

Pyl a rozmnožování rostlin

David Honys
 Ústav experimentální botaniky AVČR
www.pollenbiology.cz



Sexualita rostlin

Sumer (4000 př. n. l.)
 Annunnaki

Asýrie (3000 př. n. l.)
 Aššúr

Kněží znali pohlavnost rostlin
 Již zde symbolika borové šišky

Babylón (3000 př. n. l.)
 Marduk

Egypt (2500 př. n. l.)
 Osiris

Znali úlohu včel
 Opylovali datlové palmy



Sexualita rostlin



Rudolf Jakob Camerarius
 (1665 – 1721)

Lékař a botanik,
 profesor medicíny a
 ředitel botanické zahrady
 v Tübingen

De sexu plantarum epistola
 (1694)

Popsal a experimentálně
 potvrdil sexualitu u rostlin



Morušovník
 (Morus)



Samičí rostliny tvoří mimo
 dosah pylu ze samčích rostlin
 bezsemenné plody



Sexualita rostlin



Rudolf Jakob Camerarius
 (1665 – 1721)

Lékař a botanik,
 profesor medicíny a
 ředitel botanické zahrady
 v Tübingen

De sexu plantarum epistola
 (1694)

Popsal a experimentálně
 potvrdil sexualitu u rostlin



Bažanka
 (Mercurialis)

Samičí rostliny tvoří
 mimo dosah pylu ze
 samčích rostlin
 bezsemenné plody



Špenát (Spinacia
 oleracea)



Kukuřice
 (Zea)

Rostliny po
 odstranění samčích
 květů netvoří semena



Skočec
 (Ricinus)

Sexualita rostlin

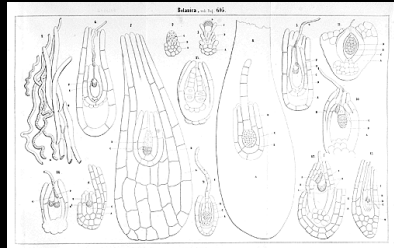


Giovanni Battista Amici
(1786 - 1863)

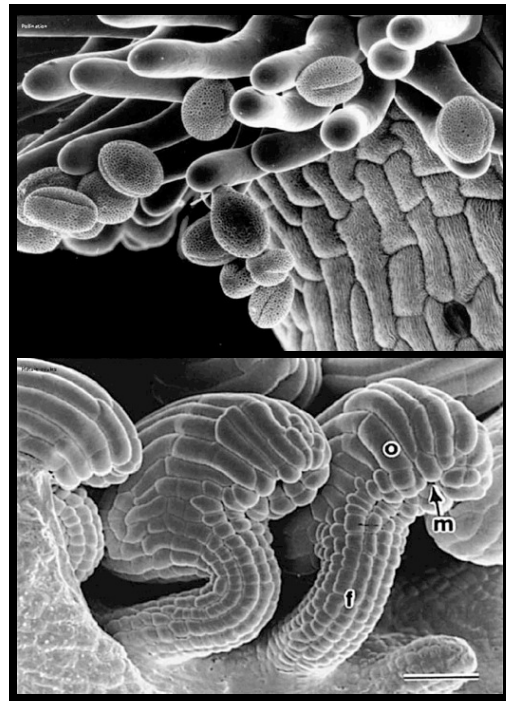
Italský astronom, matematik a optik (mikroskopie)
Popsal klíčení pylu na blizně (1824)



1824
Voskový model oplození dýně (Cucurbita pepo)

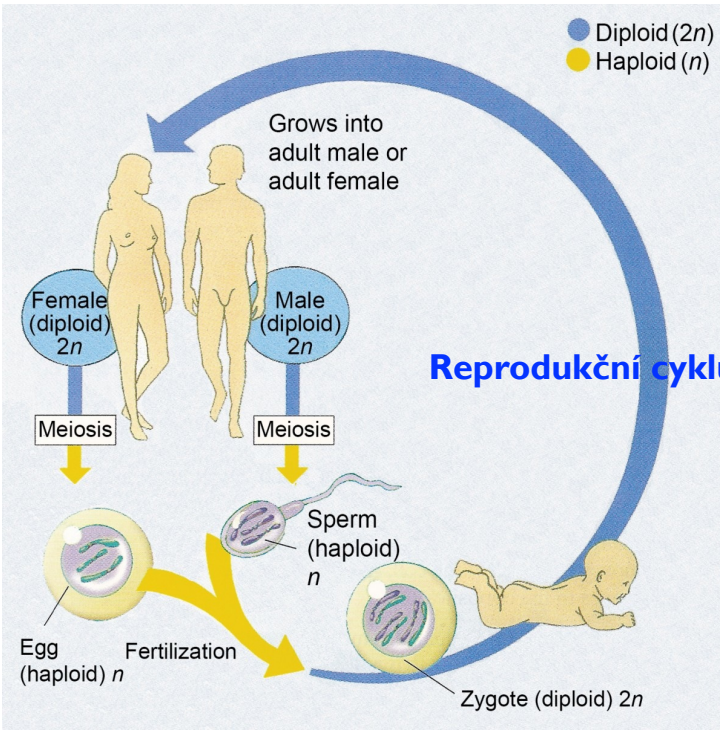


1847
Popis oplození orchideje (Orchis morio)



Tajemství (rostlinného) sexu:

Huseniček thalíu



Reprodukční cyklus živočichů

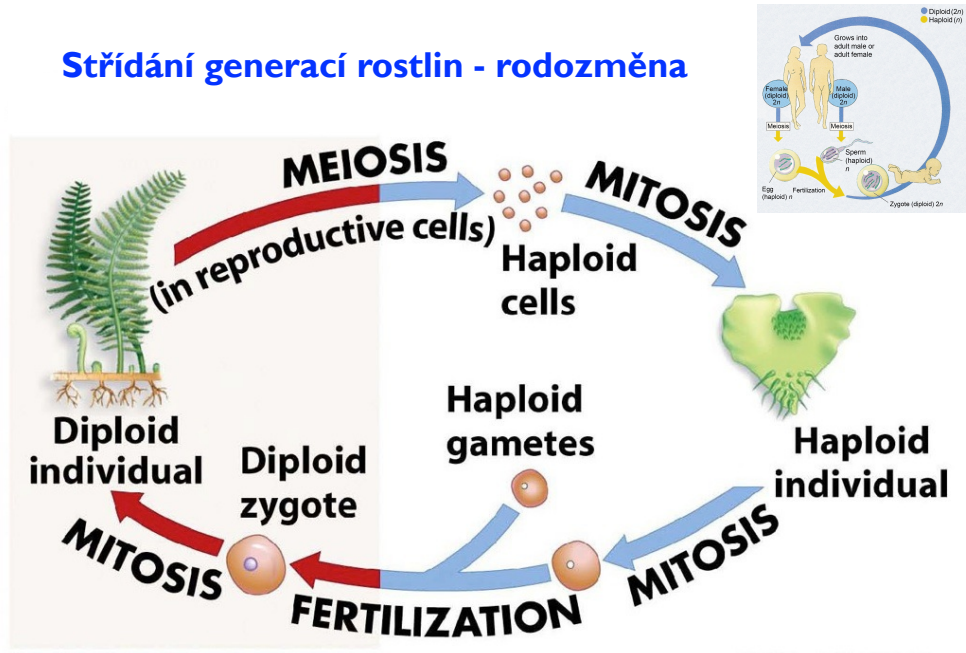
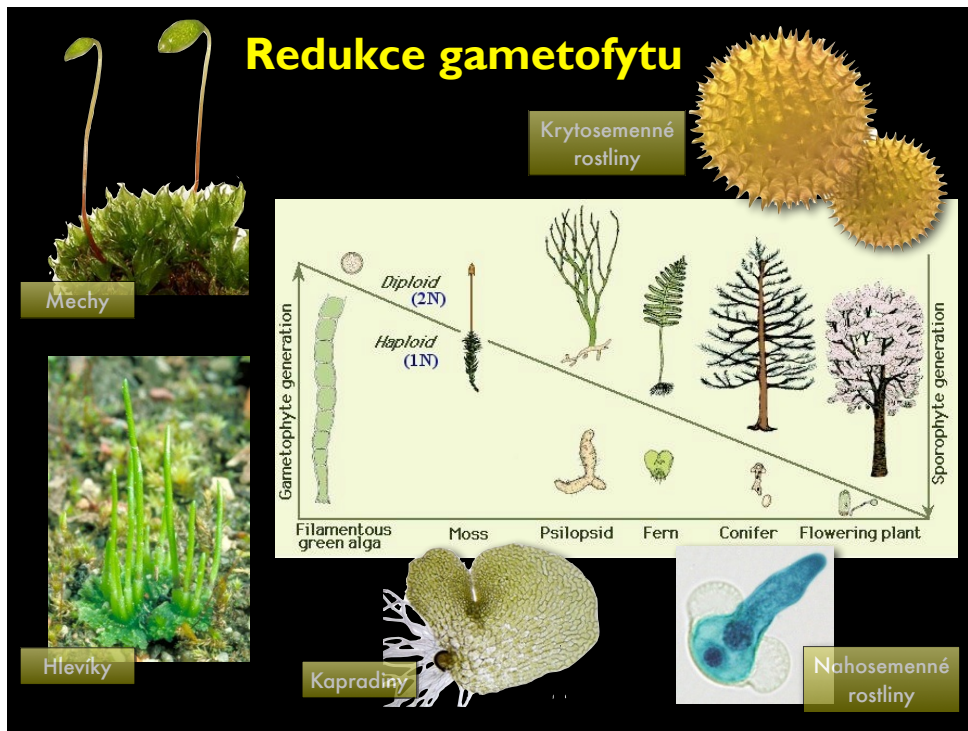


