

# Praktikum: Růst a vývoj rostlin

## Vývoj a funkce samčího a samičího gametofytu

Blok III

Alena Náprstková

Pavel Jelínek



# Úlohy

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

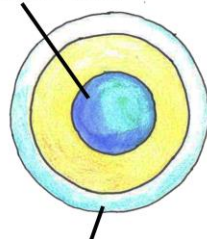
# Vývoj samčího gametofytu



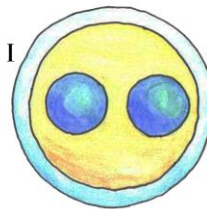
## MIKROSPOROGENEZE

MIKROSPOROCYT

JÁDRO (2N)

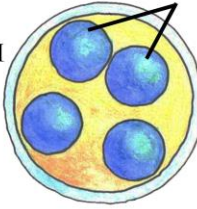


MEIÓZA I

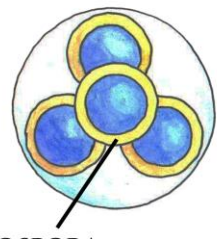


MEIÓZA II

HAPLOIDNÍ JÁDRA (1N)



TETRÁDA

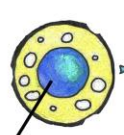


MIKROSPORA

## MIKROGAMETOGENEZE

MIKROSPORA  
PO UVOLNĚNÍ

POLARIZOVANÁ  
MIKROSPORA



VAKUOLA

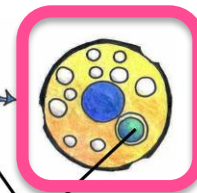
PMI



VEGETATIVNÍ JÁDRO

DVOJBUNĚČNÝ PYL

TROJBUNĚČNÝ PYL



PMII



