

Blok III

Vývoj a funkce samčího a samičího gametofytu

Jméno:

Úlohy

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

Časový harmonogram úloh

1. **Příprava media a barvicích pufrů.**
2. Úloha 1: (bod B2): nasadit pyl tabáku na barvení DAPI
3. Úloha 1: (bod A3): nasadit láčky tabáku na *in vitro* růst
4. Úloha 3: Přečíst bod 1, provést body 2-3: nasadit barvení květenství GUS
5. Úloha 2: (body 1-6): izolace vajíček, nasadit barvení Blue Dot
6. Úloha 4: (body 1-2): pylové mutace **FOTO mikroskop**
7. Úloha 3: (bod 4): promotory-GUS **FOTO stereolupa**
8. Úloha 2: (bod 7): Blue Dot **FOTO mikroskop**
9. Úloha 1: láčky tabáku (bod A4), pyl tabáku a huseníčku (body B3-B5), vajíčka huseníčku (body C1-C4) **FOTO mikroskop**

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

Teoretický úvod

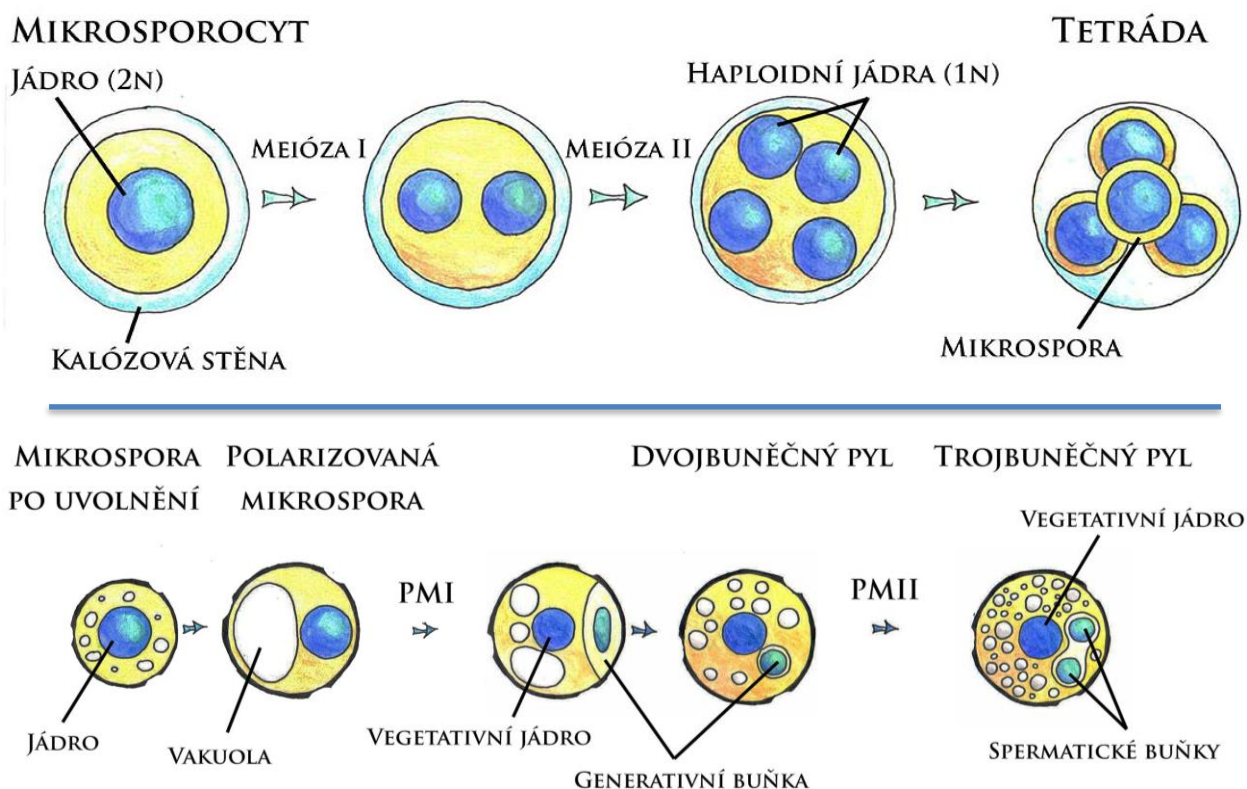
Samčí gametofyt

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 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.

