

Blok III

Vývoj a funkce samčího a samičího gametofytu

Jméno:

Úlohy

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

Časový harmonogram úloh

- | | | |
|-------------|---------------|---|
| a. Úloha 1: | (příprava) | nasadit láčky na <i>in vitro</i> růst |
| b. Úloha 3: | (příprava) | nasadit barvení květenství GUS |
| c. Úloha 2: | (příprava) | izolace vajíčků, nasadit barvení Blue Dot Assay |
| d. Úloha 4: | (mikroskopie) | pylové mutace-foto |
| e. Úloha 3: | (focení) | promotory-GUS (květenství)-foto |
| f. Úloha 2: | (mikroskopie) | Blue Dot Assay |
| g. Úloha 1: | (mikroskopie) | <i>in vitro</i> láčky/markery-foto |

Při vypracování protokolu je nutné zpracovat **všechny čtyři úlohy**. Každá úloha musí obsahovat **název, cíl úlohy, stručný postup, výsledky v dostatečné kvalitě a závěr**.

Pokud vaše fotodokumentace není dostatečná pro vyhodnocení, můžete použít fotodokumentaci kolegů. Pokud se tak stane, tak je nutné toto do protokolu uvést! Používejte především vlastní výsledky! Používejte správné názvy linií rostlin/markerů uvedené v tabulkách.

Ve všech kapitolách kromě závěru buďte struční, věcní a používejte odborný jazyk.

V závěru **vyhodnoťte výsledky**, co jste zjistili – **porovnejte**, zamýšlejte se nad pozorováním, vyhodnoťte, jestli **byl cíl úlohy splněn**, co bylo **významem celého pokusu**; otázky na konci každé úlohy by vám při psaní závěru měly pomoci.