VEGETATIVNÍ JÁDRO

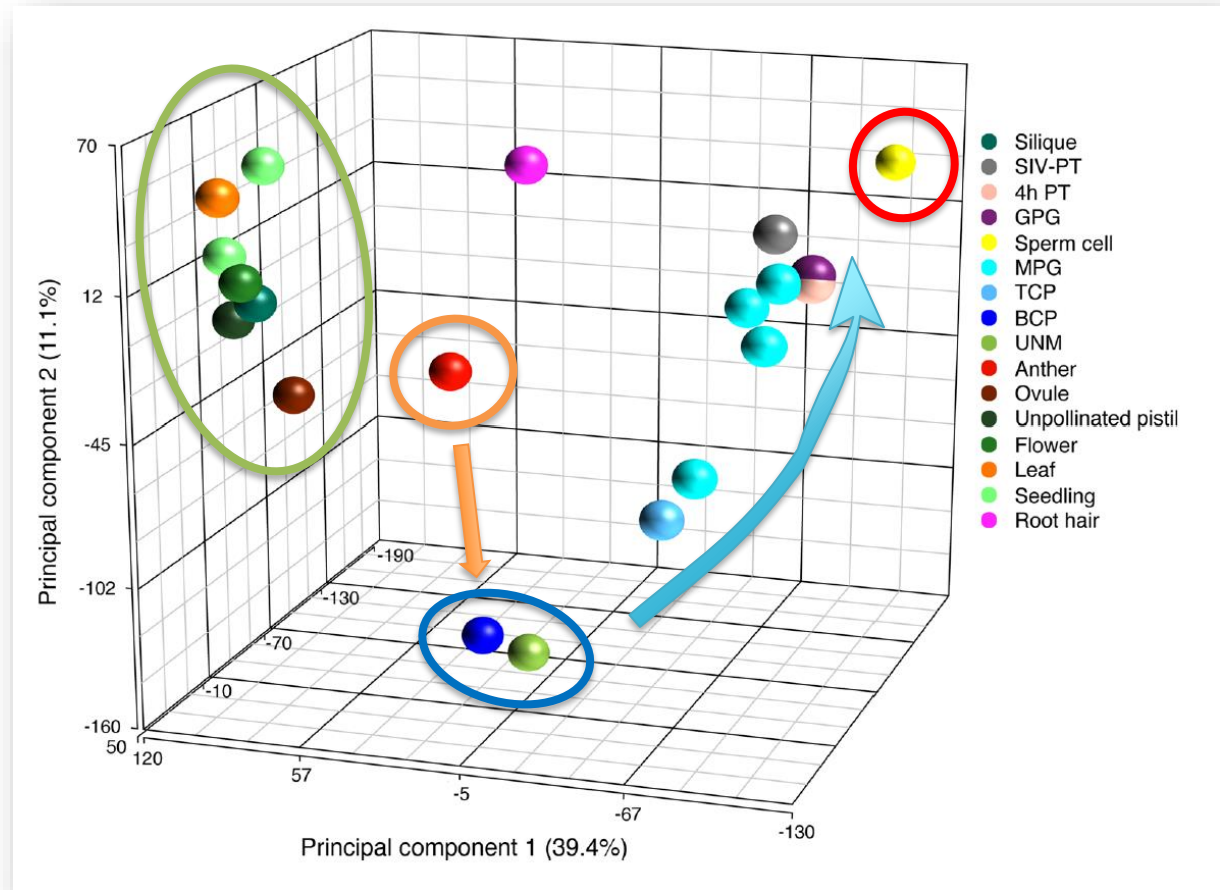
SPERMATICKÉ BUŇKY

# Porovnání transkriptomů pletiv

Vývoj pylu doprovázen  
razantními změnami  
genové exprese

Unikátní složení  
transkriptů ve  
spermatických buňkách

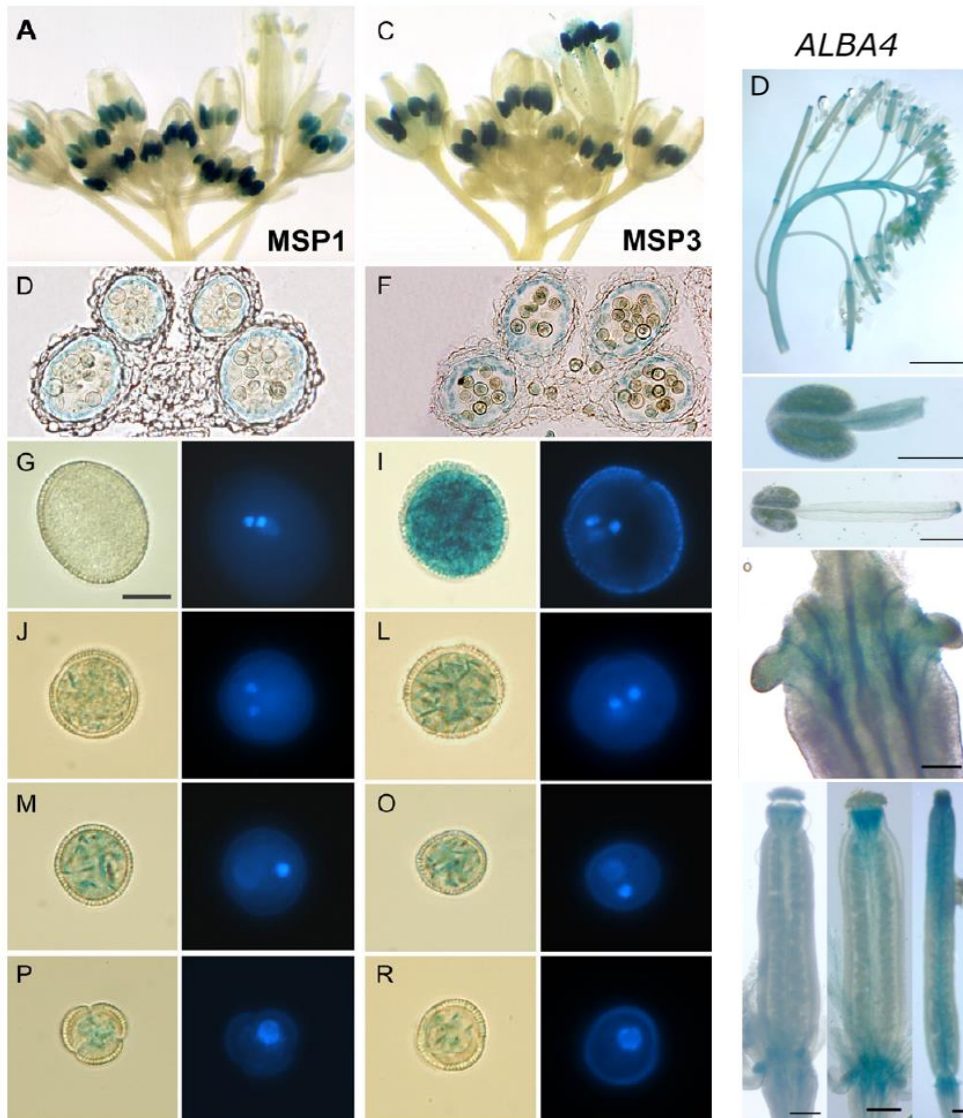
Transkriptom vyvíjejícího  
se pylu a zárodečné linie  
výrazně odlišný od  
transkriptomu sporofytu





# 3. Aktivita promotorů v gametofytu

## Barvení GUS



Cílem bude sledovat expresi reportérového genu GUS pod kontrolou promotoru Lat52 v orgánech květenství.

Honyš et al. 2006; Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis*,  
Náprstková et al. 2021; Characterization of ALBA family expression and localization in *Arabidopsis thaliana* generative organs

