

2) Reprodukce rostlin

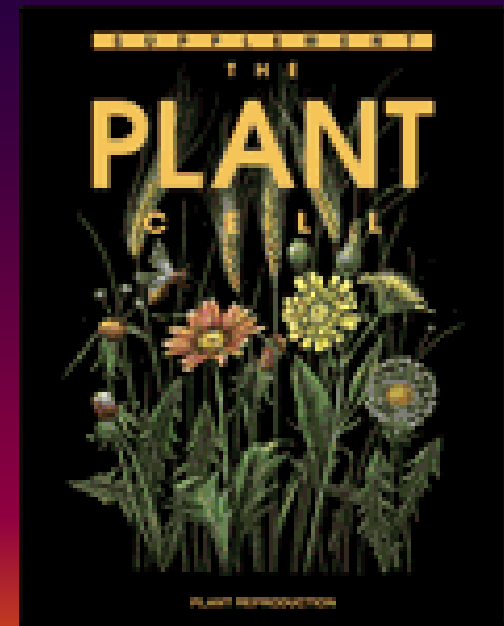
- d) Vznik gamet
- e) Mutace ve vývoji gametofytu
- f) Opylení, oplodnění

Speciální číslo Plant Cell, vol. 216 (June 2004) Supplement, pp. S1 – S245, zaměřené na Plant Reproduction (Reprodukce rostlin)