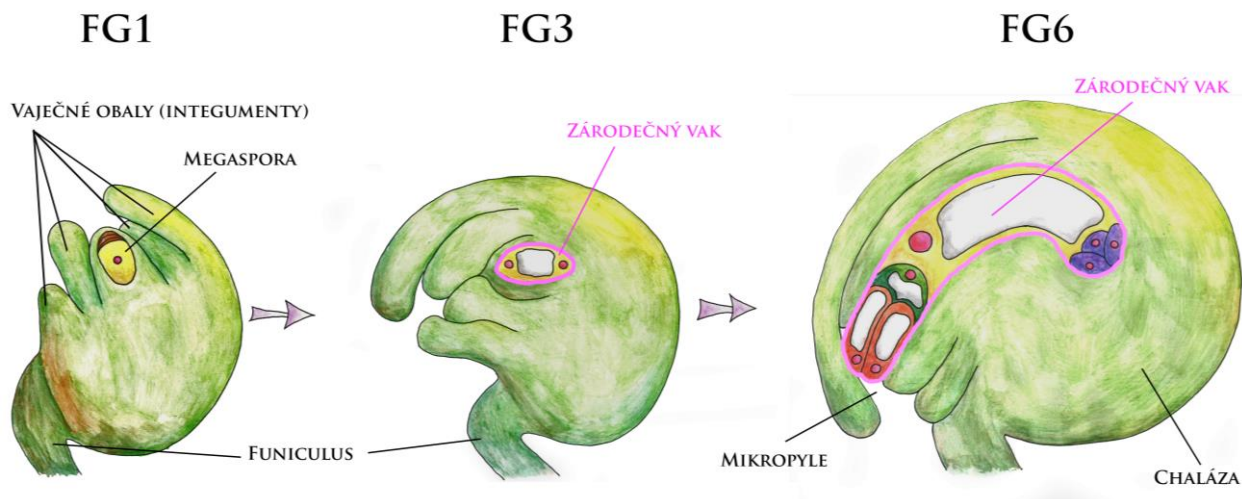
Ačkoli zrání pylu může působit jednoduchým dojmem, přepnutí sporofytické vývojové dráhy na cestu gametofytickou je spojeno s množstvím konkrétních buněčných procesů, které podmiňují růst mikrospor, buněčné dělení a diferenciaci vegetativní a generativní buňky. Mezi klíčové regulační kroky patří asymetrické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