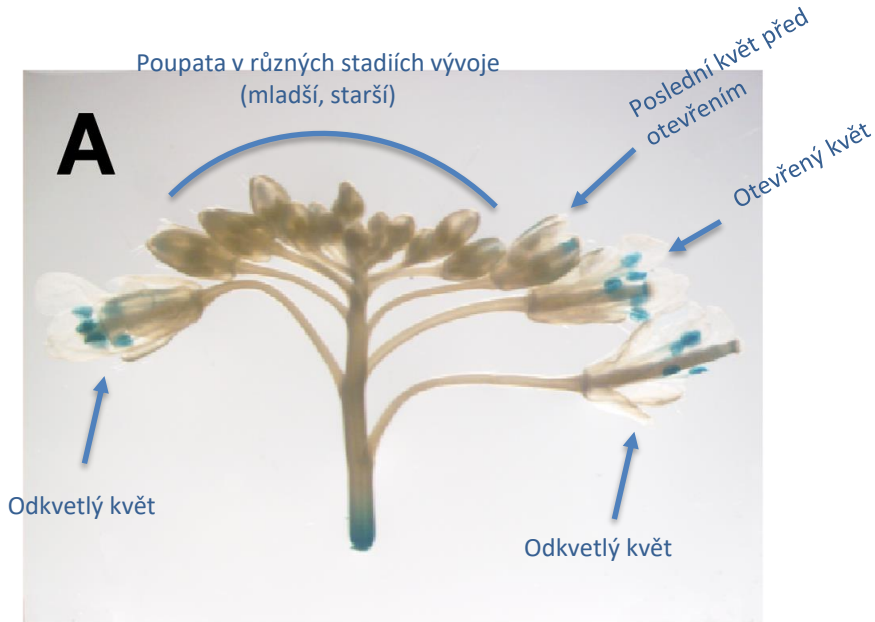
# 3. Aktivita promotorů v gametofytu

Budeme provádět expresní analýzu promotoru:

*proLat52::GUS*

Cílem bude sledovat expresi reportérového genu GUS pod kontrolou promotoru Lat52 v orgánech květenství.

## Barvení GUS



Ilustrační obrázek květenství huseníčku po barvení GUS (promotor MYB97).

1. Podrobně popište aktivitu pomotoru v květenství huseníčku (přibližné stáří květu, orgán/pletivo podle ilustračního obrázku). Kde je aktivní GUS?
2. Porovnejte aktivitu/intenzitu zabarvení vzorku nesoucího reportérový gen GUS s kontrolním vzorkem.

# 1. Organely v pylu a pylových láčkách

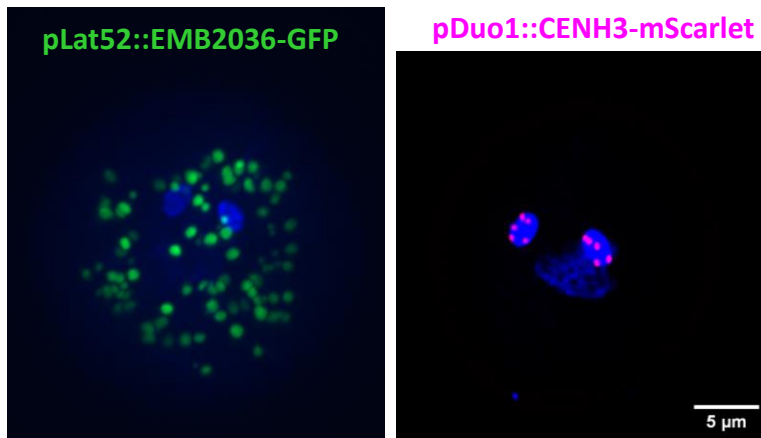
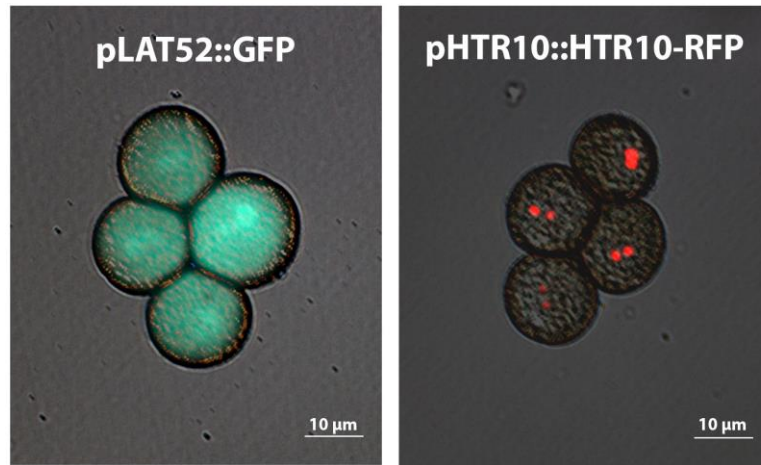
**Fluorescenčně značené proteiny (markery), které budeme sledovat v pylu huseníčku:**

*pLAT52::GFP* (cytoplazma vegetativní bky)

*pHTR10::HTR10::RFP* (jádra sperm. buněk)

*pLAT52::EMB2036::GFP* (plastidy)

*pDuo1::CENH3-mScarletH* (centromery jader sperm. buněk)



Cílem úlohy je pozorování a popis lokalizace dvou markerů huseníčku a jednoho markeru v tabáku (pyl+pylová láčka) na subbuněčné úrovni.

1. Jaké subbuněčné kompartmenty jsou označené jednotlivými markery, v jakých buňkách? (Výsledky z tabulky rozved'te v závěru.)



