

# **Analyse von Wurzelwachstum und Wurzelhaaren im Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskop**

## Referent:

*David Haumann, da-cons GmbH*

## Ko-Autoren:

*Daniel von Wangenheim, Physikalische Biologie, BMLS Goethe Universität Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 15, 60438 Frankfurt*

*Thomas Schenker, da-cons GmbH*

## **Einleitung**

Kameras, Mikroskope, Tomographen und andere bildgebende Verfahren ermöglichen es, das Pflanzenwachstum ganzer Areale auf einem Feld, einzelner Ganzpflanzen, Pflanzenteilen oder gar das Geschehen innerhalb von Pflanzenorganen, wie Blatt oder Wurzel im Detail, auf zellulärer Ebene zu verfolgen. Die da-cons GmbH verfügt über eine große Zahl an individuellen Algorithmen, mit deren Hilfe große Bilddatenmengen analysiert, visualisiert und archiviert werden. Visualisierung und Analyse werden hier am Beispiel einer wachsenden Wurzel der Ackerschmalwand demonstriert. Die Wurzel wird während des Wachstums mit einem neu entwickelten 3D-Lichtscheibenmikroskop aufgenommen und einzelne Zellen sowie Wurzelhaare mit Algorithmen identifiziert und ausgewertet. Zum Abschluss wird ein Denkanstoß gegeben, die Methoden auf beliebige andere Fragestellungen in der Landwirtschaft und im Versuchswesen zu übertragen, um durch die erreichbare Steigerung im Automatisierungsgrad einen Produktivitätsgewinn zu erzielen.

## **3D-Videoaufnahme einer Wurzel im Lichtscheibenmikroskop**

Im Zeitintervall von je 15 Minuten über einen Zeitraum von 75 Stunden scannt ein Lichtscheibenmikroskop einen kleinen Ausschnitt einer Wurzel von *Arabidopsis thaliana* (deutsch: Ackerschmalwand). Insgesamt werden so 300 dreidimensionale Aufnahmen, zusammengesetzt aus je 466 Einzelbildern mit 1,3 Gigabyte (GB) Datenvolumen und insgesamt fast 400 GB sowie 140.000 Einzelbilder aufgenommen. Die Streckung jeder einzelnen Zelle während der Seitenwurzelentwicklung wird sichtbar. Zellwände und Zellkerne sind durch ein fluoreszierendes Markerprotein hervorgehoben. Möglich ist dies mit der Technik der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 1) aus der Arbeitsgruppe von Professor Ernst H.K. Stelzer an der Goethe-Universität Frankfurt.

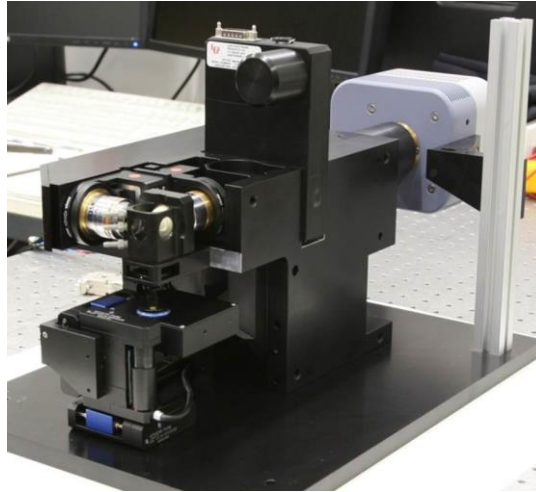


Abbildung 1: Lichtscheiben Fluoreszenz-Mikroskop (LSFM), Prof. Stelzer, Goethe Universität Frankfurt

Die Abbildung zeigt, dass zwei Objektive im 90°-Winkel um die Probenkammer angeordnet sind. Über eines der Objektive wird ein Lichtblatt erzeugt, welches in die Probe gesendet einen kleinen Teil der Probe erhellt. Über das zweite Objektiv nimmt eine Kamera im 90° Winkel das Bild auf. Die Probe wird Schritt für Schritt durch das Lichtblatt bewegt sodass eine Reihe von Einzelbildern als Z-Stapel zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden. Der Vorteil besteht darin, dass für jedes Einzelbild nur der Teil der Wurzel beleuchtet wird, der gerade im Fokus der Kamera ist. So wird die Energie, die durch die Beleuchtung in die Probe eingebracht wird, dramatisch reduziert und die Probe überlebt und wächst Tagelang in der Mikroskopkammer.