Figure 12-13c: Biological Science, 2/e



Životní cyklus (kryto)semenných rostlin

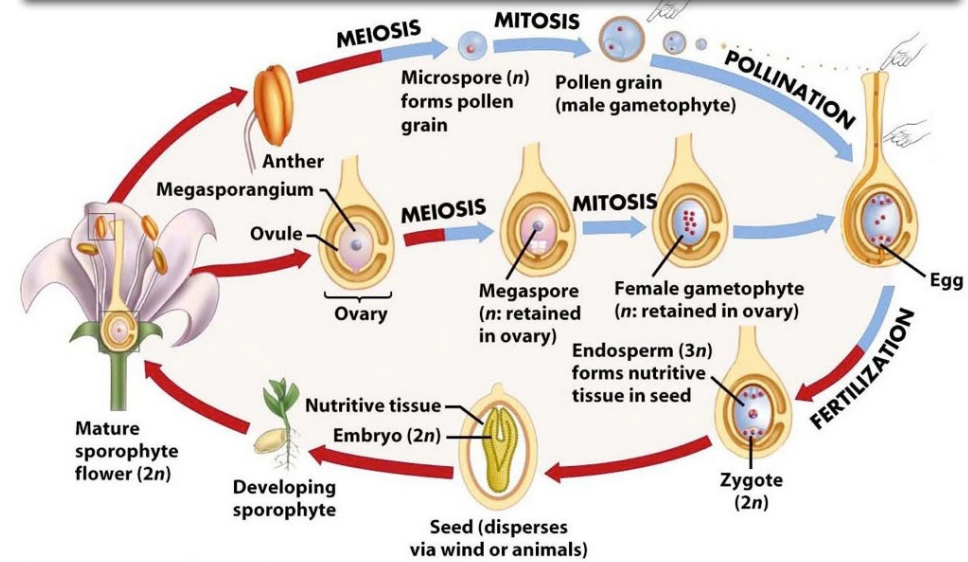
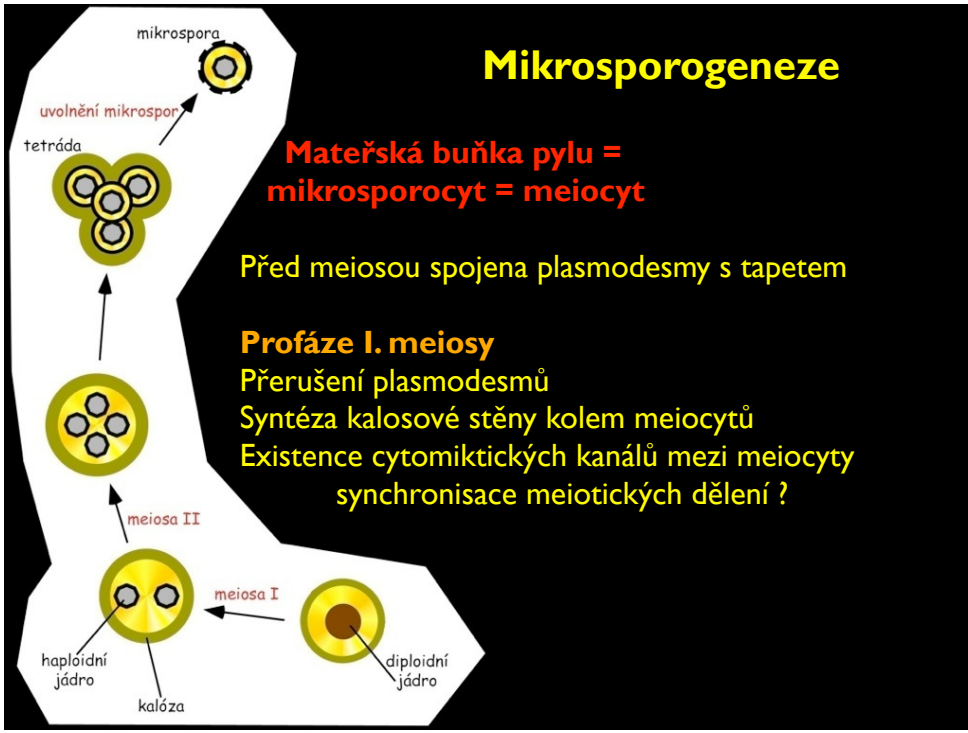
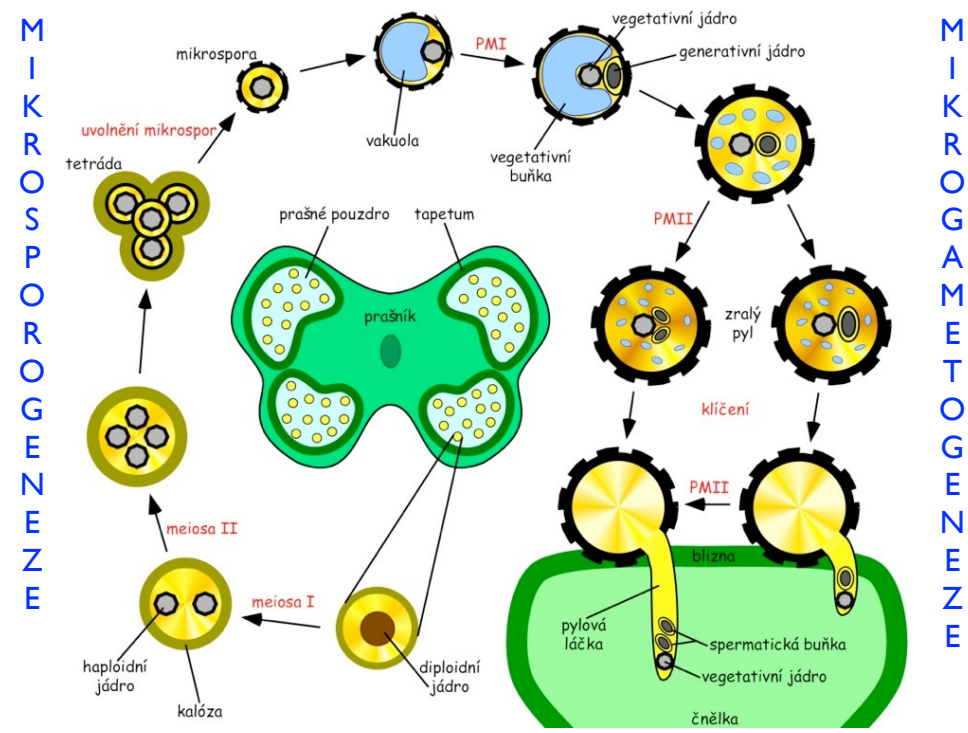
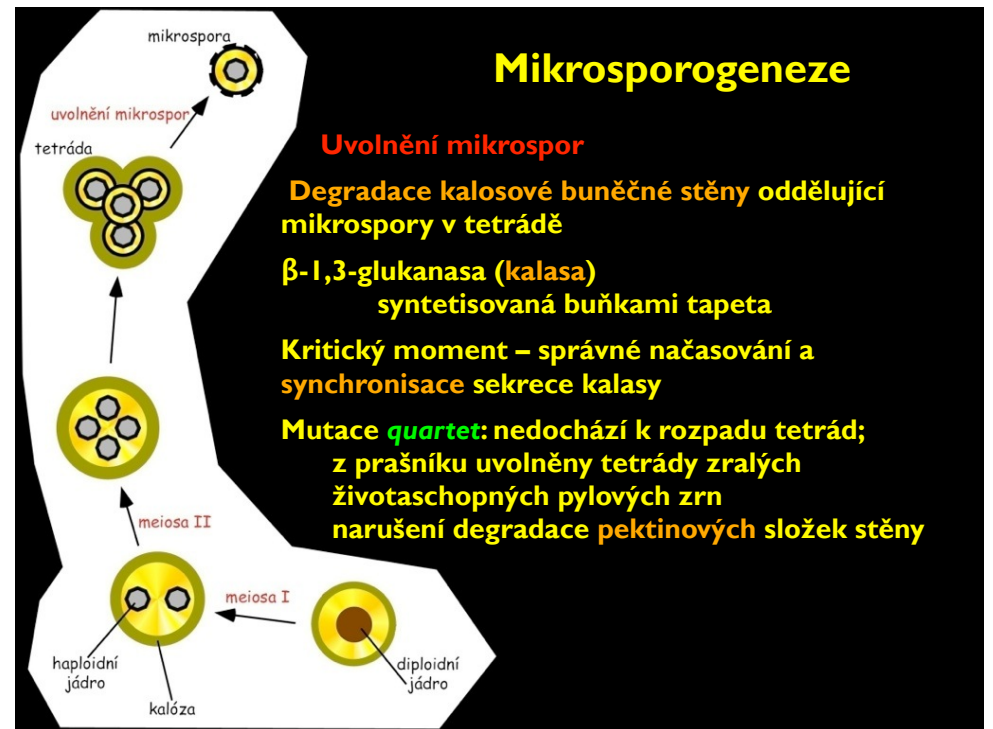
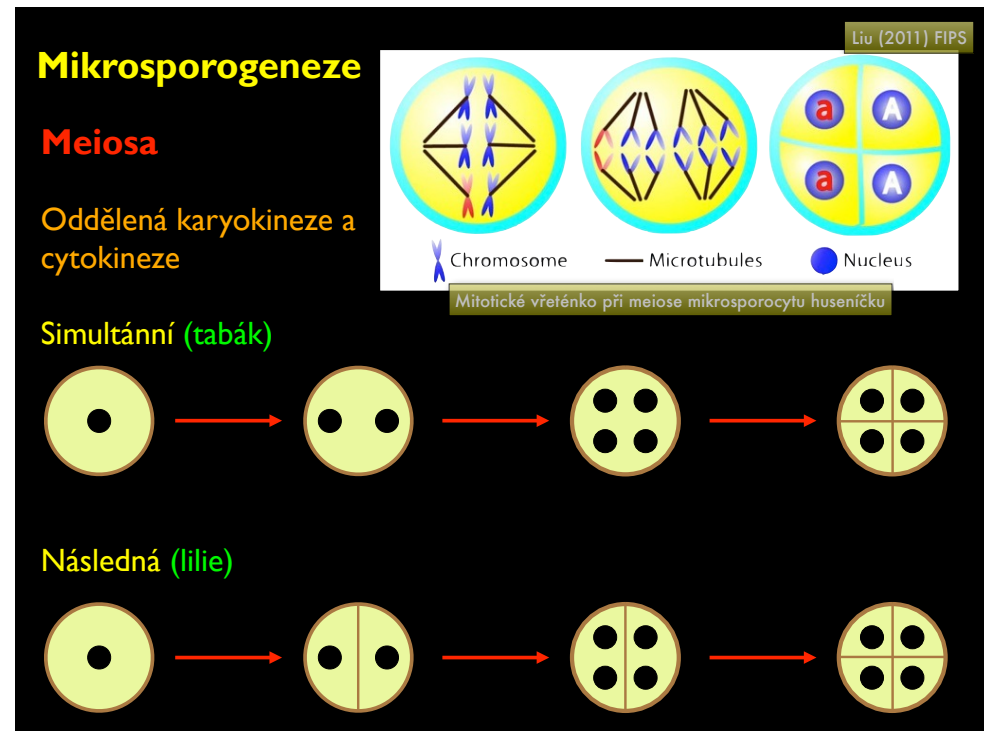
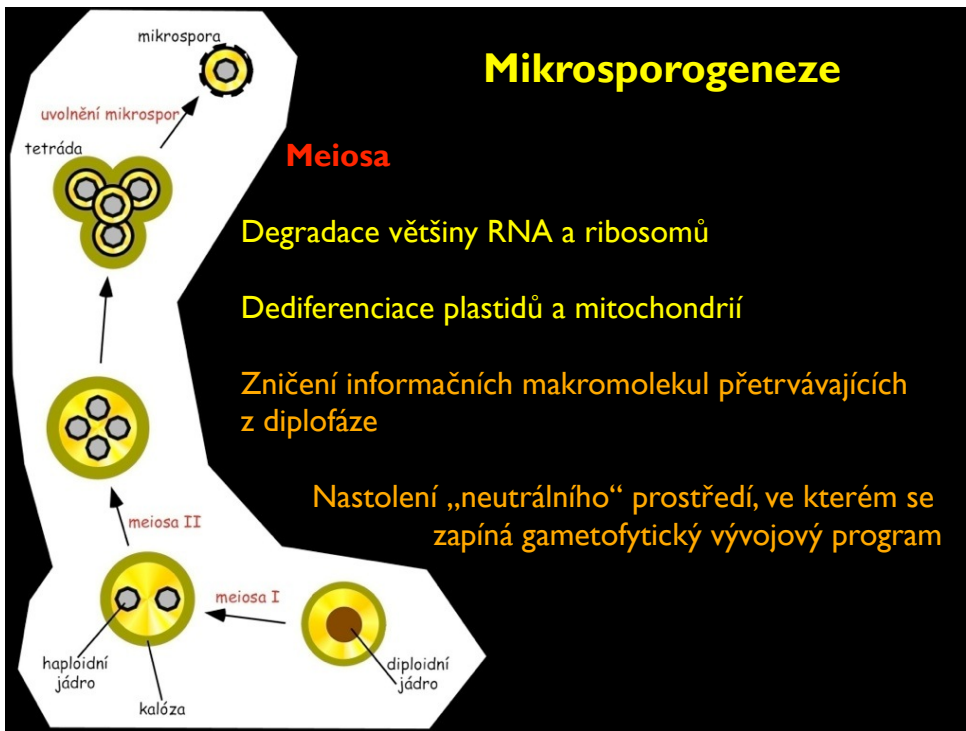


Figure 29-14e Biological Science, 2/e © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.