# 1. Organely v pylu a pylových láčkách

**Další fluorescenčně značené proteiny (markery), které budeme sledovat:**

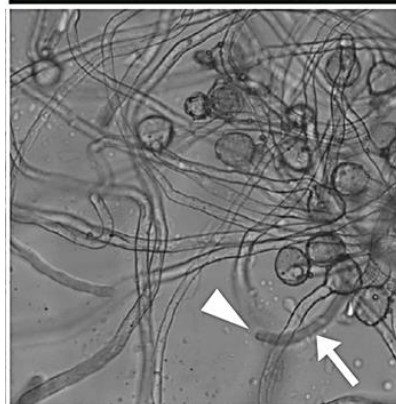
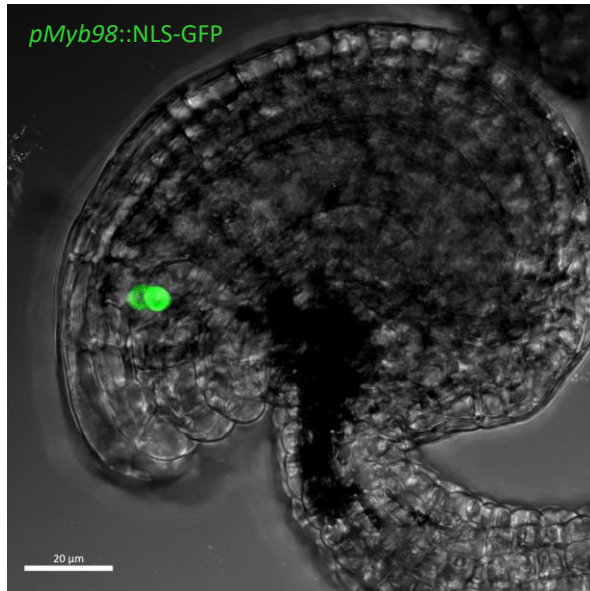
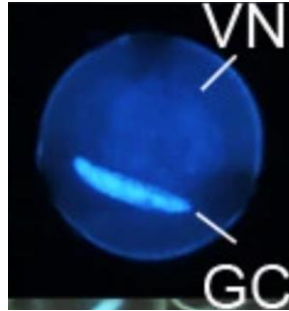
*Vajíčka huseníčku*

*pMyb98::NLS-GFP (jádra synergid)*

*Pyl a pylové láčky tabáku*

*proLat52::eIF3m-YFP (ribozomy)*

*pLAT52::YFP (cytoplazma vegetativní bky)*



Cílem úlohy je pozorování a popis lokalizace markerů ve vajíčkách huseníčku a pylu a pylových láčkách tabáku na subbuněčné úrovni.

1. Jaké subbuněčné kompartmenty jsou označené jednotlivými markery, v jakých buňkách? (Výsledky z tabulky rozved'te 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.

Nagahara et al. 2021, Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube

Hafidh et al. 2012, Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in pollard cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis



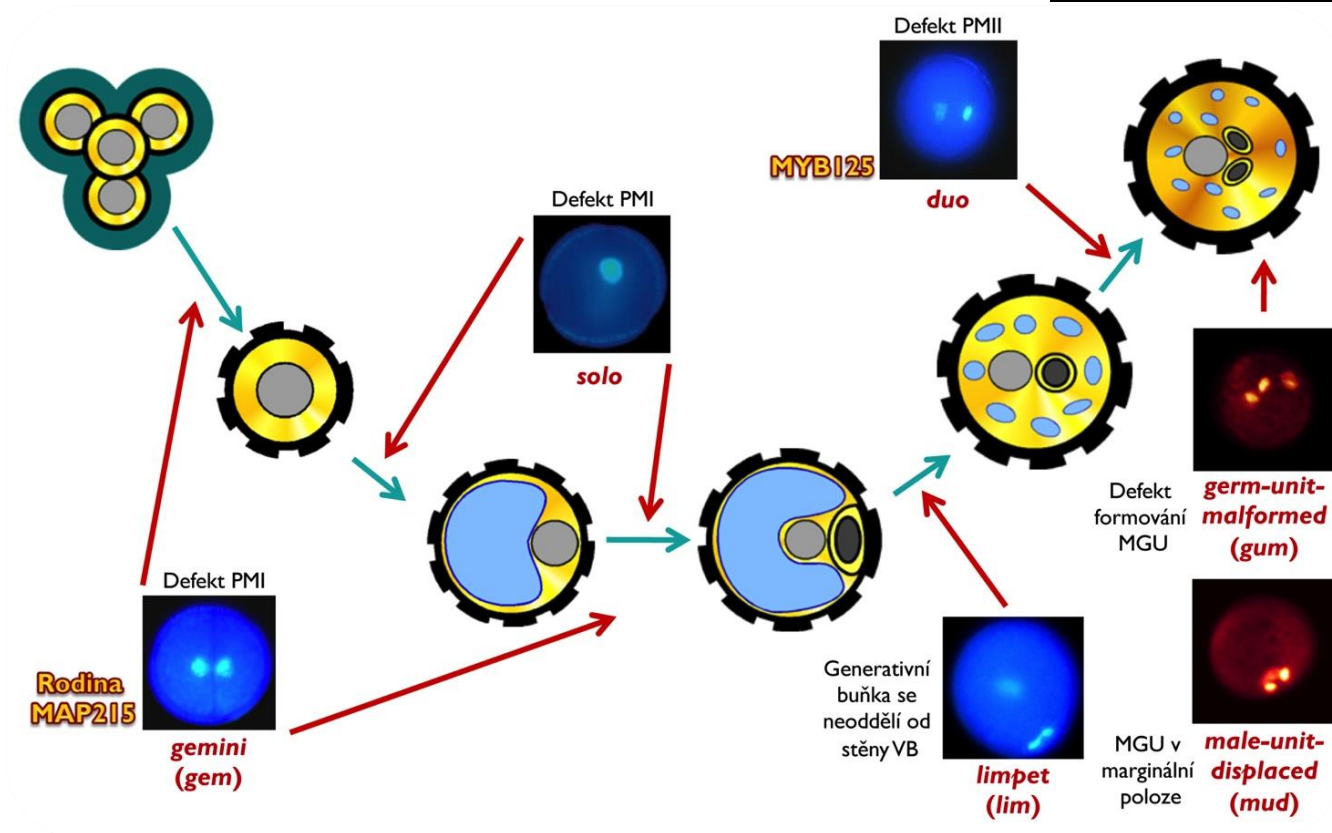
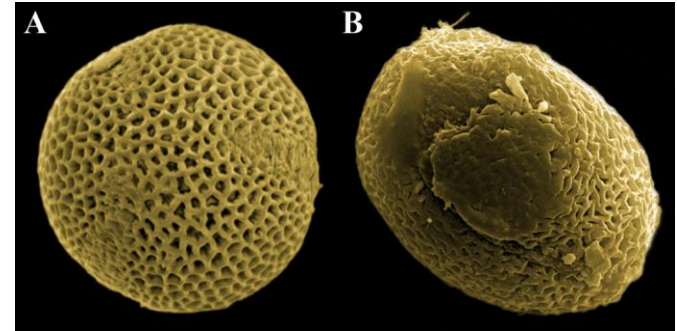