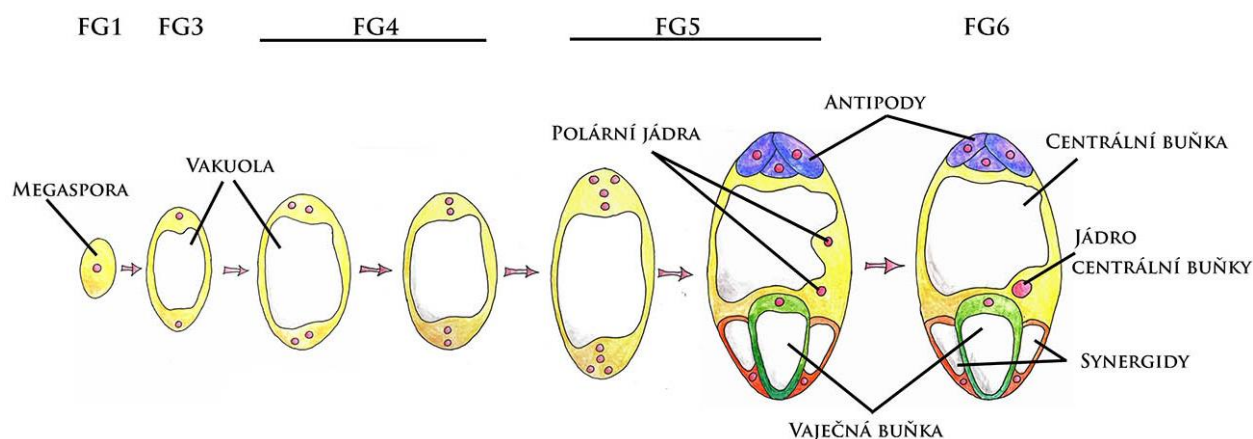
Samičí gametofyt

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. Protější 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**).

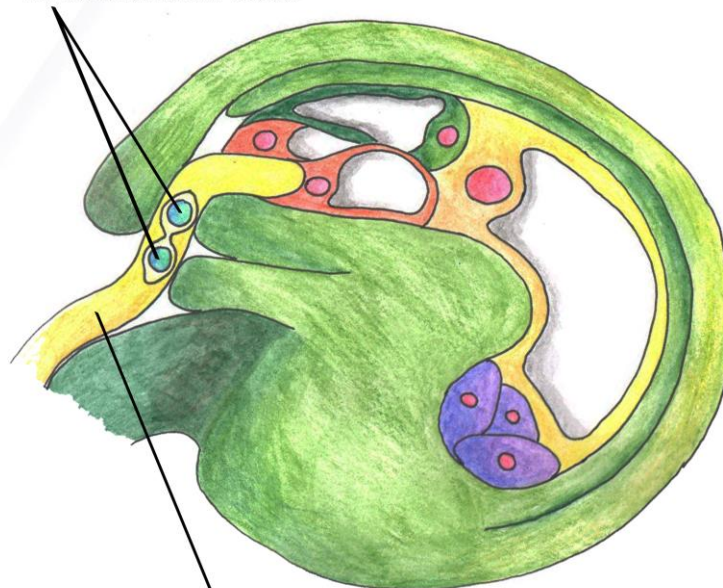


Obr. 2b: Megagametogeneze. Upraveno podle Drews and Koltunow (2011). © Alena Náprstková

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 SPERMATICKÉ BUŇKY

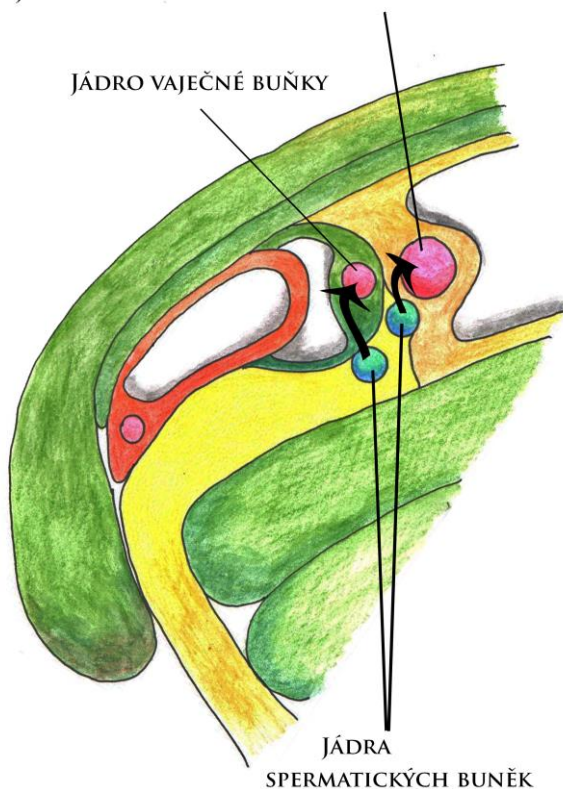


PYLOVÁ LÁČKA VSTUPUJÍCÍ DO ZÁRODEČNÉHO VAKU

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 BUŇEK

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 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 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 (vzorek 4) a pylu huseníčku (vzorky 1-3) a ve zralém pylu a pylových láčkách tabáku (vzorky 5-6). Z šedě zvýrazněných vzorků si vyberte jeden pro pozorování.