Mikrogametogeneze

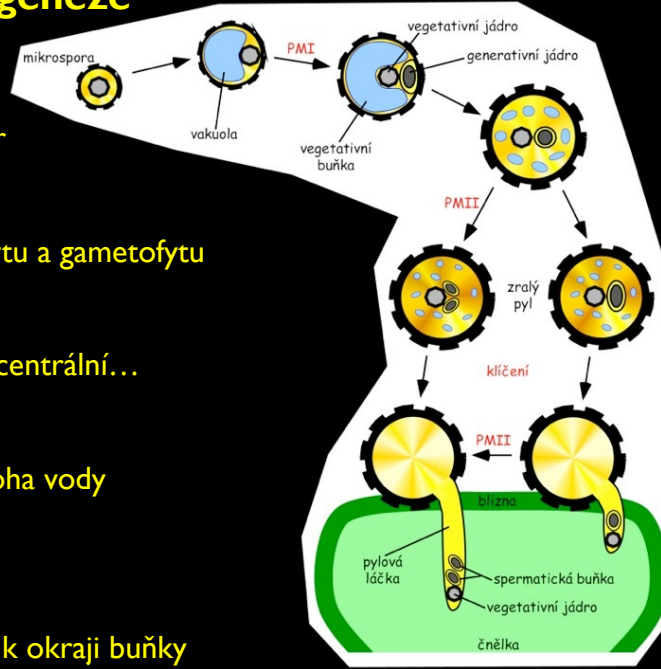
Rapidní růst mikrospor

Syntéza buněčné stěny
spolupráce sporofytu a gametofytu
exina, intina

Fúze vakuol v jedinou centrální...

... a její masivní růst
morfo-genetická úloha vody

Migrace jádra směrem k okraji buňky



Mikrogametogeneze

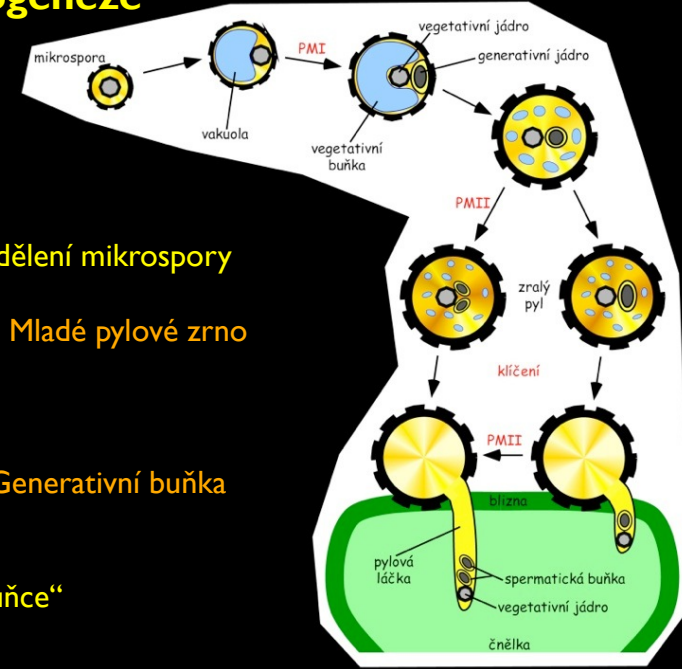
I. pylová mitosa

Výrazně asymetrické dělení mikrospory

~~Mikrospora~~ → Mladé pylové zrno

Vegetativní buňka + Generativní buňka

Struktura „buňka v buňce“



Mikrogametogeneze

I. pylová mitosa

Klíčový moment při determinaci gametofytického směru vývoje

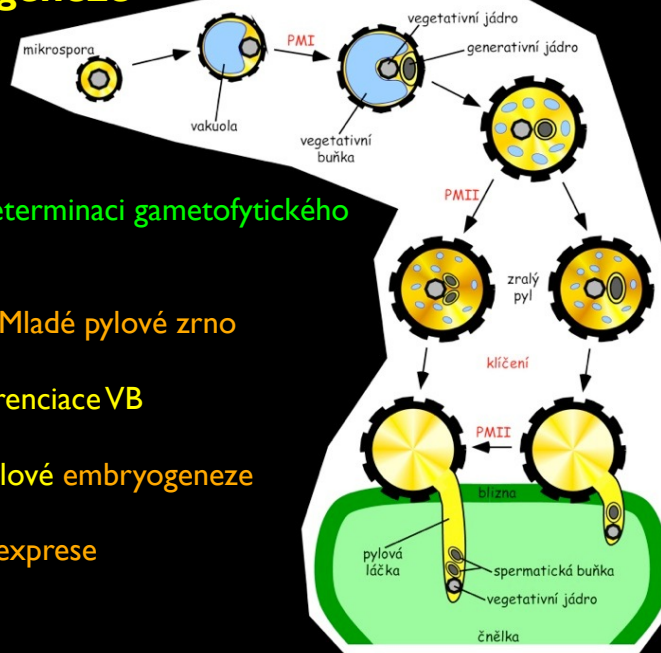
~~Mikrospora~~ → Mladé pylové zrno

Zahájení nevratné diferenciacie VB

Nemožnost iniciace pylové embryogeneze

Totální změna genové exprese

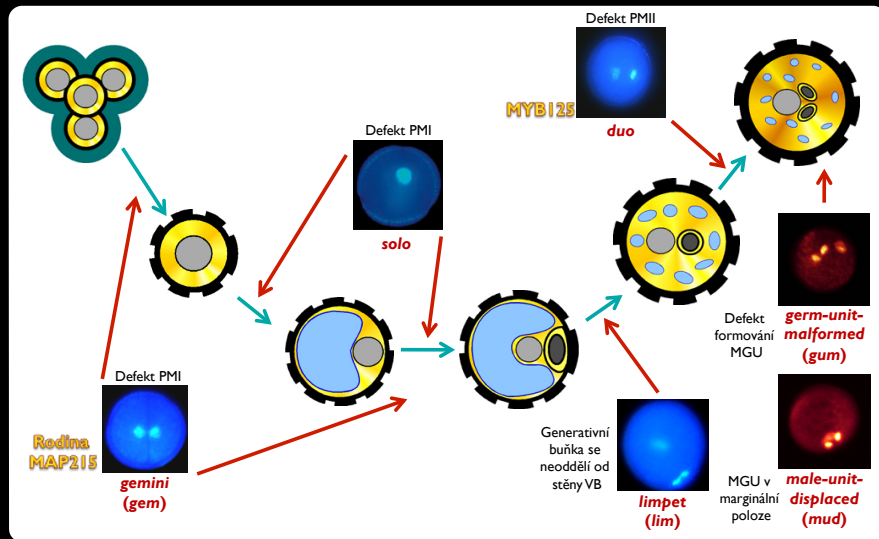
Ztráta totipotence VB



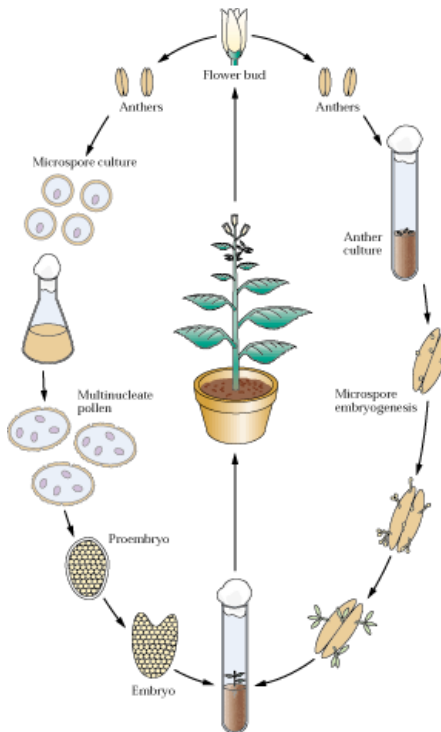
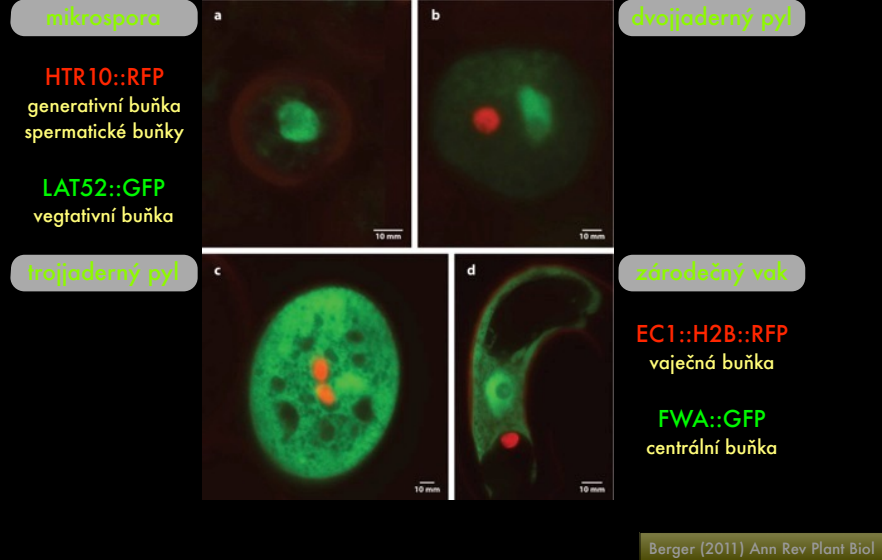
Hlavní nástroj - studium mutací



