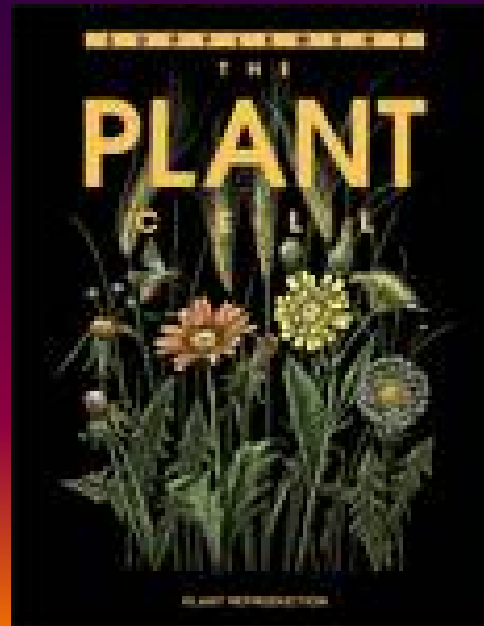


4) Reprodukce rostlin

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



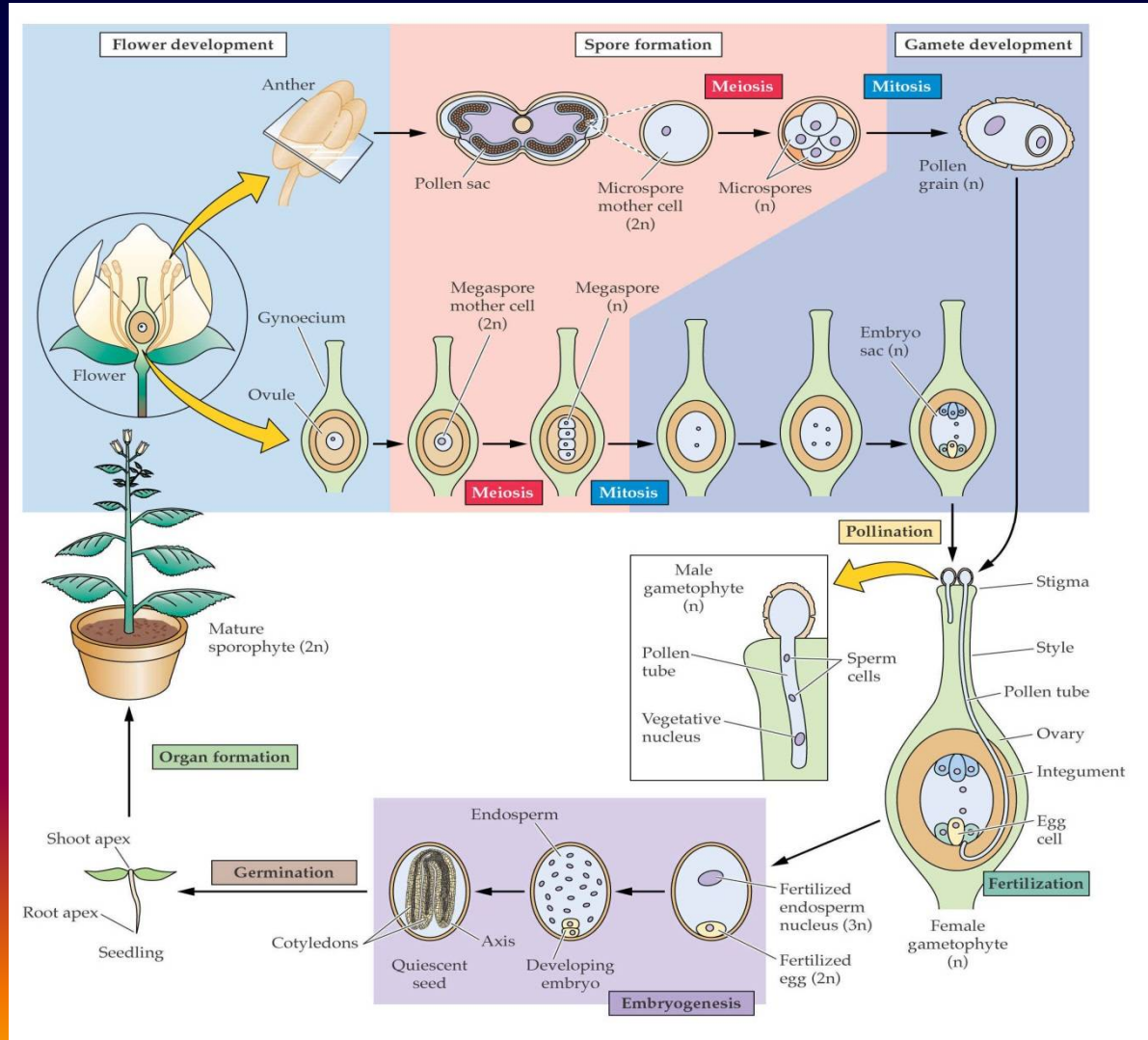
Martin Fellner
Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