Použity jsou následující fúzní proteiny:

	Materiál	Marker	Značení: vyplňte
1	<i>A.thaliana</i> pyl	<i>proHtr10::HTR10-RFP</i> , <i>proLat52::GFP</i>	
2	<i>A.thaliana</i> pyl	<i>proLat52::EMB2036-GFP</i>	
3	<i>A.thaliana</i> pyl	<i>proDuo1::CENH3-mScarletH</i>	
4	<i>A.thaliana</i> vajíčka	<i>proMyb98::NLS-GFP</i>	
5	<i>N.tabacum</i> pyl	<i>proLat52::eIF3m2-YFP</i>	
6	<i>N.tabacum</i> pyl	<i>proLat52::YFP</i>	

A. Kultivace pylových láček tabáku

- Po vyjmutí z -20°C je nutné nechat pyl tabáku temperovat při pokojové teplotě 10 minut.
- SMM-MES médium je po vyjmutí z 4°C nutné vytemperovat též.

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	101 mg
MES	23 mM	4,9 g

- Naředěte 500 µL dvakrát koncentrovaného SMM-MES média na finální koncentraci a přepipetujte do mikrozkušavky s otevřeným prašníkem tabáku. Za občasného míchání necháme inkubovat 3 h při pokojové teplotě.
- Po inkubaci žlutou špičkou s odstřiženým koncem nabereme 10 – 20 µL média s pylovými láčkami, přikryjeme krycím sklíčkem (4 cm) a pozorujeme na fluorescenčním mikroskopu (objektiv 40x) pod modrým a procházejícím světlem.

B. Lokalizace kompartmentů v pylu

- Příprava barvicího roztoku DAPI:

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

- Pro porovnání si připravíme vzorky zralého pylu tabáku. Do mikrozkušavky napipetujte 500 µL barvicího pufru DAPI a pinzetou do něj přemístěte prašník. Nechte inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě.
- Na podložní sklíčko naneste 10 – 15 µl barvicího pufru DAPI s pylem tabáku, přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte pod UV, modrým a procházejícím světlem (objektiv 40x nebo více). Porovnáme s pozorovaným fluorescenčním signálem v pylových láčkách. DAPI vizualizuje buněčná jádra.
- Na podložní sklo naneste 10-15 µl barvicího pufru DAPI (**viz úloha 3**). Odtrhněte 4 – 5 květů huseníčku, zmáčkněte 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 v procházejícím světle, pod UV, modrým a zeleným světlem dle přítomného fluoroforu (objektiv 40x nebo více).
- Překryjte krycím sklem a pozorujte na fluorescenčním mikroskopu v procházejícím, UV a modrém světle (objektiv 40x nebo více).

C. Lokalizace kompartmentů ve vajíčkách

- Připravte vzorky vajíček podle úlohy 2 (body 2 - 4).
- Vajíčka přeneste přímo na sklíčko s kapkou vody.
- Překryjte krycím sklíčkem a pozorujte pod mikroskopem v procházejícím a modrém světle.
- Určete značené kompartmenty a typ buňky, ve kterém je marker aktivní.

V protokolu uveďte **zadání, stručný postup a fotodokumentaci** pozorovaných buněčných struktur **dvou/tří vzorků huseníčku a dvou vzorků pylu a pylové láčky tabáku s popisem lokalizace** jednotlivých markerů (z šedě označených linií v tabulce si vyberte jednu pro pozorování). Pokud budete skládat obrázky dohromady (např. Fiji, ImageJ), vždy vkládejte i barevně rozdělené. Uvádějte měřítka/zvětšení. **POZOR** – zvětšení objektů není totožné se zvětšením použitého objektivu!

