

Blok 3

Vývoj a funkce samčího a samičího gametofytu

Úlohy

1. Organely v pylu a pylových láčkách
2. Jak atraktivní jsou vajíčka?
3. Aktivita promotorů v gametofytu
4. Vývojové mutace pylu

Teoretický úvod

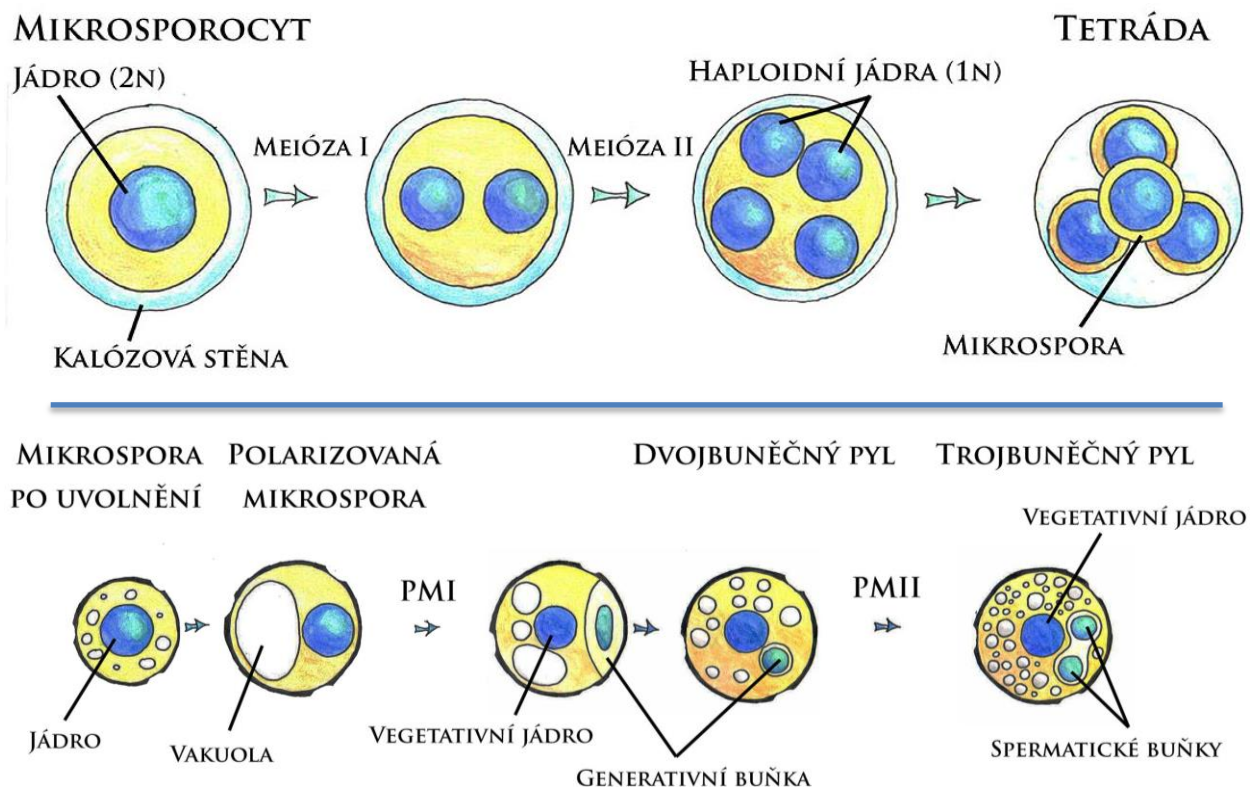
Samčí gametofyt

Samčí gametofyt krytosemenných rostlin (pylové zrno) se působením dlouhodobých evolučních tlaků vyvinul do struktury tvořené třemi haploidními buňkami. Ve srovnání se sporofytem představuje jednoduchý a vysoce redukovaný systém, který poskytuje unikátní příležitost ke studiu regulace genové exprese při vývoji pylového zrna a funkčních interakcí mezi různými typy buněk.