d) Vznik gamet

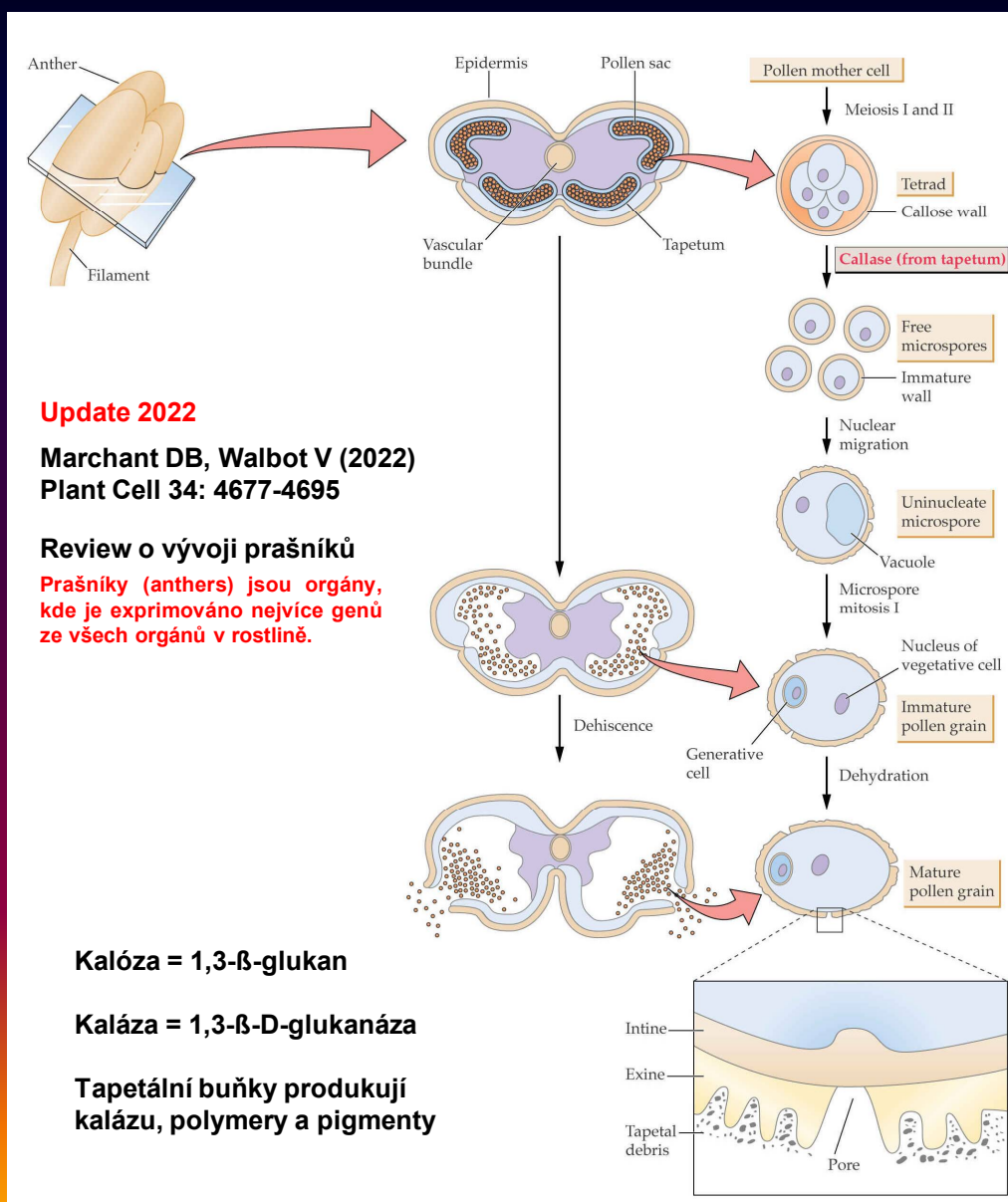
Životní cyklus rostliny

Mikrosporogeneze

Megasporogeneze



Vývoj samčího gametofytu - mikrosporogeneze



Update 2022
Marchant DB, Walbot V (2022)
Plant Cell 34: 4677-4695

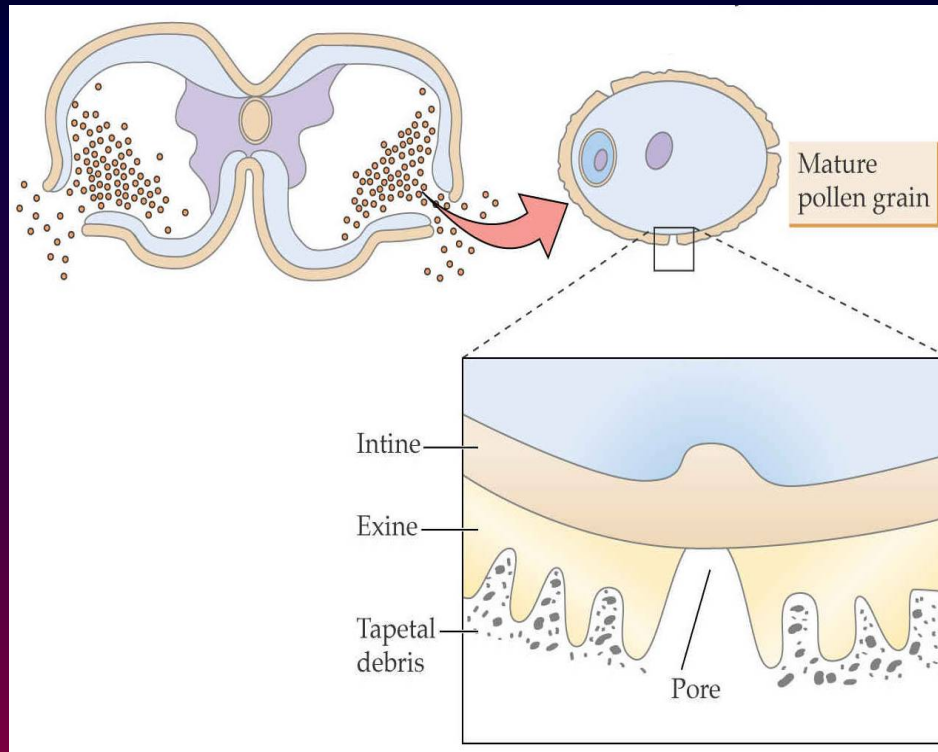
Review o vývoji prašníků
Prašníky (anthers) jsou orgány, kde je exprimováno nejvíce genů ze všech orgánů v rostlině.

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



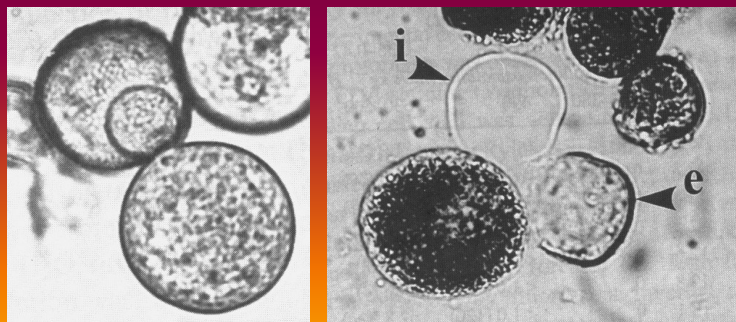
Exina = sporopolenin = polymer fenolů; extrémně rezistentní k chemickým látkám; geny, které utváření exiny kódují, jsou málo známy