http://www.plantcell.org/content/vol16/suppl_1/index.shtml

Ma H (2005) Annual Review of Plant Biology, Vol. 56: 393-434

<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141717>

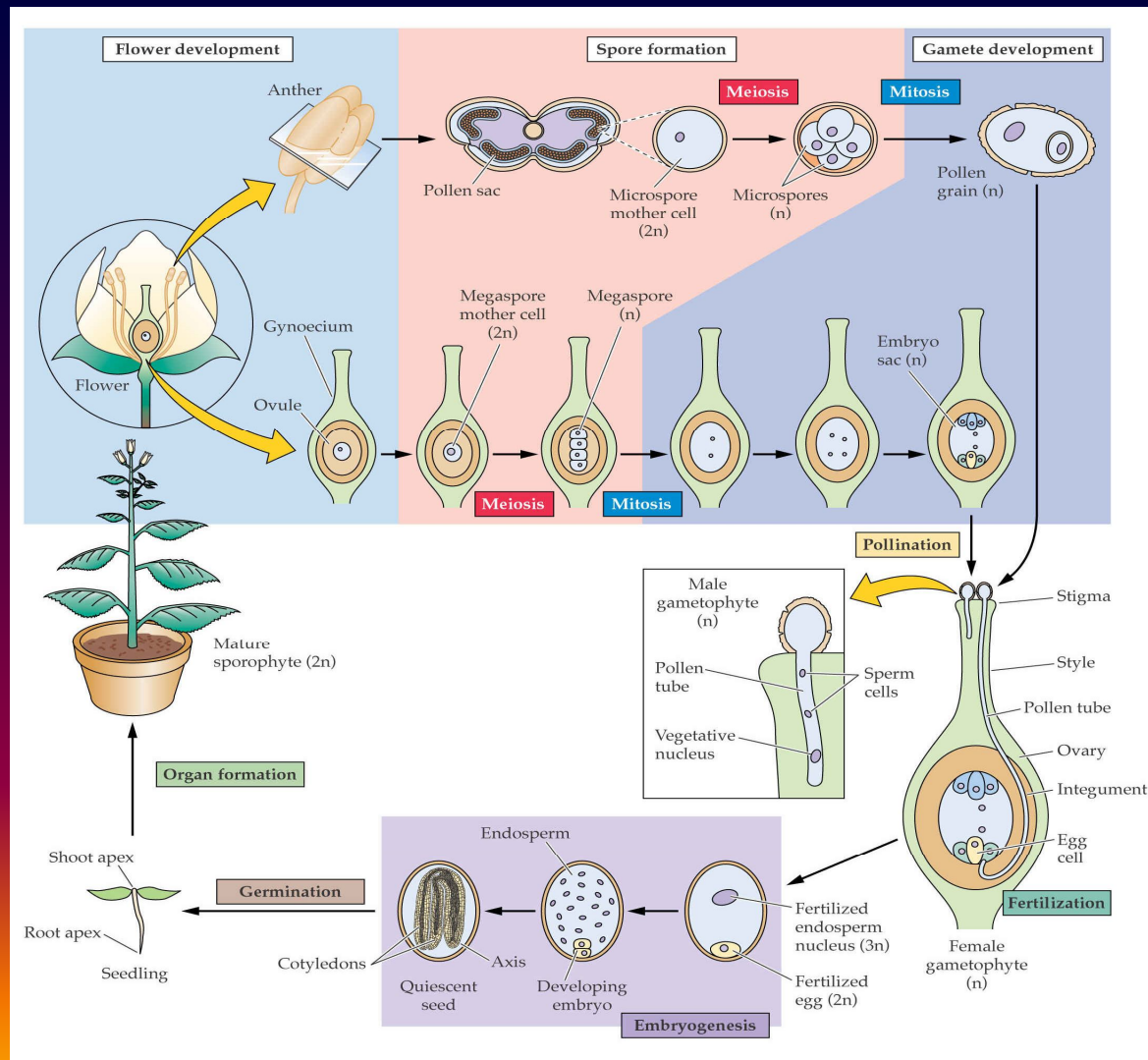


d) Vznik gamet

Životní cyklus rostliny

Mikrosporogeneze

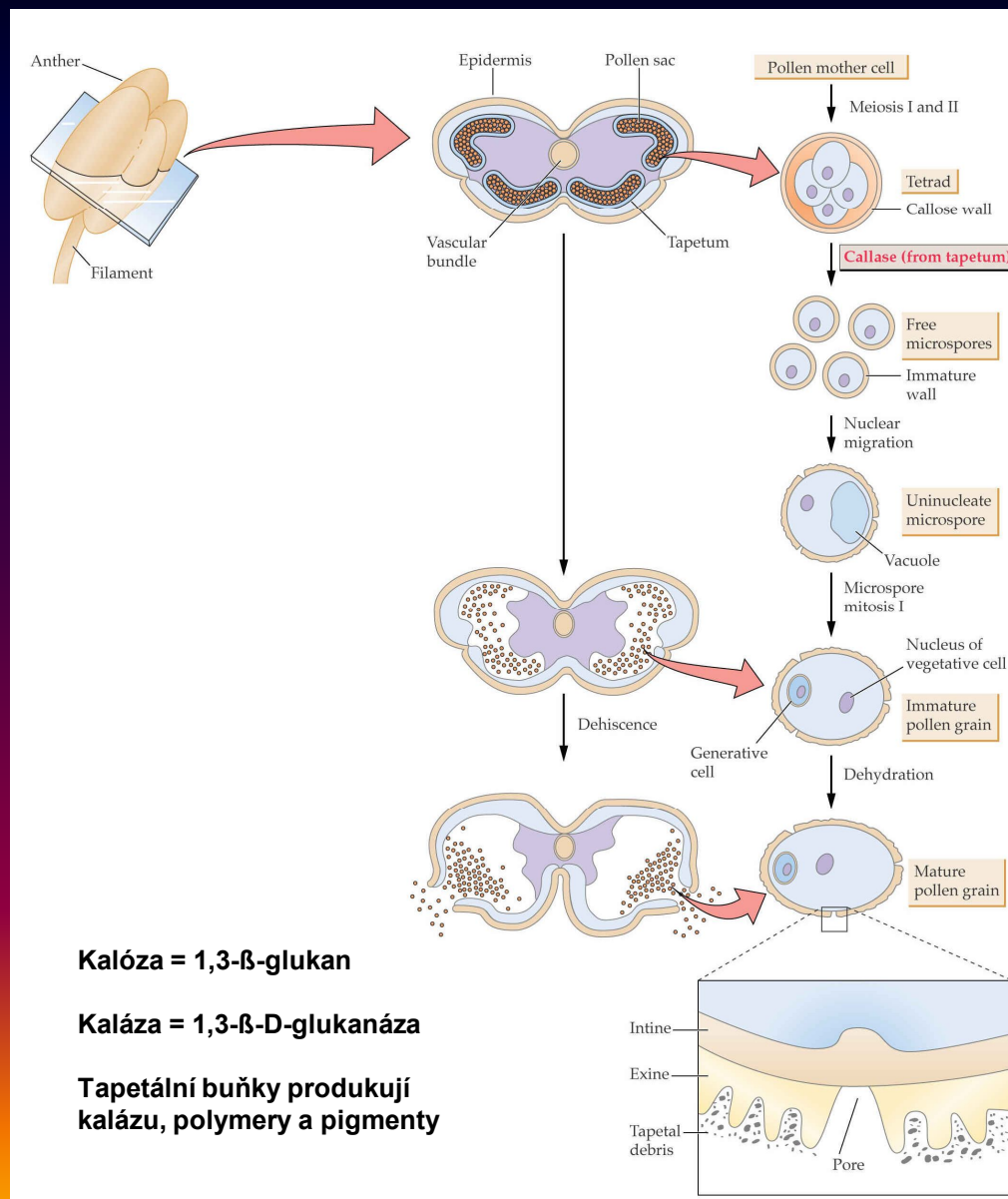
Megasporogeneze



UPDATE 2007

Turner JM (2007)
Chromosome Research 15:
517 - 521

Review o meióze



Kalóza = 1,3-β-glukan

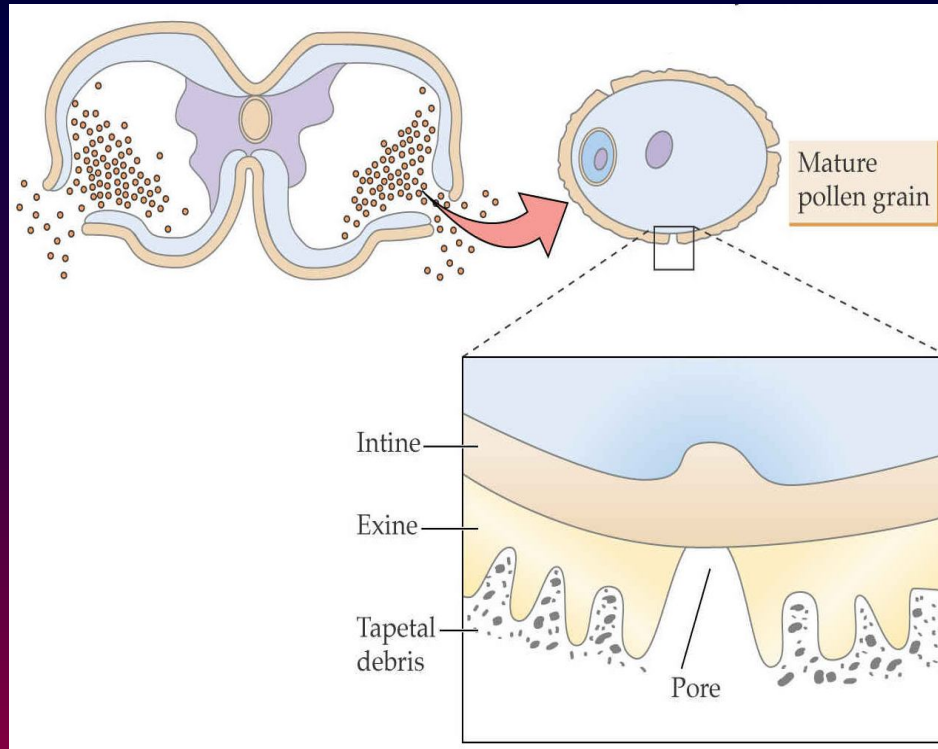
Kaláza = 1,3-β-D-glukanáza

Tapetální buňky produkují kalázu, polymery a pigmenty

Mikrosporogeneze = tvorba samčího gametofytu = pylových zrn



Samčí pohlavní buňka - pylové zrno



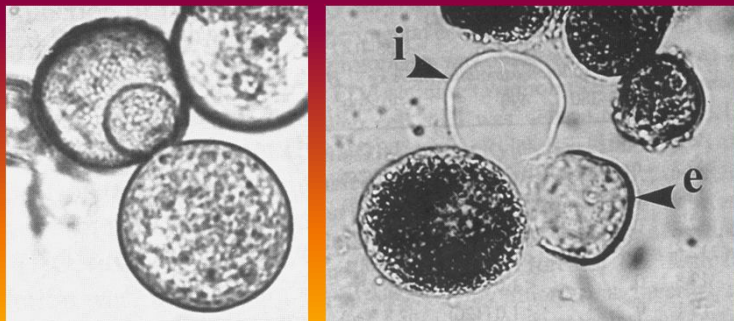
Exina = sporopolenin = polymer fenolů; extrémně rezistentní k chemickým látkám; **nejsou** známy geny, které utváření exiny kódují



Fosilní nálezy pylových zrn

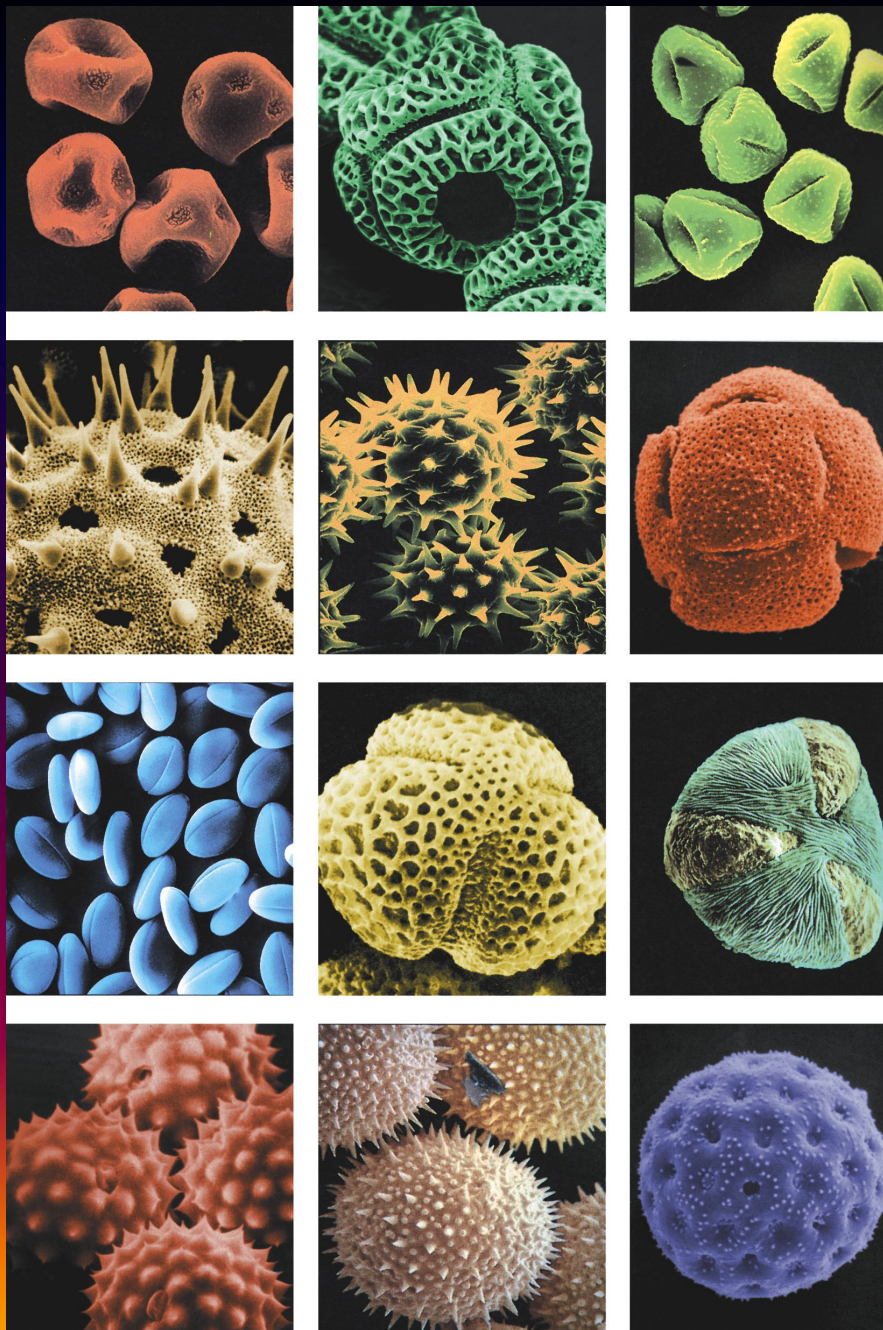


Vývojová biologie



Pylové protoplasty

Fellner M (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 157-162.

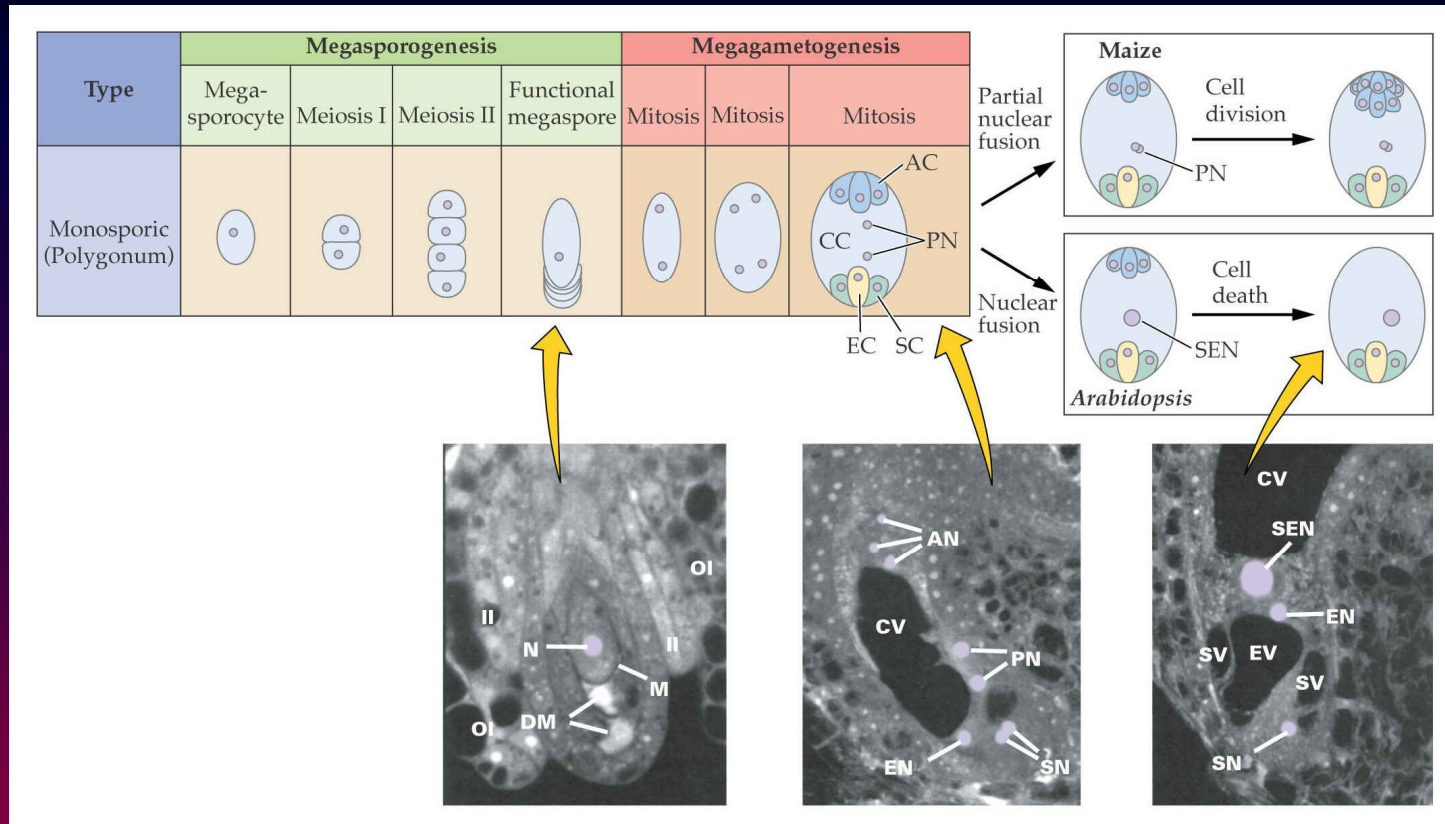


Pestré uspořádání exiny
pylových zrn



Praktické využití
(např. kriminalistika)