Teoretický úvod

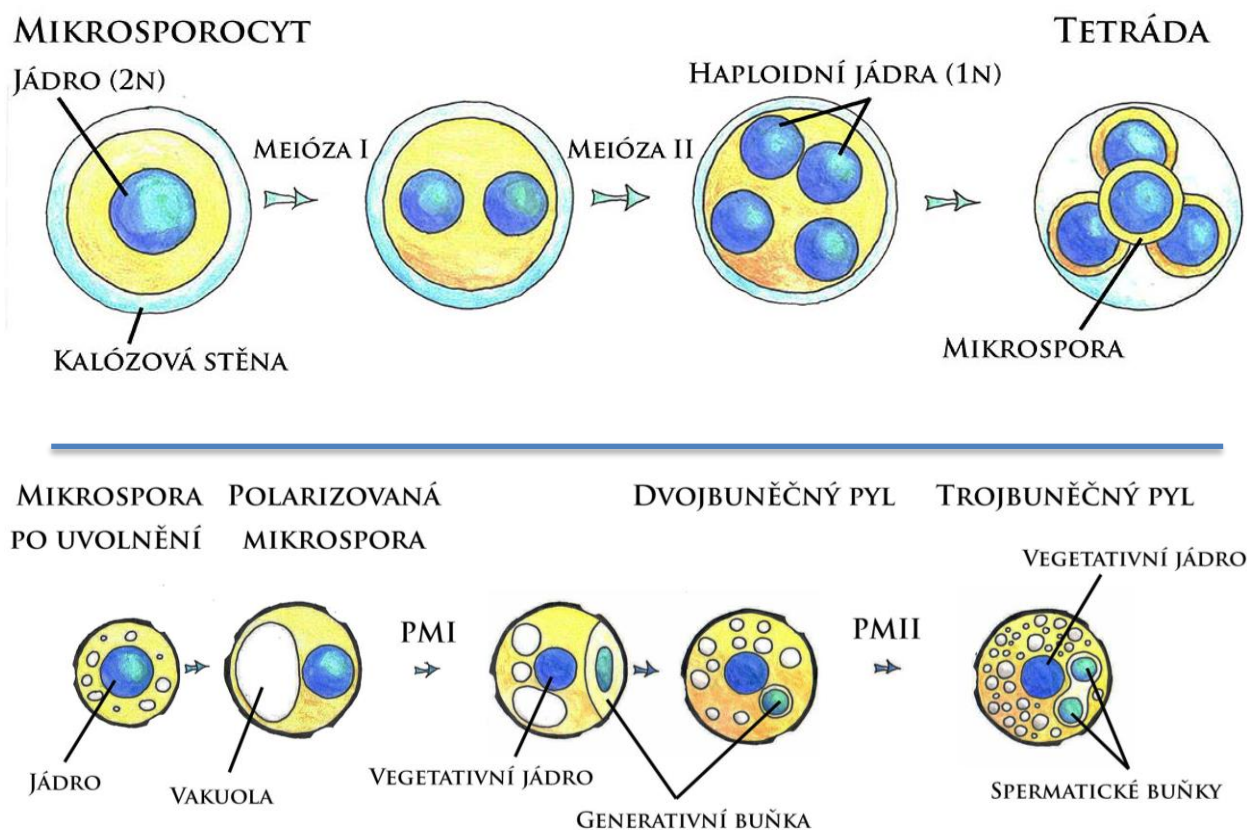
Samčí gametofyt

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 expresí. 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 pouzdech 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 ke dvojitému oplození.

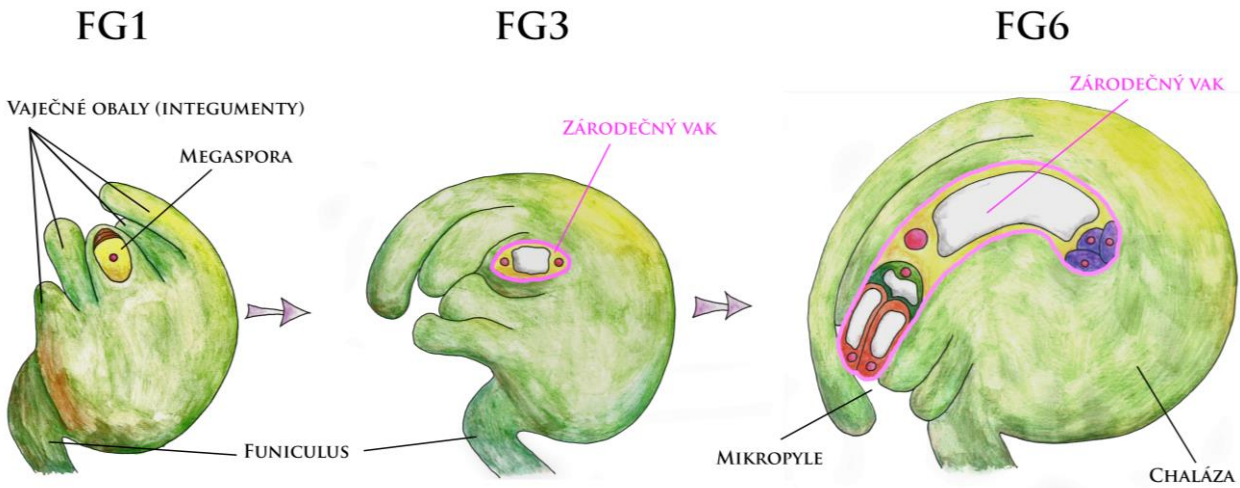
Ačkoli zrání pylu může působit jednoduchým dojmem, přepnutí sporofytické vývojové dráhy na cestu gametofytickou je spojeno s množstvím konkrétních buněčných procesů, které podmiňují růst mikrospor, buněčné dělení a diferenciaci vegetativní a generativní buňky. Mezi klíčové regulační kroky patří asymetrické 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