Fosilní nálezy pylových zrn

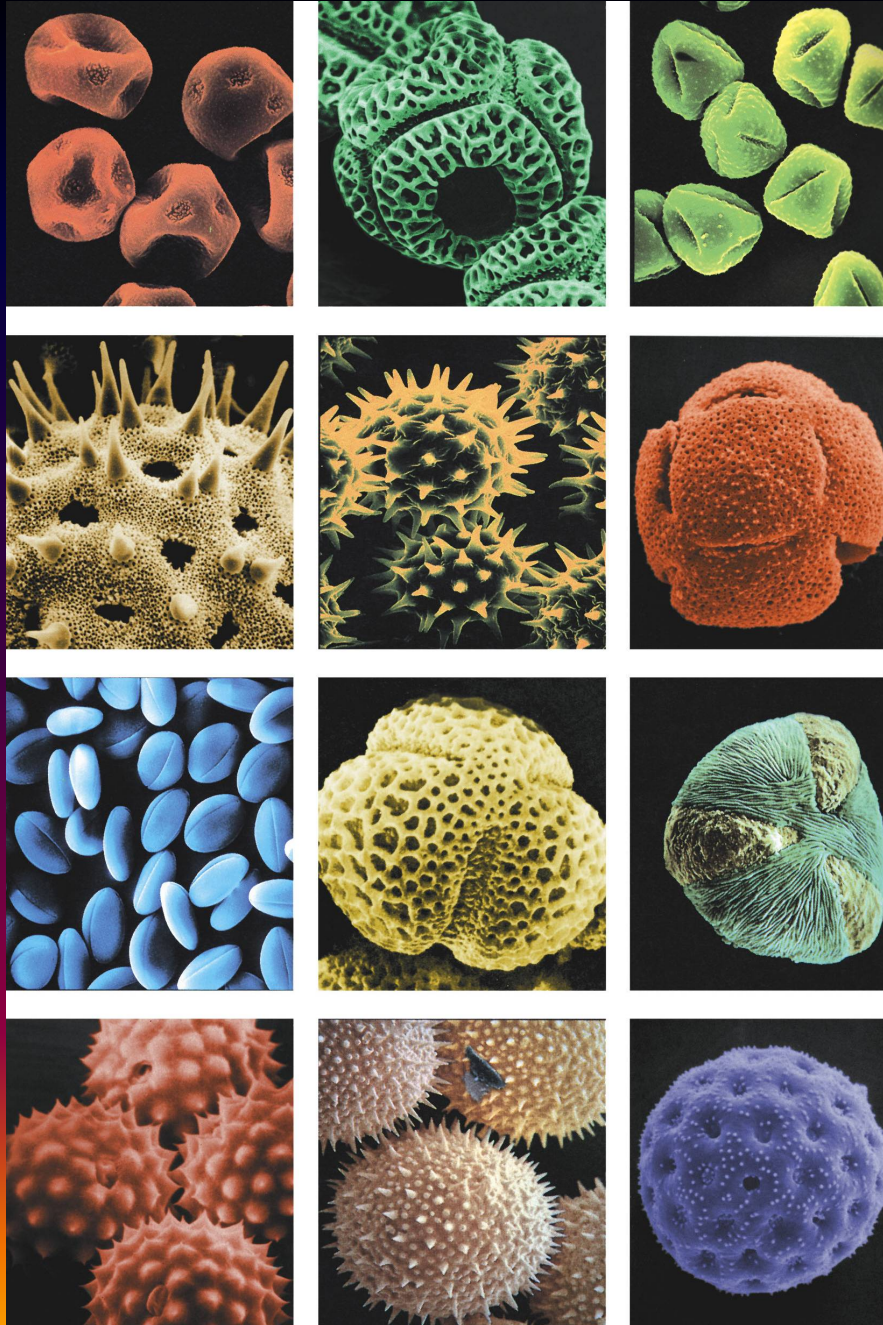


Vývojová biologie



Pylové protoplasty

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

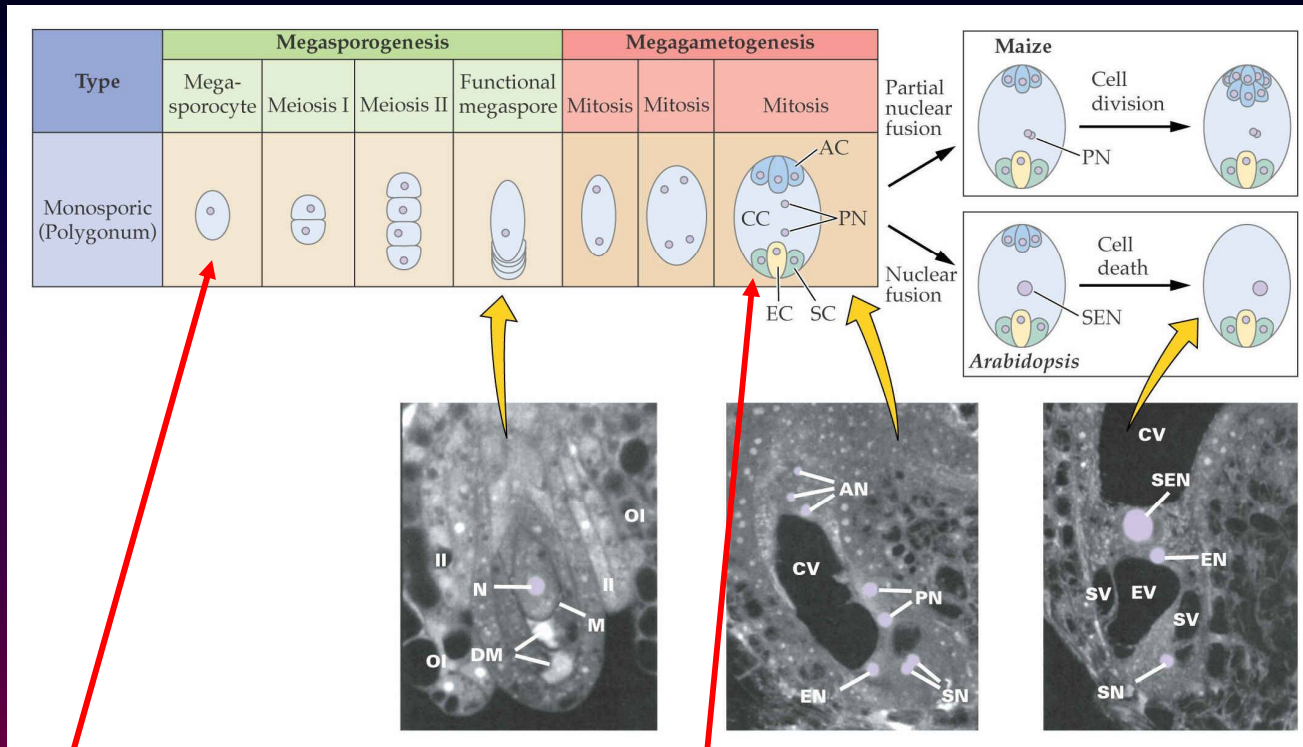


**Pestré uspořádání exiny
pylových zrn**



**Praktické využití
(např. kriminalistika)**

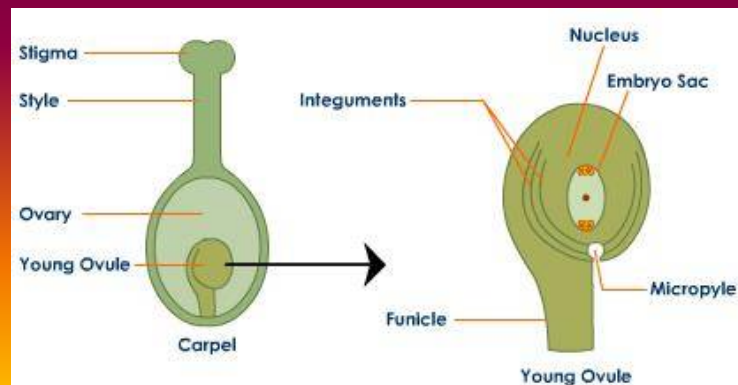
Vývoj samičího gametofytu - megasporogeneze



Meióza (2x) → **Nezralé vajíčko** → Megaspora → Mitóza (3x) → **Embryonální vak: 7 buněk**

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

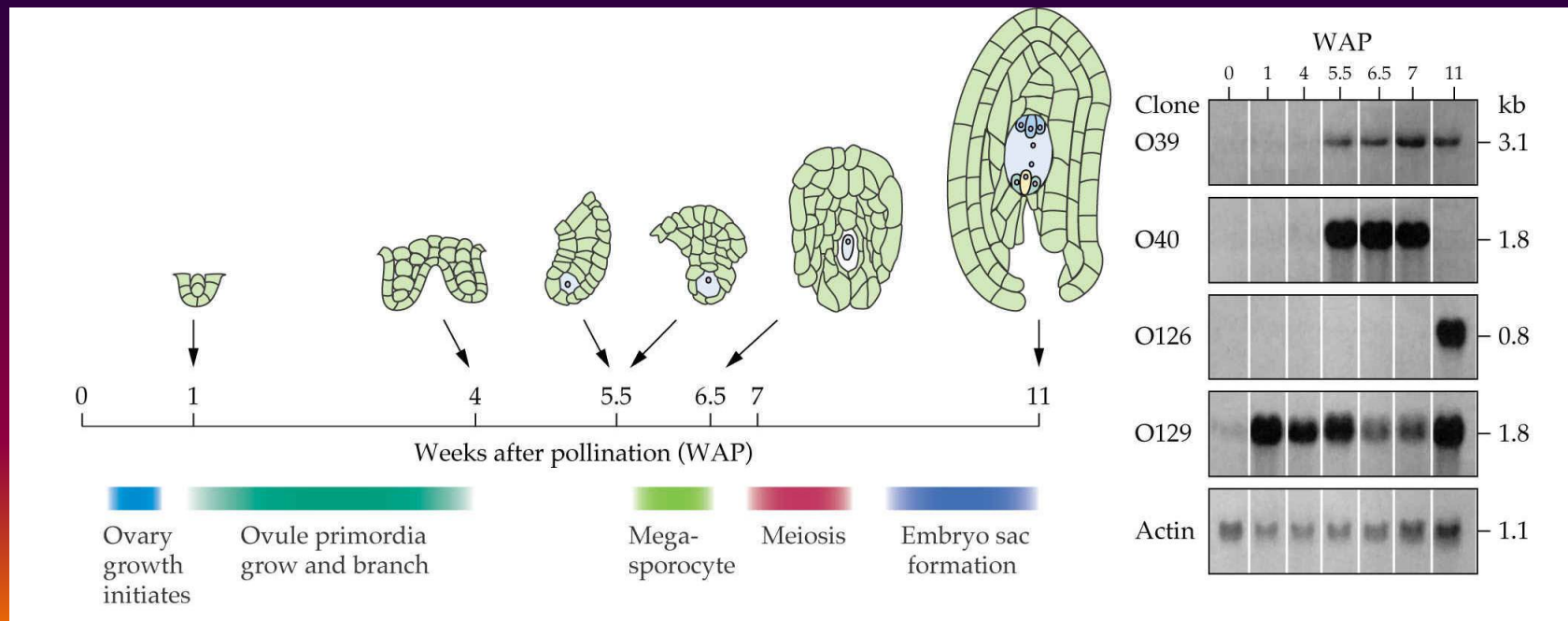
PN – 2 polární jádra
 SEN – jádro sek. endospermu



**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



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

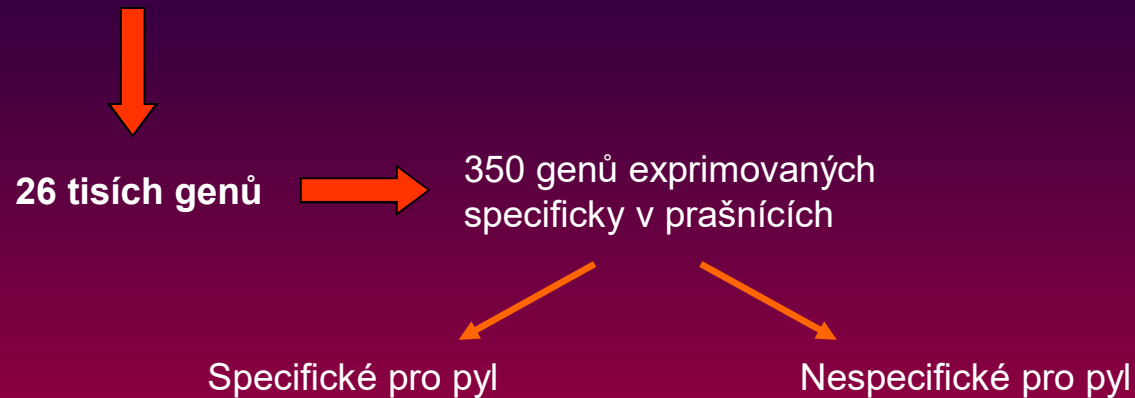
Sterilní mutanti s defektem ve vývoji vajíčka

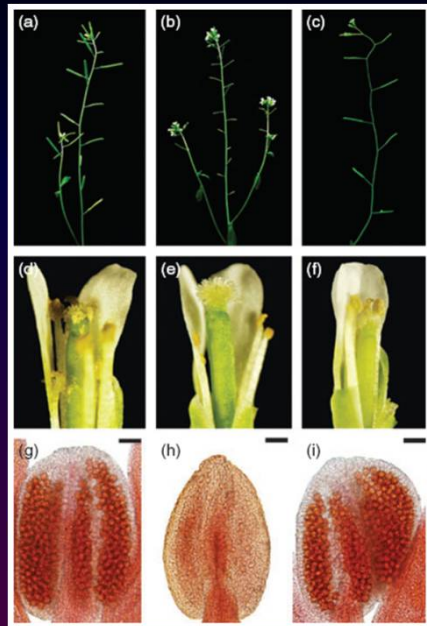
- defekt ve vývoji sporofytu
 - defekt ve vývoji megaspory
- } - ovlivněn vývoj vajíčka a ovlivněno oplodnění
- defekt ve vývoji embryonálního vaku a vajíčka – ovlivněno oplodnění