Vývoj samičího gametofytu - megasporogeneze



Nezralé vajíčko $\xrightarrow{\text{Meióza}}$ Megaspora $\xrightarrow{\text{Mitózy}}$ Embryonální vak: **7 buněk**

- 3 antipodální (AC)
- 2 synergické (SC)
- 1 centrální (CC)
- 1 vaječná (EC)

UPDATE 2010

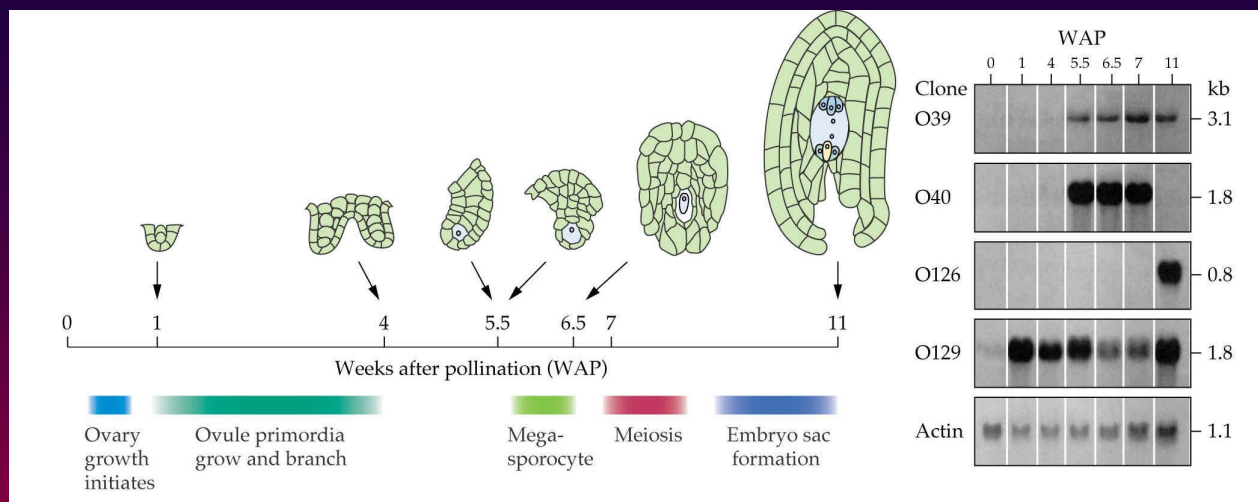
Yang W-C et al. (2010) Annu Rev Plant Biol 60: 27.1-27.20

Review o vývoji samičího gametofytu

Je problematické najít geny specificky exprimované v samičím gametofytu:
 problematické izolovat vajíčko od sporofytického pletiva => obtížné izolovat mRNA a vytvořit cDNA knihovny

Orchidej - experimentální rostlina pro studium genů specificky exprimovaných ve vajíčku

- synchronizovaný vývoj vajíček
- vajíčko se vyvíjí dlouhou dobu (11 týdnů) => možnost izolovat vajíčka v různých stádiích vývoje => mRNA v různých etapách vývoje => možnost determinovat expresi během vývoje



Nadeau JA et al. (1996) Plant Cell 8: 213-239

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=161093&action=stream&blobtype=pdf>

Skupina F. Colomba (Holandsko) identifikovala geny specificky exprimované ve vajíčku: *FBP* = MADS box geny.

Colombo L et al. (1997) Plant Cell 9: 703-715

Favaro R et al. (2002) Mol Genet Genomics 268: 152-159

e) Mutace ve vývoji gametofytu

Analýza sterilních mutantů → Identifikace genů

Pylově sterilní mutanti s defektem ve vývoji pylu - většinou recesivní, homozygotní

- defekt v meióze, netvoří pyl
- defekt ve vývoji tapetálních buněk
- deformace prašníků – pyl se neuvolňuje, nebo pozdě
- defekt v pylovém otvoru – pyl nemůže klíčit
- defekt ve vývoji sporofytu – pyl nemůže klíčit

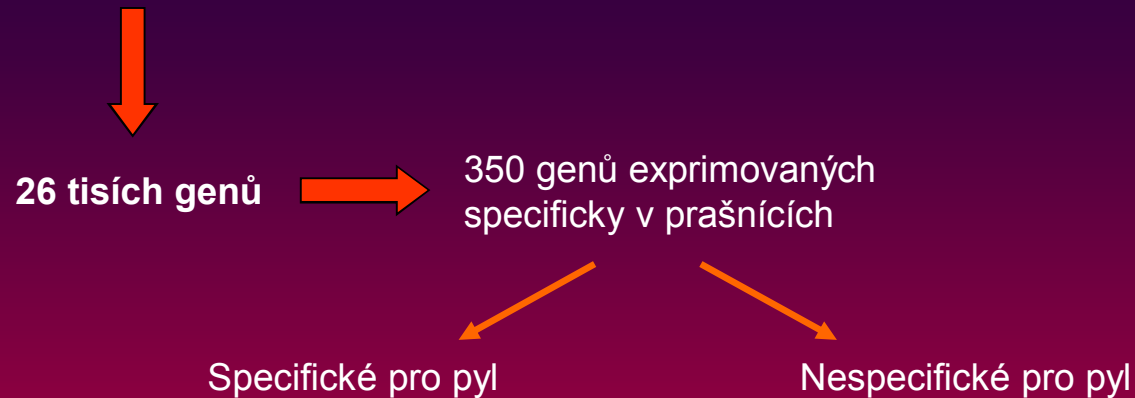
Sterilní mutanti s defektem ve vývoji vajíčka

- defekt ve vývoji sporofytu
 - defekt ve vývoji megaspory
 - defekt ve vývoji embryonálního vaku a vajíčka – ovlivněno oplodnění
- } - ovlivněn vývoj vajíčka a ovlivněno oplodnění

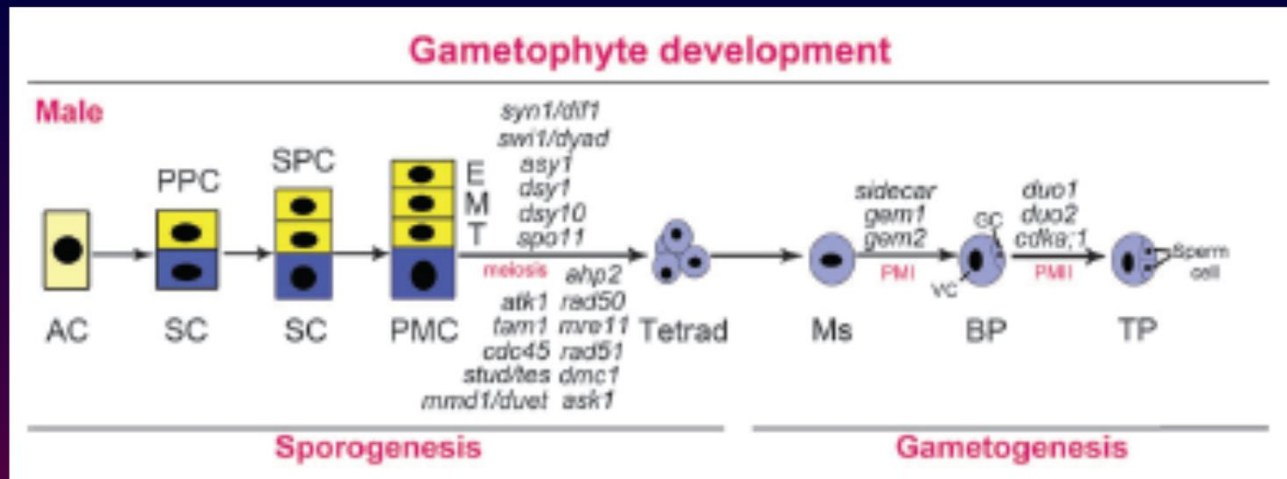
Mutace ve vývoji samčího gametofytu

60 –90% genů exprimovaných ve gametofytu je exprimováno i ve sporofytu

Sekvenování *Arabidopsis* genomu (2000) (viz MBR 1)

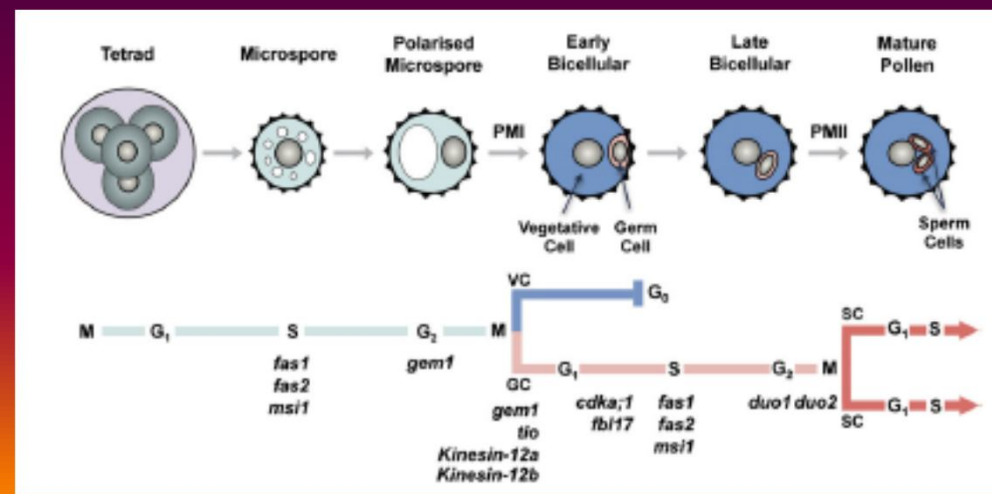


Mutace zapojené v meiotickém a mitotickém buněčném cyklu – **samčí gametofyt**



UPDATE 2009

Borg M et al. (2009) J Exp Bot 60: 1465 - 1478



GSL 8, GSL10 – enzym **glukan-syntáza-like**; narušená symetrie dělení mikrospor a nepravidelné ukládání kalózy

sporocyteless (spl) – defekt v diferenciaci primárních sporogenních buněk na mikrospory; špatně vyvinutá stěna prašníku

excess microsporocytes1 (ems1) – produkuje velké množství mikrosporocytů na úkor tapeta