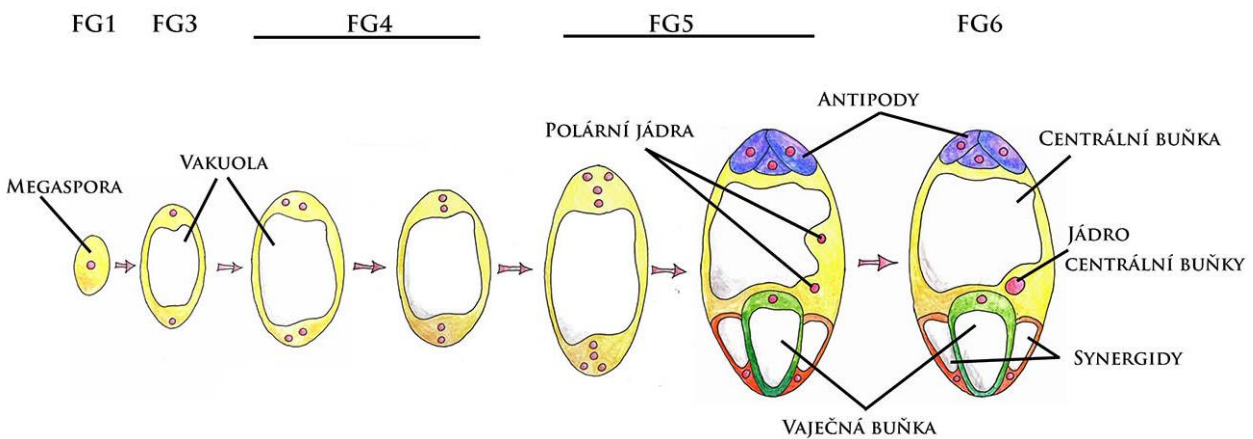
Samičí gametofyt

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. Protěžší pól se nazývá chaláza (**Obr. 2a**). Vnitřek vajíčka je vyplněn zárodečným pletivem (nucellus), v němž se vyvíjí mateřská buňka zárodečného vaku. Jejím meiotickým dělením vznikají



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

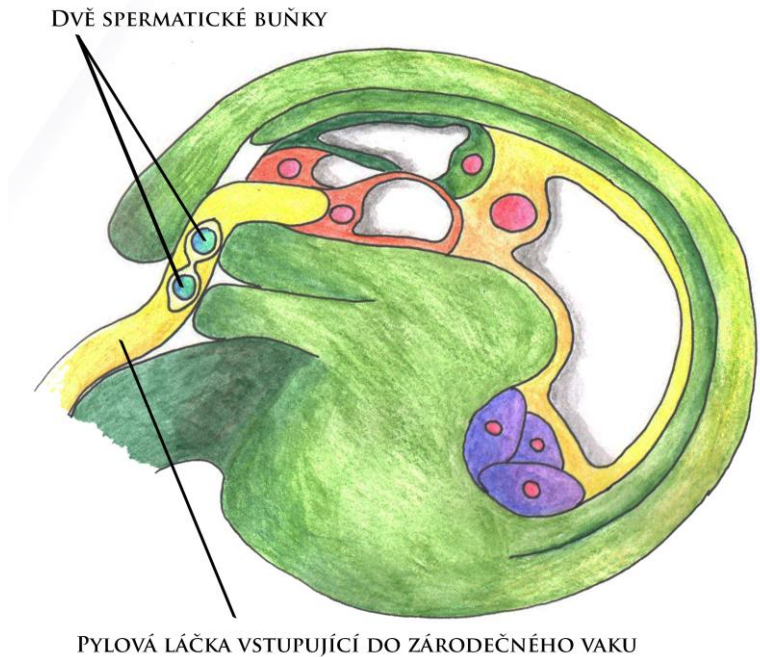
čtyři haploidní megaspory, z nichž se dále vyvíjí jen jedna. Megaspóra dále prochází třemi mitózami, které vedou ke vzniku zralého zárodečného vaku – samičího gametofytu. Tři buňky poblíž mikropyle vytvářejí vaječný aparát (vaječná buňka a dvě synergidy). Na chalazálním pólu se nacházejí tři antipody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



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

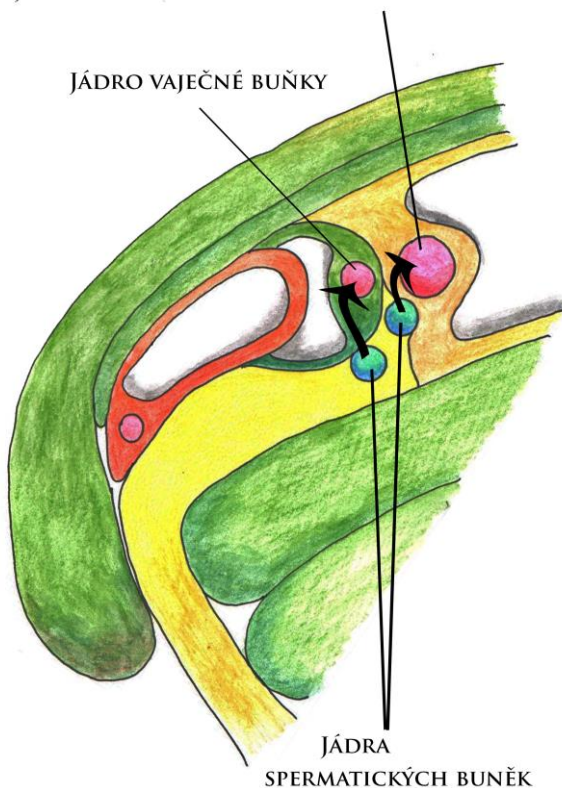
Dvojité oplození

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



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

JÁDRO CENTRÁLNÍ BUŇKY ZÁRODEČNÉHO VAKU



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

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**).

