). Při delším trávení (7-8 h) docházelo ke ztrátám materiálu. Dlouhé působení pektolytických enzymů pravděpodobně narušuje integritu chromozomů.

7.1 Postup podle R. Martin *et al.*

Nejprve jsem se pokusil zopakovat ověřený postup podle R. Martin *et al.* (1994). Tento postup neposkytuje přesné informace pro jeho reprodukci u důležitých kroků jako je lyze cytoplazmy, resp. délka působení kyseliny octové na vzorek. Nicméně pro zjednodušení jsem během tohoto postupu nepoužil drop techniku, ale squash techniku, suspenze tak nebyla předem fixována v Carnoyově fixáži. I přes rozdílnou dobu působení kyseliny octové nedocházelo k úplnému odstranění buněčných obalů a struktury se zdály být deformované (Obr. 6.2.1.1–

6.2.1.3). K deformacím docházelo při odstranění krycího sklíčka. Na preparátech se také fixovalo mnohem větší množství zbytků buněk/debris, než během jiných postupů (Obr. 6.2.1.2, 6.2.1.5, 6.2.1.6). Toto mohlo být způsobeno tím, že se fixací za mrazu dusíkem fixuje větší množství materiálu. Docházelo také ke tvorbě vrstvy překrývající buňky (Obr. 6.2.1.4 a 6.2.1.5). Ta se ale nacházela spíše v okrajových oblastech plochy, která byla překryta krycím sklíčkem. Vrstva tedy pravděpodobně vznikla vyschnutím fixačního činidla, či kyseliny octové ještě před ponořením preparátu do tekutého dusíku.

7.2 Základní postup

Během tohoto postupu byly struktury často překryty vrstvou. Ta vzniká při roztěru suspenze krouživým pohybem preparační jehlou při 50 °C. Každým pohybem/kroužkem tak potenciálně může vznikat nová vrstva (Obr. 6.2.2.1). Viditelnost struktur nacházejících se pod vrstvou tak závisí na její tloušťce, resp. počtu vrstev (Obr. 7.1). Na obrázku 6.2.2.2 je viditelný pouze obrys buňky, nachází se tedy pod více vrstvami než buňka na obrázku 6.2.2.3. Je také možné pozorovat struktury, které jsou z části trojrozměrné a z části zploštěné, tedy pod vrstvou fixačního činidla či nedokonale odstraněné cytoplazmy (Obr. 6.2.2.4). Na preparátech byly pozorovány buňky s různým stupněm odmytí cytoplazmy (Obr. 6.2.2.5–6.2.2.9). Na obrázku 6.2.2.10 je viditelné mitotické jádro s řádně odmytou cytoplazmou. U některých figur je zřejmé, že došlo nejprve k řádnému odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou, což vedlo ke zploštění a zhoršené viditelnosti struktury chromozomů (Obr. 6.2.2.11 a 6.2.2.12). U jiných je obtížně určitelné, zda se jedná o zbytky buněčných obalů, či o překrytí umělé vrstvou (Obr. 6.2.2.13–6.2.2.16). Na obrázku 6.2.2.17 je potom viditelné meiotické jádro (diplotene), kde jsou buněčné obaly odstraněny, nicméně struktura je spíše zploštěná, pravděpodobně krátkým přischnutím na vzduchu. Nejlepším výsledkem tohoto postupu je interfázní jádro s kompletně odstraněnými buněčnými obaly. Je viditelná struktura chromatinu. Chromatinová vlákna mají nepravidelnou tloušťku s globulárními strukturami, kde došlo k vyššímu stupni kondenzace chromatinu (Obr. 6.2.2.18) (Iwano *et al.*, 1997).

7.3 Překrytí krycím sklem

Překrytím krycím sklem mělo předcházet tvorbě vrstvy přisycháním kyseliny octové, nicméně může docházet ke ztrátám materiálu, dochází totiž k fixaci buněk i na krycí sklo. Odstranění krycího skla také vedlo k deformaci pozorovaných struktur, podtlak vznikající při odstranění krycího sklíčka vede k vytažení buněk a „srolování“ jejich obalů (Obr. 6.2.3.1–6.2.3.4). Kyselina octová totiž změkčuje, k vytvoření fixovaných struktur dochází až při fixaci Carnoyovou fixází. Ta ale před odstraněním krycího skla ke vzorku proniknout nemohla, jelikož přischlá kyselina octová vytváří na okrajích krycího sklíčka bariéru. Buňky, které nebyly zdeformované měly řádně odmyté buněčné obaly. Chromozomy tak byly dobře viditelné (Obr. 6.2.3.5 a 6.2.3.6).