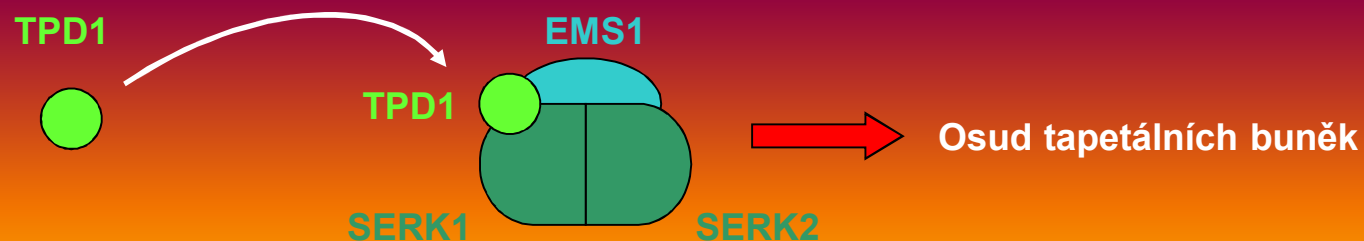
UPDATE 2010

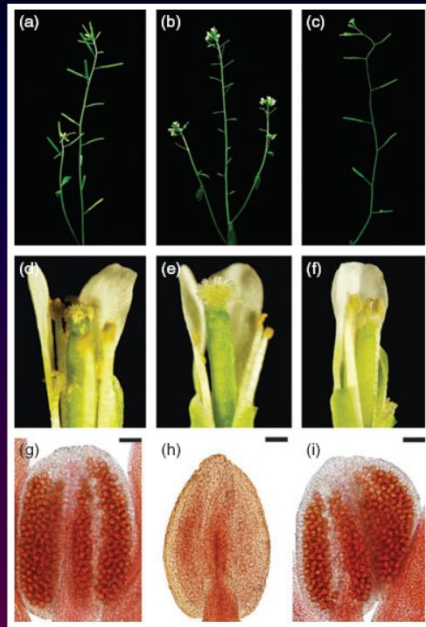
Feng X et al. (2010) Development 137: 2409 - 2416

EMS1 – LRR-RLK (leucine-rich repeat receptor-like kináza)

SERK1, SERK2 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1 a 2)

TPD1 (TAPETUM DETERMINANT 1) – syntetizovaný mikrosporocytů





WT *tdf1* Trangen *TDF1*

TDF1
(DEFECTIVE IN TAPETAL DEVELOPMENT AND FUNCTION1) –
 transkripční faktor MYB; klíčový v regulaci vývoje tapeta

Zhu J et al. (2008) Plant J 55: 266 - 277

UPDATE 2010

Ishiguro S et al. (2010) Plant Cell Physiol 51: 896-911

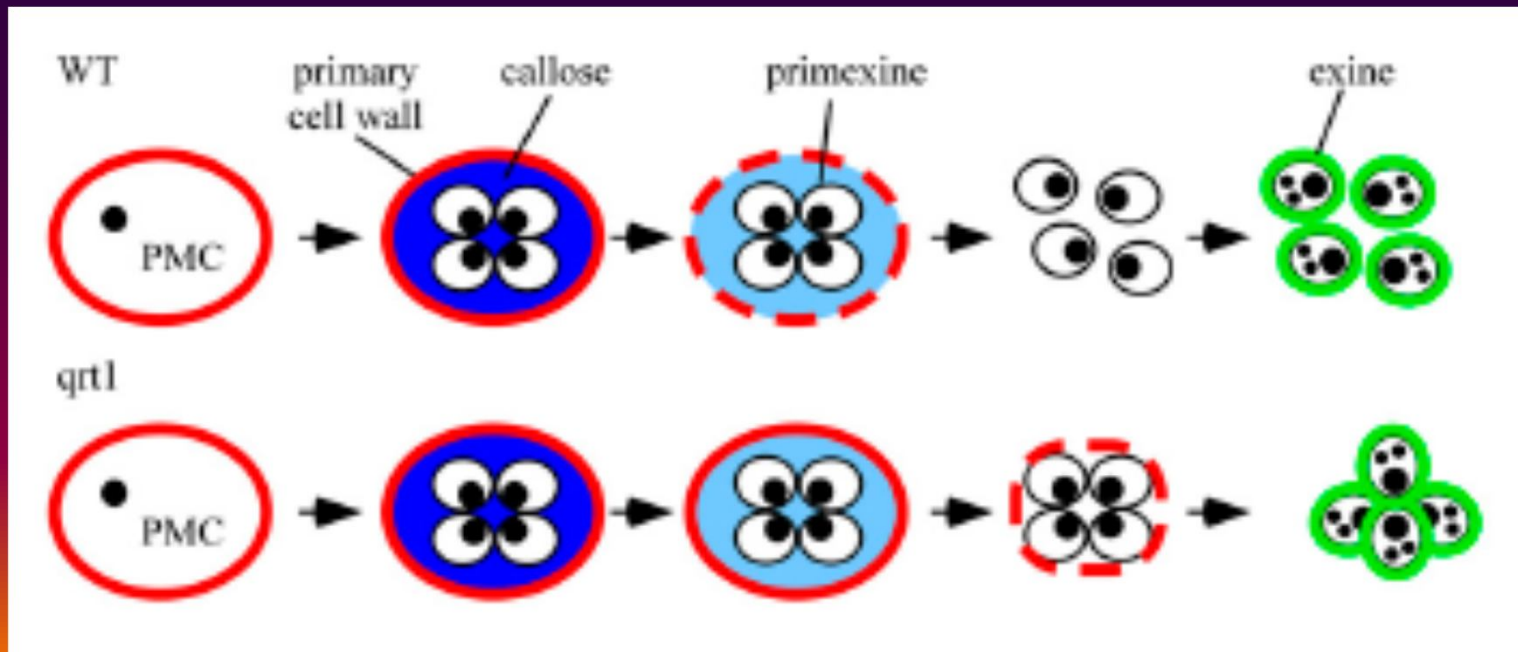
fkp1 – pylová zrna bez povrchové vrstvy

FKP1 (FLAKY POLLEN 1) – kóduje 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A syntázu = enzym mevalonátové (MVA) dráhy zapojený v biosyntéze sterolů

MVA důležitý pro vývoj organel tapetálních buněk => pylová zrna ***fkp1*** nemají povrchovou vrstvu, která vzniká z rozpadlých tapetálních buněk.

quartet (qrt) – tetrády se nerozdělují a uvolňují se celé z prašníku

QRT – kóduje enzym s pektin metylesterázovou aktivitou (PME); exprimován v prašnickových pletivech před koncem meiózy

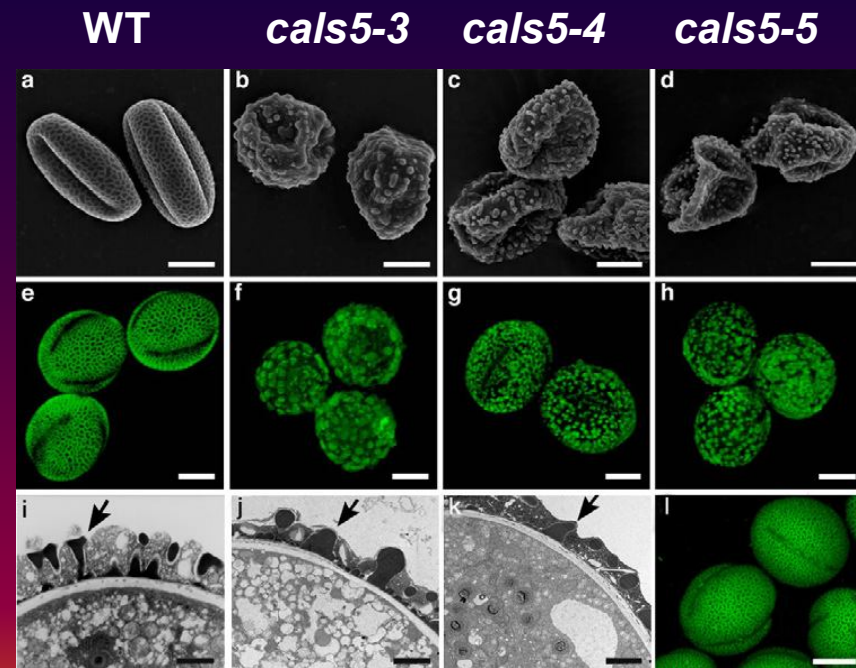


T-DNA mutant *cals5* – narušená fertilita, degenerované mikrospory

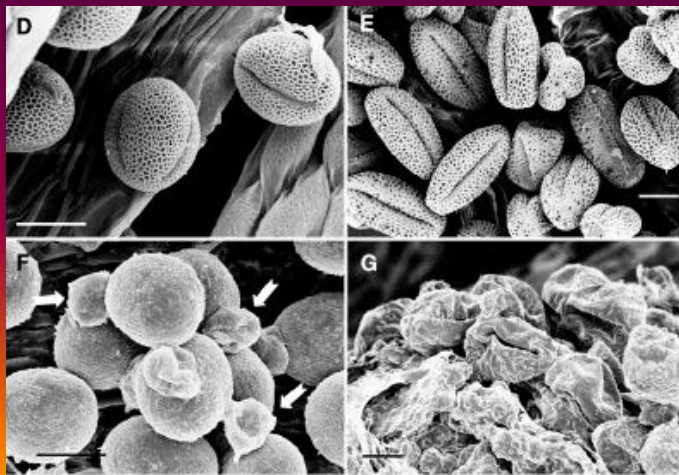
CALS5 kóduje kalóza-syntázu → syntéza kalózy → exina

Knockout mutant *CYP703A2* (cytochrom P450)
CYP703A2 – katalyzuje hydroxylaci kys. laurové