Vývoj samčího gametofytu (**Obr. 1**) je komplexní proces, který vyžaduje koordinovanou spolupráci rozličných buněčných typů a pletiv a s tím související specifickou genovou expresi. Podílí se na něm pletiva gametofytická (mikrospora, zrající pylové zrno, pylová láčka) i sporofytická (prašník, tapetum, vodivá pletiva čnělky).

Gametofytickou vývojovou fází je možno rozdělit do dvou následných období, vývojového a funkčního. Vývojová fáze se odehrává v prašných pouzdrech a je ukončena uvolněním zralých pylových zrn z prašníků. Mutace regulačních genů v tomto období může mít dramatický vliv na proces dozrávání. Funkční neboli progamická fáze začíná po přenesení pylu na bliznu, kde se buňka vegetativní přetvoří do podoby pylové láčky a dopraví dvě buňky spermatické do zárodečného vaku, kde dochází k dvojitému oplození.

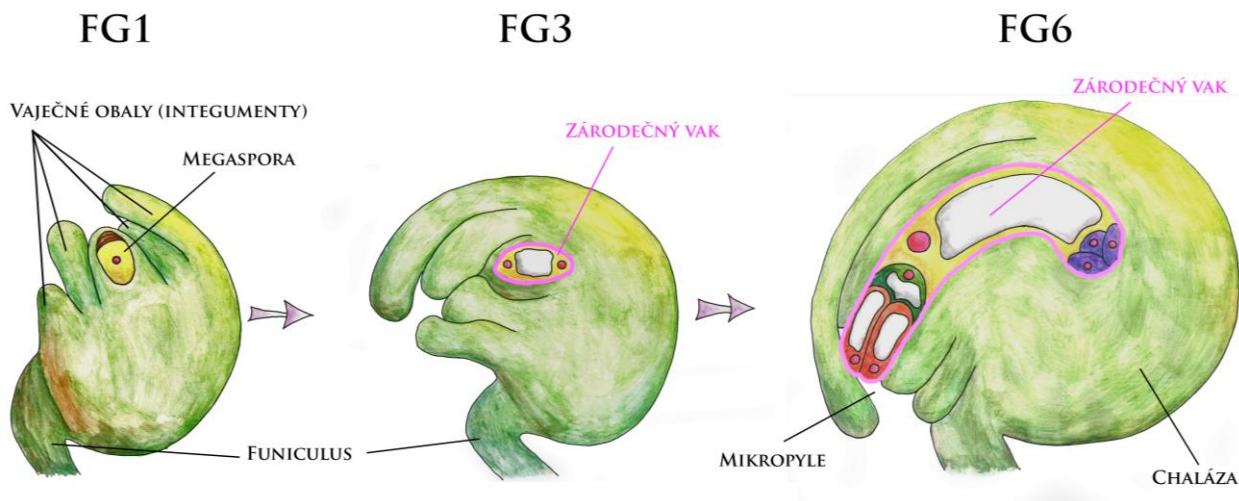
Ačkoli zrání pylu může působit jednoduchým dojmem, přepnutí sporofytické vývojové dráhy na cestu gametofytickou je spojeno s množstvím konkrétních buněčných procesů, které podmiňují růst mikrospor, buněčné dělení a diferenciaci vegetativní a generativní buňky. Mezi klíčové regulační kroky patří asymetrické dělení mikrospor (I. pylová mitóza, PMI), syntéza specifické stěny pylového zrna, dělení generativní buňky (II. pylová mitóza, PMII), zrání pylového zrna, jeho dehydratace, následná rehydratace a klíčení pylové láčky. Celý vývojový proces je po celou dobu přesně kontrolován modulací genové exprese na všech jejích regulačních úrovních.