1. Jaké subbuněčné kompartmenty jsou označeny jednotlivými markery, v jakých buňkách? Kolik buněk tvoří samčí gametofyt tabáku a kolik huseníčku? (Výsledky z tabulky rozvedte v závěru.)
2. Mění se lokalizace markerů v pylu a v pylové láčce – značí stále ty samé kompartmenty?
3. Co se s markery děje při klíčení pylu – porovnejte fotodokumentaci pylu a pylových láček a popište, co se s markery/s celou buňkou děje.

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

Budeme sledovat úspěšnost oplození.

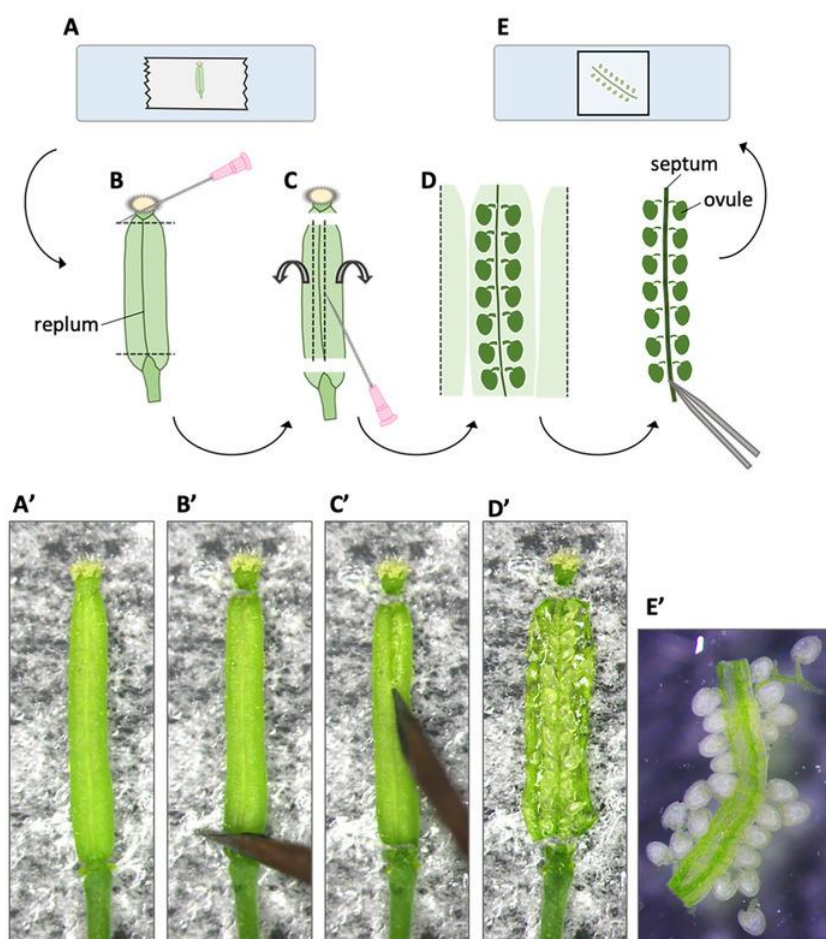
Použita bude následující linie rostlin *A. thaliana*:

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

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
40 mM	X-Gluc A	2 mM	250 μ l

1. Jedna skupina připraví barvicí roztok GUS podle tabulky. Každá skupina dostane 2-3 otevřené květy z rostlin huseníčku *proLat52::GUS*.
2. Pomocí dvou pinzet s jemnými hroty otrháme kališní a korunní lístky.
3. Pod stereolupou zafixujeme bázi pestíku na podložním sklíčku s oboustrannou lepicí páskou a zkontrolujeme pozici švu.
4. Šešuli opatrně přitlačíme na podložní sklíčko s oboustrannou lepicí páskou švem navrch (na obrázku pod písmeny A a A'), odřízneme bázi pestíku a bliznu (B, B') a jemně tenkou inzulinovou jehlou rozřízneme podél švu po obou stranách (C, C'). Řez pestíku provádíme pod stereolupou.