Sporopolenin – bloky hydroxylované
 kyseliny laurové



WT



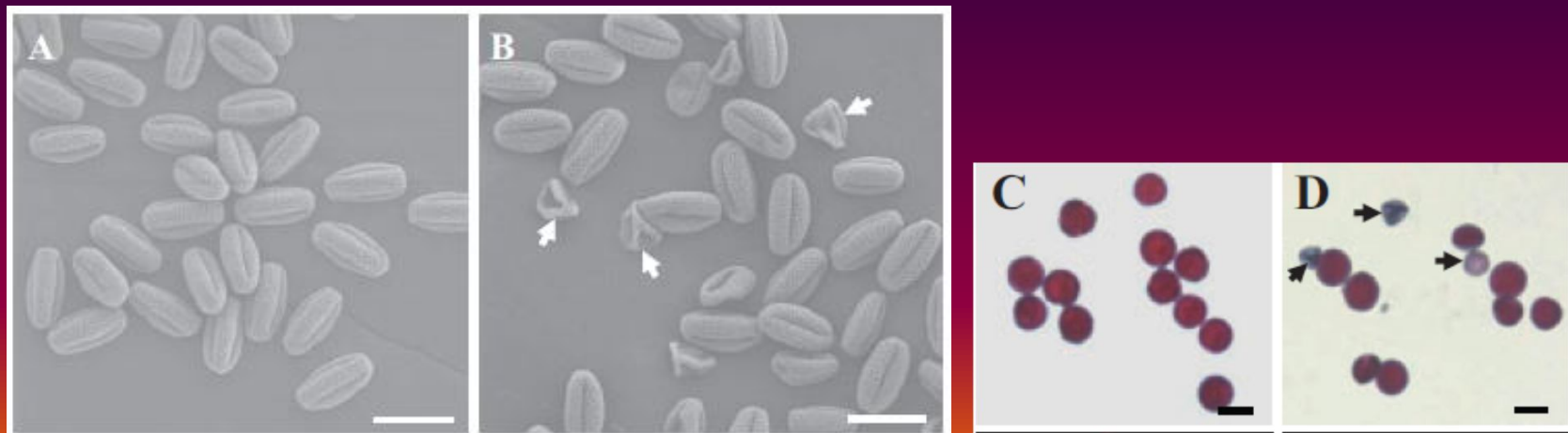
CYP703A2

UPDATE 2010

Li W-Q et al. (2010) *Plant Cell Physiol* 51: 923-935

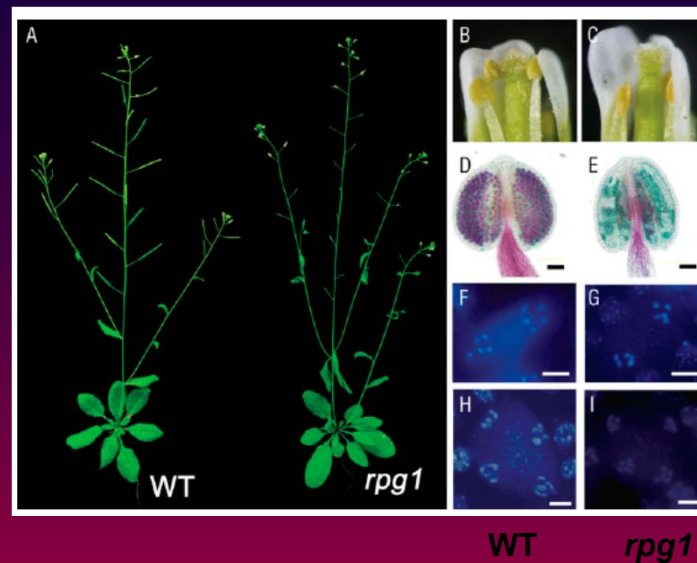
***MGP1* (MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1)** – kóduje F_a d podjednotku mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázy u *Arabidopsis*.

***mgp1* mutant** – destrukce mitochondrií v pylových zrnech a k zániku pylových zrn



MS1 (MALE STERILITY1) – transkripční faktor regulující tvorbu exiny, pyl. cytosolu a tapeta

RPG1 (RUPTURE POLLEN GRAIN1) – membránový protein nezbytný pro tvorbu exiny



Guan Z-F et al. (2008) Plant Physiol 147: 852 - 863

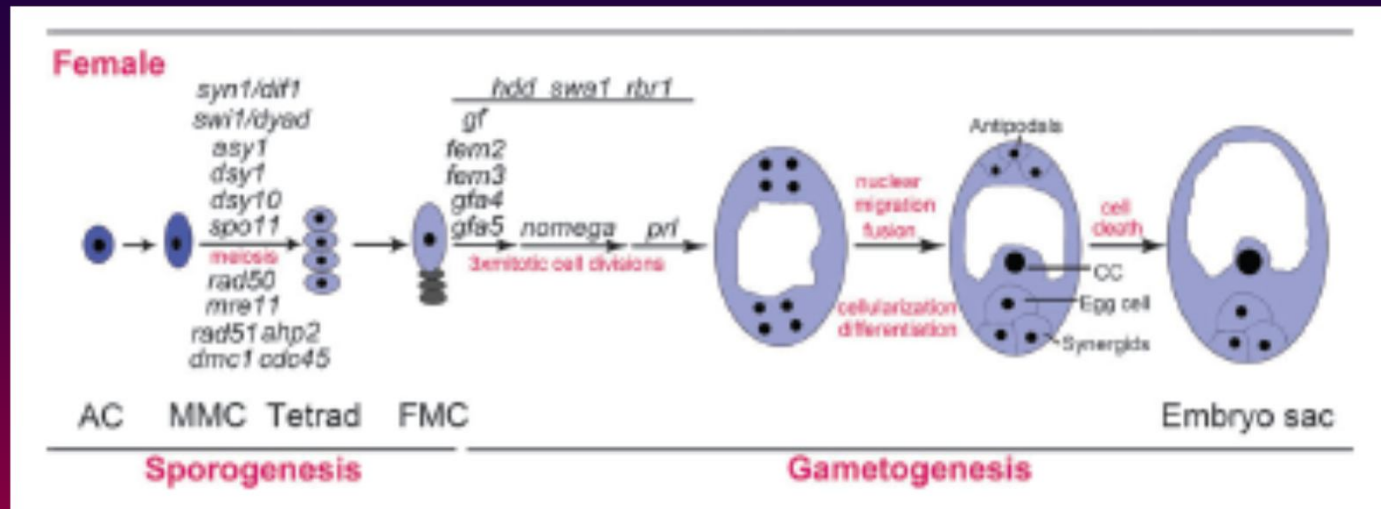
TIR1, AFB1 – AFB3 – auxinové receptory; mutanti vytváří krátké tyčinky prašníku a předčasné zrání pylu

Mutace ve vývoji samičího gametofytu

Mutace zapojené v meiotickém a mitotickém buněčném cyklu – **samičí gametofyt**

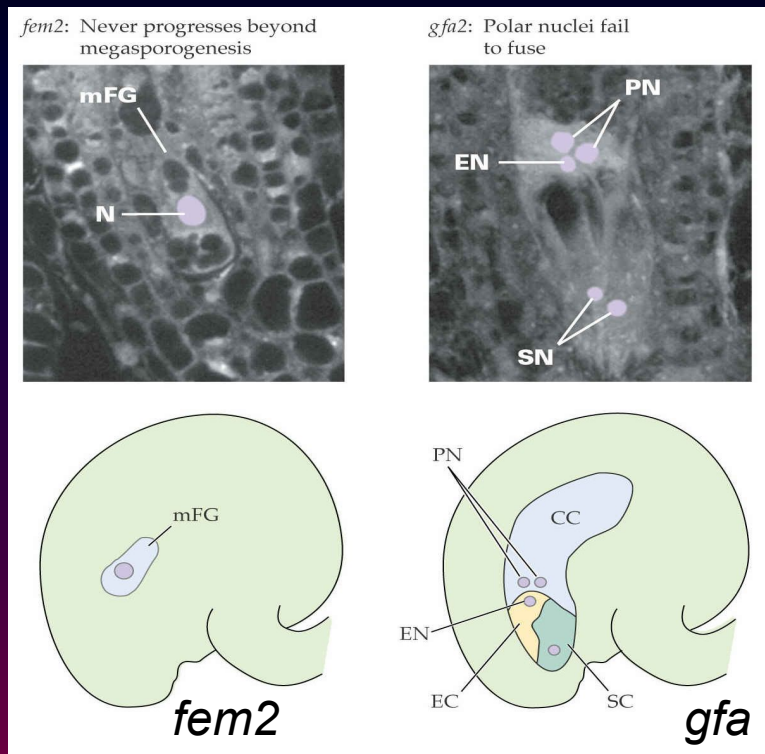
UPDATE 2008

Liu J, Qu L-J (2008) Molecular Plant 1: 564 - 574



23 genů
(funkce známa)

- 14 nespecifických (♂ + ♀)
- 9 specifických (♀)



Arabidopsis mutant *fem2* – zastaven vývoj vajíčka před megalporogenezí

Arabidopsis mutant *gfa* – nedochází k fúzi jader centrální buňky

UPDATE 2008

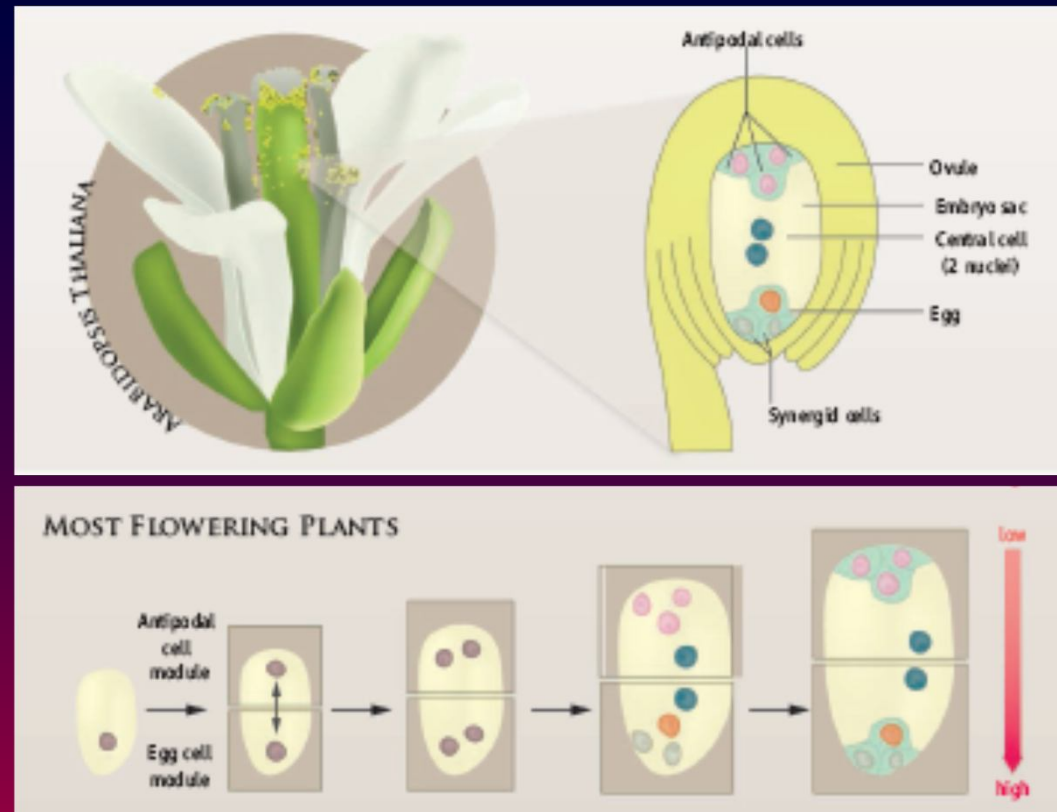
Colombo L et al. (2008) TIPS 13: 444 - 450

Přehled genů specifických pro vývoj vajíčka.