# Co se může pokazit?

Špatné uložení pylových obalů

Buněčná polarizace

Buněčné dělení

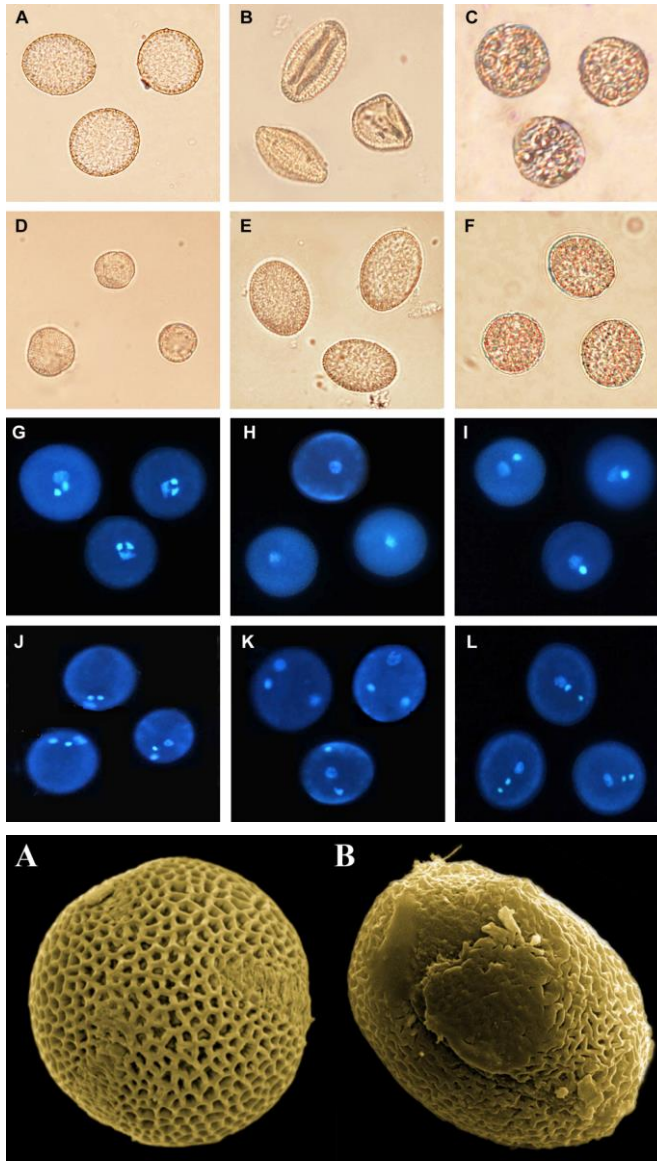


# 4. Vývojové mutace pylu

Budeme provádět  
fenotypovou analýzu  
mutanta *Ebryo  
Defective 2036*  
(*e2036-3*):

*e2036-3* (mutant)

*Col-0* (kontrola)