Mutace ve vývoji samčího gametofytu

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

Sekvenování *Arabidopsis* genomu (2000)





WT

*tdf1*Trangen *TDF1****TDF1*****(DEFECTIVE IN TAPETAL DEVELOPMENT AND FUNCTION 1)**

– transkripční faktor MYB; klíčový v regulaci vývoje tapeta

DYT1**(DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1)** – protein DYT1 se váže přímo na promotorovou oblast genu *TDF1*

- DYT1 je lokalizován v cytoplasmě i jádře
- C-terminální doména BIF je nezbytná pro dimerizaci, nukleární lokalizaci a schopnost aktivovat transkripci
- Prostorově časová subcelulární lokalizace DYT1 je důležitá pro samotnou funkci DYT1

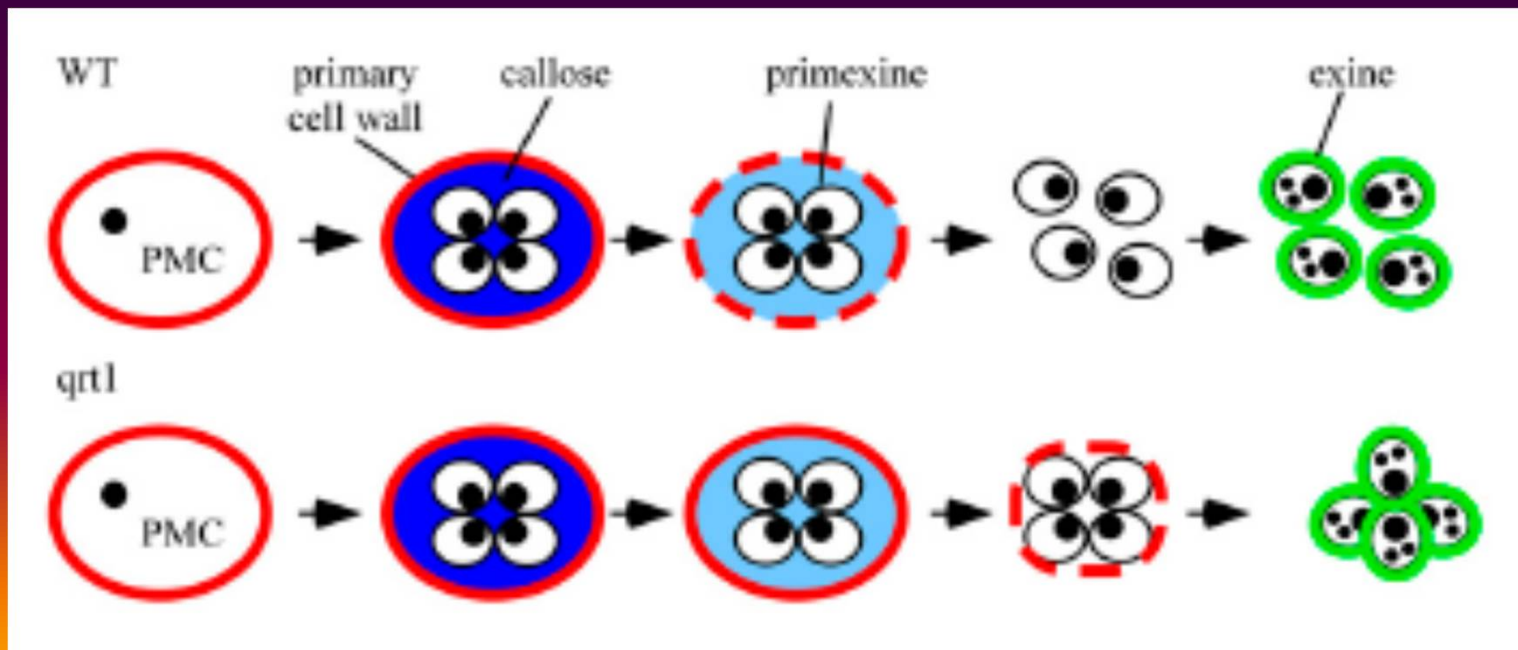
fkp1 – pylová zrna bez povrchové vrstvy

***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 prašниковých pletivech před koncem meiózy



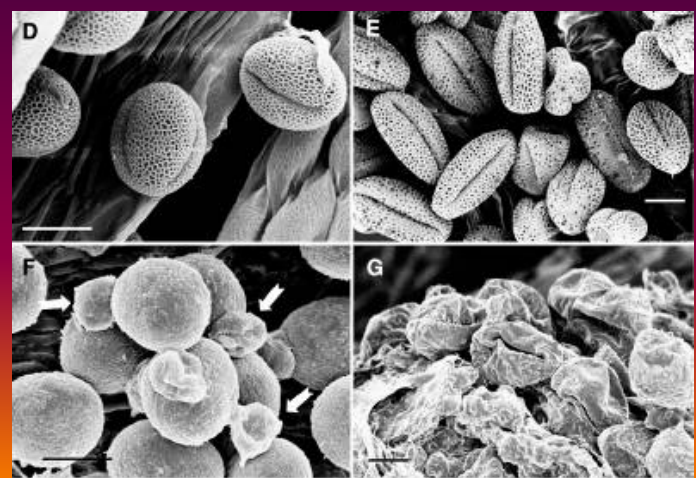
T-DNA mutant *cals5* – narušená fertilita, degenerované mikrospory

CALS5 kóduje kalóza-syntázu → syntéza kalózy → exina

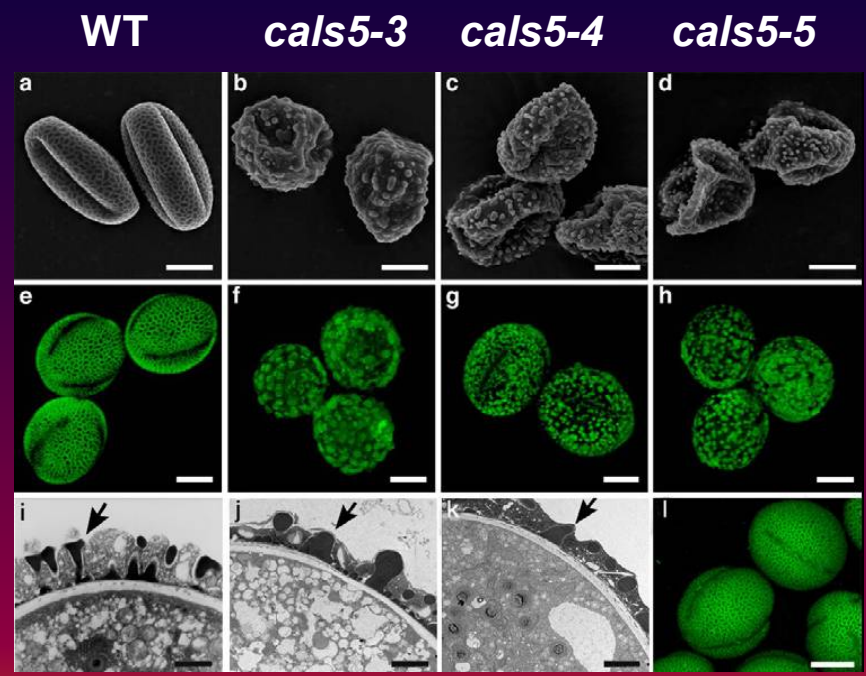
Knockout mutant *CYP703A2* (cytochrom P450)
CYP703A2 – katalyzuje hydroxylaci kys. laurové