BEL1, *WUS*, *INO*, *ANT* – geny významné ve vývoji integumentu (vnějšího obalu vajíčka); homologní geny existují u jiných rostlinných druhů a regulují rovněž vývoj samičího gametofytu.

UPDATE 2009

Pagnussat GC et al. (2009) Science 324: 1684-1689



Distribuce auxinů v embryonálním vaku je polarizovaná - tvoří se gradient koncentrace auxinů. Na základě tohoto gradientu auxin určuje identitu buněk:

Vysoká koncentrace auxinu → Synergické buňky a vaječná buňka

Nízká koncentrace auxinu → Antipodální buňky

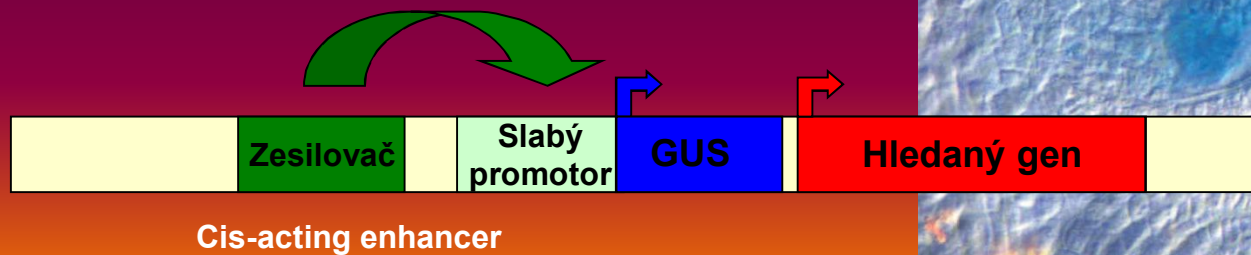
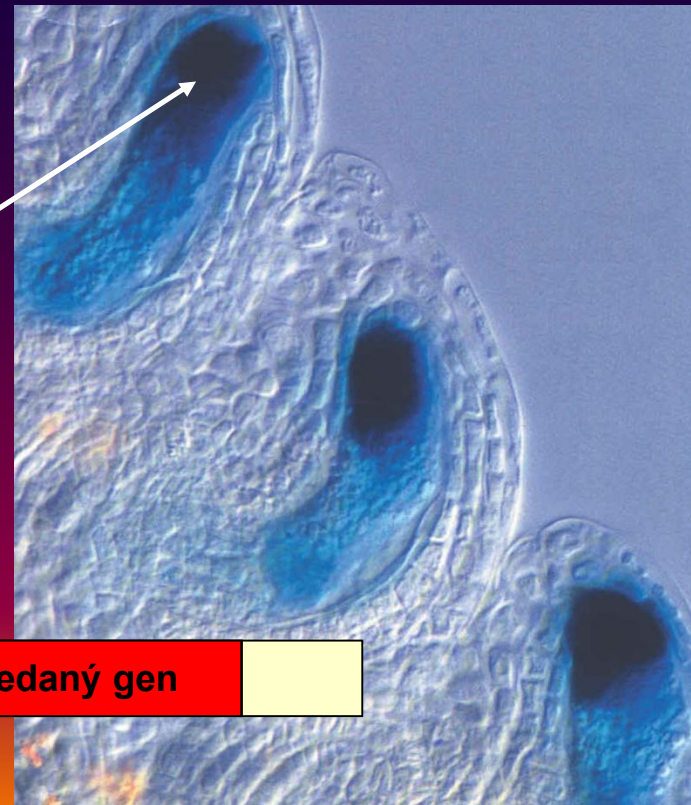
Metoda enhancer-trap mutageneze = „chytání zesilovače“

Identifikace genů specificky exprimovaných v buňkách embryonálního vaku



Konstrukt: Slabý promotor GUS

GUS expression



Cytoplasmatická samčí sterilita (CMS) = pylová sterilita přenášená pouze samičími orgány

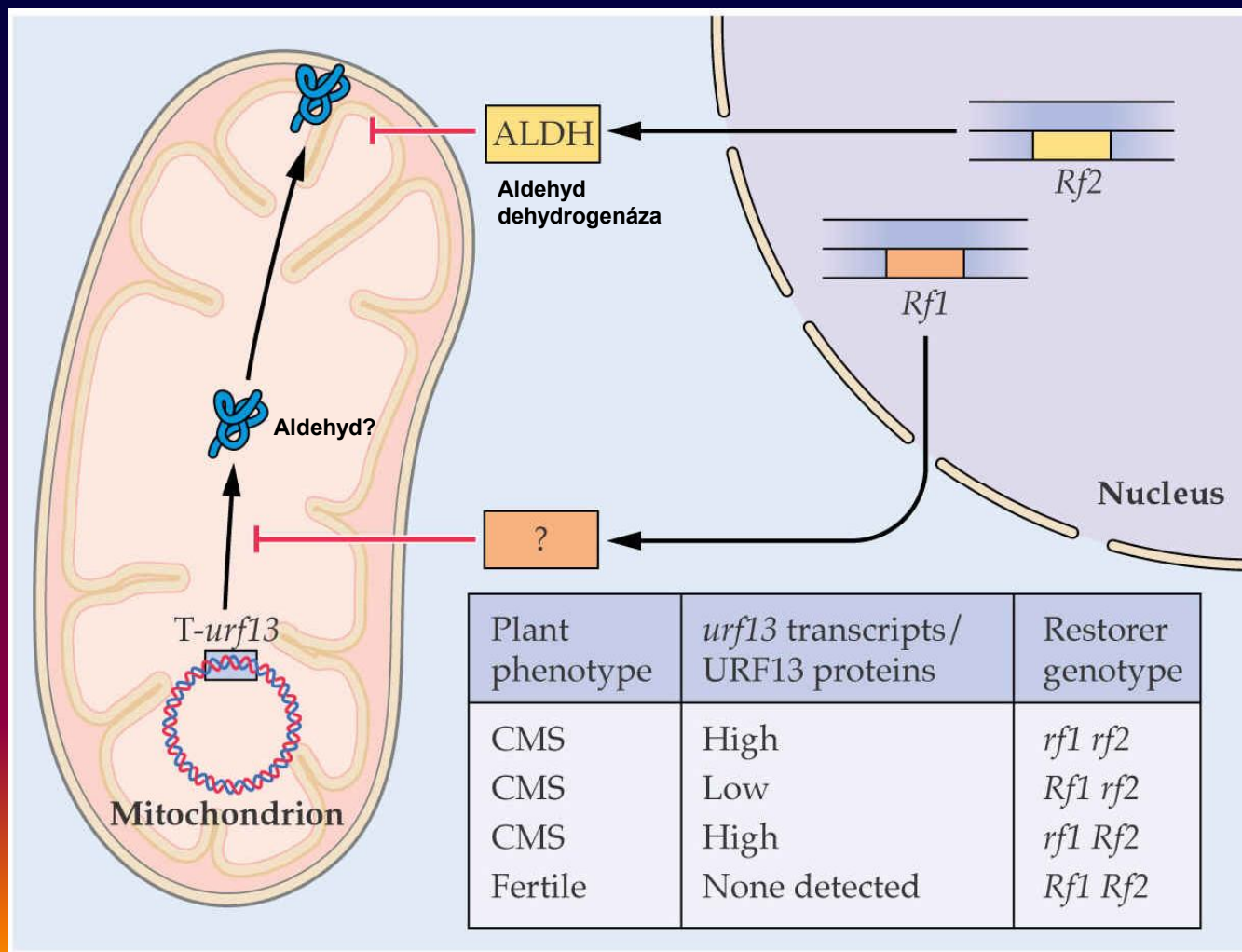
- Odpovědné geny jsou většinou součástí chloroplastového či mitochondriálního genomu.
- Ve všech známých případech je CMS způsobena expresí abnormálních proteinů v mitochondriích prašníků.
- Mechanismus, jakým abnormální proteiny ovlivňují mitochondrie, není znám.
- Mitochondrie v prašníku mají vliv na vývoj pylu.
- Pokud je exprese abnormálního proteinu redukována, fertilita je obnovena.
- Ve všech CMS systémech existují jaderné geny, které potlačují expresi (tvorbu) abnormálních proteinů v prašníku.