Defekty vývoje pylu



Markery gametofytické vývojové dráhy



Mikrosporová / pylová (haploidní) embryogeneze

Zvrácení gametofytického vývojového programu zpět na program sporofytický

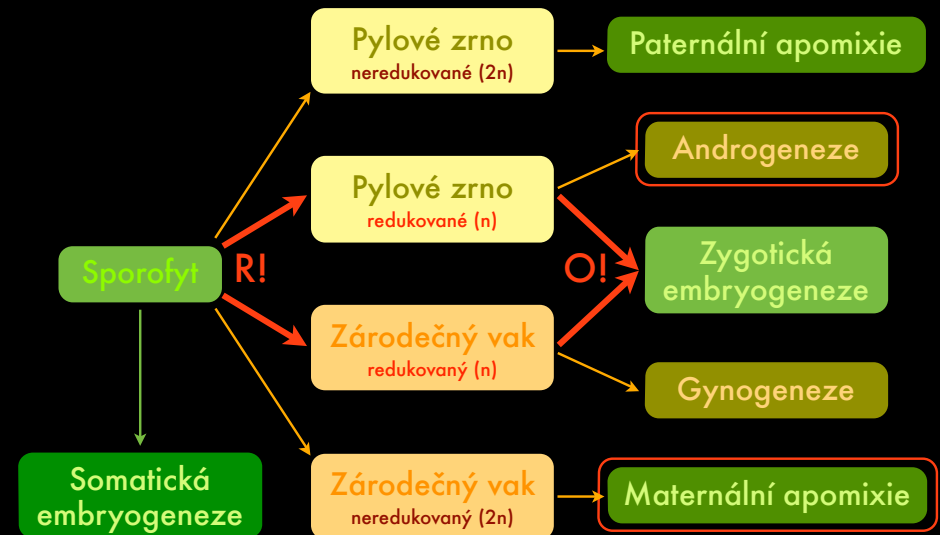
Po působení šoku

Haploidní rostliny

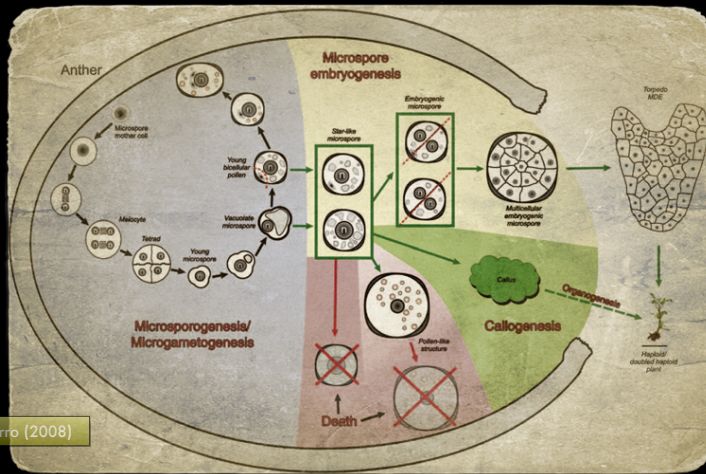
Dihaploidní rostliny

Význam ve šlechtitelské praxi
Produkce homozygotních linií

Typy embryogeneze



Mikrosporová embryogeneze - terminologie



Seguí-Simarro (2008)

Mikrosporová / pylová / haploidní embryogeneze
Androgeneze

Cesty k androgenezi

1. krok - intraovarijní opylení (mák)



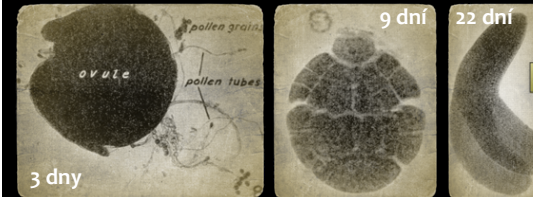
Fig. 1. Ovary injected with pollen suspension. The petals and stamens have been removed to show the hole made by the needle. ($\times 3/5$)

Figs. 2 and 3. Ovaries six and nine days after injection. ($\times 3/5$)

Fig. 4. Nine-day-old ovary cut vertically to show maturing

Kanta (1960) Nature

2. krok - opylení *in vitro* (mák)



Kanta (1962) Nature

3. krok - prašnickové kultury (durman)



Guha a Maheswari (1964) Nature

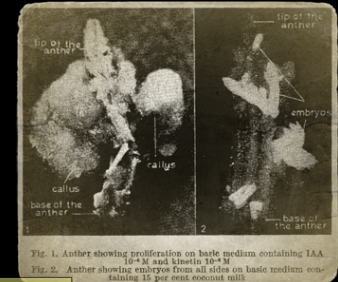


Fig. 1. Anther showing proliferation on basic medium containing IAA. $10^{-4}M$ and kinetin $10^{-6}M$.
Fig. 2. Anther showing embryos from all sides on basic medium containing 10^{-4} per cent coconut milk.

Androgeneze u durmanu

Guha a Maheswari (1966) Nature

Chromosomový test klíčících rostlinek

Embrya - deriváty mikrospor
Haploidní embrya

Mikrospora \rightarrow (kalus) \rightarrow embryoid \rightarrow embryo
 \rightarrow haploidní rostlinka

Normální morfogeneze, diferenciace
 \rightarrow kořinky, prýty

Haploidní embryogeneze v suspenzní kultuře izolovaných mikrospor

Nitsch a Norreel (1973)

Androgeneze

- 60.-70. léta – prudký rozvoj
 - 1983: 247 druhů, 88 rodů, 34 čeledí
 - Aktuálně mnohem více ...
- 80.-90. léta – určitý útlum
- Poslední dekáda – nové technologie
 - Oživení zájmu o haploidní biotechnologie
 - Molekulární mechanismy

- Datura innoxia*
- Nicotiana tabacum*
- Brassica napus*
- Hordeum vulgare*
- Triticum aestivum*
- ... stovky druhů,
- ... desítky čeledí
- Arabidopsis thaliana*
- Fabaceae*



Paternální apomixie

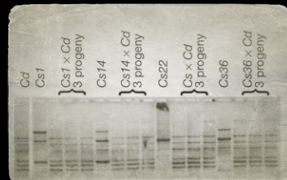
Cypřiš tassilský (*Cupressus dupreziana*)

- Diploidní pyl
- Různé alozymy v embryích a v mateřské rostlině
- Endosperm není haploidní



Je embryo derivátem diploidního pylu?

- ♀ *C. sempervirens* X ♂ *C. dupreziana*
- Morfologické a cytologické srovnávací analýzy
- Genetická diverzita
 - Isozymy
 - RAPD



Pichot (2001)

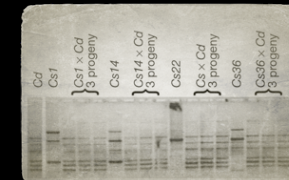
Paternální apomixie

Cypřiš tassilský (*Cupressus dupreziana*)

- Apomiktický vývoj pylu

Cypřiš vřdyzelený (*Cupressus sempervirens*)

- Náhradní matka
- Vajíčko umožní vývoj embrya z diploidní pylové láčky jiného druhu



Pichot (2001)

Paternální apomixie

Cypřiš vřdyzelený (*Cupressus sempervirens*)

- Haploidní pyl

Cypřiš tassilský (*Cupressus dupreziana*)

- Náhradní matka
- Vajíčko umožní vývoj embrya z haploidní pylové láčky jiného druhu



Pichot (2001)

Mikrogametogeneze

II. pylová mitosa

Generativní buňka → 2 buňky spermatické

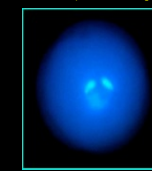
Dvojbuněčný/trojbuněčný pyl

PMII po vyklíčení v rostoucí láčce

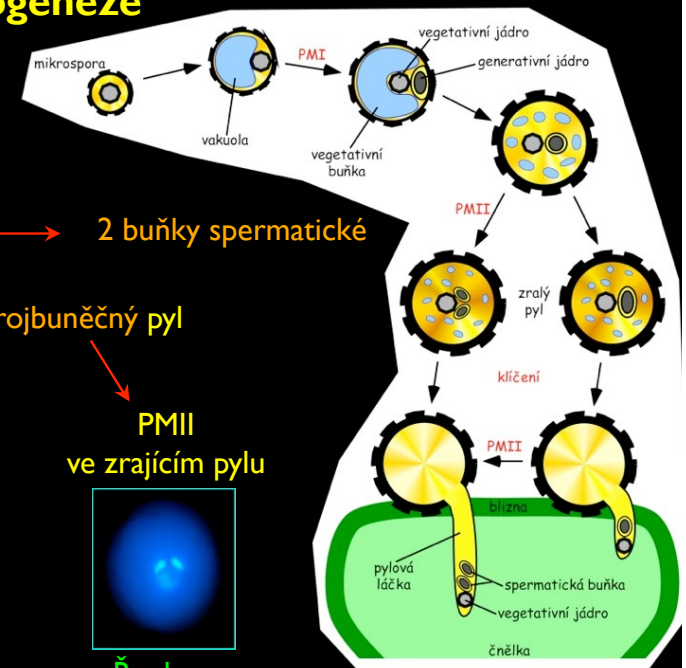


Tabák

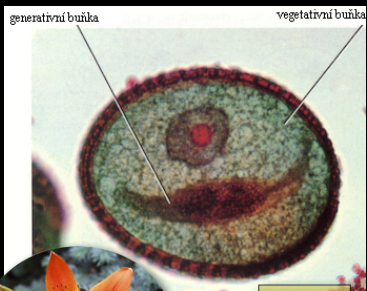
PMII ve zrajícím pylu



Řepka

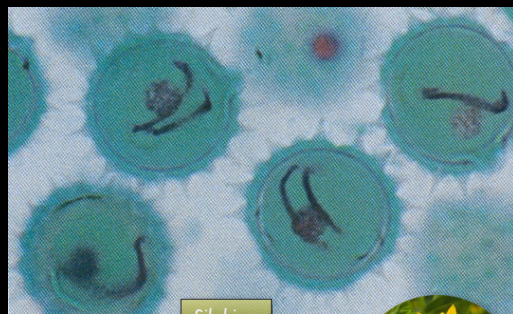


Vývoj samčího gametofytu



Zralý samčí gametofyt

vegetativní buňka s buňkami spermatickými



Lilium

Silphium

Dvojbuňčný pyl: *Solanaceae, Liliaceae* (asi 70%)

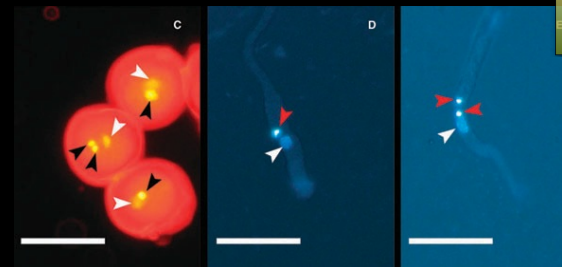
Trojbuňčný pyl: *Poaceae, Brassicaceae* (asi 30%)

asi deset rodů tvoří oba druhy pylu

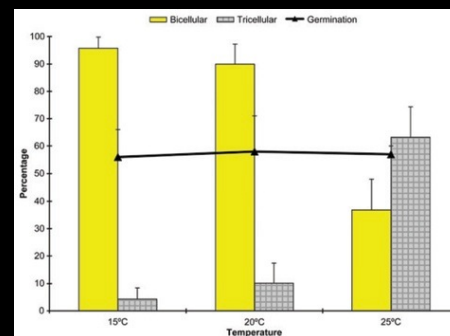
Vznik mikrospor a vývoj samčího gametofytu koreluje s dalším vývojem prašníku

Raven P.H., Everet R.F., Eichhorn S.E.: Biology of Plants. – W. H. Freeman and Comp. Publ., 2005

Přechodný typ pylu



Annona cherimola



Oba typy pylu v jednom květu
Poměr závisí na teplotě
Klíčivost zhruba stejná



Lora et al. (2009) Am J Bot

Profáze

Metafáze

II. pylová mitosa

Arabidopsis thaliana

Anafáze

Telofáze

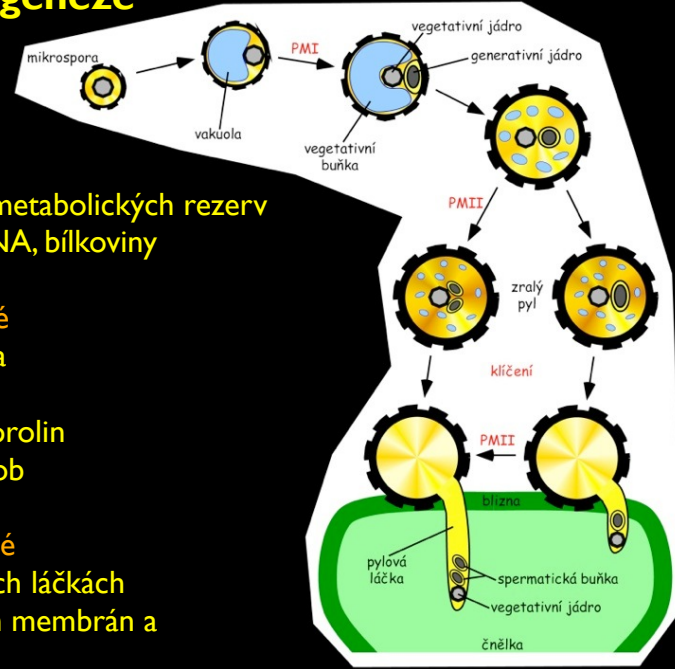
© Anjusha Durberry, unpubl.