7.4 Prodloužení působení kyseliny octové

V předchozích postupech se často fixovaly buňky, které měly buněčné obaly odstraněné jen z části anebo vůbec (Obr. 6.2.2.5 – 6.2.2.8.). Tento problém jsem se pokusil odstranit delším působením kyseliny octové na suspenzi buněk. Tato skutečnost ale vedla pouze ke vzniku většího počtu vrstev (Obr. 6.2.4.1 – 6.2.4.3.). Celková kvalita preparátu byla špatná a nalezení buněk nenacházejících se pod vrstvou bylo vzácné (Obr. 6.2.4.4).

7.5 Inkubace s kyselinou octovou

Při podpoření aktivity k. octové (50 °C) se zvyšuje pravděpodobnost překrytí chromozomů vrstvou. Takto nevznikala vrstva po celém povrchu preparátu. Většina buněk se takto fixovala na okraji kapky (Obr. 6.2.5.12). Nejlepší výsledek poskytly preparáty, které byly nejprve inkubovány s kyselinou octovou a následoval rychlý roztěr při 50 °C. Fotky pořízené z jednoho preparátu (Obr. 6.2.5.1 – 6.2.5.4) ukazují různý stupeň odmytí cytoplazmy, překrytí a zploštění, nicméně většina buněk nebyla fixována na okraji kapky kyseliny octové. K fixaci těchto buněk došlo pravděpodobně až při rychlém roztěru při 50 °C, to zároveň způsobilo rozdílný stupeň viditelnosti/překrytí sledovaných struktur. Na obrázku 6.2.5.5 je částečně viditelná profáze II, zde došlo nejprve k odmytí cytoplazmy a následnému překrytí vrstvou a zploštění. Narozdíl od obrázků 6.2.5.6 – 6.2.5.10, kde nedošlo k úplnému odstranění

cytoplazmy. Na obrázku 6.2.5.11 jsou viditelné diády s řádně odstraněnými buněčnými obaly, došlo ale ke zploštění struktur vlivem vyschnutí na vzduchu během fixace, v jádrech jsou také viditelná jadérka. Srovnání snímků pořízených na fázovém kontrastu a SEM poukazují na to, že často pozorovatelná meiotická jádra pod fázovým kontrastem nejsou vůbec viditelná pod SEM (Obr.6.2.5.14). Důvodem je opět překrytí vrstvou. J.F. Zoller *et al.*, (2004b) pozorovali ve fázi zygotene/pachytene příčná spojení homologních chromozomů jako na obrázku 6.2.5.4 .

7.6 Fixace před lyzí cytoplazmy

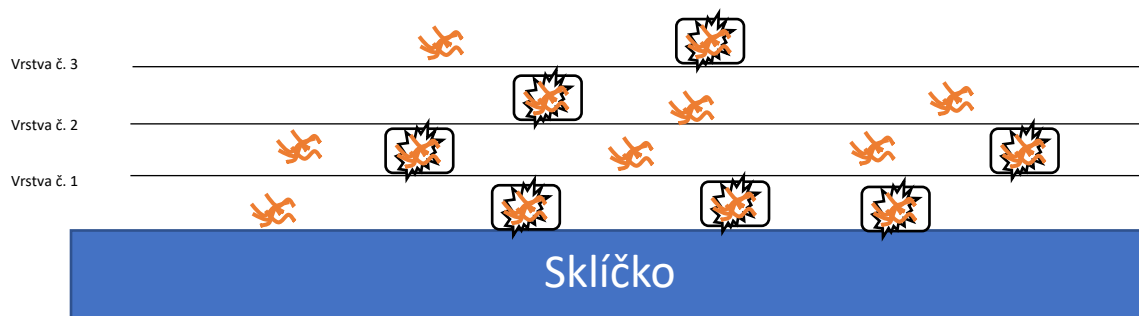
Zde byla snaha buňky nejprve zafixovat a až poté odstranit cytoplazmu. Tímto jsem částečně vyřešil problém s fixací buněk pouze na okraji kapky. Carnoyovu fixáž při fixaci buněk jsem nechal částečně odpařit, kyselinu octovou jsem na preparát nanesl ještě před přisycháním fixáže, nicméně během tohoto postupu vznikala vrstva rozdílná od předešlých postupů (Obr. 7.2). Tato vrstva vznikala pravděpodobně esterifikací kyseliny octové (Obr. 6.2.6.1 a 6.2.6.2) (Wanner a Schroeder-Reiter, 2008). Jako u předchozích postupů také u některých buněk nebyla odmyta cytoplazma (Obr. 6.2.6.3 a 6.2.6.4). Většinou ale byly buňky fixovány na povrchu preparátu (Obr. 6.2.6.5 – 6.2.6.8). V jádrech diád na obrázcích 6.2.6.5 a 6.2.6.6 jsou jasně viditelná jadérka. Na obrázku 6.2.6.8 je viditelné interfázní jádro s počátkem kondenzace chromatinu, opět jsou viditelná příčná spojení chromozomů (Zoller *et al.*, 2004b). V anafázním jádře na obrázku 6.2.6.7 je podobně jako na obrázku 6.2.5.7 viditelné dělicí vřeténko. Kyselina octová na struktury dělicího vřeténka nepůsobí nebo působí méně.