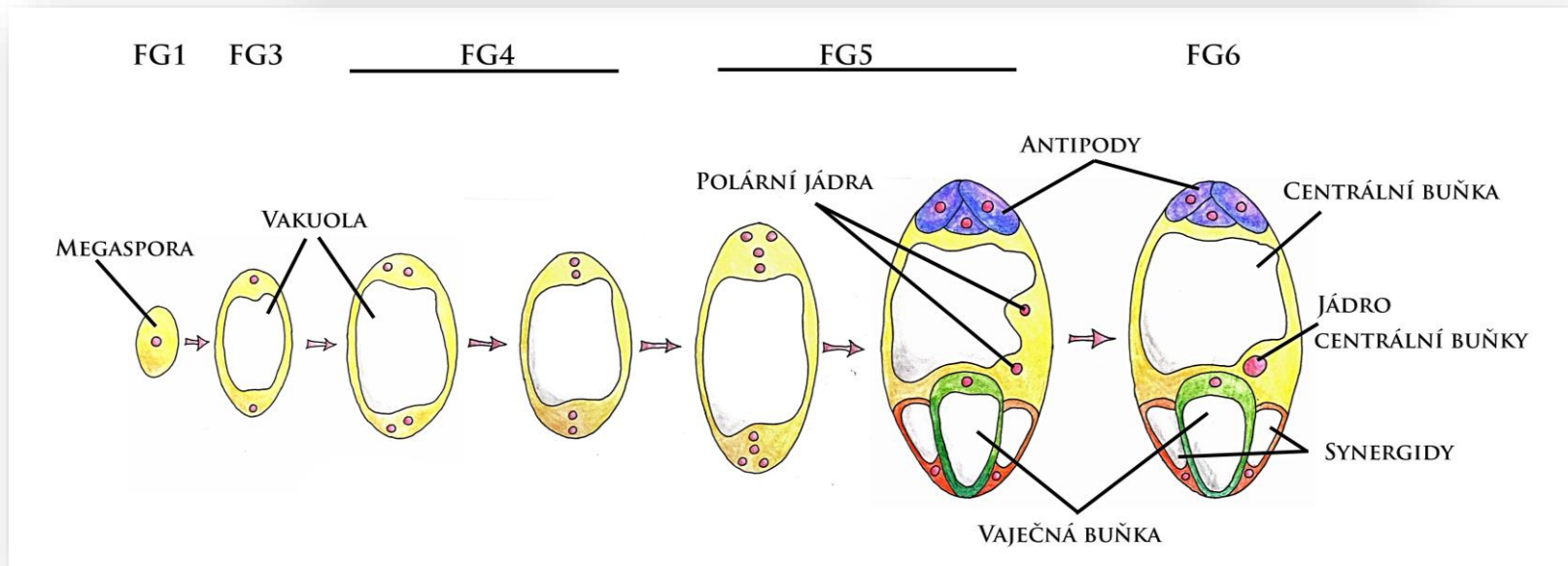
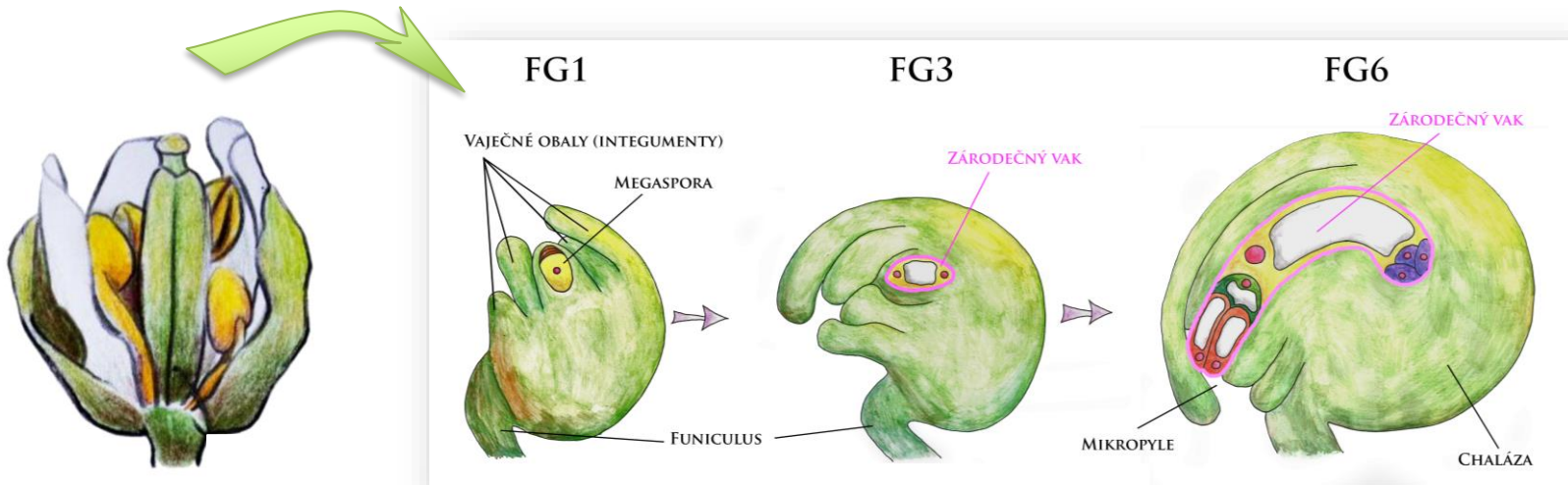


**Co vše se může v pylu pokazit?**  
Cílem je provedení fenotypové  
analýzy a popis ovlivnění vývoje  
pylu s absencí příslušného  
genu.