Sporopolenin – bloky hydroxylované
kyseliny laurové

WT

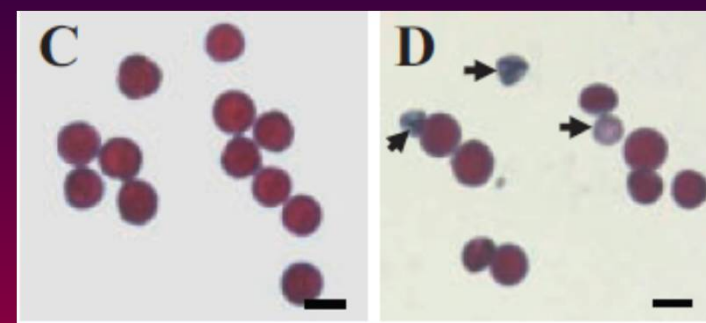
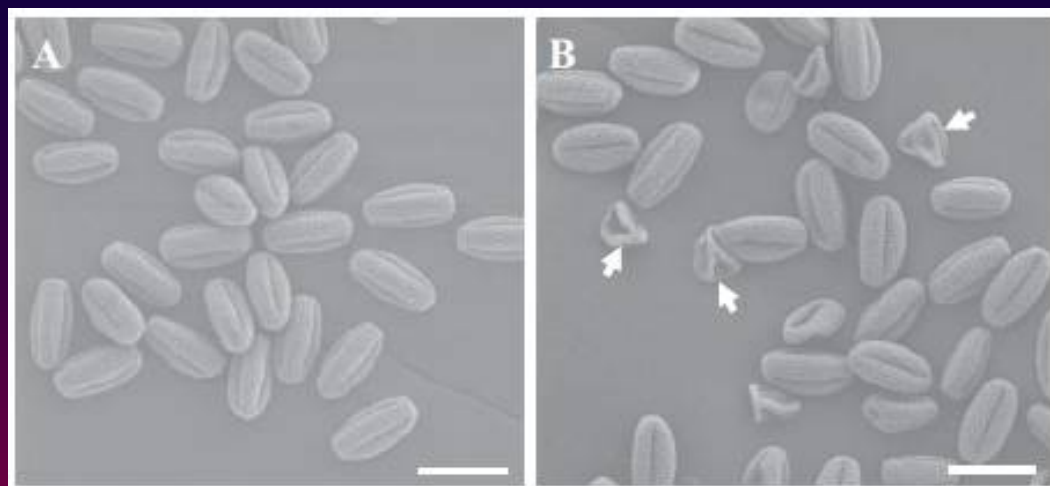


CYP703A2



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



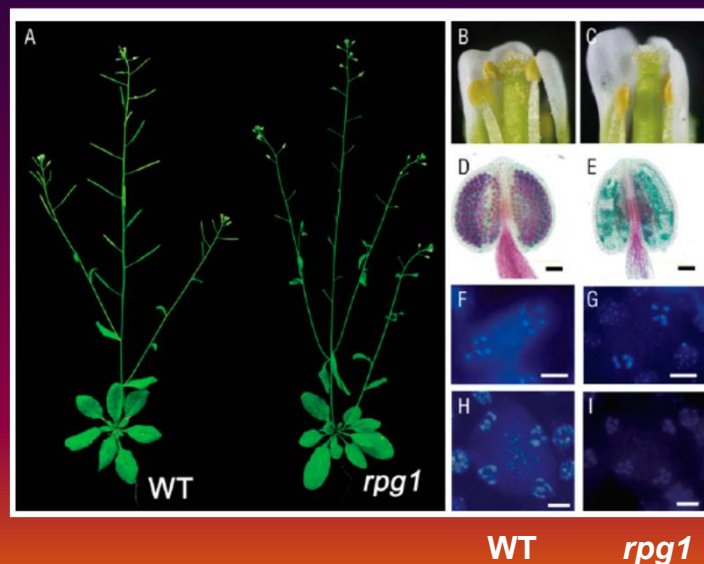
MS1 (MALE STERILITY1) – transkripční faktor regulující tvorbu exiny, pyl. cytosolu a tapeta

MS2 (MALE STERILE2) – kóduje reduktázu mastných kyselin nutnou pro tvorbu exiny

MGT4, MGT5, MGT9 (MAGNESIUM TRANSPORTER 4, 5, 9) – nezbytné pro vývoj pylu *Arabidopsis*; **mgt4-1** – nevyvinutá pylová zrna, rostliny sterilní

MGT4 – lokalizován v ER, exprimován v pylových zrnech ve dvoubuněčném stádiu až do zralého pylového zrna

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

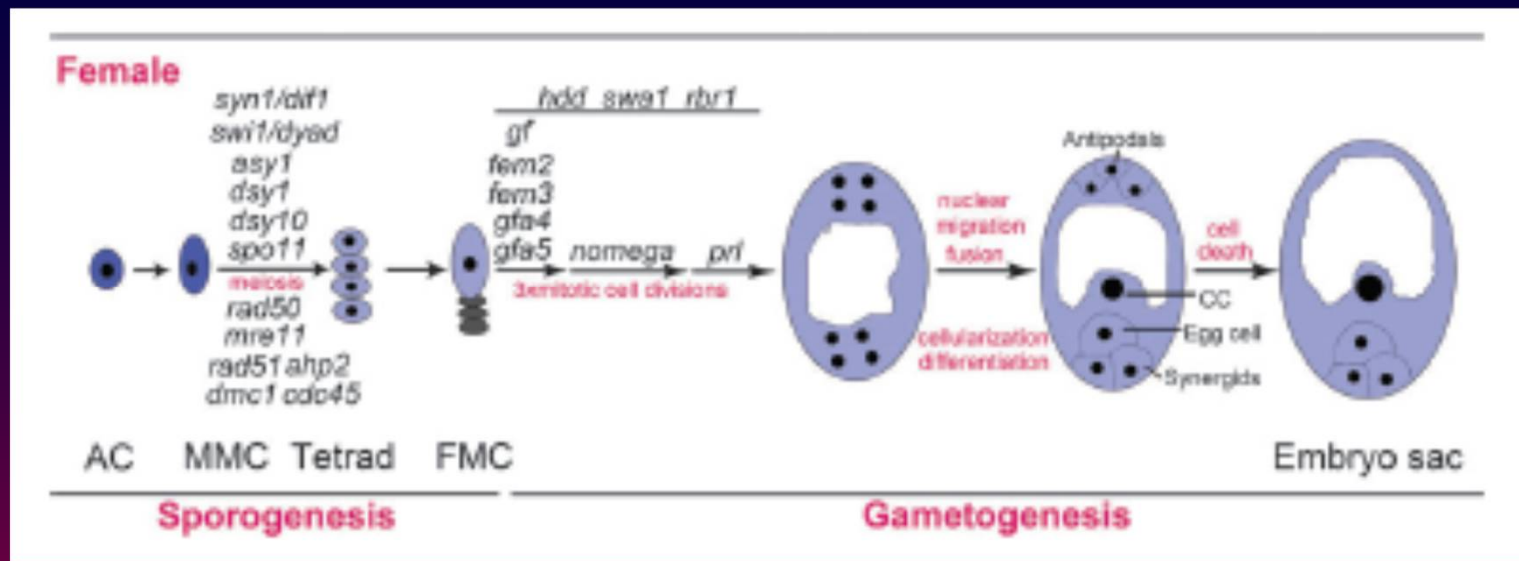


Guan Z-F et al. (2008) *Plant Physiol* 147: 852 - 863

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

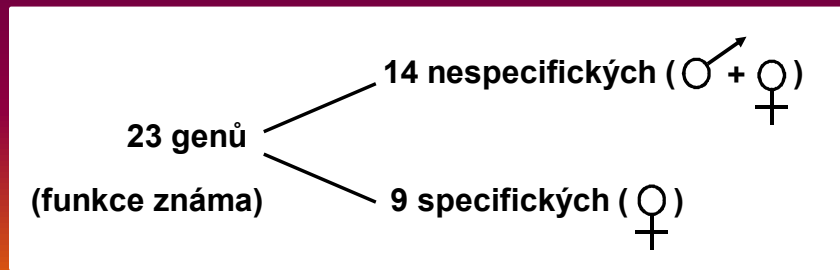


Update 2020

Zhao H et al. (2020) Plant Physiology 182: 2006-2024

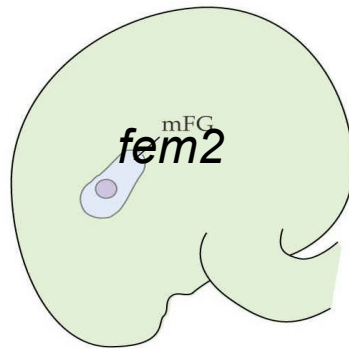
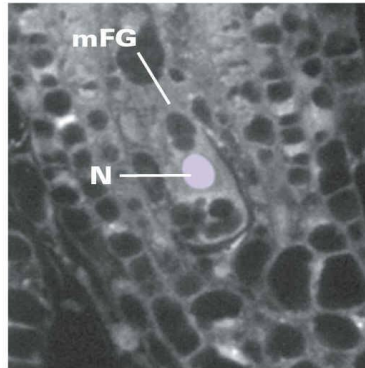
Transkriptomová analýza ve 3 stádiích vývoje vajíčka rýže (AC, MMC a FMC): 5,274 genů

AC a MMC: 958 genů

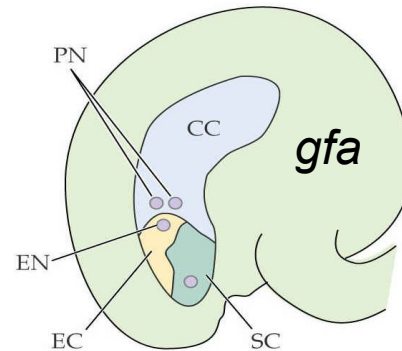
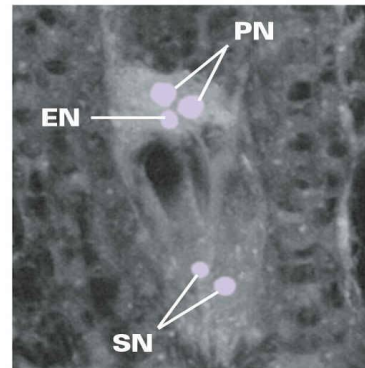