Nové review o CMS

Chase CD et al. (2007) Trends in Genetics 23: 81 - 90

CMS-T systém u kukuřice – abnormální mitochondriální protein URF13

Obnovení fertility vyžaduje 2 jaderné geny: *Rf1* a *Rf2*



Klíčení pylu

Pro klíčení vyžaduje vysušené pylové zrno **vlhkost**

1) Rostliny s **vlhkou bliznou** – pylové zrno bere vlhkost z blizny

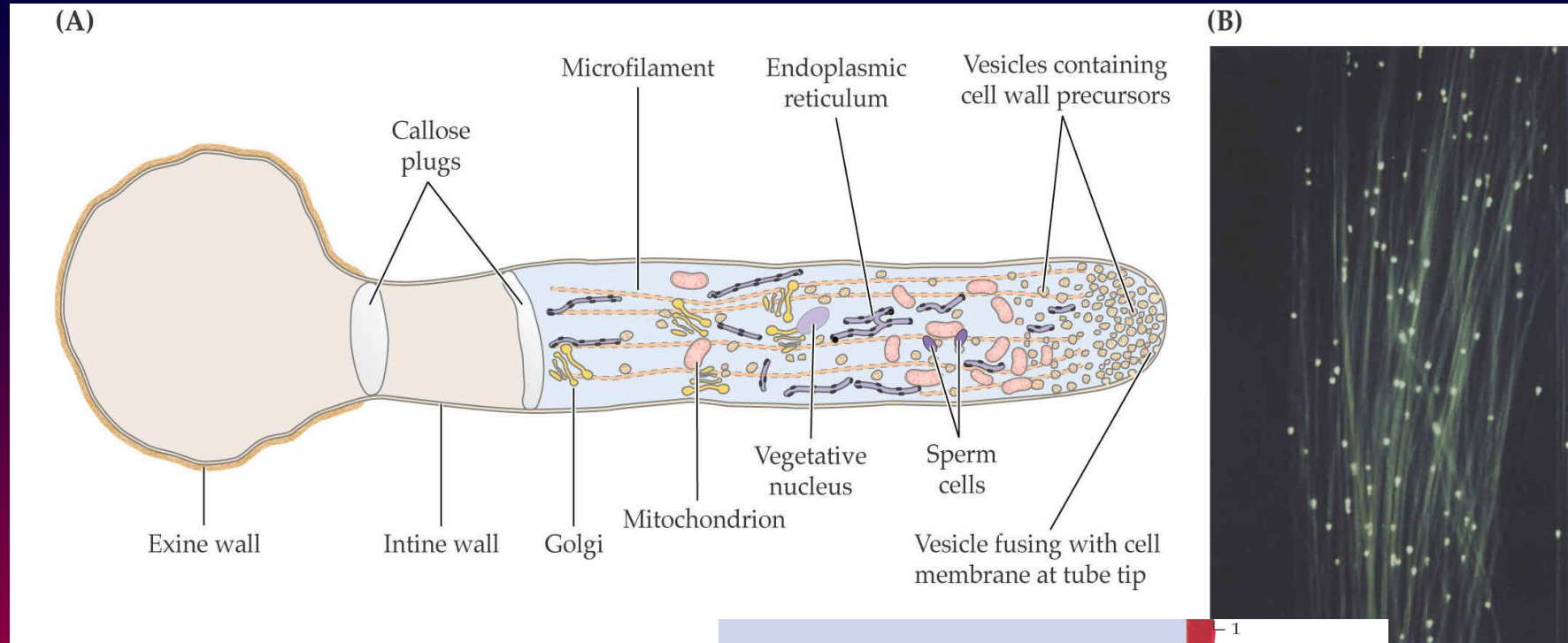
2) Rostliny se **suchou bliznou** – vlhkost je zajištěna **lipidy** na povrchu pylového zrna. Lipidy hrají významnou roli v klíčení pylu.

Arabidopsis mutant **cer** – má defektní lipidovou vrstvu – klíčí pouze za extrémní vlhkosti

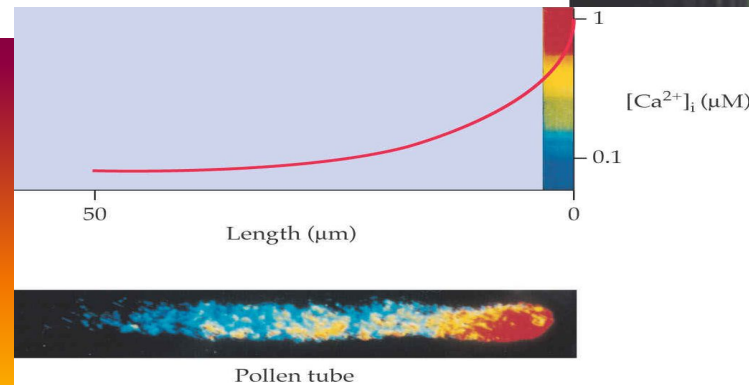
Arabidopsis mutant **fiddlehead** – má odlišné lipidy (vysokomolekulární) v epidermálních buňkách listů. Pylová zrna WT na těchto listech klíčí !!!

Flavonoidy na povrchu pylového zrna hrají roli v klíčení pylu. Rostliny kukuřice s mutací v genu, kódujícím enzym biosyntézy flavonoidů, jsou self-sterilní

Mechanismus klíčení pylu – není dosud přesně znám



Ca²⁺ gradient – nezbytný pro klíčení pylu; hraje roli v regulaci směru růstu pylové láčky

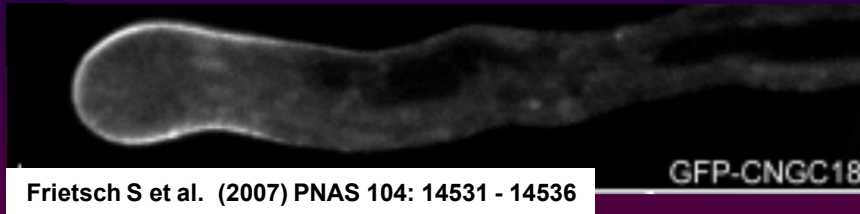


Není známo, jak je Ca^{2+} signál přeložen do finální reakce prodlužování pylové láčky.

cngc18 – nulový mutant s pylovou sterilitou

CNGC18 – kóduje kationtový kanál regulovaný cyklickými nukleotidy

GFP:CNGC18 analýza



Frietsch S et al. (2007) PNAS 104: 14531 - 14536

cngc18: komplementovaný GFP:CNGC18

Heterologní exprese v *E. coli* – časově a koncentračně závislá akumulace Ca^{2+}

UPDATE 2009

Myers C et al. (2009) Plant J 59: 528-539

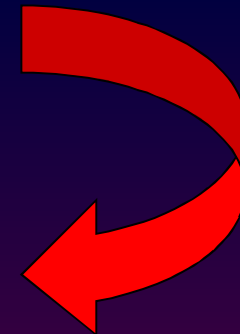
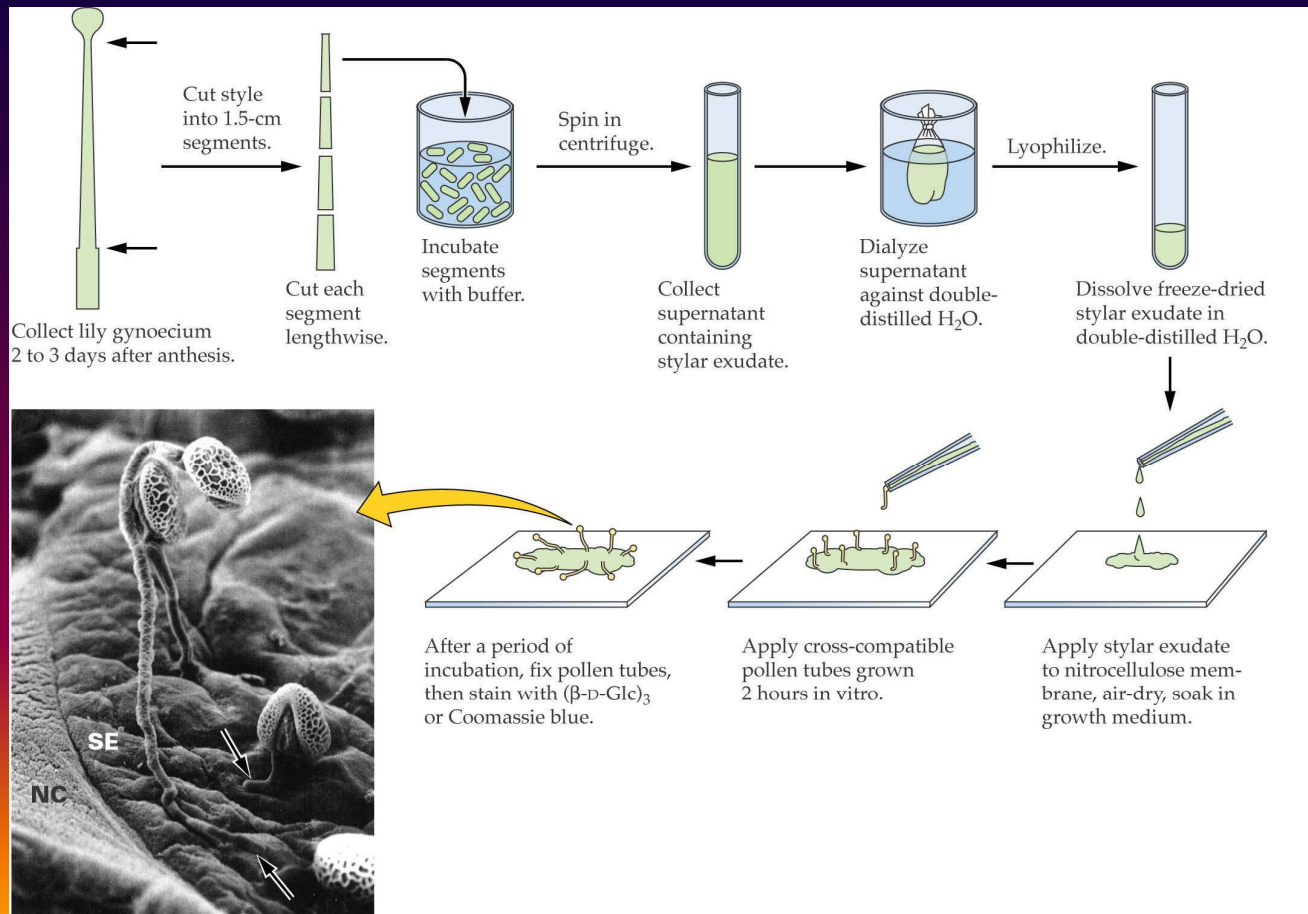
Zapojení Ca^{2+} -dependentních kináz

Wang Y et al. (2009) Plant Physiol 148: 1201-1211

Upregulace genů pro calmodulin, cation/hydrogen exchangers, heat-shock proteiny

Klíčení se dá indukovat *in vitro* na médiu obsahujícím cukr, kys. boritou, Ca^{2+}

Klíčení *in vivo* je vždy rychlejší → Další faktory (?) pocházející z blizny, hrající roli v klíčení pylu



Další faktory ovlivňující klíčení pylové láčky – rostlinné hormony

Gibereliny – stimulují prodlužovací růst (Swain and Singh 2005, TIPS 10: 123-129)

GA deficientní mutanti
 Mutanti s defektem v GA signaling } trpasličí vzrůst, defekt ve vývoji prašníků a pylu

Overexprese enzymu deaktivující GA → Inhibice růstu pylové láčky

Brasinosteroidy – stimulují prodlužovací růst

Mutant *cpd* – CPD kóduje cytochrom P450 (biosyntéza BRs)