Obr. 1: Vývoj samčího gametofytu. Upraveno podle Borg and Twell, 2011. © Alena Náprstková

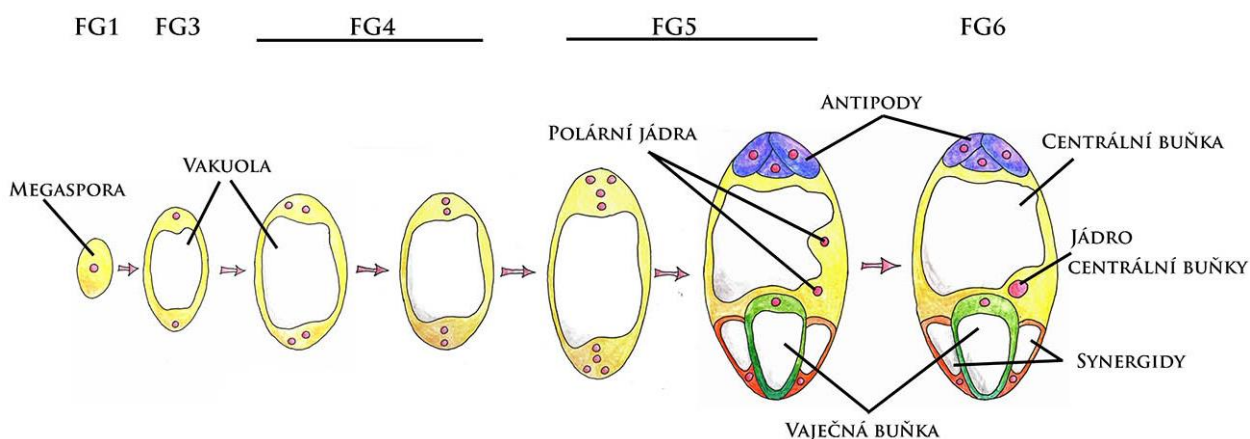
Samičí gametofyt

U krytosemenných rostlin samičí zárodečné listy srůstají a vytvářejí pestík, který je na bázi tvořen semeníkem, z něhož vyrůstá čnělka zakončená bliznou. V semeníku se zakládají vajíčka, která jsou připojena poutkem (funiculus) k placentě. Vnější obal vajíčka se člení na dva vaječné obaly (integumenty). Pylová láčka prorůstá k zárodečnému vaku skrze otvor v integumentech, tzv. mikropyle. Protějšší pól se nazývá chaláza (**Obr. 2a**). Vnitřek vajíčka je



Obr. 2a: Megagametogeneze. Upraveno podle Drews and Koltunow (2011). © Alena Náprstková

vyplněn zárodečným pletivem (nucellus), v němž se vyvíjí mateřská buňka zárodečného vaku. Jejím meiotickým dělením vznikají čtyři haploidní megaspory, z nichž se dále vyvíjí jen jedna. Megaspóra dále prochází třemi mitózami, které vedou ke vzniku zralého zárodečného vaku – samičího gametofytu. Tři buňky poblíž mikropyle vytvářejí vaječný aparát (vaječná buňka a dvě synergidy). Na chalazálním pólu se nacházejí tři antipody a ve středu zárodečného vaku vzniká diploidní centrální buňka (**Obr. 2b**).