1. Popište identifikované pylové  
defekty inzerčního mutanta ve  
světelném poli a UV spektru. (1-2  
fenotypy a kontrolní vzorek včetně  
fotodokumentace). Jaké jsou  
rozdíly mezi kontrolním a  
mutantním vzorkem?

2. Čím jsou způsobeny pozorované  
defekty?

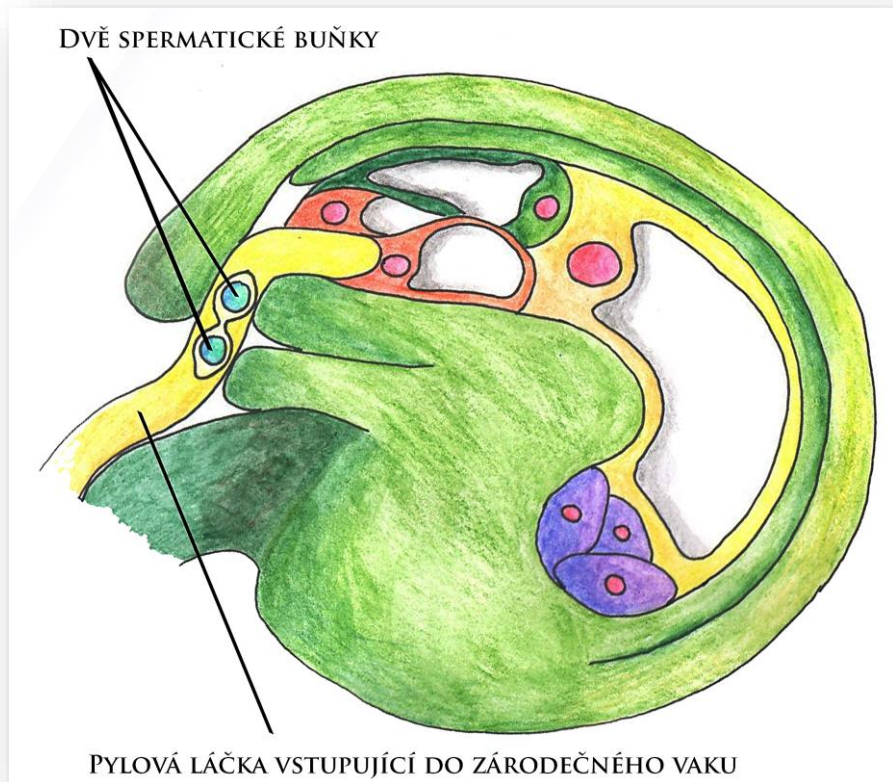
# Vývoj samičího gametofytu



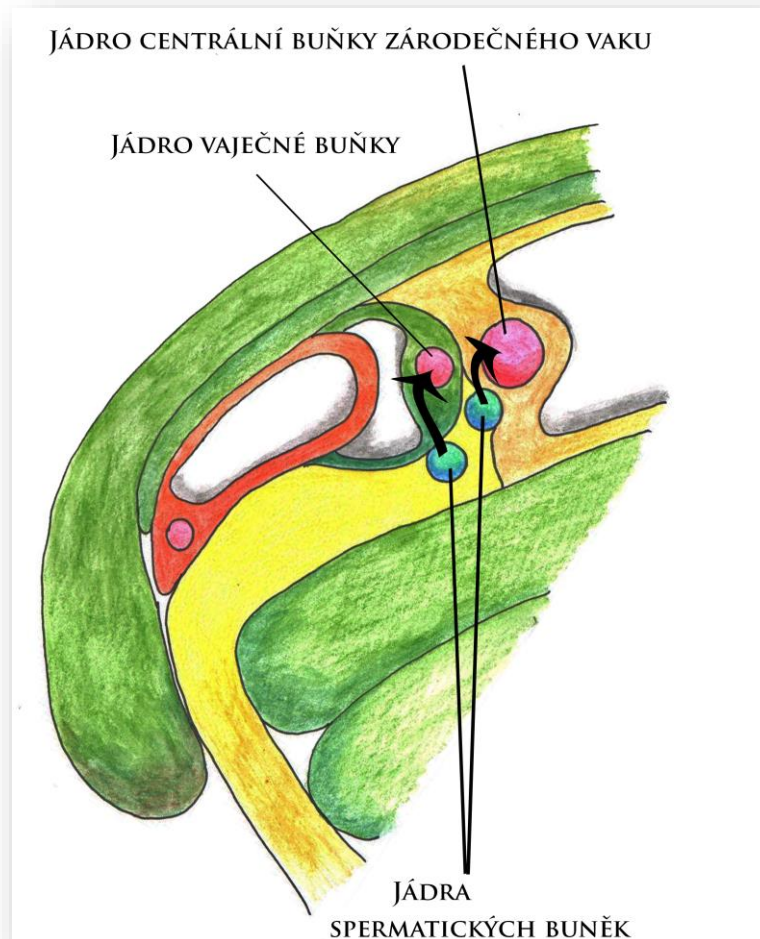


# Dvojité oplození

Růstání pylové láčky až k vajíčku, prorůstání k zárodečnému vaku skrze mikropylu

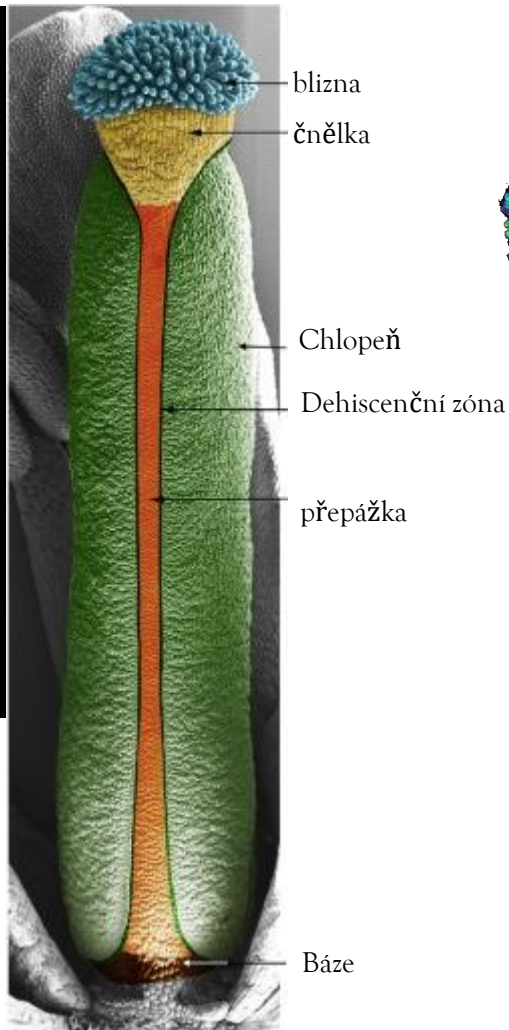
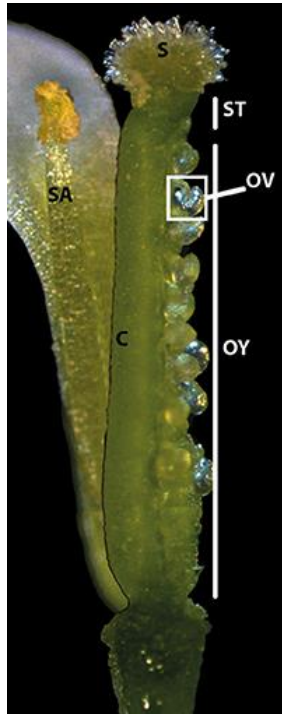


Prasknutím pylové láčky jsou uvolněny spermatické buňky





## 2. Jak atraktivní jsou vajíčka?



Budeme sledovat atraktivitu vajíček u rostlin s konstruktem pLat52:GUS pomocí Blue Dot Assay