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.

1. Organely v pylu a pylových láčkách

Cíl úlohy:

Použitím barvení nebo fluorescenčně značených markerových proteinů lze vizualizovat různé buněčné kompartmenty. Cílem úlohy je pozorování a popis lokalizace barvení a jednotlivých markerů v samčím a samičím gametofytu huseníčku a tabáku 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 jiných buněčných 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 vajíčkách a pylu huseníčku a ve zralém pylu a pylových láčkách tabáku.

Použity jsou následující fúzní proteiny:

	Materiál	Marker	Značení: vyplňte
A	<i>A.thaliana</i> pyl	<i>proHtr10::HTR10-RFP</i> , <i>proLat52::GFP</i>	
B	<i>A.thaliana</i> pyl	<i>proLat52::EMB2036-GFP</i>	
C	<i>A.thaliana</i> pyl	<i>proDuo1::CENH3-mScarletH</i>	
D	<i>A.thaliana</i> vajíčka	<i>proMyb98::NLS-GFP</i>	
5	<i>A.thaliana</i> pyl/láčky	<i>proLat52::mScarlet-GUS</i>	
6	<i>N. tabacum</i> pyl	Bez markeru (pouze DAPI)	
7	<i>N. tabacum</i> láčky	Bez markeru (možnost DAPI)	

A. Kultivace pylových láček tabáku

1. Pyl tabáku lze skladovat v mrazáku při teplotě -20 °C. Po vyjmutí z mrazáku je nutné nechat pyl tabáku temperovat při pokojové teplotě 10 minut.
2. SMM-MES médium je po vyjmutí z 4 °C nutné vytemperovat též. Pozorně čtěte etiketu SMM-MES média, zda nepracujete s 2x koncentrovaným SMM-MES médiem. Pokud ano, nařeďte 1:1 s destilovanou vodou.
3. Přidejte 10-15 mL temperovaného SMM-MES média do kultivační Erlenmeyerovy baňky. Přidejte pyl tabáku nabraného na špičku párátko ze zkumavky. Opatrně rozmíchejte pyl v médiu. Za občasného míchání necháme inkubovat 3 h při pokojové teplotě.

SMM-MES médium

Chemikálie	Koncentrace	Na 1L média
Sacharóza	175 mM	59,9 g
H ₃ BO ₃	1,6 mM	98,5 mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	3 mM	0,71 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,8 mM	195 mg
KNO ₃	1 mM	101mg
MES	23 mM	4,9 g

- Po inkubaci pylu v klíčícím médiu odeberte žlutou špičkou s odstřiženým koncem 10–20 µL média s pylovými láčkami, převedte na podložní sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem (4 cm) a pozorujeme na fluorescenčním mikroskopu (objektiv 40x) pod procházejícím světlem.
- Pozorujte živé láčky, jejich růst ve špičce a cytoplazmatické proudění. Do protokolu nakreslete schéma směrů cytoplazmatického proudění láčkou pylu tabáku.
- Připravte další vzorek láček, tentokrát ale přidejte roztok DAPI a pozorujte jádra v láčce pod fluorescenčním mikroskopem. Rozhodněte, zda již došlo k PMII nebo ne a jak láčku barvení DAPI ovlivní.

!!! Při manipulaci s DAPI vždy používejte rukavice !!!

Zásobní roztok	Složka	Konečná koncentrace	Pro 5 ml
x	GUS pufr	x	5 ml
0,5 mg/ml	DAPI	0,4 ug/ml	4 µl

- Pro porovnání si připravíme také vzorky zralého pylu tabáku. Na podložní sklíčko naneste 10–15 µl barvicího pufru DAPI s malým množstvím pylu tabáku, přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte pod UV a procházejícím světlem (objektiv 40x nebo více).
- (navíc)* Sběr pylu tabáku se provádí denně během léta v otevřeném skleníku, podmínky okolí (teplota, oblačnost, vlhkost) mohou narušit vývoj pylu a vést k defektům. Pozorujte, zda právě ve vašich vzorcích pylu není zvýšený výskyt defektů. Případně popište defekty pomocí tabulky v následujících úlohách, nezapomeňte ale na rozdíly mezi pylem huseníčku a tabáku.