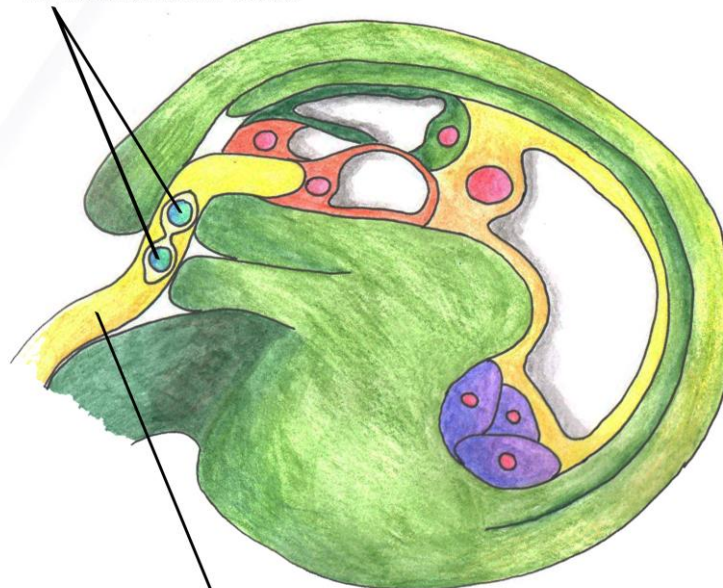


Obr. 2b: Megagametogeneze. Upraveno podle Drews and Koltunow (2011). © Alena Náprstková

Dvojité oplození

Dvojité oplození je komplexní fertilizační mechanismus krytosemenných rostlin (angiosperm). Začíná dopadem pylového zrna na bliznu, jeho aktivací a vyklíčením pylové láčky, která prorůstá pletivou pestíku až k vajíčku. Po dosažení mikropyle se dostává až k zárodečnému vaku, interaguje s receptivní synergidou (jež následně odumře), praskne a uvolní svůj obsah i s oběma spermatickými buňkami (**Obr. 3a**). Synergidy plní důležitou úlohu v přilákání pylové láčky vylučováním různých peptidů (např. LURE) a následně při vzájemné komunikaci pomocí vápenatých iontů. “Rozhovor” (cross-talk) mezi samčím a samičím gametofytem během oplození jsou intenzivně studovány, avšak přesné mechanismy nejsou známy. Příklady genů, jejichž mutace způsobují poruchy při oplození, jsou *FERONIA*, *LORELEI*, *NORTIA*, členové rodiny defensinů (*DEF*) a transkripční faktory z rodiny *MYB*. Po uvolnění spermatických buněk splývá jedna z nich s vaječnou buňkou za vzniku diploidní zygoty, která se později vyvíjí v embryo. Druhá spermatická buňka se účastní oplození centrální buňky zárodečného vaku, čímž vzniká polyploidní (triploidní) endosperm, který vyživuje vyvíjející se embryo (**Obr. 3b**).

DVĚ SPERMATICKE BUNKY

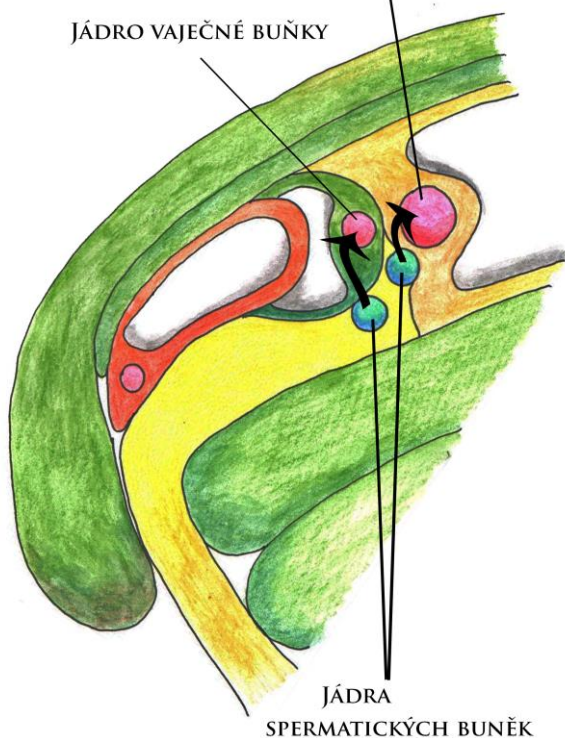


PYLOVÁ LÁČKA VSTUPUJÍCÍ DO ZÁRODEČNÉHO VAKU

Obr. 3a: Vstup pylové láčky do zárodečného vaku. Upraveno podle Drews and Koltunow (2011). © Alena Náprstková