Mikrogametogeneze

Vegetativní buňka

Akumulace značných metabolických rezerv sacharidy, lipidy, RNA, bílkoviny

- 1) Rezervy krátkodobé
Růst pylového zrna
Syntéza intiny
Osmoprotekce – prolin
Dehydratace - škrob
Pylová mitosa II
- 2) Rezervy dlouhodobé
Využity v rostoucích láčkách
Syntéza buněčných membrán a buněčné stěny



Mikrogametogeneze

Rozpad a degradace vakuoly

Degradace škrobu

Dehydratace pylu
stupeň dehydratace:

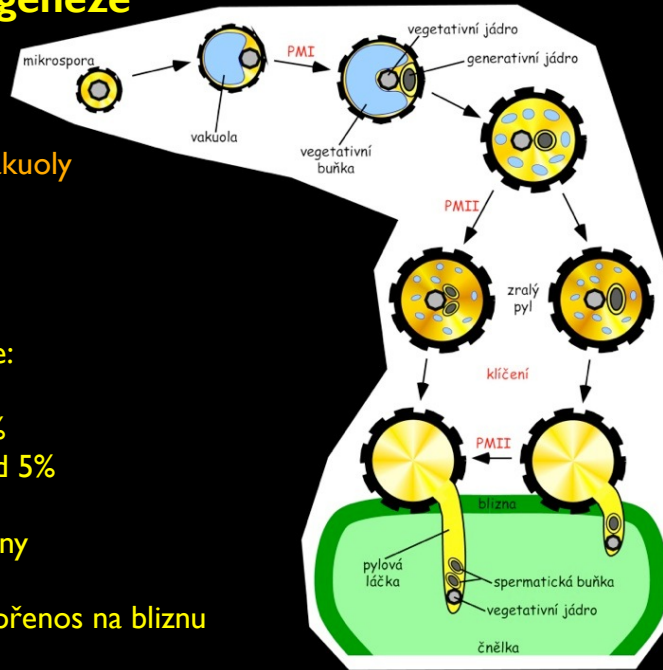
Topol – 94%

Kukuřice – 50%

Tykvovité – pod 5%

Zásobní RNA a bílkoviny

Uvolnění z prašníku a přenos na bliznu



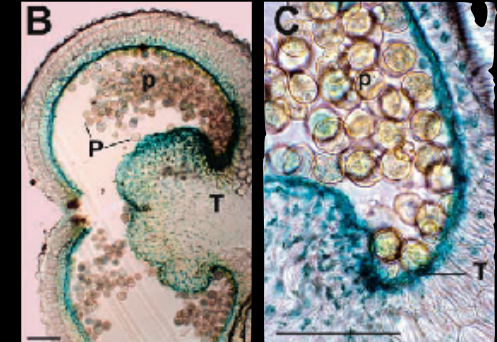
Interakce gametofytu se sporofytem

Tapetum

Vrstva buněk obklopující
prašné pouzdro

Dočasná přítomnost zejména
během vývoje mikrospor

Programovaná buněčná smrt



Pro vývoj pylu zásadní – popsáno mnoho sporofytických mutací
způsobujících samčí sterilitu

- 1) Syntéza kalasy – uvolnění mikrospor z tetrád
- 2) Výživa mikrospor a mladého pylu
- 3) Podíl na tvorbě pylové buněčné stěny a dalších obalů

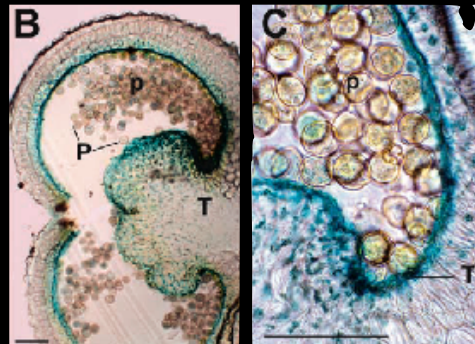
Interakce gametofytu se sporofytem

Tapetum

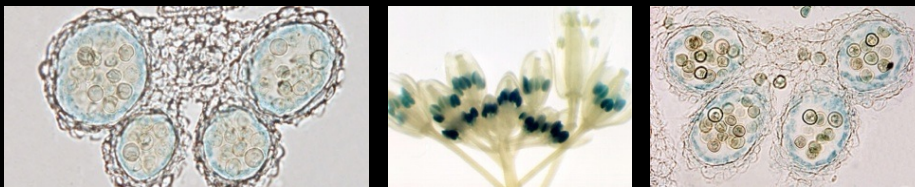
Vrstva buněk obklopující
prašné pouzdro

Dočasná přítomnost zejména
během vývoje mikrospor

Programovaná buněčná smrt

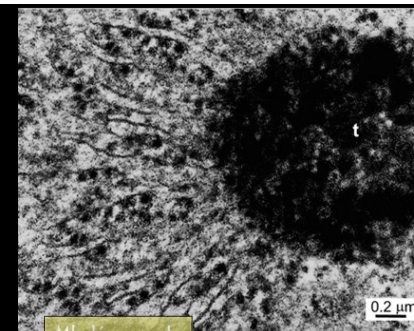


Koordinovaná exprese genů v tapetu a v pylu



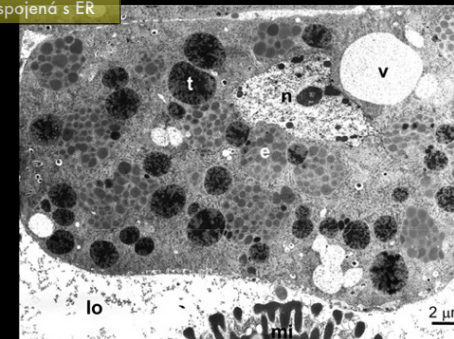
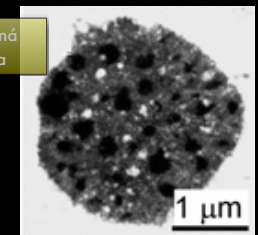
Tapetozom

Organela charakteristická pro tapetum,
odvozena z endoplazmatického retikula,
obsahuje neutrální lipidy, flavonoidy
kryté vrstvou lipidů a oleozinů (proteiny)



Mladá organela
spojená s ER

Zralá volná
struktura



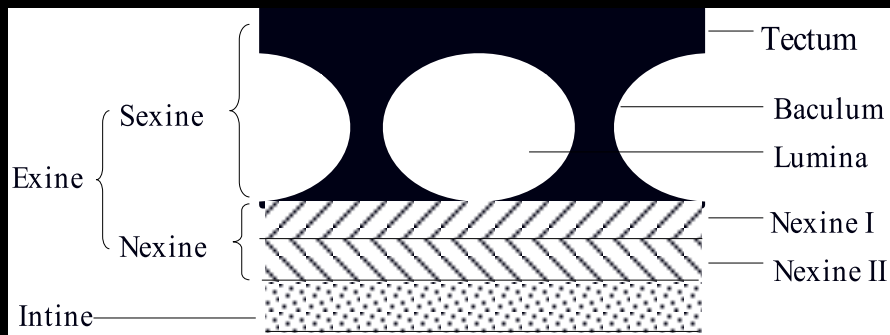
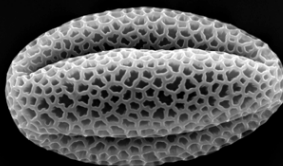
v – vakuola
n – jádro
t – tapetozom
e – elaioplast (forma plastidů)
lo – prostor prašného pouzdra

Buněčná stěna pylového zrna

Zcela unikátní struktura a chemické složení

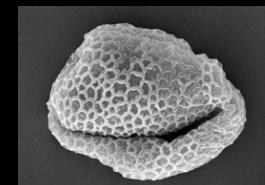
Syntéza společným působením sporofytu a gametofytu

Proměnlivé složení v různých obdobích – fenomén kalosy

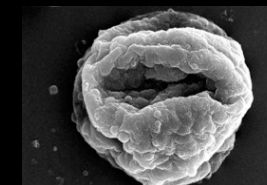


Mutace ve formování stěny

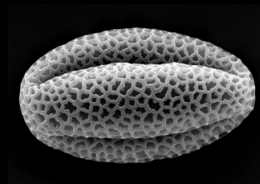
Arabidopsis thaliana



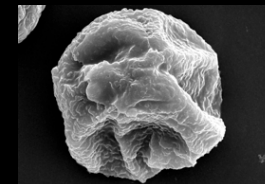
WIP316



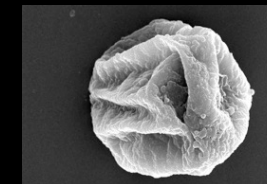
WIP117



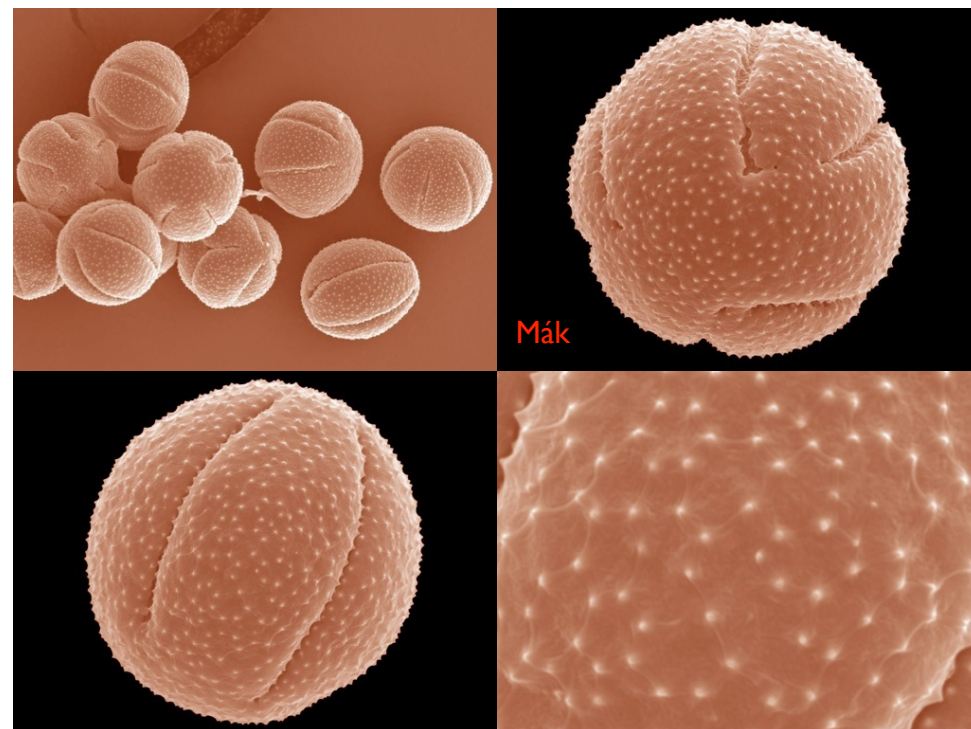
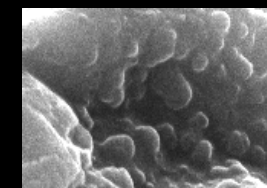
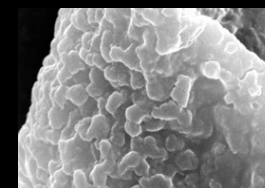
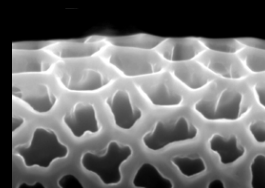
WT