Během mé práce jsem si často kladl otázky, proč u jiných prací nemají jejich autoři problém s úplným překrytím chromozomů vrstvami (Wanner *et al.*, 2015; Zoller *et al.*, 2004a, 2004b). Rozdílem je často práce s rostlinami, které mají mnohem větší genom/chromozomy než *Arabidopsis thaliana*. Větší plocha chromozomu by tak mohla mít vyšší pravděpodobnost adheze na povrch sklíčka během fixace. Dále překrytí vrstvou nemusí v tak velké míře jako u malých chromozomů způsobit horší pozorovatelnost.

Dále se mi podařilo zachytit meiotické buňky zejména v profázi I. Profáze I trvá z celého meiotického cyklu nejdelší dobu, proto bylo pravděpodobné, že se buňky budou nacházet nejčastěji v této fázi.

Vzorky pro SEM jsem pro srovnání také fotil pod fázovým kontrastem (Obr. 6.2.5.13, 6.2.5.14, a 6.2.6.9). Dále jsem chtěl preparáty nafotit pod fluorescenčním mikroskopem. To ale

nebylo možné, jelikož se DAPI na chromozomy nenavázala. Neschopnost vazby DAPI může být způsobena tenkou vrstvou kovu, přes kterou DAPI ke vzorku nepronikne anebo vyblokováním stejného vazebného místa při kontrastování vzorků. DAPI i platinová modř se vážou na AT bohatá místa. Barvení chromozomů DAPI je tedy nekompatibilní s jinými technikami, používající kontrastování chromozomů (Sartsanga *et al.*, 2021).



Obr. 7.1 Schéma zobrazující fixaci buněk pod přischlými vrstvami kyseliny octové



Obr. 7.2 Schéma zobrazující vrstvu esterifikace Carnoyovy fixáže. Většina buněk se udržuje na povrchu kapky kyseliny octové, které na jejím okraji přisychají.

Jako další postup navrhuji využití nižších koncentrací kyseliny octové, a tím pádem delší působení na vzorek. S. Sugiyama *et al.*, (2004) testovali efekt kyseliny octové na struktury rostlinných chromozomů. Využili při tom koncentrace 45, 30, a 15 %. Nejlepší výsledky poskytovala koncentrace 30 % u vyšší koncentrace docházelo k poškození chromozomů, u nižších nedocházelo k řádnému odstranění cytozolu. Nicméně vzorky s kyselinou octovou byly inkubovány přes noc, což by značně prodloužilo daný postup. Dále využití rostlinných druhů, které mají větší chromozomy (*Hordeum vulgare*, *Secale cereale*,...) by mohlo vést k lepším výsledkům.