Abbildung 2 zeigt *Arabidopsis thaliana* im Probenhalter. Die Blätter sind frei in der Luft und können beleuchtet werden. Die Wurzel wächst auf einem Gel in einer Flüssigkeit. Die Pflanze steht senkrecht im Mikroskop.

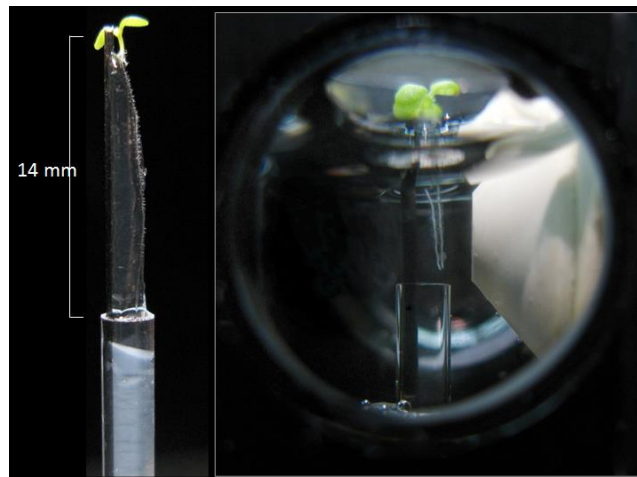


Abbildung 2: Links: Probenhalterung mit *Arabidopsis*. Rechts: Durchsicht über das Sichtfeld in die Probenkammer

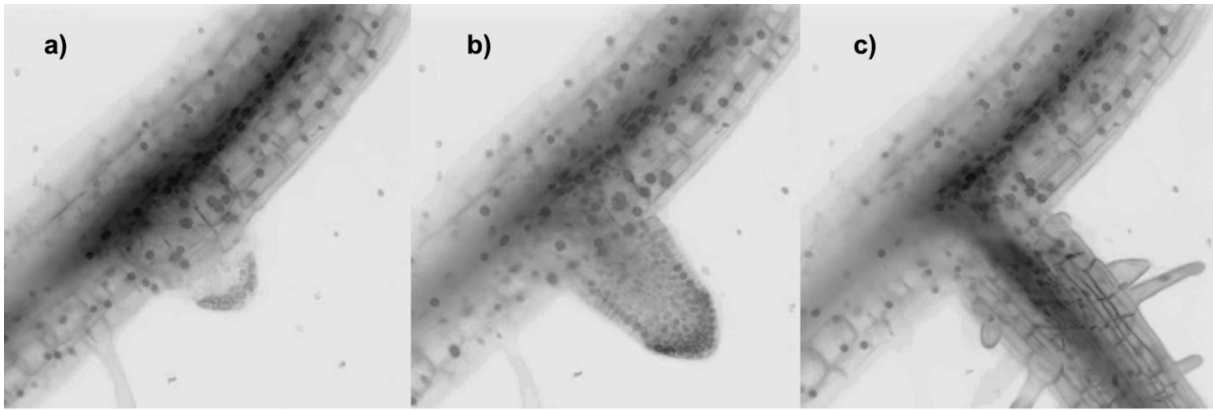


Abbildung 3: Zeitlich aufeinander abfolgende (a,b,c) Ausschnitte einer wachsenden Seitenwurzel von *Arabidopsis thaliana*. Datensatz freundlicherweise bereitgestellt von Daniel von Wangenheim, Physikalische Biologie, Arbeitsgruppe Prof. Stelzer, BMLS, Goethe Universität Frankfurt.

Abbildung 3 zeigt, wie eine Seitenwurzel aus der Hauptwurzel herauswächst (a,b,c). Die Wurzel ist ca.  $120\mu\text{m}$  dick. Die runden Punkte sind Zellkerne. Im mittleren Bild (b) liegen die Zellkerne noch dicht gedrängt beieinander, die Zellen sind klein, aber schon alle angelegt. Im Weiteren zeitlichen Verlauf entstehen Wurzelhaare auf den Epidermiszellen.