JÁDRO CENTRÁLNÍ BUŇKY ZÁRODEČNÉHO VAKU

JÁDRO VAJEČNÉ BUŇKY



JÁDRA
SPERMATICKÝCH BUNĚK

Obr. 3b: Dvojité oplození. Upraveno podle Drews and Koltunow (2011). © Alena Náprstková

Doporučená literatura:

Dresselhaus, T., Sprunck, S. and Wessel, G.M. 2016. Fertilization Mechanisms in Flowering Plants. *Current Biology* 26:R125-R139.

Hafidh, S., Fíla, J. and Honys, D. Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction*, 29:31-51.

Fischer, L. a Pavlová, L. Růst a vývoj rostlin. 2012. Karolinum.

Úlohy

1. Organely v pylu a pylových láčkách

Cíl úlohy:

Použitím fluorescenčně značených markerových proteinů lze vizualizovat různé buněčné kompartmenty. Cílem úlohy je pozorování a popis lokalizace jednotlivých markerů v pylových zrnech na subbuněčné úrovni.

Princip úlohy:

Fúzní protein se známou subcelulární a případně i pletivově-specifickou lokalizací je nazýván markerem. Marker slouží k vizualizaci organel a struktur a používá se také při studiu buněčného osudu (cell fate) v mutantních liniích s narušeným vývojovým programem, kde bývá ovlivněna jeho exprese.

Zadání

Budeme sledovat lokalizaci fúzních proteinů/markerů ve zralém pylu a pylových láčkách.

Použity jsou následující fúzní proteiny:

	Marker	Značení: vyplňte
1	pHtr10:HTR10::RFP, pLat52::GFP	
2	pLat52::EMB2036::GFP	
3	pCen3:CEN3::GFP	
4	pDan1::NLS::DAN1::YFP	

Příprava kultivačního média pro pylové láčky:

Složka	Finální koncentrace	Zásobní roztok	Pro 10 ml média (doplnit dH ₂ O)
Sacharóza	10%	X	1 g
H ₃ BO ₃	0,01%	20%	5 µl
CaCl ₂	5 mM	1 M	50 µl
MgSO ₄	1 mM	1 M	10 µl
Agaróza	1,5%	X	0,15 g
KCl	5 mM	1 M	50 µl

1. Médium musí být vždy čerstvě připravené. Všechny složky se smíchají, doplní destilovanou vodou (pipetou) na finální objem a médium se pomalu rozvaří v mikrovlnné troubě.
2. Na připravená podložní sklíčka pomocí pipety se žlutými špičkami (200 µL) nakreslíme horkým médiem obdélníkový obrys, který vyplníme médiem tak, aby vznikl tenký agarózový polštářek (max 2 mm). Každá skupina připraví dvě sklíčka s agarózovým polštářkem.
3. Po zatuhnutí média na něj nanese pyl ze dvou markerových linií rostlin. Z každé linie použijeme 3-5 otevřených květů. Pomocí mikropinzety uchopíme květ na bázi, tlakem se květní obaly rozevrou a zpřístupní prašníky. Květ otočíme a pyl otřeme jemně po povrchu média. Neryjeme do média!