8 Závěr

Nepodařilo se zoptimalizovat postup a připravit vzorky s konzistentními výsledky. Nejkritičtějšími kroky byly lyze cytoplazmy a fixace Carnoyovou fixází, během kterých byly struktury překryty vrstvou. Je zajímavé, že i při rozdílných postupech jsem zachytil chromozomy alespoň částečně viditelné. Jindy zase docházelo i při použití totožného postupu k rozdílným výsledkům. Existuje tedy tenká hranice, kdy jsou buňky fixovány, zároveň mají odstraněné buněčné obaly a chromozomy nejsou překryty vrstvou. Většina použitých postupů má tedy potenciál pro zlepšení a větší konzistentnost výsledků. Další optimalizace by tak mohla vést ke kýženým výsledkům a pozorování chromozomů s vysokým rozlišením i u rostlin s malými chromozomy jako je *Arabidopsis thaliana*.

9 Zdroje:

- Aggarwal, S.K., Wagner, R.W., McAllister, P.K., Rosenberg, B., 1975. Cell-Surface-Associated Nucleic Acid in Tumorigenic Cells Made Visible with Platinum-Pyrimidine Complexes by Electron Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 928. doi: 10.1073/pnas.72.3.928
- Alberts, B., Kotyk, A., 2004. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vyd. ed. Espero Publishing.
- Allen, T.D., Jack, E.M., Harrison, C.J., Claugher, D., 1988. The three dimensional structure of human metaphase chromosomes determined by scanning electron microscopy. *Chromosom. Chromatin* 2, 51–72.
- Allen, T.D., Jack, E.M., Harrison, C.J., Claugher, D., 1986. Scanning electron microscopy of human metaphase chromosomes. *Scan. Electron Microsc.* 301–308.
- Ambros, P. F., Matzke, M. A., Matzke, A. J. M., 1986 Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 94, 11–18. doi: 10.1007/BF00293525
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., Moudrianakis, E.N., 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10148–10152. doi: 10.1073/pnas.88.22.10148
- Bai, X., Peirson, B.N., Dong, F., Xue, C., Makaroff, C.A., 1999. Isolation and Characterization of SYN1, a RAD21-like Gene Essential for Meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 417–430. doi: 10.1105/tpc.11.3.417
- Baker, J.R., 1933. *Cytological Technique*. Cytol. Tech. Methuen.
- Baldwin, E.A., Pressey, R., 1989. Pectic enzymes in pectolyase: separation, characterization, and induction of ethylene in fruits. *Plant Physiol.* 90, 191–196. doi: 10.1104/pp.90.1.191
- Ball, P., 2003. Portrait of a molecule. *Nature* 421, 421–422. doi: 10.1038/nature01404
- Bhat, T.A., Wani, A.A., 2017. *Chromosome Structure and Aberrations*. [online], Springer eBooks. Springer India.
- Bhatt, A.M., Lister, C., Page, T., Fransz, P., Findlay, K., Jones, G.H., Dickinson, H.G., Dean, C., 1999. The DIF1 gene of Arabidopsis is required for meiotic chromosome

- segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 19, 463–472. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00548.x
- Elbouami F., 2001. Isolation and regeneration of protoplasts from mycelium of *Fusarium solani*. *Afr. Crop Sci. J.*, 9, 351–358. doi: 10.4314/acsj.v9i2.27605
- Boveri, T., 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur analyse des zellkerns. *Verh. d. phys.med. Ges. Würzburg N. F.* 35, 67–90
- Cai, X., Dong, F., Edelman, R.E., Makaroff, C.A., 2003. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *J. Cell Sci.* 116, 2999–3007. doi: 10.1242/jcs.00601
- Carnoy, J.B., 1886 La cvtodierê se de l’oeuf. *Cellule* 3, 1–92.
- Chalkley, R., Hunter, C., 1975. Histone-Histone Propinquity by Aldehyde Fixation of Chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1304–1308. doi: 10.1073/pnas.72.4.1304
- Chapman, G.P., Cooke, S.A., 1983. A technique for optical and electron microscopy of isolated plant chromosomes. *Protoplasma* 116, 198–200. doi: 10.1007/BF01279838
- Choi, K., Zhao, X., Kelly, K.A., Venn, O., Higgins, J.D., Yelina, N.E., Hardcastle, T.J., Ziolkowski, P.A., Copenhaver, G.P., Franklin, F.C.H., McVean, G., Henderson, I.R., 2013. Arabidopsis meiotic crossover hotspots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.* 45. doi: 10.1038/ng.2766
- Clarke, J.A.L., Solly, S., 1851. XXVI. Researches into the structure of the spinal chord. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 141, 607–621. doi: 10.1098/rstl.1851.0029
- Cuvier, O., Hirano, T., 2003. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J. Cell Biol.* 160, 645–655. doi: 10.1083/jcb.200209023
- Dawe, R.K., Sedat, J.W., Agard, D.A., Cande, W.Z., 1994. Meiotic chromosome pairing in maize is associated with a novel chromatin organization. *Cell* 76, 901–912. doi: 10.1016/0092-8674(94)90364-6
- Dillé, J.E., Bittel, D.C., Ross, K., Gustafson, J.P., 1990. Preparing plant chromosomes for scanning electron microscopy. *Genome.* 33, 333–339. doi: 10.1139/g90-052
- Falconi, M., Teti, G., Lanciotti, C., Galanzi, A., Mazzotti, G., 2006. High resolution morphological analysis of in situ human chromosomes. *Micron* 37, 146–153. doi:10.1016/j.micron.2005.08.008