Was hier auf dem Papier nur zweidimensional abgedruckt werden kann, ist am Computer dreidimensional zu beobachten. Die 75 Stunden Entwicklungszeit der Seitenwurzel sind in einem Video im Zeitraffer auf die Dauer von ungefähr 10 Sekunden beschleunigt, abrufbar unter <http://www.youtube.com/watch?v=MmnVObueCJI> oder <http://www.youtube.com/watch?v=P1QmghjsrkM>.

### Automatische Auswertung der Wurzelhaarwachstumsgeschwindigkeit und Zellzahl mit dem da-cons system (dcs)

Jeder der 300 Zeitzustände, die als dreidimensionale Volumendatensätze dargestellt sind, wird mit Hilfe des flexiblen Bildanalyse-Systems dcs von da-cons analysiert.

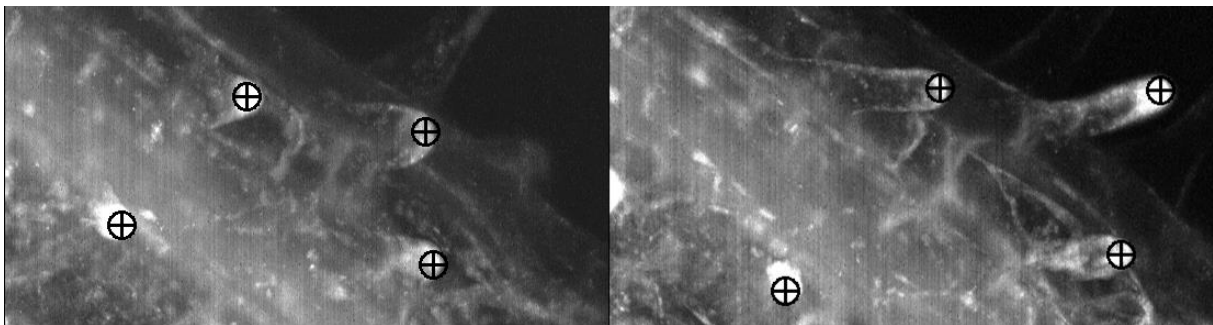


Abbildung 4: Automatische Erkennung und Tracking der Wurzelhaarspitzen mit dem da-cons system (dcs), Wurzelspitzenidentifikation erkennbar durch Markierung mit eingekreistem Plus. Links: Zeitpunkt 140, rechts: Zeitpunkt 226 von insgesamt 300

Abbildung 4 zeigt die automatische Erkennung der Wurzelhaarspitze durch das da-cons system, symbolisiert durch ein Plus in einem Kreis. Die Wachstumsgeschwindigkeit über die Zeit wird vermessen. Mit dem flexiblen da-cons system dauert es nur einige Tage, die Bildanalyse zuverlässig semi-automatisch zu realisieren. Weitere Datensätze können jetzt, nach dem der Analyse-Workflow aufgebaut ist, in kürzester Zeit analysiert werden und Statistiken mit einer größeren Zahl Experimente effizient erstellt werden.