B. Lokalizace buněčných kompartmentů v pylu huseníčku

1. Na sklíčko naneste 10-15 μ l barvicího pufru DAPI. Odtrhněte několik květů transgenní linie huseníčku, zmáčkněte květ na bázi pro lepší otevření květu, ponořte vrchní část květu s odhalenými tyčinkami do kapky pufru a vytřepejte pyl z prašníků.
2. Překryjte krycím sklem a pozorujte na fluorescenčním mikroskopu v procházejícím světle, pod UV, modrým a zeleným světlem dle přítomného fluoroforu (objektiv 40x nebo více).

C. Lokalizace kompartmentů ve vajíčkách a láčkách prorůstajících vodivá pletiva

1. Připravte vzorky vajíček a vodivých pletiv podle úlohy 2.
2. Vajíčka přeneste přímo na sklíčko s kapkou vody.
3. Překryjte krycím sklíčkem a pozorujte pod mikroskopem v procházejícím a zeleném/modrém světle.
4. Určete značené kompartmenty a typ buňky, ve kterém je marker aktivní. Vyfoťte láčky prorůstající vodivým pletivem. Pokuste se lokalizovat oplozená a neoplozená vajíčka na základě fluorescence.

V protokolu uveďte **zadání, stručný postup a fotodokumentaci** pozorovaných buněčných struktur **vzorků pylu, láček a vajíček u huseníčku a tabáku s popisem lokalizace** u jednotlivých markerů. Pokud budete skládat obrázky dohromady (např. Fiji, ImageJ), vždy vkládejte i barevně rozdělené. Uvádějte měřítko/zvětšení. POZOR – zvětšení objektů není totožné se zvětšením použitého objektivu!

Uveďte do protokolu odpovědi na následující otázky:

1. Jaké buněčné kompartmenty jsou označené jednotlivými markery, v jakých buňkách? Kolik buněk tvoří samčí gametofyt tabáku a kolik huseníčku? (Výsledky z tabulky rozved'te v závěru.)
2. Co určuje správnou lokalizaci markerů v pylu a v pylové láčce a co jsme použili pro jejich detekci?
3. Uveďte základní funkce jednotlivých pozorovaných buněk a jejich kompartmentů, přemýšlejte nad jejich specifickou rolí ve vývoji pylu, opylení, klíčení pylových láček, růstu pylové láčky k vajíčku a oplození.
4. Vyberte si další buněčnou strukturu (organelu, kompartment atd.), který na praktiku pozorovaný nebyl a spekulujte, jak by pravděpodobně mohla vypadat jeho lokalizace.
5. Sami vymyslete 2-3 otázky, které by vás zajímaly ohledně pozorovaných buněčných kompartmentů nebo reprodukce rostlin. Navrhněte jednoduchý experiment, který by mohl pomoci je objasnit.

2. Jak atraktivní jsou vajíčka?

Cíl úlohy

Vajíčka uvolňují látky, které přitahují lácčky 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

Budeme sledovat úspěšnost oplození uvnitř samosprašných květů huseníčku.

Použita bude následující linie rostlin *A. thaliana*:

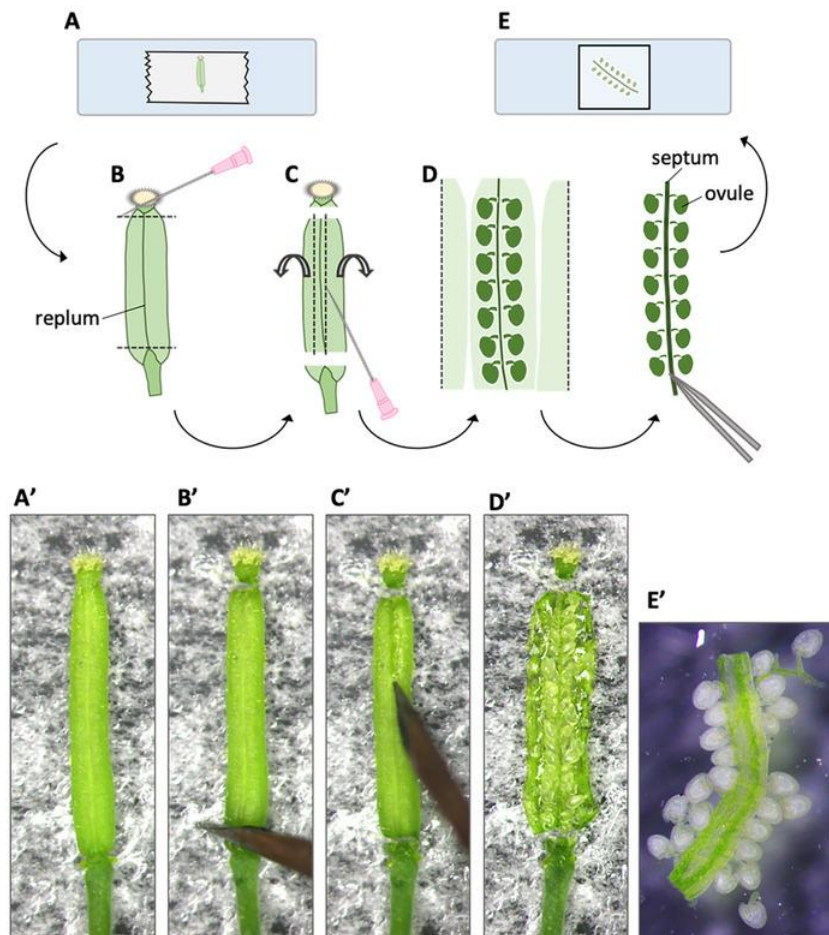
	Linie	Promotor je specificky aktivní v: vyplňte
1	<i>proLat52::GUS</i>	
2	<i>proLat52::GUS-mScarlet</i>	

Barvicí roztok GUS se substrátem X-GlucA a stabilizátory reakce:

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
40 mM	X-Gluc A	2 mM	250 μ l

1. Jedna skupina připraví barvicí roztok GUS podle tabulky pro všechny ostatní.
2. Každá skupina dostane 2-3 otevřené květy z rostlin huseníčku *proLat52::GUS* nebo *proLat52::GUS-mScarlet*. S květy pracujte pod binolupou.
3. Pomocí dvou pinzet s jemnými hroty otrháme kališní a korunní lístky. Zafixujte bázi pestíku na podložním sklíčku s oboustrannou lepicí páskou a zkontrolujte pozici švu.
4. Šešuli opatrně přitlačte na podložní sklíčko s oboustrannou lepicí páskou švem navrch (**obrázek: A a A'**), odřízněte bázi pestíku a bliznu (**B, B'**) a tenkou inzulinovou jehlou jemně rozřízněte podél švu na obou stranách (**C, C'**).

Schematické znázornění preparace vajíček



5. Hrotem jehly oddělte celou placentu s vajíčky (**D a D'**) a přeneste do mikrozkušavky s barvicím roztokem GUS (100 μ l) (**E, E'**).
6. Inkubujte při 37 °C a průběžně kontrolujeme stav zbarvení (1-2 hodiny).
7. Následně vzorky pinzetou jemně přeneste na podložní sklíčko s kapkou pufru GUS a pozorujeme na binolupě a na mikroskopu ve pod procházejícím světlem. Při opatrném zacházení je možné přenést vajíčka i pomocí pipety s ustříženou špičkou.

V protokolu uveďte **zadání, stručný postup a fotodokumentaci vajíček** (oplozeného a neoplozeného) a **vyvodte závěry**.

1. Jak vypadá oplozené a jak neoplozené vajíčko (popište rozdíl, který vidíte).
2. Proč v oplozeném vajíčku pozorujete Blue Dot? Jak došlo k jeho obarvení? (Popište princip.)
3. Jaký je rozdíl mezi materiálem proLat52::GUS a proLat52::GUS-mScarlet? Pokuste se odhadnout i pokud jste pracovali pouze s jednou variantou.
4. Jak by barvení placenty s vajíčky vypadalo, pokud bychom měli rostlinu s poškozenou chemoatrakcí vajíček? A jak by vypadalo barvení, pokud by pyl nebyl schopen vyklíčit?

3. Aktivita promotorů v gametofytu

Cíl úlohy

Na vývoji gametofytů se podílí velké množství genů aktivních v různých vývojových stadiích 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 promotorů zkoumaných genů. Po inkubaci se substrátem pro enzym β -glukuronidázu jsme schopni vizualizovat expresi fúzního proteinu na základě modrého zbarvení.

