

Tìm hiểu về Đồng hồ sinh học và sự Sinh trưởng của Cây bằng NightSHADE

Getting to Know The Circadian Clock and Plant Growth with NightSHADE

Rainer Kembügler[€], Charles Schmidt[€], Bernd Hutter^{€,*}

Giới thiệu

Introduction

Sự kết hợp phức tạp giữa cơ chế tín hiệu ánh sáng và đồng hồ sinh học ảnh hưởng đến rất nhiều khía cạnh sinh trưởng và phát triển của cây. Hệ tạo ảnh nhạy cho phép các nhà nghiên cứu sử dụng cấu trúc vùng khởi động::chỉ thị Luciferase đom đóm (LUC) để khảo sát những mô hình biểu hiện gen trong một khoảng thời gian dài trên cây. Tốc độ sinh trưởng của cây non và cấu trúc trụ dưới lá mầm được sử dụng rộng rãi để xác định đặc điểm của các cơ chế vận hành quá trình sinh trưởng và tạo hình của cây dưới sự điều hòa của môi trường^{1,2,3}. Những thí nghiệm như vậy thường mang khó khăn trong việc kết hợp môi trường sinh trưởng được kiểm soát với hệ tạo ảnh có độ nhạy cao. Trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ ra rằng khoang tạo ảnh NightSHADE có thể được sử dụng cho rất nhiều ứng dụng, bao gồm cả phát quang sinh học và phân tích tốc độ sinh trưởng trong điều kiện môi trường được kiểm soát chiếu sáng hoặc tối.

In plants, complex integration of light signaling mechanisms and the circadian clock influence many aspects of growth and development. Sensitive imaging systems have allowed researchers to use promoter::firefly Luciferase (LUC) reporter constructs to study gene expression patterns over long periods of time in living plants. Growth-rate of seedlings and a structure called hypocotyl has been used extensively to characterize various mechanisms involved in environmental control of plant growth and morphogenesis^{1,2,3}. Performing such studies poses challenges to combine controlled growth environments with highly sensitive imaging systems. Here we show the NightSHADE imaging chamber can be used for multiple applications, including bioluminescence and growth-rate analysis under dark or light-controlled environment.

[€]Communicated by BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Calmbacher Str. 22, D-75323 Bad Wildbad, Germany

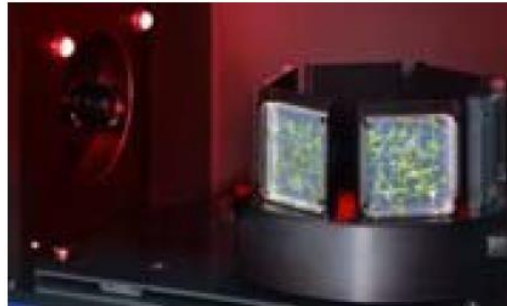
*Address all correspondence to: bernd.hutter@berthold.com

Phương pháp

Method

Vật liệu thực vật (*prCCA1::LUC*, CS9382; *prCAB::LUC*, CS9381; Col-0, CS28168) được lấy từ kho trung tâm Arabidopsis TAIR⁴ (TAIR Arabidopsis stock center). Sau khi được phân loại, chúng tôi làm hạt giống nảy mầm^{3,5} và sinh trưởng trên các đĩa chứa môi trường MS⁶. Tất cả hình ảnh đều thu được từ bộ máy ảnh CCD cài đặt trong khoang NightSHADE⁷. Máy ảnh CCD có vị trí đặt trên đỉnh của khoang được sử dụng để ghi hình ảnh phát quang sinh học. Khi được chuyển qua vị trí sườn khoang thì nó ghi lại ảnh thời gian thực của những cây non sinh trưởng trên đĩa đặt theo chiều thẳng đứng (như Hình 1 cho thấy).