4. Připravená sklíčka co nejdříve uložíme do komůrky s navlhčeným ubrouskem a necháme kultivovat při teplotě 22°C (ideálně stejné podmínky, při nichž byla kultivována mateřská rostlina). Po 4 hodinách na narostlé láčky kápneme 50% glycerol, přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme na fluorescenčním mikroskopu.
5. Pro snazší manipulaci s materiálem si připravíme také vzorky zralého pylu těch samých transgenních rostlin. Na podložní sklíčko naneste 10 – 15 µl barvicího pufru DAPI (**viz úloha 4**). Odtrhněte 4 – 5 květů, zmáčknete na bázi, ponořte vrchní část květu s odhalenými tyčinkami do kapky pufru a vytřepejte pyl z prašníků. Překryjte krycím sklem a pozorujte na fluorescenčním mikroskopu. Porovnáme s pozorovaným fluorescenčním signálem v pylových láčkách. DAPI vizualizuje buněčná jádra.
6. V protokolu uveďte **zadání, stručný postup a fotodokumentaci** pozorovaných buněčných struktur **dvou/tří vzorků v pylu a jednoho/dvou vzorků v pylové láčce s popisem lokalizace** jednotlivých markerů. Pokud budete skládat obrázky dohromady, vždy vkládejte i barevně rozdělené.

2. Jak atraktivní jsou vajíčka?

Cíl úlohy

Vajíčka uvolňují látky, které přitahují láčky a pomáhají jim k dosažení zárodečného vaku. Cílem úlohy je pozorování schopnosti vajíček přilákat pylovou láčku a jejich splnutí pomocí Blue Dot Assay.

Princip

Rostliny s vloženým genem pro enzym β -glukuronidázu (štěpí bezbarvý substrát X-glucA na barevný ve vodě nerozpustný produkt) pod kontrolou pylově specifického promotoru Lat52 lze použít pro vizualizaci pylových láček a sledování oplození vajíček pomocí modrého zabarvení (modrou tečku/Blue Dot) ve vajíčkách, která byla tímto pylem oplozena. Barvením vajíček ze samosprašných pestíků lze měřit účinnost oplození. Květy huseníčku jsou samosprašné a opylení nastává těsně před otevřením květu. Plně otevřené květy použité pro tuto úlohu tím pádem už budou obsahovat oplozená vajíčka.

Zadání

Barvicí roztok GUS:

Zásobní roztok	Složka	Konečná koncentrace	Pro 5 ml
x	GUS pufr	x	4,9 ml
0,1 M	Ferrokyanid draselný	0,5 mM	25 μ l
0,1 M	Ferrikyanid draselný	0,5 mM	25 μ l
0,2 M	X-Gluc A	2 mM	50 μ l

1. Jedna skupina připraví barvicí roztok GUS podle tabulky.
2. Každá skupina dostane 2 otevřené květy z rostlin huseníčku. Pomocí dvou pinzet s jemnými hroty otrháme kališní a korunní lístky.
3. Pestík položíme na podložní sklíčko s oboustrannou lepicí páskou švem navrch a jemně tenkou inzulinovou jehlou rozřízneme podél švu po obou stranách, nakonec odřízneme bázi pestíku a bliznu (řez pestíku provádíme pod stereolupou).
4. Hrotem jehly oddělíme celou placentu s vajíčky a přeneseme do mikrozkušavky s barvicím roztokem GUS (100 μ l).
5. Inkubujeme při 37°C a průběžně kontrolujeme stav zabarvení (1-2 hodiny). Následně vzorky pinzetou jemně přeneseme na podložní sklíčko s kapkou pufru GUS a pozorujeme na stereolupě a na mikroskopu ve světlém poli.
6. V protokolu uveďte **zadání, stručný postup a fotodokumentaci vajíček** (oplozeného a neoplozeného) a **vyvodte závěry**.

3. Aktivita promotorů v gametofytu

Cíl úlohy

Na vývoji gametofytů se podílí velké množství genů aktivních v různých vývojových stádiích a pletivech vajíček a prašníků. Cílem je lokalizace aktivity promotorů vybraných genů v příslušných pletivech či orgánech květenství.

Princip

Reportérový gen GUS byl vložen do genomu huseníčku pod kontrolou zkoumaných promotorů. Po inkubaci se substrátem pro enzym β -glukuronidázu jsme schopni vizualizovat expresi fúzního proteinu na základě modrého zabarvení.