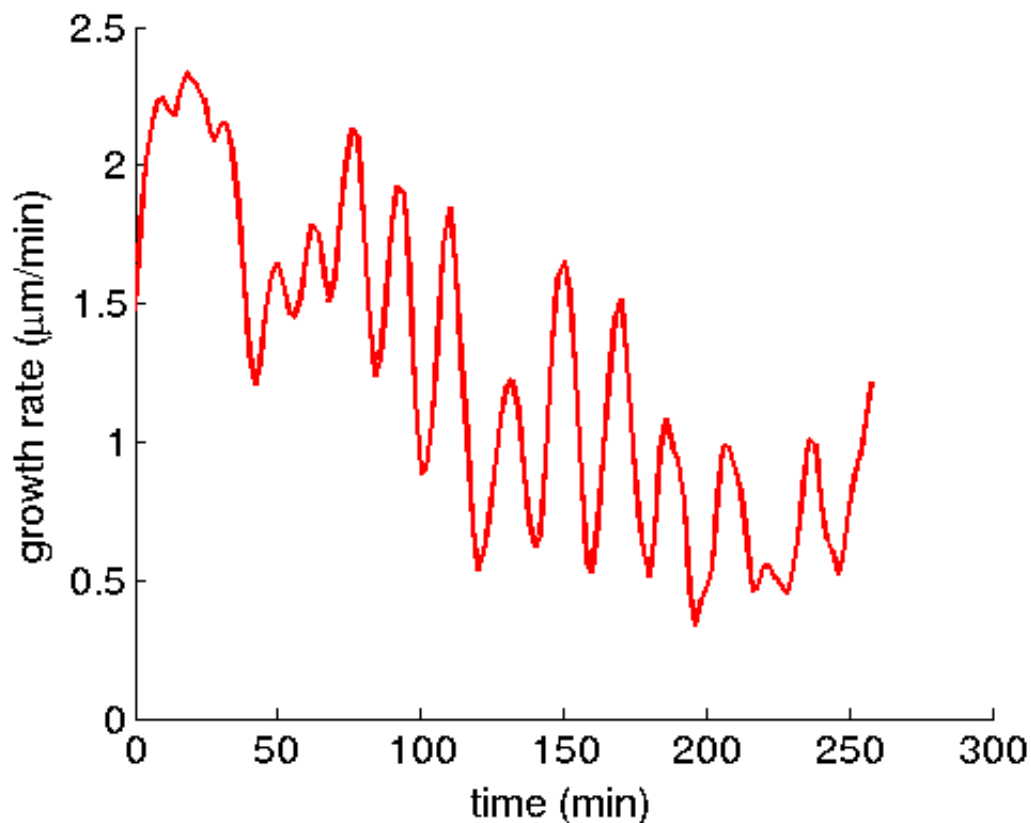


Abbildung 5: Wachstum einer Wurzelhaarspitze in  $\mu\text{m}/\text{Minute}$  über insgesamt 260 Minuten

Abbildung 5 zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelhaarspitzen in Abhängigkeit der Zeit.

Interessante Optionen für weitere Untersuchungen sind die Interaktionen von Mykorrhizapilzen oder Pathogenen mit dem Wurzelepithel und den Wurzelhaaren. So kann die Auswirkung von Dünger oder Pflanzenschutzmittel auf die Interaktion zwischen Pilz/Pathogen und Pflanze Life auf zellulärer und subzellulärer Ebene im Mikrometermaßstab über die Zeit untersucht werden.

### Übertragbarkeit der Methode auf Anwendungen in der Landwirtschaft

Die auf Fragestellung bzw. Kundenwunsch angepasste Bildanalyse mit dem da-cons system – dcs – ist auf jedes bildgebende Verfahren in der Landwirtschaft und im Versuchswesen übertragbar.

Ebenso wie die Analyse von Wurzelhaaren in Mikroskop-Bilddatensätzen, ist das Prinzip anwendbar auf die Analyse des oberirdischen Teils von Pflanzen, die mit Kameras gefilmt werden. Sie können auf Größe/Wuchshöhe, ggf. Blattzahl oder Blattfläche ausgewertet werden.

Dabei spielt das Datenvolumen eine untergeordnete Rolle. Via Cluster Computing werden Datenvolumina bis hin zu mehreren Terabytes verarbeitet und bis zu Petabytes archiviert.

## **Zusammenfassung:**

Am Beispiel eines dreidimensionalen Videos von der Wurzel der Ackerschmalwand, erstellt aus 3D-Bilddatensätzen aus einem Lichtscheibenmikroskop, wurde die mehrdimensionale Bildanalyse mit dem *da-cons system (dcs)* demonstriert. Wurzelhaarspitzen werden mit Hilfe von Operatoren automatisch identifiziert und die Wachstumsgeschwindigkeit aufgezeichnet sowie Zellkerne erkannt und gezählt.

Anwendbar ist die Methode z.B. auf die Analyse der Effekte von Dünger und Pestizide/Insektizide auf Pflanzen sowie die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen.

Durch Einsatz der individuell anpassungsfähigen Bildanalyse von *da-cons* können Prozesse an der Pflanze im Mikrometerbereich effektiv und effizient analysiert werden. In größerem Maßstab werden mit dem *da-cons system* Arbeitsschritte mit Analyse semi-automatisiert und so die Produktivität gesteigert.

Übertragbar ist die flexible schnelle Bildanalyse auf alle bildgebenden Aufnahmemethoden, von Kameras, Tomographen und Mikroskopen. Untersuchungen mit Hilfe von Bildanalyse auf Ebene der Boniturprüfung/Plant Phenotyping bis hin zum subzellulären Bereich werden abgedeckt.