Schematické znázornění preparace vajíček

5. Hrotem jehly oddělíme celou placentu s vajíčky (na obrázku pod písmeny D a D') a přeneseme do mikrozkušavky s barvicím roztokem GUS (100 μ l) (obrázek E, E').
6. Inkubujeme při 37°C a průběžně kontrolujeme stav zabarvení (1-2 hodiny) – vajíčka jsou usazena na dně mikrozkušavky.
7. Následně si pod stereolupou připravíme vzorek - pipetou se žlutou špičkou s odstřiženým koncem přeneseme obarvená vajíčka/placentu na podložní sklo a překryjeme krycím sklem s kapkou pufru GUS. Na stereolupě zkontrolujeme přítomnost vajíček (lze prohodit světlou/tmavou podložku lupy). Na mikroskopu pozorujeme ve světlém poli, fotíme při použití objektivu zvětšujícího 40x.

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. 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

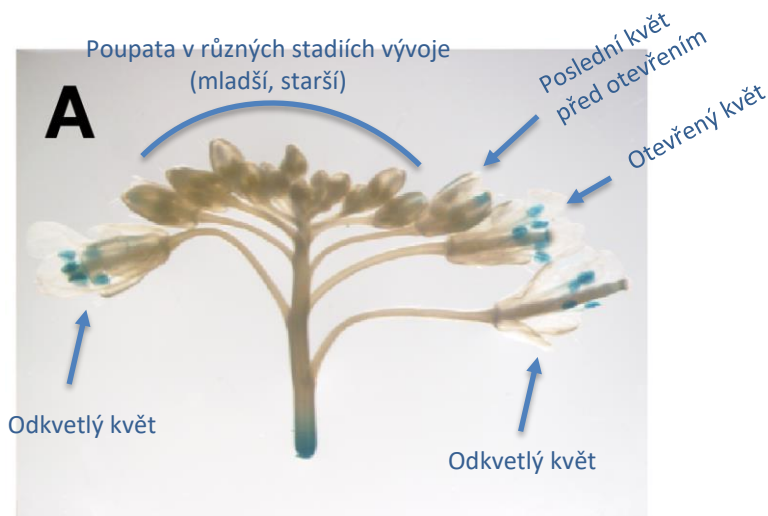
1. Každá skupina dostane jeden vzorek fixovaného již nabarveného květenství huseníčku v mikrozkuhavce (na výběr jsou vzorky 3-5) a dva vzorky květenství huseníčku si připraví. Jedná se o stabilní linie s vneseným konstruktem typu promotor::GUS (vzorky 2-5) a kontrolní rostlinu bez transgenu Col-0 (vzorek 1).

	Linie	Exprese (vývojové stadium + orgán/pletivo)
1	Col-0 (kontrola)	
2	<i>proLat52::GUS</i>	
3	<i>proelf3m1::GUS</i>	
4	<i>proAlba6::GUS</i>	
5	<i>proE2036::GUS</i>	

2. Vneste květenství Col-0 a *proLat52::GUS* samostatně do dvou mikrozkuhovek s cca 500 μ L barvicího pufru GUS (**viz úloha 2**).
3. Ujistěte se, že je květenství plně ponořeno do pufru a nechte inkubovat 1-2 hodiny v 37°C.
4. Všechna 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 na bílém podkladu.

V protokolu uveďte **zadání a stručný postup, fotodokumentaci vzorků (Col-0, proLat52::GUS a jednoho ze vzorků 3-5) 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 A). Kde je aktivní GUS?