WIP277

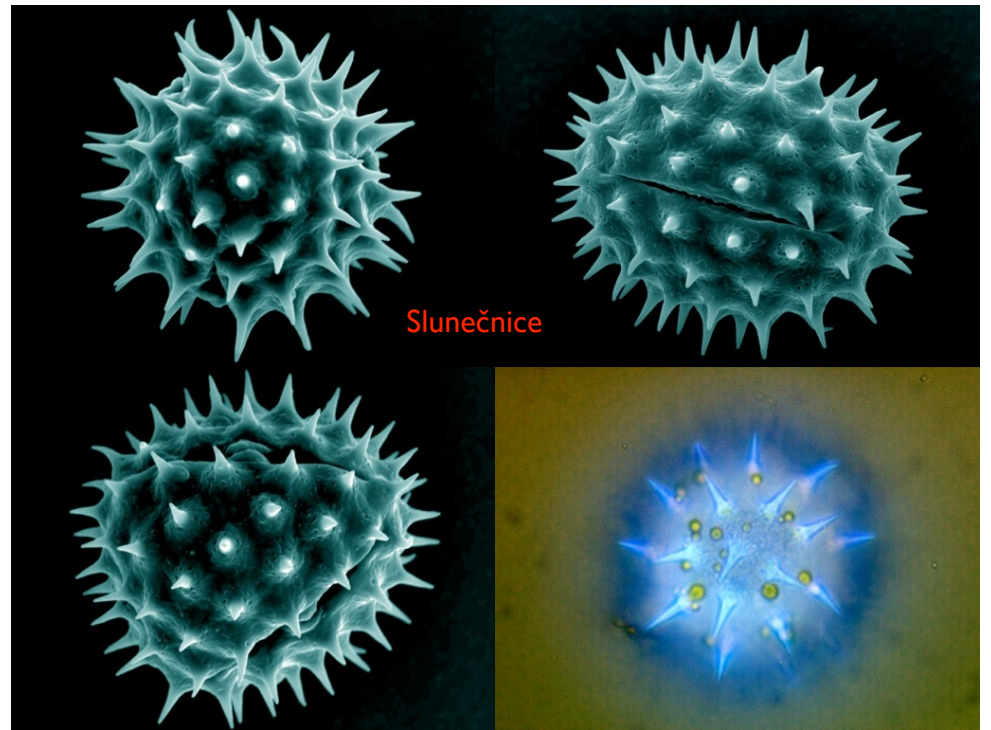


WIP278

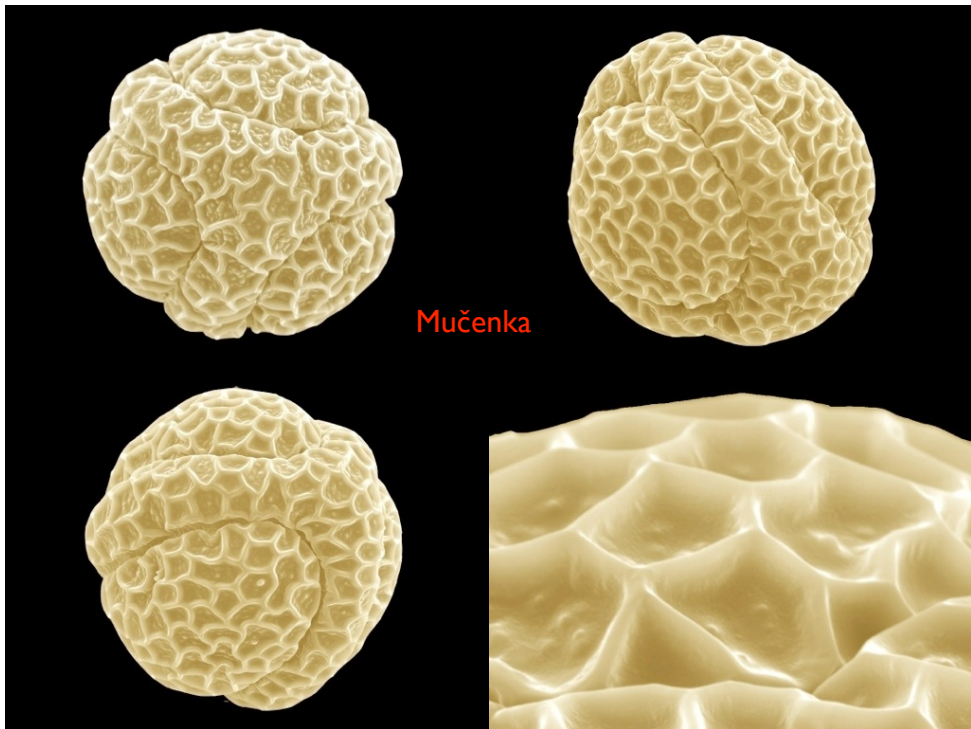




Mimosa

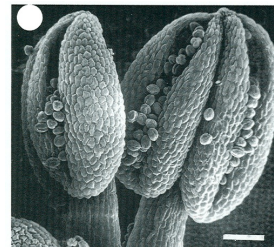


Slunečnice



Mučenka

Uvolnění pylu z prašníku



Arabidopsis thaliana

Bowman (1994) Arabidopsis. An Atlas of Morphology and Development



Pinus



Přenos pylu na bliznu / opylení

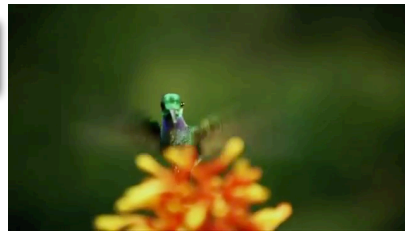
Samosprašnost / cizosprašnost
(Autogamie / alogamie)

Kleistogamie



Větrosprašnost
(anemofilie)

Hmyzosprašnost
(entomofilie)
zoofilie
hydrofilie



Snížení možnosti autogamie

Heterostylie

Dichogamie
Proterogynie x protandrie



Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honyš

Blizna



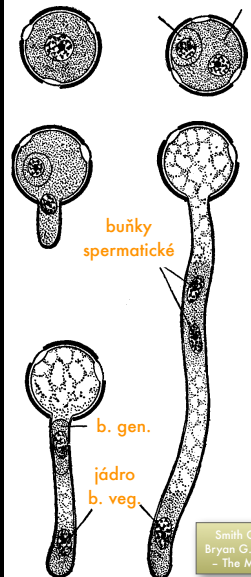
Papilární buňky

Čnělka

© Jürgen Berger / Heiko Schoof - MPI

Klíčení pylu na blizně

buňka
mikrospora generativní buňka vegetativní



buňky
spermatické

b. gen.

jádro
b. veg.



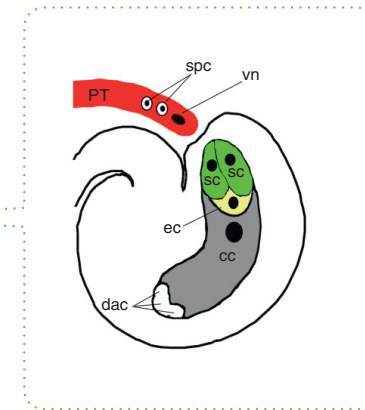
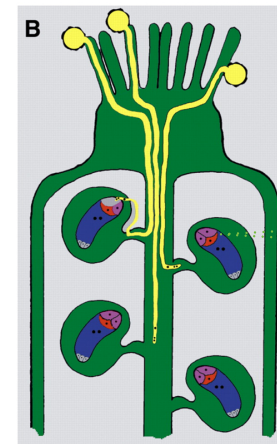
Impatiens glandulifera

Klíčení pylu na blizně – hydratace pylu
Růst pylové láčky

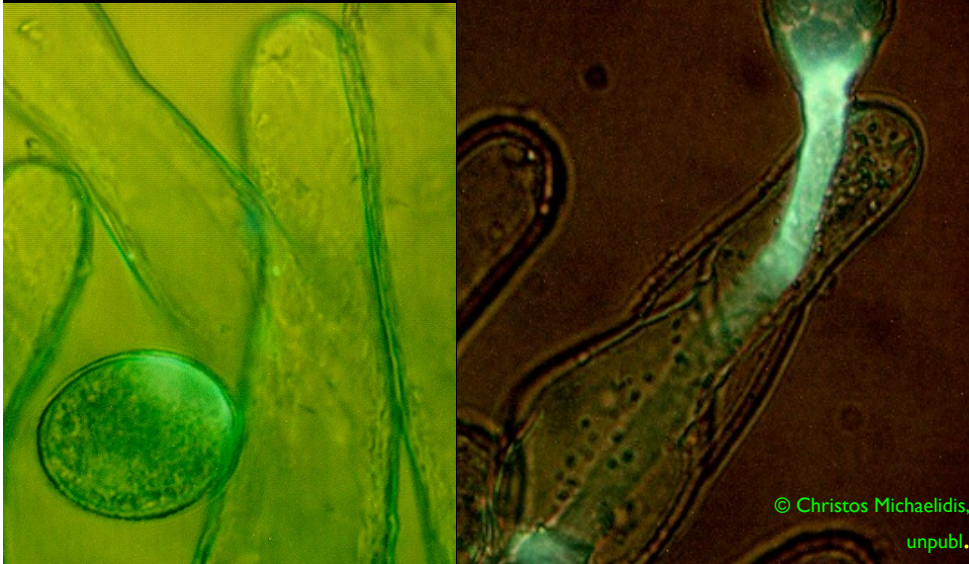
Smith G.M., Gilbert E.M., Evans R.I., Duggar B.M., Bryan G.S., Allen Ch.E.: A Textbook of General Botany. - The Mackmillan Comp. 1946, New York. Upraveno

Crest M., Blackmore J., van Went J.L.: Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants. - Springer-Verlag, Berlin 1992

Růst pylové láčky pletivy čnělky



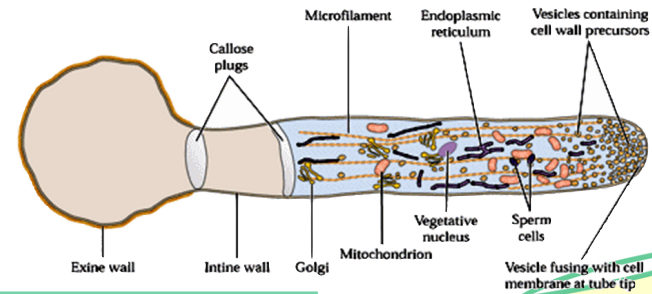
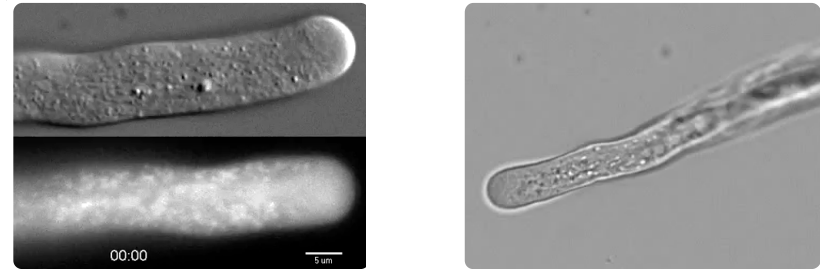
Aktivace a klíčení pylového zrna