Zadání

Barvicí roztok DAPI:

Zásobní roztok	Složka	Konečná koncentrace	Pro 5 ml
x	GUS pufr	x	5 ml
0,5 mg/ml	DAPI	0,4 μ g/ml	4 μ l

1. Každá skupina dostane tři různé vzorky květenství huseníčku. Jedná se o stabilní linie s vnesenými konstrukty typu promotor::GUS. Vzorky pro dvě linie již budou připraveny (barvení trvá 1-2 dny) a naloženy v alkoholu.
2. My si obarvíme jeden vzorek květenství (inkubace 1-2 hodiny v 37°C) v barvicím pufru GUS (**viz úloha 2!**).
3. Obarvená květenství přeneseme pinzetou na podložní sklíčko s vodou a rozprostřeme pomocí inzulinových jehel tak, aby byla vidět všechna vývojová stadia květů. Zdokumentujeme barvení všech vzorků na stereolupě.

	Linie	Exprese
1	pLat52::GUS	
2	pAlba10::GUS	
3	pAlba20::GUS	
4	pAlba30::GUS	
5	pE2036::GUS	

4. Preparační jehlou odřežte prašníky z otevřených květů s obarveným pylem, ostatní materiál odstraňte.
5. K vzorku přidejte roztok DAPI (10 μ L), a nechte 10 minut barvit.
6. Pozorujte a zdokumentujte pylová zrna pod fluorescenčním mikroskopem v bílém poli a pod UV světlem.
7. V protokolu uveďte **zadání a stručný postup, fotodokumentaci všech vzorků s popisem exprese markeru** v jednotlivých liniích na úrovni květenství.

4. Vývojové mutace pylu

Cíl úlohy

Mutace genů důležitých při vývoji samčího gametofytu vedou k tvorbě pylových zrn s nestandardním fenotypem. Cílem je provedení fenotypové analýzy a popis ovlivnění vývoje pylu s absencí příslušného genu.