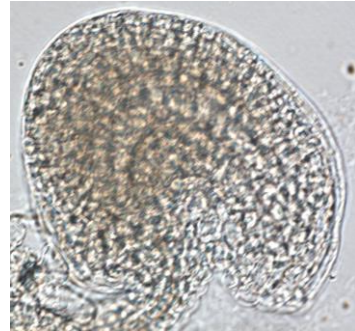
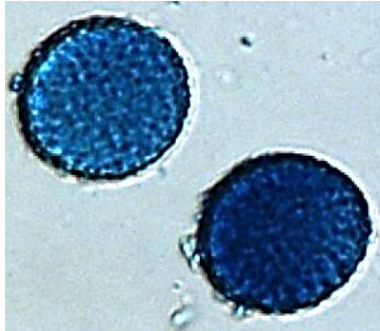
1. Jak vypadá oplozené a jak neoplozené vajíčko (popište rozdíl, který vidíte).

2. Proč v oplozeném vajíčku pozorujete Blue Dot? Jak došlo k jeho obarvení? (Popište princip.)

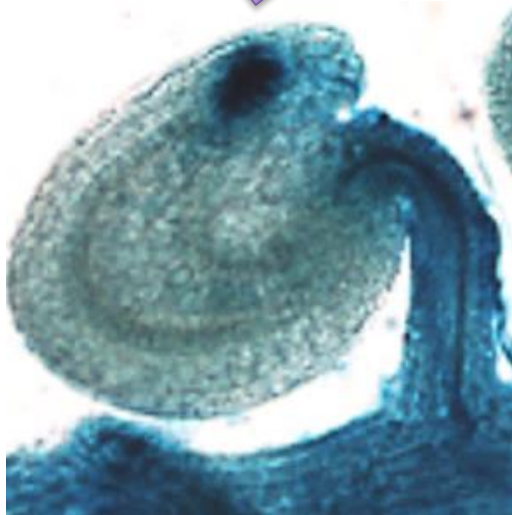
## 2. Jak atraktivní jsou vajíčka?

Pyl (pLat52::GUS) +

Vajíčko



Blue dot (modrá tečka)



Budeme sledovat atraktivitu vajíček u rostlin s konstruktem pLat52:GUS pomocí Blue Dot Assay

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.)

# Časový harmonogram úloh

**Podepište si protokol, je váš!**

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