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

2. Porovnejte aktivitu jednotlivých promotorů mezi pletivy/ orgány v různě starých květech. Kde dochází k expresi genů ve stejných/různých částech květenství? Proč vzorek Col-0 není obarven?

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 zobrazuje 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).

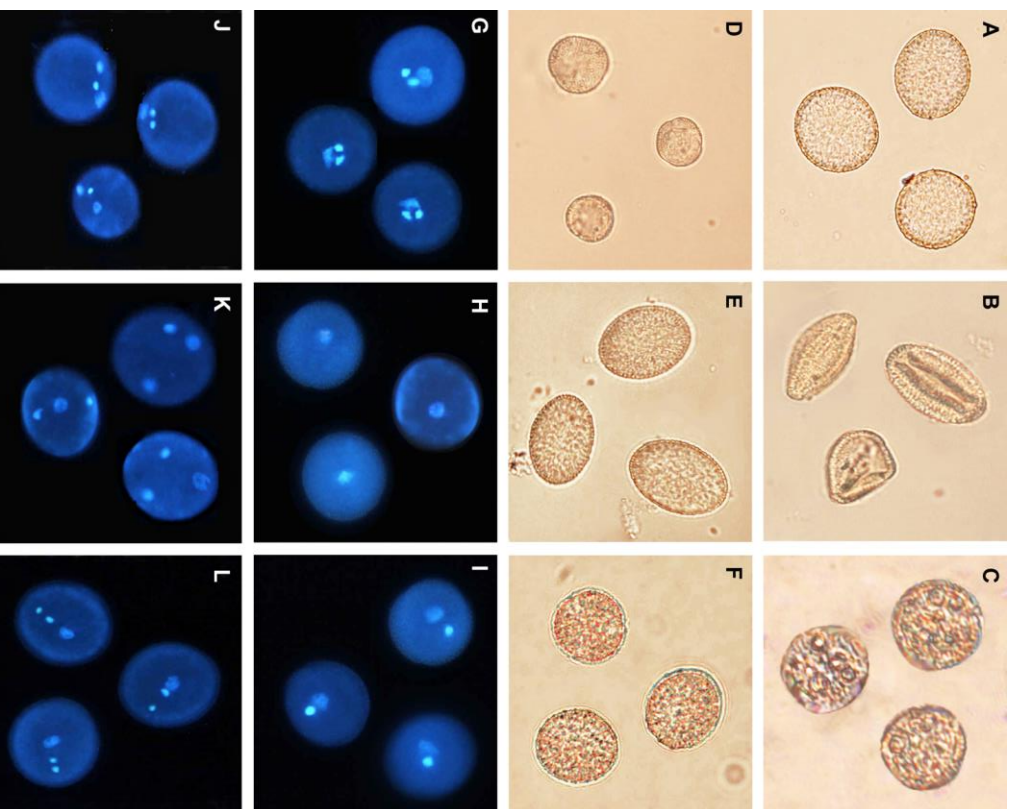
	Linie	Pozorovaný fenotyp
1	Col-0 (divoký typ)	
2	<i>e2036-3</i> (mutantní rostlina)	

2. 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. Přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte v UV spektru a ve světlém poli (objektiv 40x a více) .

Zdokumentujeme **normální pylová zrna rostlin divokého typu** a **aberrantní pylová zrna mutantních rostlin** (obojí ve světlém poli a UV spektru). V protokolu **popište pylové defekty** inzerčního mutanta a doplňte je **popisem fenotypových kategorií** (včetně fotodokumentace) pylových zrn. Uvádějte měřítko/zvětšení.

1. Popište identifikované pylové defekty inzerčního mutanta ve světelném 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. Čím mohou být pozorované defekty způsobeny?

Aberace v BF a pod UV jsou na sobě nezávislé!



Obr. 4: Příklady fenotypových defektů mutančních 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 zrna; 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. Renák.

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
E MGU organization	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
	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