Specifické geny

fem2: Never progresses beyond megasporogenesis



gfa2: Polar nuclei fail to fuse



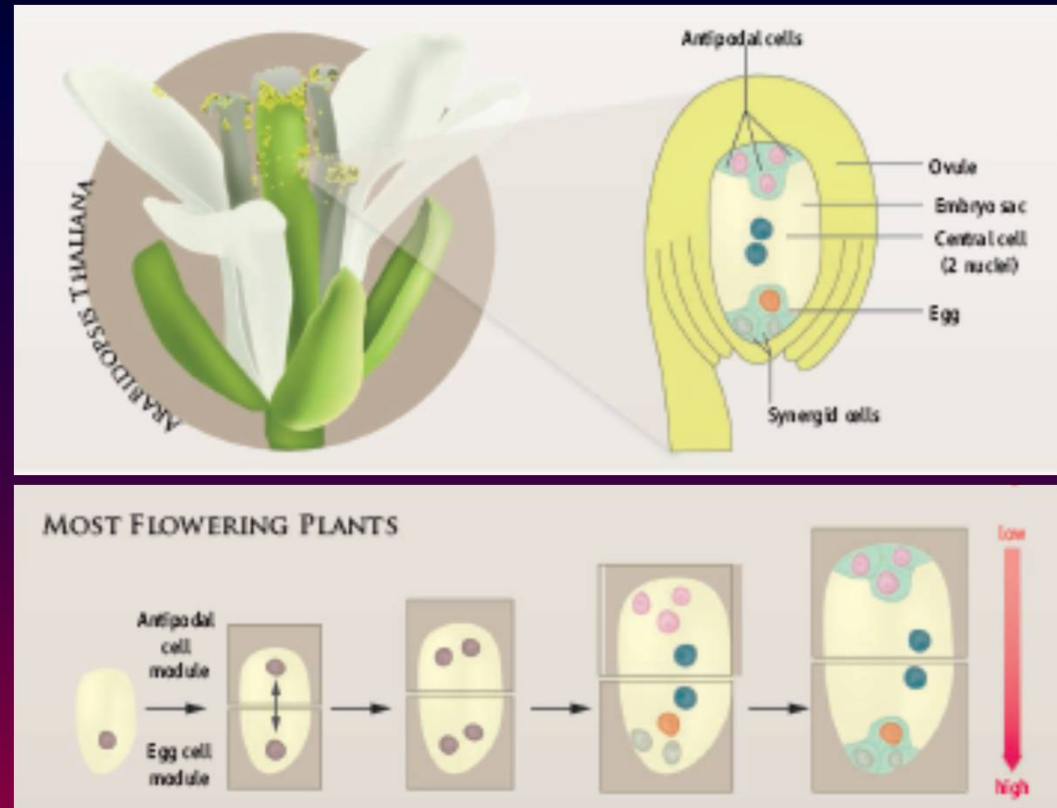
Arabidopsis mutant **fem2** – zastaven vývoj vajíčka před megagametogenezí

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

Arabidopsis mutant **gcd1** – narušené zrání vaječné buňky

Mitochondriální protein GCD1 je nezbytný pro konečné zrání samičích gamet.

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

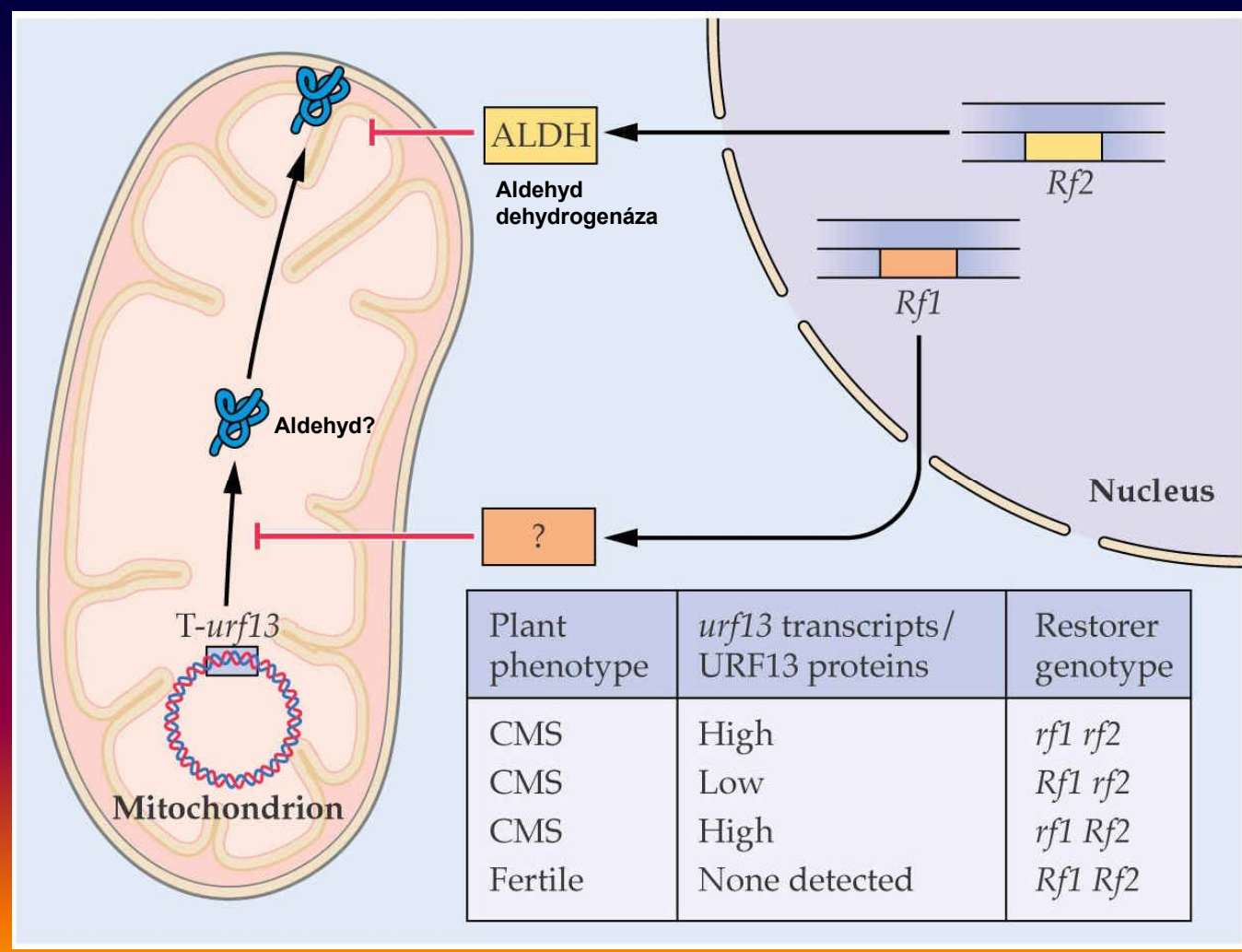
Nízká koncentrace auxinu → Antipodální buňky

Cytoplazmatická 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.