Kalosoové zátčky



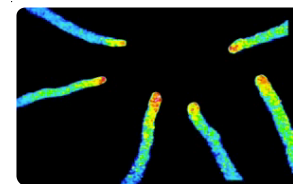
Progamická fáze



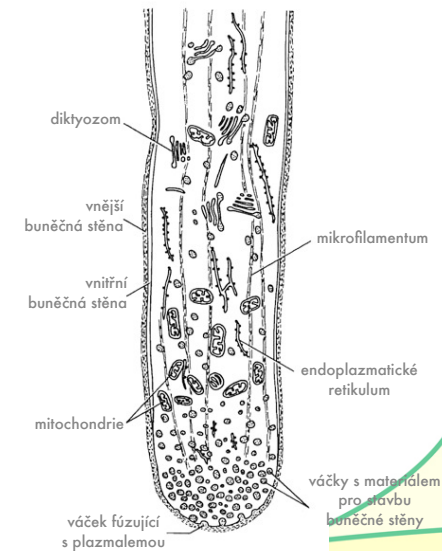
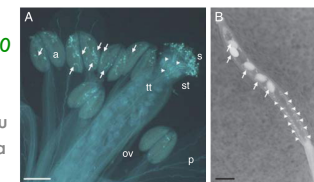
Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honys

Pylová láčka - apikální růst

Apikální růst pylové láčky
 vodící pletivo čnělky – gradient Ca^{2+} ,
 postupná syntéza BS od špičky
 ukládání a zesíťování pektinů
 glykosylace proteinů
 (arabinogalaktanové proteiny - AGP)



agp6/agp11/agp40
 klíčení láček již
 v prašníku
 pomalý růst čnělkou
 neoplozená vajíčka

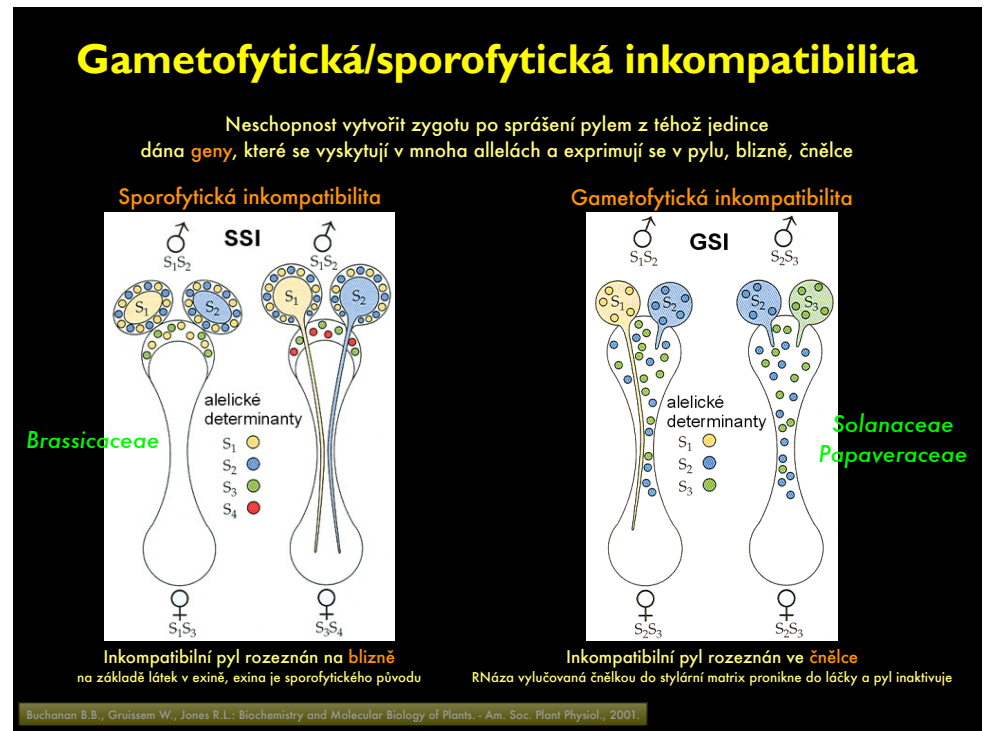
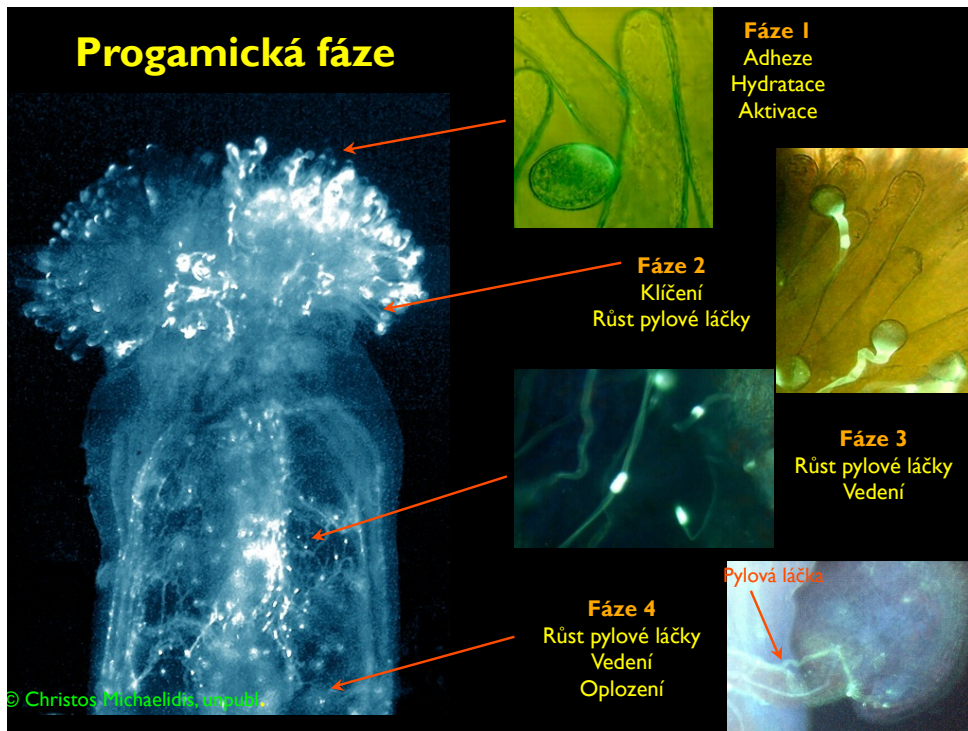


Raven (2005) Biology of Plants

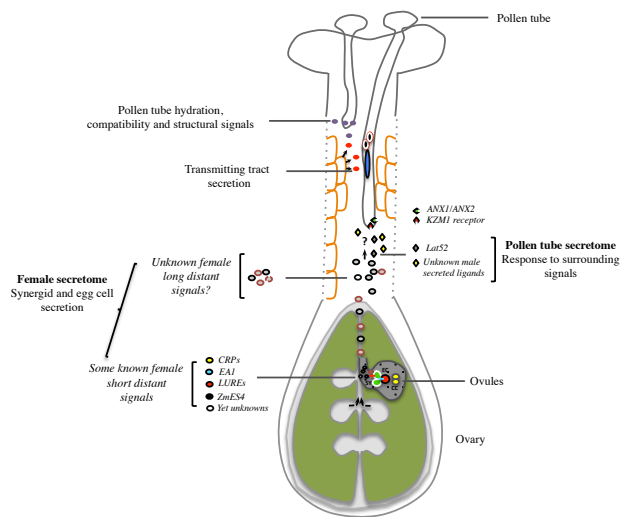
Mascarenhas (1993) TPC

Nguema (2012) Ann Bot

Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honys



Vedení pylové láčky v pestíku

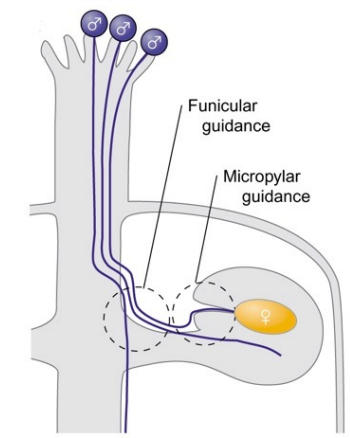


Vedení pylové láčky pestíkem (Guidance)

Gametofytická fáze

Komplexní proces
kontrola směru růstu láčky-
zárodečný vak
aktivace láčky (Ca⁺⁺/Rop/aktin)
odpuzení pomalejších láček

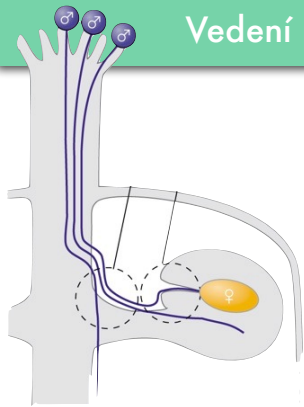
Dvě složky
Funikulární signál - delší dosah
Mikropylární signál - kratší dosah



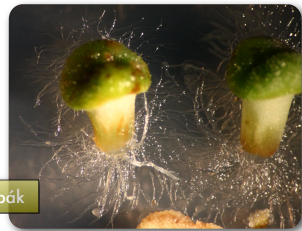
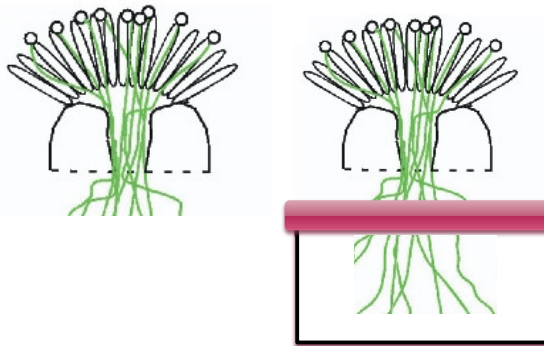
Signál ???