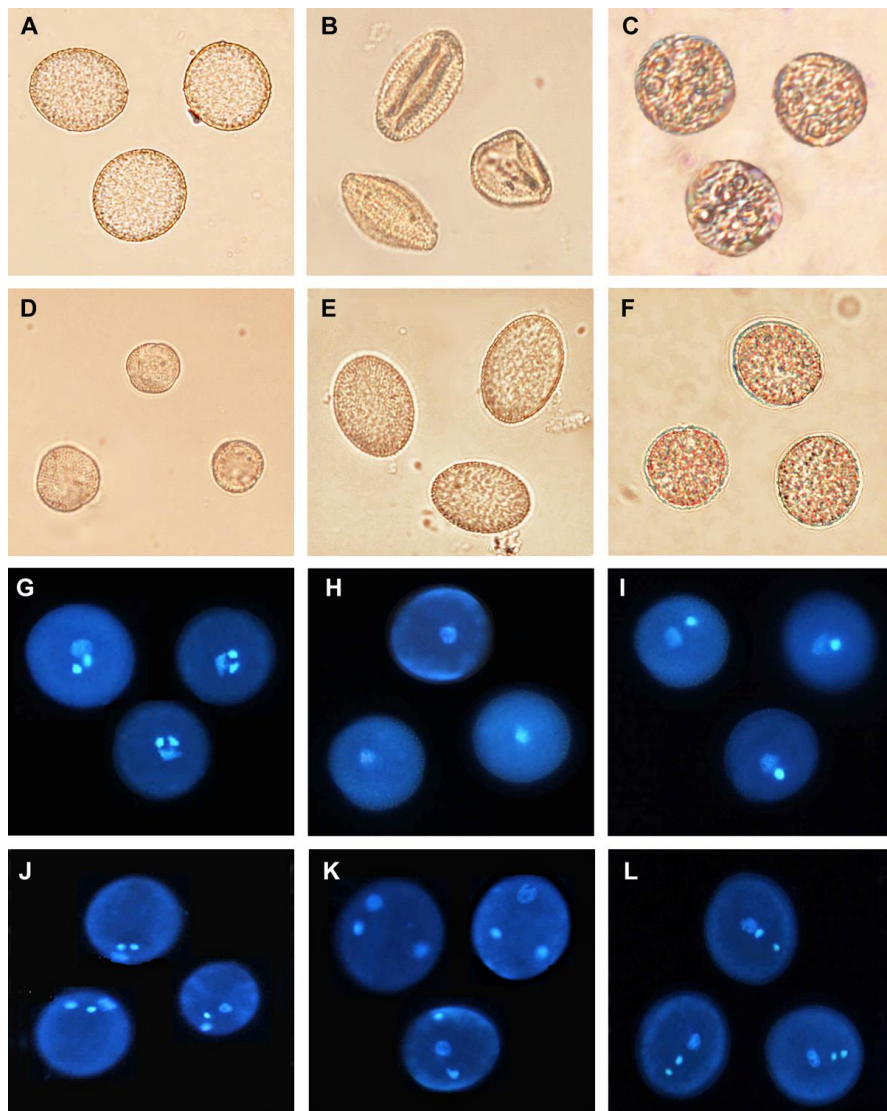
Princip

Fenotypová analýza pylu se provádí mikroskopicky ve světlém poli a v UV spektru. Pro fluorescenční mikroskopii barvíme pyl roztokem DAPI, který zviditelní jádra. Pro stanovení jednotlivých fenotypových tříd využijte přiloženého klíče (**Obr. 4**), který ukazuje příklady hodnocených aberací. Ve světlém poli je možné posoudit **velikost** a **tvár pylu** stejně jako přítomnost možných **inkluzí**. Fluorescenční mikroskopie nám poskytne informaci o **počtu** a **typech jader** buněk samčího gametofytu a tedy i o možných poruchách buněčného dělení.

Zadání

1. Každá skupina dostane dva vzorky květů huseníčku: mutantní rostlinu a kontrolní rostlinu divokého typu (Wild Type). Na dvě podložní skla naneste 10 – 15 µl barvicího pufru DAPI. Postupně do pufru ponořte 4 – 5 otevřených květů jejich vrchní částí a vyklepejte pyl z prašníků.
2. Přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte v UV spektru a ve světlém poli.
3. Zdokumentujeme **normální pylová zrna rostlin divokého typu** a **aberantní pylová zrna mutantních rostlin** (obojí ve světlém poli a UV spektru). V protokolu **popište pylové defekty** inzerčního mutantu a doplňte je **popisem fenotypových kategorií** (včetně fotodokumentace) pylových zrn.

Aberace v BF a pod UV jsou na sobě nezávislé!



Obr. 4: Příklady fenotypových defektů mutantních pylových zrn huseníčku ve světlém poli (A-F) a při užití fluorescence (G-L).

Fenotypové kategorie:

A, G – divoký typ;

B – aborce;

C – přítomnost inkluzí;

D – malé pylové zrno;

E – oválný pyl;

F – deformace buněčné stěny;

H – jednobuněčný pyl;

I – dvoubuněčný pyl;

J – excentrická poloha MGU;

K – rozpadlá MGU;

L – lineární MGU;

MGU – „male germ unit“, strukturní a funkční jednotka tvořená vegetativním jádrem a dvěma buňkami spermatickými. Foto D. Reňák.

Časový harmonogram úloh

1. Úloha 1: nasadit láčky na *in vitro* růst
2. Úloha 3: nasadit barvení květenství GUS
3. Úloha 2: izolace vajíček, nasadit barvení Blue Dot
4. Úloha 4: pylové mutace-foto
5. Úloha 3: promotory-GUS (květenství)-foto
6. Úloha 2: Blue Dot-foto
7. Úloha 1: *in vitro* láčky/markery-foto