- Finch, J.T., Klug, A., 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 1897–1901. doi: 10.1073/pnas.73.6.1897
- Fischer, A., 1899. *Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas: kritische Untersuchungen über Technik und Theorie in der neueren Zellforschung.* Fischer.
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., Benavente, R., 2012. The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp. Cell Res.* 318, 1340–1346. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.018
- Goldstein, J.I., Newbury, D.E., Michael, J.R., Ritchie, N.W.M., Scott, J.H.J., Joy, D.C., 2017. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.* Springer.
- Golubovskaya, I.N., Hamant, O., Timofejeva, L., Wang, C.-J.R., Braun, D., Meeley, R., Cande, W.Z., 2006. Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase I. *J. Cell Sci.* 119, 3306–3315. doi: 10.1242/jcs.03054
- Hadlaczký, G., Bisztray, G., Praznovszky, T., Dudits, D., 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta* 157, 278–285. doi: 10.1007/BF00405195
- Hanks, S., Gollin, S., Rao, P., Wray, W., Hittelman, W., 1983. Cell cycle-specific changes in the ultrastructural organization of prematurely condensed chromosomes. *Chromosoma* 88, 333–342. doi: 10.1007/BF00285856
- Hermann, R., Muller, M., 1991. Prerequisites of High-Resolution Scanning Electron-Microscopy. *Scanning Microsc.* 5, 653–664.
- Hudson, D.F., Marshall, K.M., Earnshaw, W.C., 2009. Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 17, 131–144. doi: 10.1007/s10577-008-9009-7
- Iwano, M., Fukui, K., Takaichi, S., Isogai, A., 1997. Globular and Fibrous Structure in Barley Chromosomes Revealed by High-Resolution Scanning Electron Microscopy. *Chromosome Res.* 5, 341–349. doi: 10.1023/B:CHRO.0000038766.53836.c3
- Johnson, T.J.A., 1985. Aldehyde fixatives: Quantification of acid-producing reactions. *J. Electron Microsc.* Tech. 2, 129–138. doi: 10.1002/jemt.1060020204
- K850 Critical Point Dryer Quorum Technologies, URL <https://www.quorumtech.com/quorum-product/k850-critical-point-dryer> (cit. 12.16.19).

- Kashtwari, M., Zargar, S.A., & Wani, A.A., 2017. Laboratory Techniques of Studying Plant Chromosomes. In *Chromosome Structure and Aberrations*. Springer, New Delhi. doi: 10.1007/978-81-322-3673-3_4
- Kättström, P.O., Nilsson, B.O., 1992. Preparation of Human Chromosomes for High Resolution Scanning Electron Microscopy. *Arch. Histol. Cytol.* 55, 53–56. doi:10.1679/aohc.55.Suppl_53
- Keeney, S., 2008. Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn. Stab.* 2, 81–123. doi: 10.1007/7050_2007_026
- Kerzendorfer, C., Vignard, J., Pedrosa-Harand, A., Siwiec, T., Akimcheva, S., Jolivet, S., Sablowski, R., Armstrong, S., Schweizer, D., Mercier, R., Schlögelhofer, P., 2006. The *Arabidopsis thaliana* MND1 homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination. *J. Cell Sci.* 119, 2486–2496. doi: 10.1242/jcs.02967
- Khursheed, A., 2011. Scanning electron microscope optics and spectrometers. World scientific. doi: 10.1142/7094.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K., Nasmyth, K., 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98, 91–103. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80609-1
- Köpf-Maier, P., Köpf, H., 1986. Cytostatische Platin-Komplexe: eine unerwartete Entdeckung mit weitreichenden Konsequenzen. *Naturwissenschaften* 73, 239. doi: 10.1007/BF00367775
- Kuo, J., 2014. *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, 3rd ed, Methods in Molecular Biology. Humana Press. doi: 10.1007/978-1-62703-776-1
- Loidl, J., 2011. Synaptonemal complex spreading in *Allium*. II. Tetraploid *A. vineale*. *Can. J. Genet. Cytol.* doi: 10.1139/g86-106
- Losada, A., Hirano, T., 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19, 1269–1287. doi: 10.1101/gad.1320505
- Luckner, M., Wanner, G., 2018. From Light Microscopy to Analytical Scanning Electron Microscopy (SEM) and Focused Ion Beam (FIB)/SEM in Biology: Fixed Coordinates, Flat Embedding, Absolute References. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* 24, 526–544. doi: 10.1017/S1431927618015015