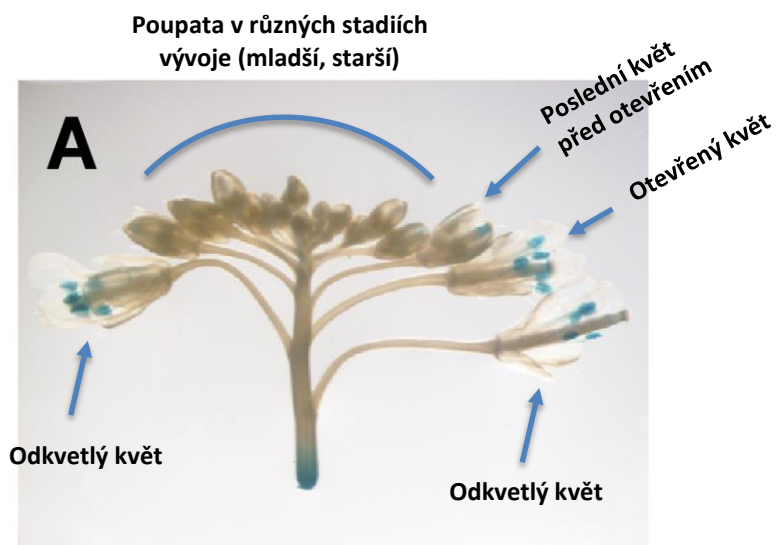
	Linie	Exprese (vývojové stadium + orgán/pletivo)
1	<i>proLat52::GUS</i>	
2	<i>proALBA6::GUS</i>	
3	Col-0	

Zadání

1. Každá skupina dostane dva různé vzorky obarveného květenství huseníčku. Jedná se o stabilní linii s vneseným konstruktem typu promotor::*GUS* a kontrolní rostlinu bez transgenu Col-0.
2. Obarvená květenství přeneste pinzetou na podložní sklíčko s vodou a rozprostřete pomocí inzulinových jehel tak, aby byla vidět všechna vývojová stadia květů. Zdokumentujeme barvení všech vzorků na stereolupě na bílém podkladu.
3. Preparační jehlou odřežte prašníky z otevřených květů s obarveným pylem *proLat52::GUS*, ostatní materiál odstraňte.
4. K vzorku přidejte roztok DAPI (10 μ L), a nechte 10 minut barvit.
5. Pozorujte a zdokumentujte pylová zrna pod fluorescenčním mikroskopem v bílém poli a pod UV světlem.

V protokolu uveďte **zadání** a **stručný postup**, **fotodokumentaci všech vzorků s popisem exprese markeru** v jednotlivých liniích na úrovni květenství.

1. Podrobně popište aktivitu jednotlivých promotorů v květenství huseníčku (přibližné stáří květu, orgán/pletivo podle ilustračního obrázku). Kde je aktivní GUS?
2. Porovnejte aktivitu jednotlivých promotorů mezi pletivy/ orgány v různě starých květech. Kde dochází k expresi genů ve stejných/různých částech květenství?



Ilustrační obrázek květenství huseníčku po barvení GUS (promotor MYB97). Liang et al. 2013 MYB97, MYB101 and MYB120 Function as Male Factors That Control Pollen Tube-Synergid Interaction in *Arabidopsis thaliana* Fertilization

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 pod průchozím světlem a pod UV spektrem. 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