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

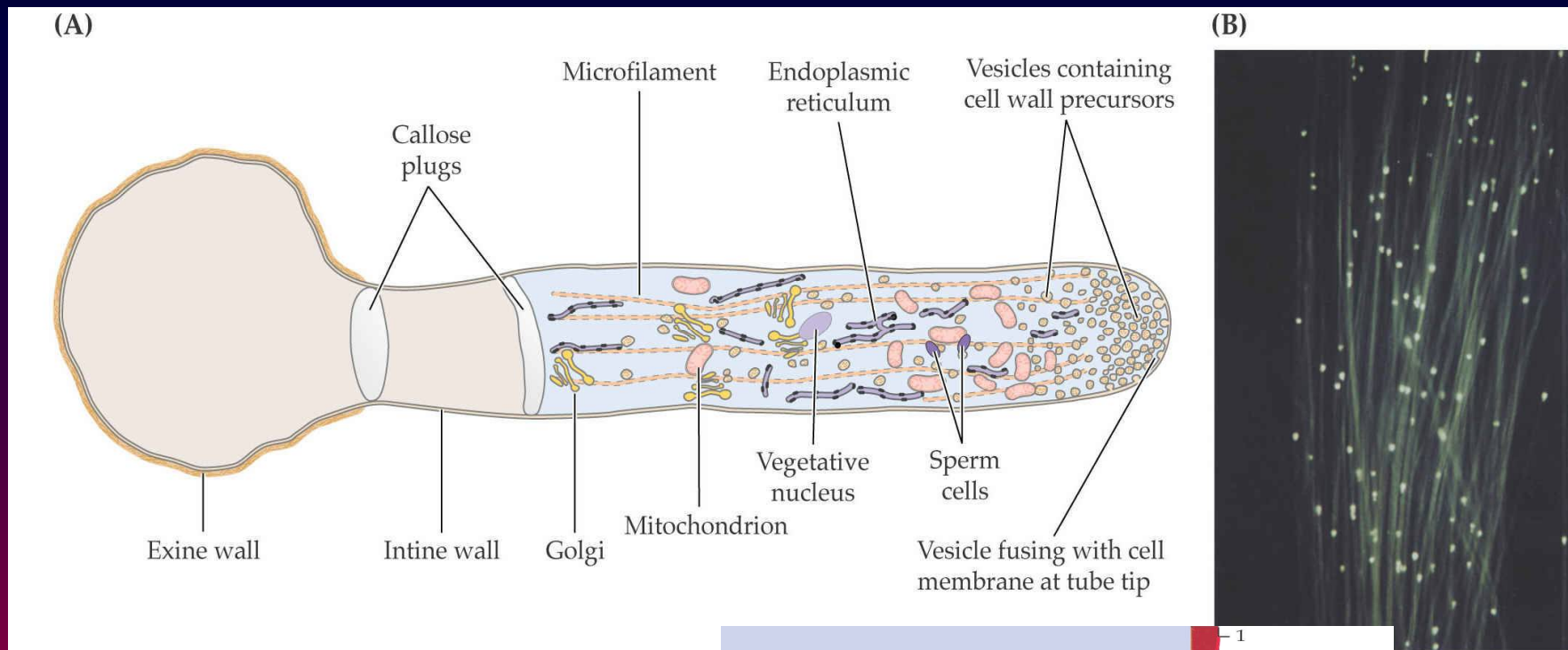
2) Rostliny se **suchou bliznou** – vlhkost je zajištěna **lipidy** na povrchu pylového zrna. Lipidy hrají významnou roli v klíčení pylu.

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

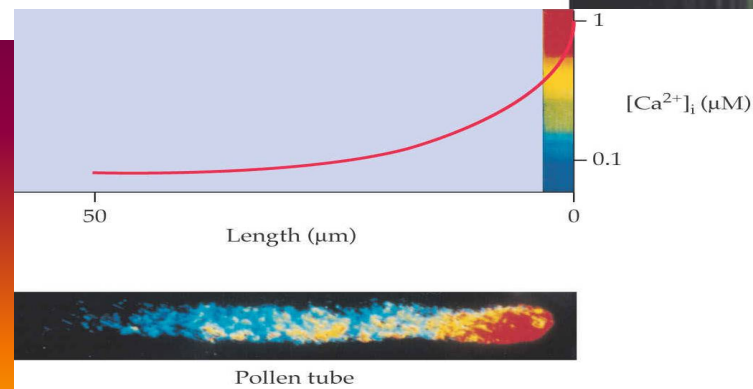
Arabidopsis mutant **fiddlehead** – má odlišné lipidy (vysokomolekulární) v epidermálních buňkách listů. Pylová zrna WT na těchto listech klíčí !!!

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 – pozorován při růstu pylové láčky



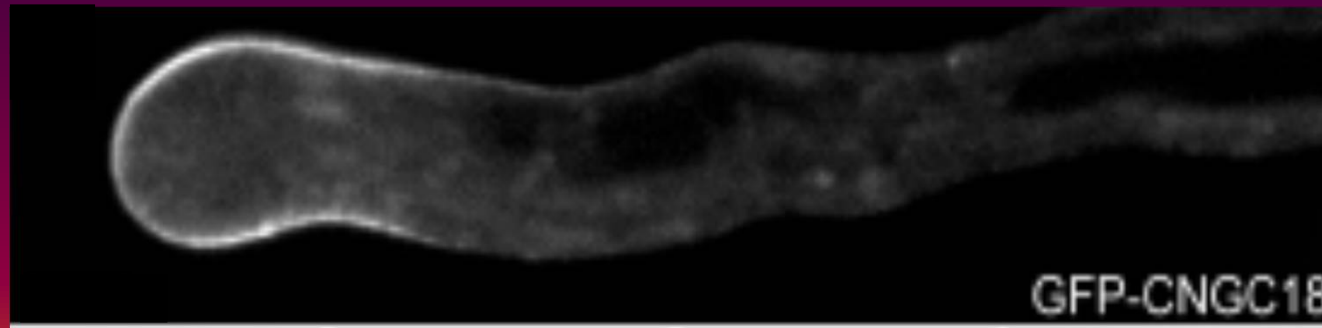
Není známo, jak je Ca^{2+} signál přeložen do finální reakce prodlužování pylové láčky.

cngc18 – nulový mutant s pylovou sterilitou

CNGC18 – kóduje kationtový kanál regulovaný cyklickými nukleotidy

GFP:CNGC18 analýza

cngc18: komplementovaný GFP:CNGC18

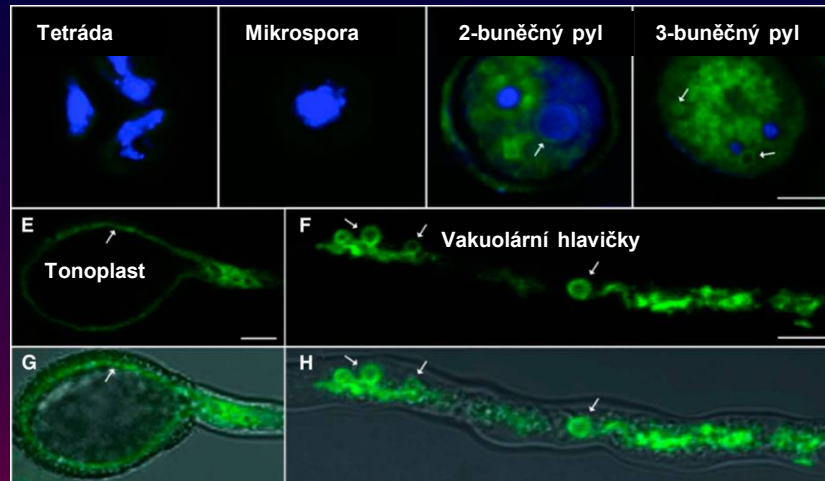


Frietsch S et al. (2007) PNAS 104: 14531 - 14536

TIP1;3, TIP5;1 – jsou nejrozšířenější vysoce exprimované proteiny ve zralých pylových zrnech

TIP1;3 – exprimován ve vezikulech a vakuolách vegetativní buňky

TIP5;1 – exprimován ve vakuolách spermatických buněk



Expresse **TIP1;3-GFP** ve zrajícím pylovém zrně (jádra obarvena modře)

Expresse **TIP1;3-GFP** v klíčícím pylovém zrně; exprese v tonoplastu vegetativní buňky a vakuolárních hlavičkách pylové láčky

Mutanti *tip1;3* a *tip5;1* ukazují krátké pylové láčky pouze v podmínkách při nedostatku dusíku