- Mainiero, S., Pawlowski, W.P., 2014. Meiotic chromosome structure and function in plants. *Cytogenet. Genome Res.* 143, 6–17. doi: 10.1159/000365260
- Malick, L.E., Wilson, R.B., Stetson, D., 1975. Modified Thiocarbohydrazide Procedure for Scanning Electron Microscopy: Routine use for Normal, Pathological, or Experimental Tissues. *Stain Technol.* 50, 265–269. doi: 10.3109/10520297509117069
- Mandáková, T., Lysak, M., 2016. Chromosome Preparation for Cytogenetic Analyses in *Arabidopsis*. *Curr. Protoc. Plant Biol.* 1, 43–51. doi: 10.1002/cppb.20009
- Martin, R., Busch, W., Herrmann, R.G., Wanner, G., 1996. Changes in chromosomal ultrastructure during the cell cycle. *Chromosome Res.* 4, 288–294. doi: 10.1007/BF02263679
- Martin, R., Busch, W., Herrmann, R. G., and Wanner, G., 1995. In situ hybridization and signal detection by high resolution scanning electron microscopy. Kew Chromosome Conference IV, 159–166, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Martin, R., Busch, W., Herrmann, R.G., Wanner, G., 1994. Efficient preparation of plant chromosomes for high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res.* 2, 411–415. doi: 10.1007/BF01552801
- Maruyama, K., 1983. Stereoscopic scanning electron microscopy of the chromosomes in *Vicia faba* (broad beans). *J. Ultrastructure Res.* 82, 322–326. doi: 10.1016/s0022-5320(83)80019-7
- Miao, C., Tang, D., Zhang, H., Wang, M., Li, Y., Tang, S., Yu, H., Gu, M., Cheng, Z., 2013. Central region component1, a novel synaptonemal complex component, is essential for meiotic recombination initiation in rice. *Plant Cell* 25, 2998–3009. doi: 10.1105/tpc.113.113175
- Heneen, W.K., 1981 Mitosis as discerned in the scanning electron microscope. *J. Cell Biol.* 2, 242–7. Nagai, S., Inoue, T., Iino, A., 1982. Fibrous structure of human chromosomes observed by scanning electron microscopy. *Cytobios* 34, 35–44.
- Nasmyth, K., Haering, C.H., 2005. The Structure and Function of Smc and Kleisin Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 595–648. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219
- Olins, A.L., Olins, D.E., 1974. Spheroid Chromatin Units (v Bodies). *Science* 183, 330–332. doi: 10.1126/science.183.4122.330