Plant materials (prCCA1::LUC, CS9382; prCAB::LUC, CS9381; Col-0, CS28168) were obtained from TAIR4 Arabidopsis stock center. After stratification seeds were germinated^{3,5} and grown on plates containing MS⁶ medium. All images were obtained with a CCD camera installed in the NightSHADE⁷ chamber. The CCD camera was used from its housing on the top of the chamber for bioluminescence images and was moved to its housing on the side for real-time images of young seedlings growing on vertical plates (as shown in Figure 1).



Hình 1. Bục xoay đặt trong máy NightSHADE có thể giữ tới sáu đĩa vuông. Phần mềm indiGO™ cho phép chúng tôi điều khiển trực quay hoàn toàn bằng phần cứng để ghi hình các đĩa liên tiếp và nhiều lần trong khoảng thời gian vài ngày. Khoang có đèn LED phát ánh sáng trắng (hoặc hồng ngoại) để ghi hình còn đèn LED phát ánh sáng đỏ, xanh hoặc đỏ xa được sử dụng để kiểm soát ánh sáng chiếu lên cây. Ảnh cung cấp bởi BERTHOLD TECHNOLOGIES.

Figure 1. Rotating platform inside the NightSHADE holds up to six square plates. The indiGO™ software allows complete hardware control of the rotor to image each plate consecutively multiple times over a period of days. The inside chamber has white (or infra-red) LEDs for imaging, and red, blue, or far-red LEDs for light treatment. Picture courtesy of BERTHOLD TECHNOLOGIES.

Kết quả

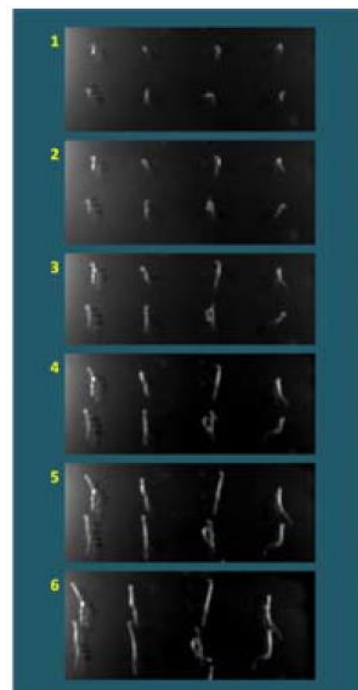
Results

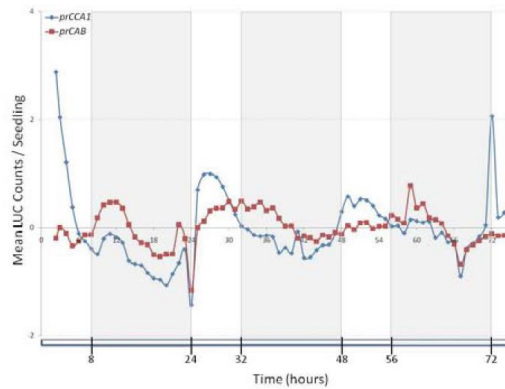
Gen *LIÊN QUAN TỚI ĐỒNG HỒ SINH HỌC (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED - CCA1)* tham gia vào vòng lặp phản hồi trung tâm trên *Arabidopsis*. Chúng tôi cho rằng gen này hoạt động vào khoảng thời gian khi bình minh lên để kích hoạt biểu hiện gen *CAB*^{8,9,10}. Cây non được điều chỉnh sinh trưởng trong khoảng thời gian ngắn ngày được ghi hình biểu hiện *LUC* trên máy NightSHADE. Gen *CCA1* được biểu hiện trước cả khi vùng khởi động *CAB* ở trạng thái kích hoạt (Hình 2). Điều này hợp lý với đặc tính tương hỗ mà protein *CCA1* tác động lên biểu hiện gen *CAB*. Ở một thí nghiệm khác, cây *Arabidopsis* non (*Col-0*) được điều chỉnh để thích ứng trong điều kiện ngắn ngày trong vòng 3 ngày. Chúng tôi ghi hình những cây non này bằng máy ảnh CCD được cố định ở một bên của khoang (Hình 3). Những kết quả nêu trên chỉ là hai trong vô số các ứng dụng ghi ảnh mà khoang NightSHADE cung cấp. Dòng máy này mang trong mình sự kết hợp độc nhất vô nhị giữa khả năng kiểm soát môi trường sinh trưởng và một máy ảnh CCD có độ nhạy cao.

CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) is involved in the central feedback loop in Arabidopsis and is thought to act around dawn to activate CAB gene expression^{8,9,10}. Seedlings entrained under short-day conditions were imaged for LUC expression in the NightSHADE. CCA1 gene expression preceded activation of CAB promoter (Figure 2), consistent with CCA1 protein playing a positive role in CAB gene expression. In a separate experiment, Arabidopsis (Col-0) seedlings were entrained under short-day conditions for 3 days and imaged (Figure 3) with the CCD camera housed on one side of the chamber. These results display two of the multiple imaging applications of the NightSHADE chamber, which provides a unique combination of controlled growth environment with a sensitive CCD camera.

Hình 2. Gen *CCA1* được biểu hiện trước trạng thái kích hoạt của vùng khởi động *CAB* (*CAB promoter*). Các cây non (*prCCA1::LUC & prCAB::LUC*) được điều chỉnh sao cho có thể thích ứng với chu kỳ sáng dài 8 tiếng (huyền quang trắng lạnh, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) và chu kỳ tối dài 16 tiếng trong vòng 7 ngày. Chúng tôi phun luciferin lên những cây non này và ghi hình phát quang sinh học của chúng mỗi giờ trong vòng 3 ngày trong điều kiện ánh sáng mờ của khoang NightSHADE.

Figure 2. *CCA1 gene expression preceded activation of CAB promoter. Seedlings (prCCA1::LUC & prCAB::LUC) were entrained under 8-h-light (cool white fluorescents, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 16 h dark photoperiods for 7 days, sprayed with luciferin and imaged for bioluminescence every hour for 3 days under dim constant light in the NightSHADE.*





Hình 3. Cây Arabidopsis non (Col-0) được cho sinh trưởng (như đã miêu tả ở văn bản bên dưới³) trước khi chúng được ghi ảnh bởi máy NightSHADE mỗi 4 giờ một lần (hình 1-6). Phần mềm indiGO™ điều khiển máy ảnh CCD, trực quay và điều kiện chu kỳ sáng hay tối. Chỉ có phần trên của đĩa được trình bày lại trên từng hình. Những hình này được sử dụng để đo chiều dài của trụ dưới lá mầm bằng phần mềm ImageJ (NIH) (dữ liệu không được thể hiện).

Figure 3. Rotating platform inside the NightSHADE holds up to six square plates. The indiGO™ software allows complete hardware control of the rotor to image each plate consecutively multiple times over a period of days. The inside chamber has white (or infra-red) LEDs for imaging, and red, blue, or far-red LEDs for light treatment. Picture courtesy of BERTHOLD TECHNOLOGIES.

Tài liệu tham khảo

References

- ¹Vandenbussche, F. et al. D. Bioessays 27, 275–284 (2005).
- ²Nozue, K. & Maloof, J. N. Plant Cell Environ. 29, 396–408 (2006).
- ³Nozue, K. et al. Nature 448, 358–361 (2007).
- ⁴The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>).
- ⁵Millar, A.J. et al. Plant Cell 4, 1075-1087 (1992).
- ⁶Murashige, T. & Skoog, F. Physiol. Plant. 15, 493-497 (1962).
- ⁷For more information on NightSHADE LB 985, visit: <http://www.berthold.com/ww/en/pub/bioanalytik/produkte/nightshade.cfm>
- ⁸Millar, A.J. & Kay, S.A. Plant Cell 3, 541-550 (1991).
- ⁹Wang, Z.-Y. & Tobin, E.M. Cell 93, 1207-1217 (1998).
- ¹⁰Alabadi, D. et al. Science 293, 880-883 (2001).