- Funikulární - přímý difundující z vaječníku **???** nepřímý způsobující změny ECM odpuzuje přebytečné láčky
- Mikropylární - nepochybně difundující signál; chemické složení ??? mutace *magatama (maa)* - láčky nenajdou mikropyle

Vedení pylové láčky - interakce s pletivou čnělky

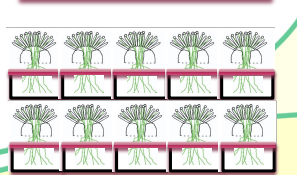


Efekt přítomnosti izolovaného vajíčka v médiu



tabák

Said Hafidh 2012



Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honyš

Vedení pylové láčky

Efekt přítomnosti izolovaného vajíčka v médiu



0 min

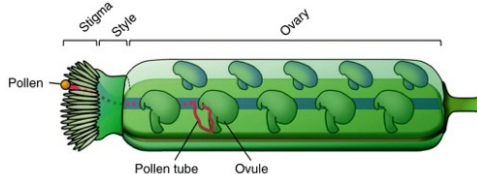
20 min

Takeuchi (2011) COPB

Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honyš

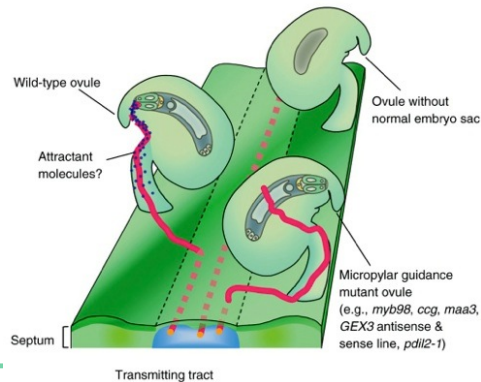
Vedení pylové láčky

Efekt přítomnosti izolovaného vajíčka v médiu:



0 min

20 min



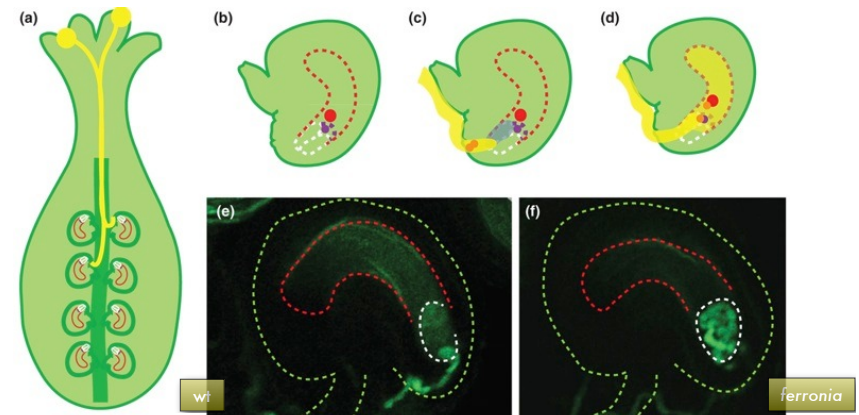
Mutace *magatama (maa)* - pylová láčka nenajde mikropyle a bloudí okolo

MAGATAMA - RNA helikasa

Takeuchi (2011) COPB

Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honyš

Vedení pylové láčky pestíkem (Guidance)



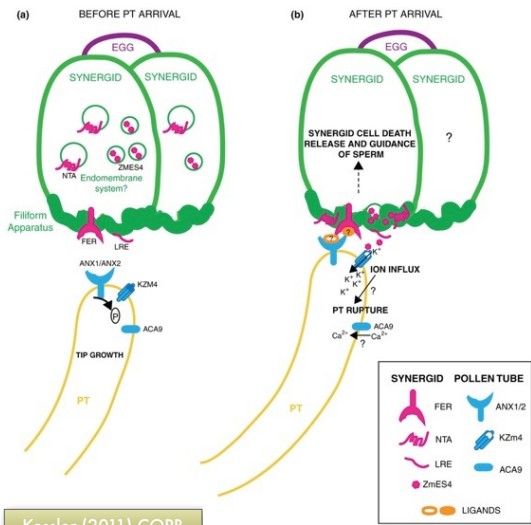
Mutace *ferronia (fer)* - pylová láčka najde mikropyle, ale v synergidě nepukne a snaží se dál růst

FERRONIA - receptor-like kinasa

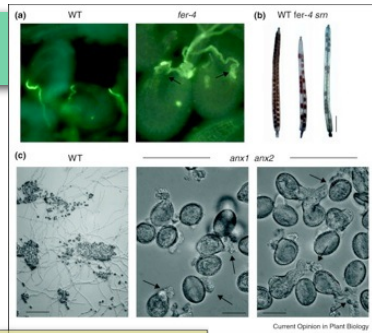
Kessler (2011) COPB

Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honyš

Vedení pylové láčky



Kessler (2011) COPB



Cheung (2011) COPB

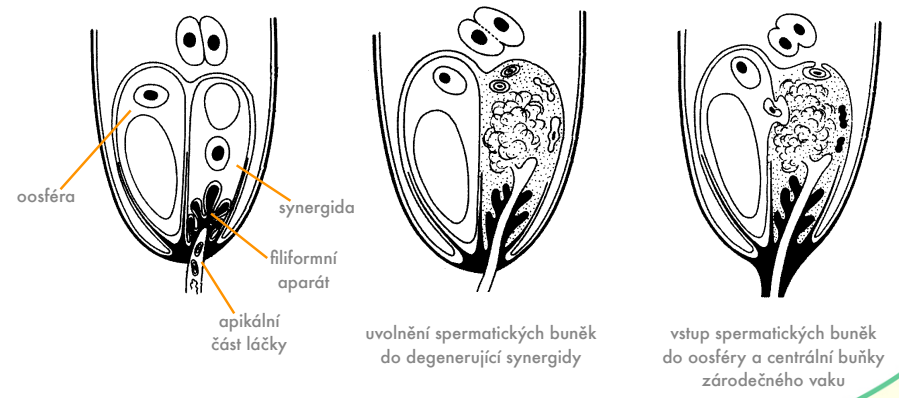
Signální komplexy:

- 1) interakce **FERRONIA (FER)** α **ANXUR1/ANXUR2 (ANX1/ANX2)** - receptor-like kinasy - přes zatím neznámý ligand - snad **ML (sugar-binding protein)**
- 2) **LORELEI (LRE)** - GPI-anchored protein - signál pro PT

Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honys

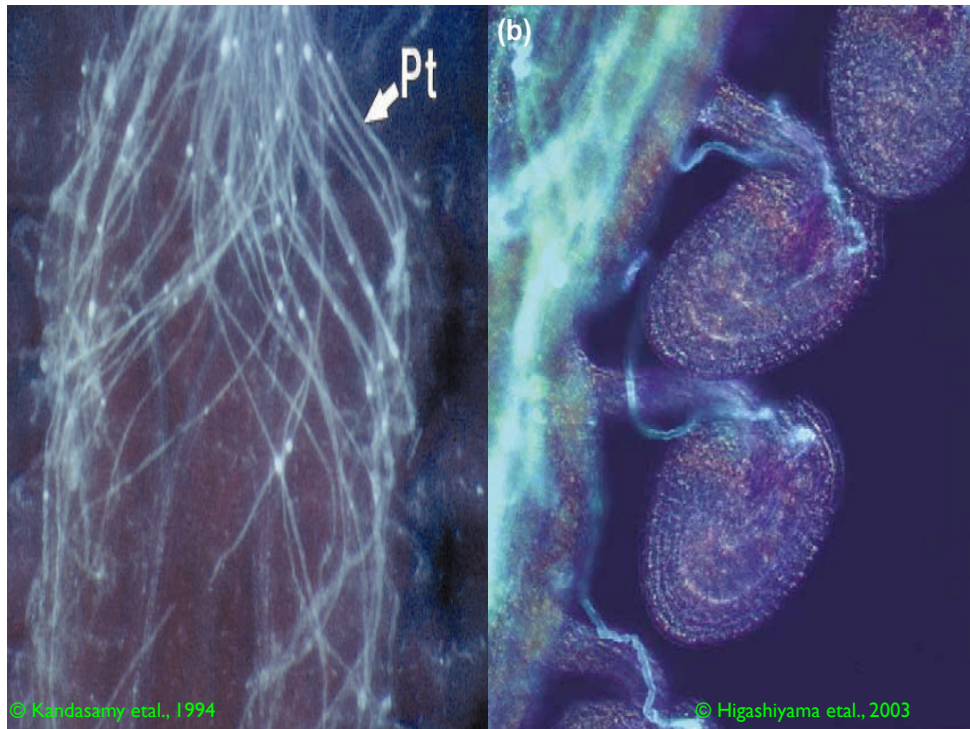
Dvojité oplození krytosemenných rostlin

Jádra musí být ve stejné fázi buněčného cyklu, chromatin nesmí bránit fúzi jader



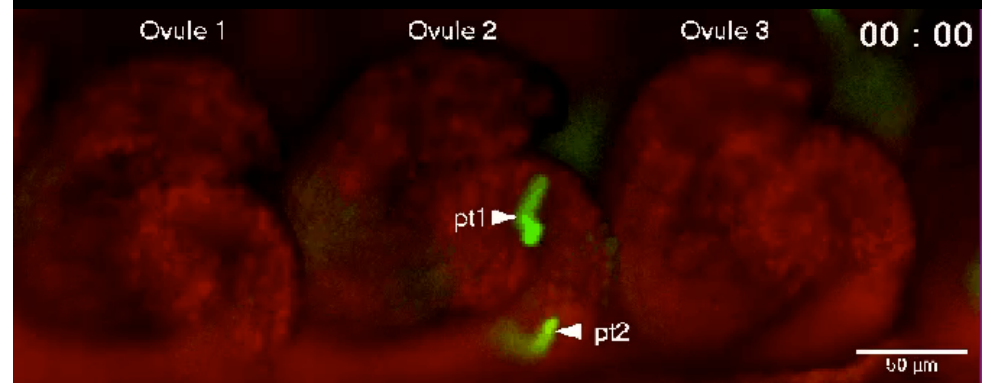
Podle Lörsten N. R.: Flowering Plant Embryology. Blackwell Publ., Ames, Iowa, 2004.

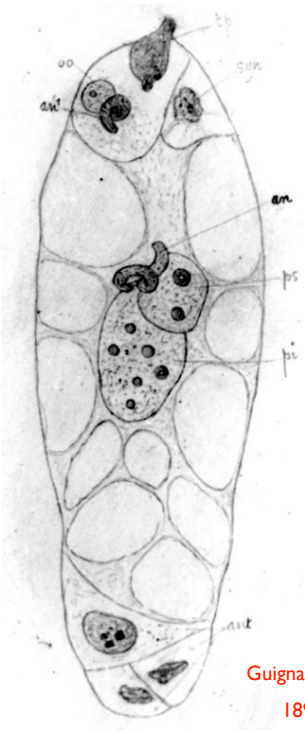
Růst a vývoj rostlin, KEBR PFF UK, David Honys



Vedení pylové láčky pestíkem (Guidance)

Gametofytická fáze





Guignard 1899

Oplození

- Vniknutí láčky do zárodečného vaku
- synergida
- rozpad vegetativního jádra pyl. láčky
- plazmogamie, karyogamie, syngamie

Dvojitě oplození

I. spermatická b. + b. vaječná

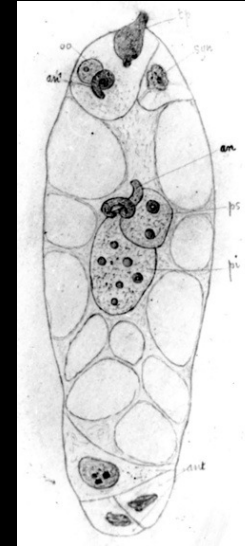
diploidní zygota

embryo

II. spermatická b. + diploidní jádro zralého zárodečného vaku

triploidní endosperm

Dvojitě oplození krytosemenných rostlin



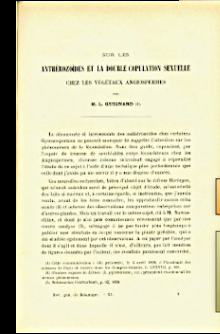
Guignard 1899

Nawaschin, Sergion (1898):
Resultate einer Revision der
Befruchtungsvorgänge bei
Lilium martagon und Frillaria
tenella. Bull. Acad. Imp. Sci. St.
Petersburg 9, 377-382.

1898



Sergion Nawaschin
(1857 - 1930)



1899



Leon Guignard
(1852 - 1928)