- Osman, K., Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H., 2011. Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 190, 523–544. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03665.x
- Pischinger, A., 1937. Untersuchungen über die Kernstruktur, Besonders über die Beziehungen zwischen Struktur im Leben und nach Fixierung. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 26, 249–280. doi: 10.1007/BF00375464
- Remeseiro, S., Losada, A., 2013. Cohesin, a chromatin engagement ring. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 63–71. doi: 10.1016/j.ceb.2012.10.013
- Reznik, N.A., Yampol, G.P., Kiseleva, E.V., Khristolyubova, N.B., Gruzdev, A.D., 1991. Functional and structural units in the chromomere. *Genetica* 83, 293–299. doi: 10.1007/BF00126235
- Ris, H., 1985. The cytoplasmic filament system in critical point-dried whole mounts and plastic-embedded sections. *J. Cell Biol.* 100, 1474–1487. doi: 10.1083/jcb.100.5.1474
- Ris, H., Witt, P.L., 1981. Structure of the mammalian kinetochore. *Chromosoma* 82, 153–170. doi: 10.1007/BF00286101
- Rosa, M., Von Harder, M., Cigliano, R.A., Schlögelhofer, P., Mittelsten Scheid, O., 2013. The *Arabidopsis* SWR1 chromatin-remodeling complex is important for DNA repair, somatic recombination, and meiosis. *Plant Cell* 25, 1990–2001. doi: 10.1105/tpc.112.104067
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229–257. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
- Sartsanga, C., Phengchat, R., Fukui, K., Wako, T., Ohmido, N., 2021. Surface structures consisting of chromatin fibers in isolated barley (*Hordeum vulgare*) chromosomes revealed by helium ion microscopy. *Chromosome Res.* 29, 81–94. doi: 10.1007/s10577-021-09649-2
- Schatten, H., 2012. *Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences, Advances in Microscopy and Microanalysis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schatten, H., 2011. Low voltage high-resolution SEM (LVHRSEM) for biological structural and molecular analysis. *Micron* 42, 175–185. doi: 10.1016/j.micron.2010.08.008
- Schatten, H., Pawley, J.B., 2008. *High-Resolution, Low Voltage, Field-Emission Scanning Electron Microscopy (HRLVFESEM) Applications for Cell Biology and Specimen*

- Preparation Protocols. In *Biological Low-Voltage Scanning Electron Microscopy*. Springer, New York, NY.
- Schommer, C., Beven, A., Lawrenson, T., Shaw, P., Sablowski, R., 2003. AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in Arabidopsis meiosis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 36, 1–11. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01850.x
- Schroeder-Reiter, E., Pérez-Willard, F., Zeile, U., Wanner, G., 2009. Focused ion beam (FIB) combined with high resolution scanning electron microscopy: A promising tool for 3D analysis of chromosome architecture. *J. Struct. Biol.* 165, 97–106. doi: 10.1016/j.jsb.2008.10.002
- Scott L. Page, R. Scott Hawley, 2003. Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet. *Science* 301, 785. doi: 10.1126/science.1086605
- Seligman, A.M., Wasserkrug, H.L., Hanker, J.S., 1966. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid containing membranes and droplets in osmium tetroxide fixed tissue with osmiophilic thiocarbonylhydrazide(TCH). *J. Cell Biol.* 30, 424–432. doi: 10.1083/jcb.30.2.424
- Shao, T., Tang, D., Wang, K., Wang, M., Che, L., Qin, B., Yu, H., Li, M., Gu, M., Cheng, Z., 2011. OsREC8 is essential for chromatid cohesion and metaphase I monopolar orientation in rice meiosis. *Plant Physiol.* 156, 1386–1396. doi: 10.1104/pp.111.177428
- She, W., Grimanelli, D., Rutowicz, K., Whitehead, M.W.J., Puzio, M., Kotlinski, M., Jerzmanowski, A., Baroux, C., 2013. Chromatin reprogramming during the somatic-to-reproductive cell fate transition in plants. *Dev. Camb. Engl.* 140, 4008–4019. doi: 10.1242/dev.095034
- Snustad, D.P., Simmons, M.J., Relichová, J., 2017. Genetika, Druhé, aktualizované vydání. ed. Masarykova univerzita.
- Strasburger, E., 1888. Über Kern-und Zelltheilung im Pflanzenbereich, nebst einem Anhang über Befruchtung.
- Stronghill, P., Pathan, N., Ha, H., Supijono, E., Hasenkampf, C., 2010. Ahp2 (Hop2) function in Arabidopsis thaliana (Ler) is required for stabilization of close alignment and synaptonemal complex formation except for the two short arms that contain nucleolus organizer regions. *Chromosoma* 119, 443–458. doi: 10.1007/s00412-010-0270-0
- Sugiyama, S., Yoshino, T., Kanahara, H., Shichiri, M., Fukushi, D., Ohtani, T., 2004. Effects of acetic acid treatment on plant chromosome structures analyzed by atomic force microscopy. *Anal. Biochem.* 324, 39–44. doi: 10.1016/j.ab.2003.09.026