Mutant *bri1* – BRI1 kóduje receptor BRs

Zastaveno prodlužování pylové láčky



BRs a BRs signaling nutné pro růst pylové láčky



Clouse et al. (1996)
 Plant Physiol 111: 671-678

UPDATE 2010

Zonia L (2010) Journal Exp. Botany 61: 1939-1957

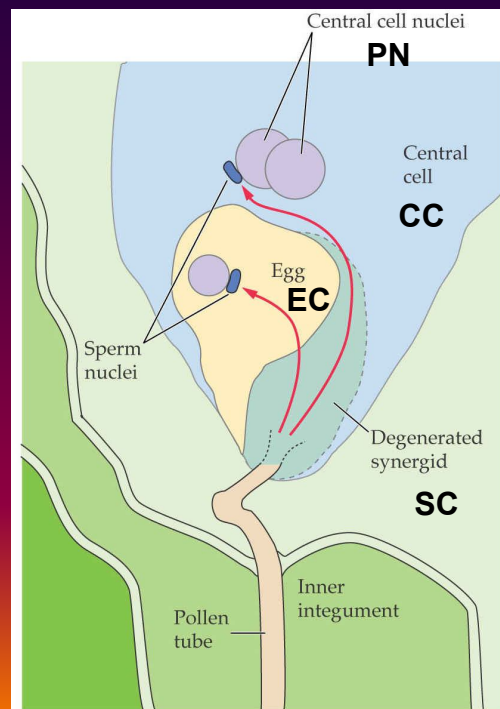
Review o prostorové a časové integraci signálních drah regulujících klíčení pylové láčky

f) Opylení, oplodnění

Obě spermatické buňky vnikají do jedné ze synergických buněk (SC). Dochází k dvojímu oplodnění:

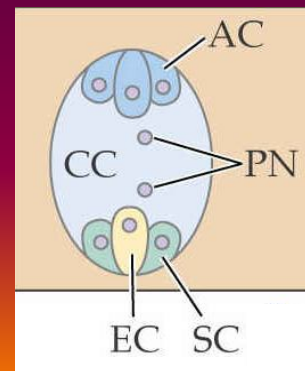
1. Oplodnění:

1. spermatická buňka oplodní haploidní vaječnou buňku (EC) => **diploidní zygota**



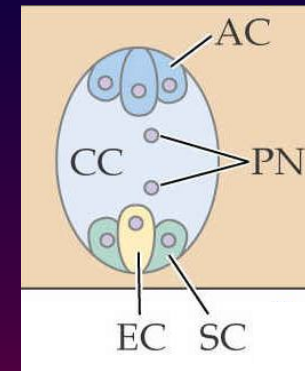
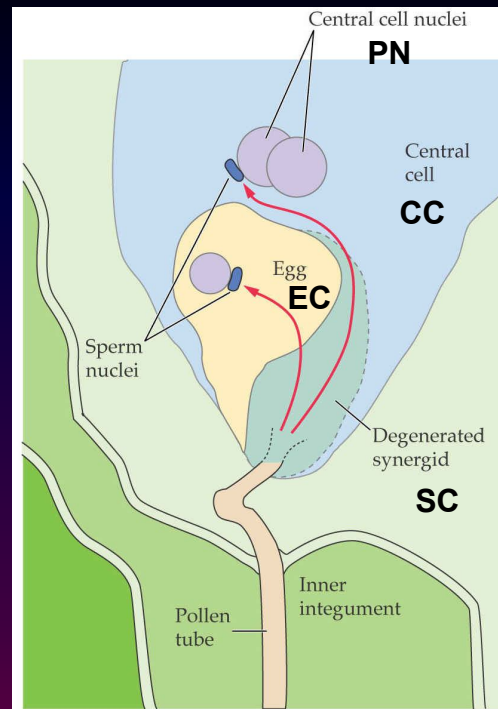
2. Oplodnění:

2. spermatická buňka oplodní diploidní centrální buňku (CC) = spojí se s jádry (PN) => **triploidní endosperm**



Klíčová otázka:

Co nutí a směřuje pylovou láčku k embryonálnímu vaku?



HAP2 – exprimován v haploidních spermatických buňkách; nutný k tomu, aby se pylová láčka dostala k vajíčku => spermatické buňky aktivně směřují pylovou láčku k vajíčku

GEX3 – správná exprese genu ve vaječné buňce a spermatických buňkách – směřování pyl. láčky k vajíčku

MAA3 (MAGATAMA3) – kóduje enzym helikázu, která je potřeba pro metabolismus RNA. Hraje roli ve správném směřování pylové láčky k mikropyle

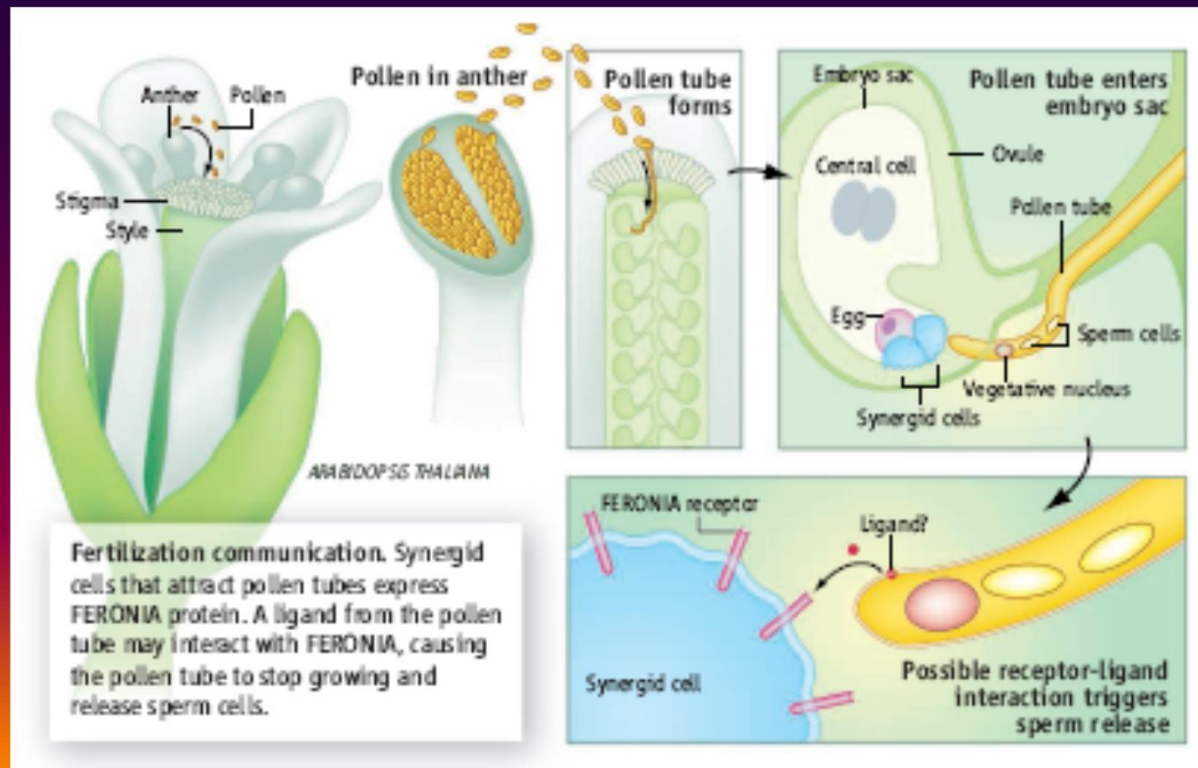
UPDATE 2007

Escobar-Restrepo J-M et al. (2007) Science 317: 656 - 660

feronia – pylová láčka vniká do synergické buňky, ale nepraská a neuvolňuje spermatické buňky

Synergické buňky exprimují protein **FERONIA** (receptor-like kináza) - přitahují pylovou láčku

Neznámý ligand + receptor FERONIA → Zastavení růstu pylové láčky, uvolnění spermatických buněk



UPDATE 2008

Berger F et al. (2008) TIPS 13: 437 - 443

Review o dvojitém oplodnění

UPDATE 2009

Boisson-Dernier A et al. (2009) Development 136: 3279-3288

Miyazaki S et al. (2009) Current Biology 19: 1327-1331

anx1anx2 – pylová láčka praská ještě předtím, než dosáhne samičího gametofytu



Geny ***ANXUR1*** a ***ANXUR2*** – homology genu FERONIA

Funkce ANX1 a ANX2? : konstitutivní **inhibice praskání** pylové láčky a uvolňování spermatických buněk; specificky exprimované v pylové láčce



Pylová láčka dosahuje samičího gametofytu.



Aktivace dráhy FERONIA

Deaktivace dráhy ANX



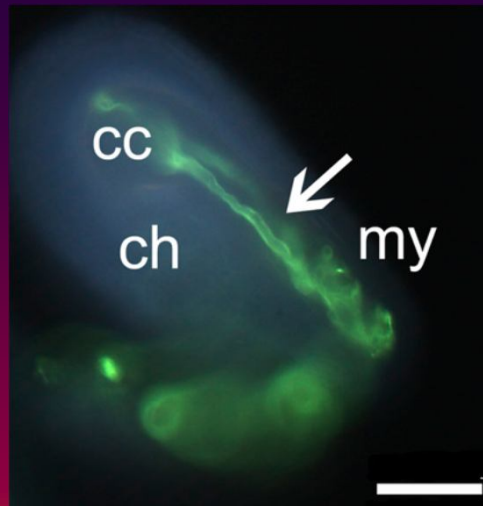
Prasknutí pylové láčky a uvolnění spermatických buněk.

UPDATE 2009

Capron A et al. (2008) Plant Cell 20: 3038-3049

Mutant *lorelei* - defekt v uvolnění spermatických buněk

Pylová láčka mutanta po dosažení embryonálního vaku nepraská, ale pokračuje v růstu uvnitř embryonálního vaku směrem k centrální buňce (CC). Tam se ale otočí a směřuje zpátky k mikropyle.



cc – central cell

my – micropylární konec

ch – chalaziální konec

LORELEI (LRE) - exprimován v synergických buňkách

LORELEI je glucosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein - umožňuje samičímu gametofytu rozpoznat vniknutí kompatibilní pylové láčky a umožnit uvolnění spermatických buněk.