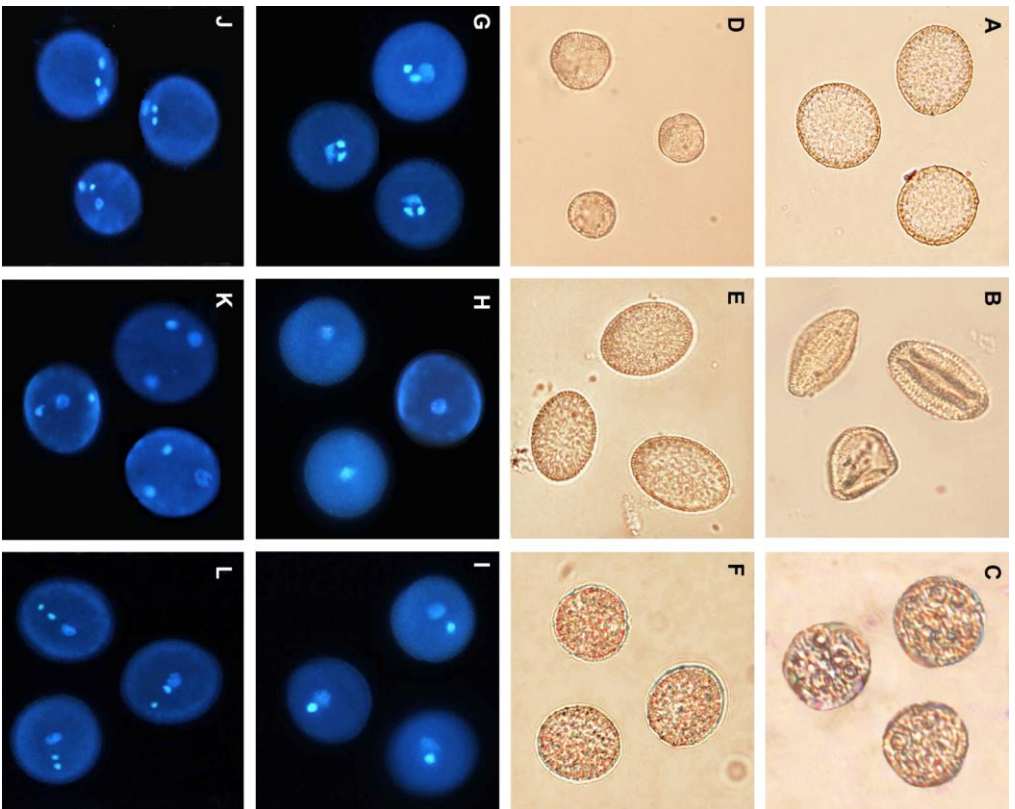
1. Každá skupina dostane dva vzorky květů huseníčku: mutantní rostlinu a kontrolní rostlinu divokého typu (WT, Wild Type).

	Linie	Pozorovaný fenotyp
1	Col-0 (divoký typ)	
2	e2036-3 (mutantní rostlina)	

2. Na dvě podložní skla naneste 10–15 µl barvicího pufru DAPI. Postupně do pufru ponořte 2-3 otevřené květy jejich vrchní částí a vyklepejte pyl z prašníků. Přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte v UV spektru a ve světlém poli (objektiv 40x a více).

Zdokumentujte normální **pylová zrna rostlin divokého typu** a **aberantní pylová zrna mutantních rostlin** (obojí ve světlém poli a UV spektru). V protokolu **popište pylové defekty** mutanta a doplňte je **popisem fenotypových kategorií** (včetně fotodokumentace) pylových zrn. Uvádějte měřítko/zvětšení. **Aberace v BF a pod UV jsou na sobě nezávislé!**

1. Popište identifikované pylové defekty inzerčního mutanta ve světlém poli a UV spektru. (Alespoň dva fenotypy a kontrolní vzorek včetně fotodokumentace v UV a procházejícím světle). Jaké jsou rozdíly mezi kontrolním a mutantním vzorkem?
2. Pokuste se odhadnout, ve které fázi vývoje pylu pravděpodobně došlo k poruše normálního průběhu vývoje.
3. Čím jsou pozorované defekty způsobeny?
4. Navrhněte 2 procesy ve vývoji pylu (nebo procesy probíhající v buňce obecně), které chcete narušit a spekulujte jaký efekt toto narušení bude mít na podobu pylu huseníčku.



Obř. 4: Příkladů fenotypůvých defektů mutanůvých pylových zrn husenůvku ve světlem poli (A-F) a při užití fluorescence (G-L).

Fenotypové kategorie: A, G – divoký typ; B – abortce; C – přítomnost inkluzí; D – malé pylové zrn; 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.

Functional disorder	Mutant phenotype	Description
A pollen abortion	1 abortion	totally collapsed pollen grain, no cytoplasm
B presence of inclusions	2 inclusions	number of inclusions in cytoplasm of unknown content
C pollen grain size, cell wall structure	3 small grain	small and round grain with a half diameter of wild-type pollen, normal MGU
	4 oval grain	distinctively oval grain
	5 deformed cell wall	deformed cell wall, rough cell surface
D cell cycle defects	6 one-celled pollen	only one nucleus with more condensation than regular vegetative nucleus
	7 two-celled pollen	one regular vegetative nucleus and one sperm cell-like nucleus, both in centre
	8 eccentric MGU	MGU shifted from the central position against cell wall, MGU itself may keep the same figure or sperm cells can be little separated from VN
E MGU organization	9 separated MGU	all nuclei separated from each other making a wide triangular figure of MGU
	10 linear MGU	all nuclei stand in linear arrangement with VN in the centre and sperm cells towards the cell wall