- Sumner, A.T., 1991. Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase. *Chromosoma* 100, 410–418. doi: 10.1007/BF00337519
- Sumner, A.T., Ross, A., 1989. Factors affecting preparation of chromosomes for scanning electron microscopy using osmium impregnation. *Scanning Microsc.* 3, 87–97.
- Thoma, F., Koller, T., Klug, A., 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403–427. doi: 10.1083/jcb.83.2.403
- Utsumi, K.R., 1982. Scanning electron microscopy of giemsa-stained chromosomes and surface-spread chromosomes. *Chromosoma* 86, 683–702. doi: 10.1007/BF00285611
- Utsumi, K.R., 1985. A scanning electron microscopic study of chromosomes and nuclei. *Scan. Electron Microsc.* 1121–1132.
- Vernon-Parry, K.D., 2000. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Rev.* 13, 40–44. doi: 10.1016/S0961-1290(00)80006-X
- Walther, P., 2008. High-Resolution Cryoscanning Electron Microscopy of Biological Samples, in: Schatten, H., Pawley, J.B. (Eds.), *Biological Low-Voltage Scanning Electron Microscopy*. Springer New York, New York, NY. doi: 10.1007/978-0-387-72972-5_10
- Wanner, G., Formanek, H., 2000. A New Chromosome Model. *J. Struct. Biol.* 132, 147–161. doi: 10.1006/jsbi.2000.4310
- Wanner, G., Formanek, H., 1995. Imaging of DNA in human and plant chromosomes by high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res.* 3, 368–374. doi: 10.1007/BF00710018
- Wanner, G., Formanek, H., Herrmann, R. G., 1990. Ultrastructure of plant chromosomes by high-resolution scanning electron microscopy. *Plant Mol Biol Rep* 8, 224–236. doi: 10.1007/BF02668760
- Wanner, G., Formanek, H., Martin, R., Herrmann, R.G., 1991. High resolution scanning electron microscopy of plant chromosomes. *Chromosoma* 100, 103–109. doi: 10.1007/BF00418243
- Wanner, G., Schroeder-Reiter, E., 2008. Chapter 23 Scanning Electron Microscopy of Chromosomes. *Methods Cell Biol.* 88, 451–474. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00423-8

- Wanner, G., Schroeder-Reiter, E., Ma, W., Houben, A., Schubert, V., 2015. The ultrastructure of mono- and holocentric plant centromeres: an immunological investigation by structured illumination microscopy and scanning electron microscopy. *Chromosoma* 124, 503–517. doi: 10.1007/s00412-015-0521-1
- Watson, J.D., Crick, F., 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. University of Chicago Press.
- Watson, M.L., 1958. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 475–478. doi: 10.1083/jcb.4.4.475
- Whelan, E.D.P, Haggis, G.H., Ford, E.J., Dronzek, B., 1974. Scanning electron microscopy of meiotic chromosomes of plants in situ. *Can. J. Bot* 52, 1438–1440. doi: 10.1139/b74-188
- Wood, T.M., Bhat, K.M., 1988. Methods for measuring cellulase activities, in: *Methods in Enzymology, Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose*. Academic Press. doi: 10.1016/0076-6879(88)60109-1
- Woodcock, C.L.F., Safer, J.P., Stanchfield, J.E., 1976. Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence. *Exp. Cell Res.* 97, 101–110. doi: 10.1016/0014-4827(76)90659-5
- Yamada, T., Ohta, K., 2013. Initiation of meiotic recombination in chromatin structure. *J. Biochem. (Tokyo)* 154, 107–114. doi: 10.1093/jb/mvt054
- Zhang, J., Han, F., 2017. Centromere pairing precedes meiotic chromosome pairing in plants. *Sci. China Life Sci.* 60, 1197–1202. doi: 10.1007/s11427-017-9109-y
- Zoller, J.F., Herrmann, R.G., Wanner, G., 2004a. Chromosome condensation in mitosis and meiosis of rye (*Secale cereale* L.). *Cytogenet. Genome Res.* 105, 134–144. doi: 10.1159/000078020
- Zoller, J.F., Hohmann, U., Herrmann, R.G., Wanner, G., 2004b. Ultrastructural analysis of chromatin in meiosis I + II of rye (*Secale cereale* L.). *Cytogenet. Genome Res.* 105, 145–156. doi: 10.1159/000078021