TIP1;3 a TIP5;1 jsou zapojeny v metabolické dráze N během klíčení pylu

Update 2016

Di Giorgio JAP et al. (2016) Plant Cell 28: 1063 – 1077

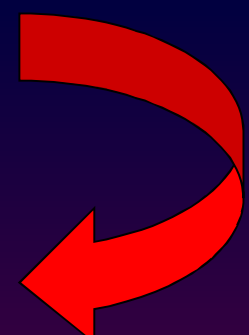
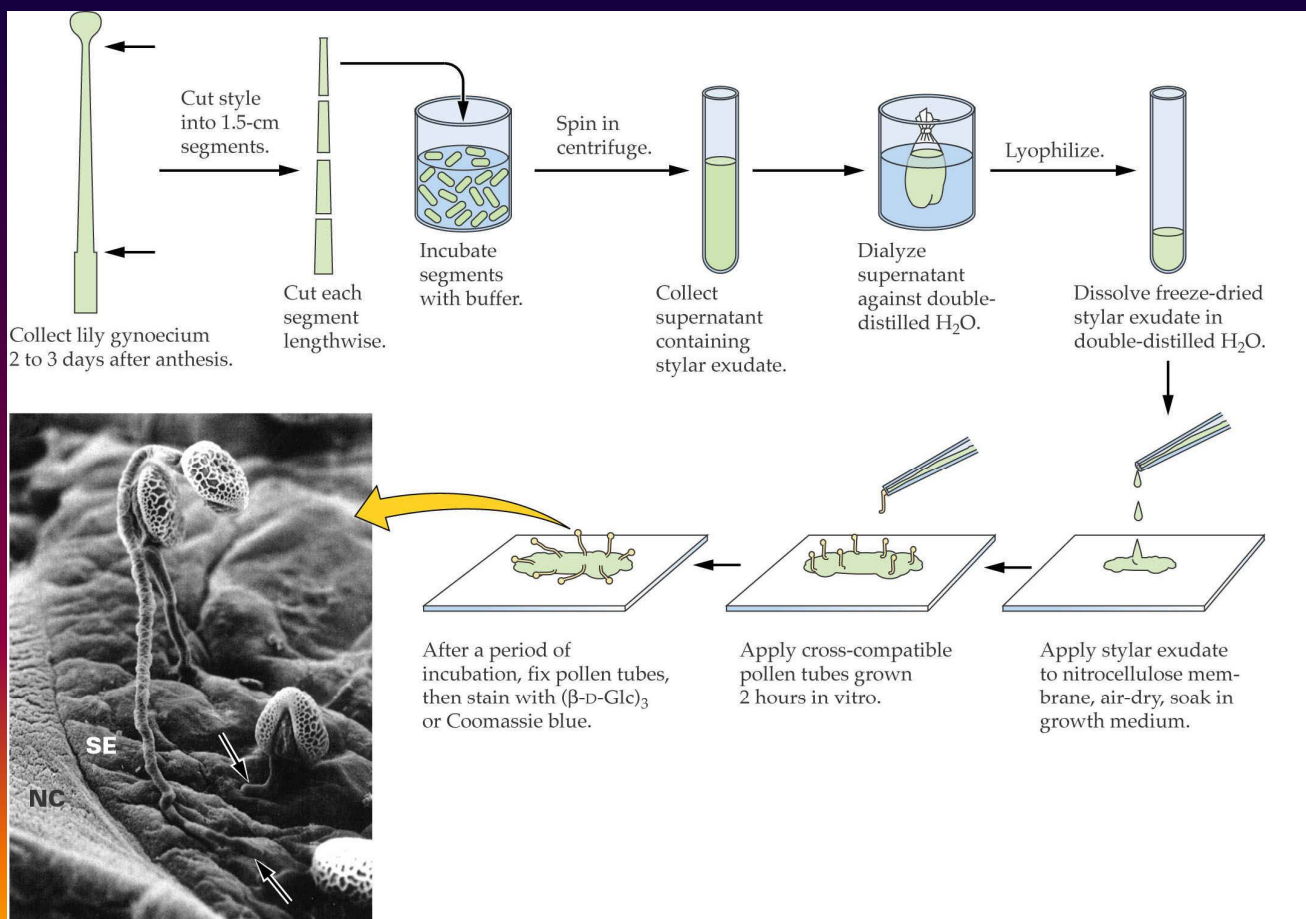
NIP4;1, NIP4;2 – nezbytné pro vývoj pylu a opylení; mutanti - nízký počet semen, redukované klíčení pylu, redukovaný růst pylové láčky; **NIP4;1** – velice nízká exprese ve zralém pylu, **NIP4;2** – nejvyšší exprese během růstu pylové láčky

C-terminální domény **NIP4;1, NIP4;2** – fosforylovány pylově specifickými CPK (Ca²⁺- dependentní protein kinázy) => modifikace permeability pro H₂O

NIP4;1 – transportuje rovněž amoniak, močovinu, H₃BO₃, H₂O₂

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

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



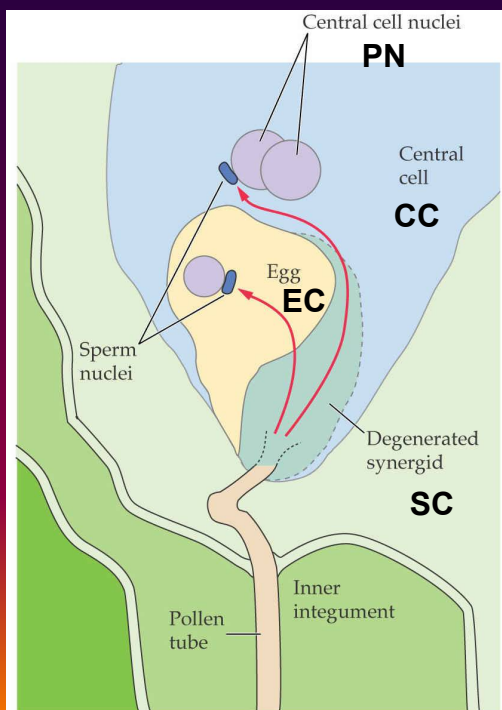
Clouse et al. (1996)
Plant Physiol 111: 671-678

f) Opylení, oplodnění

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

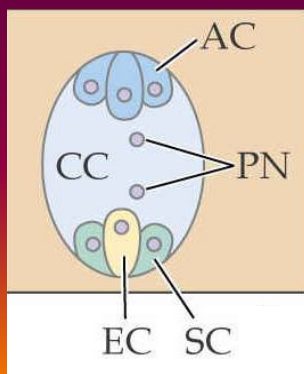
1. Oplodnění:

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**

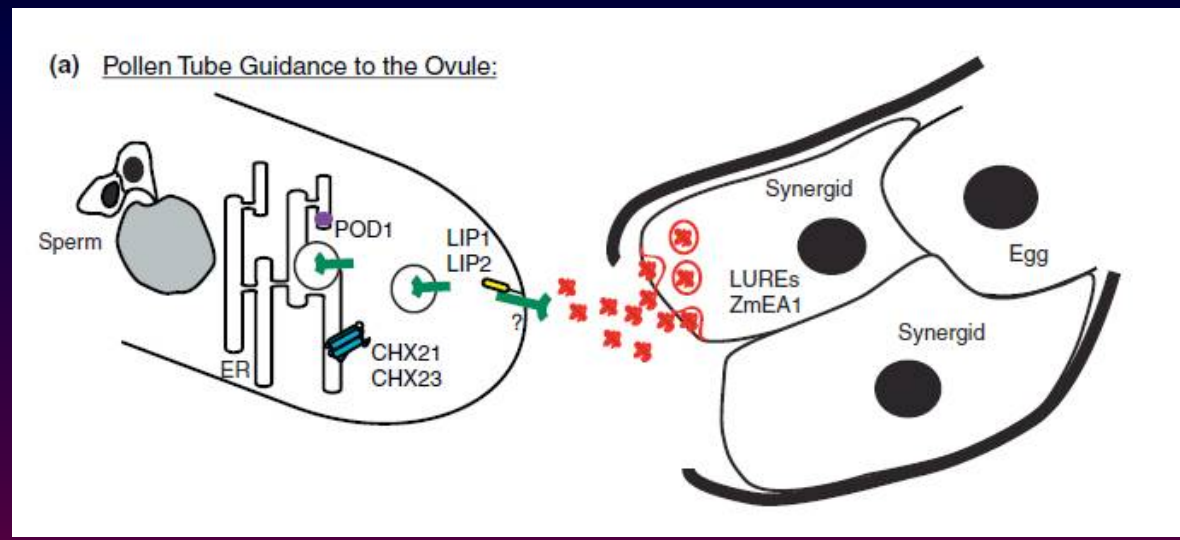
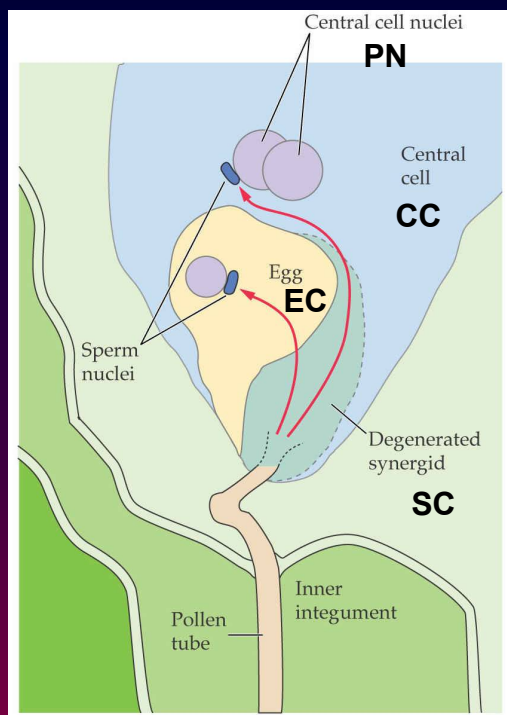


Update 2024

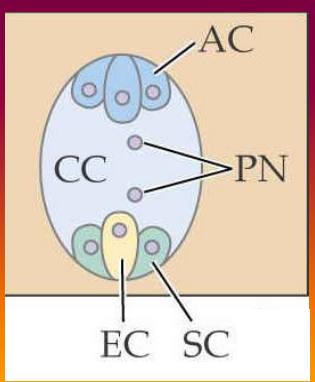
Baillie AL et al. (2024) TIPS 29: 343-354

Review o současných znalostech oplodnění u rostlin

1) Co nutí a směřuje pylovou láčku k embryonálnímu vaku?

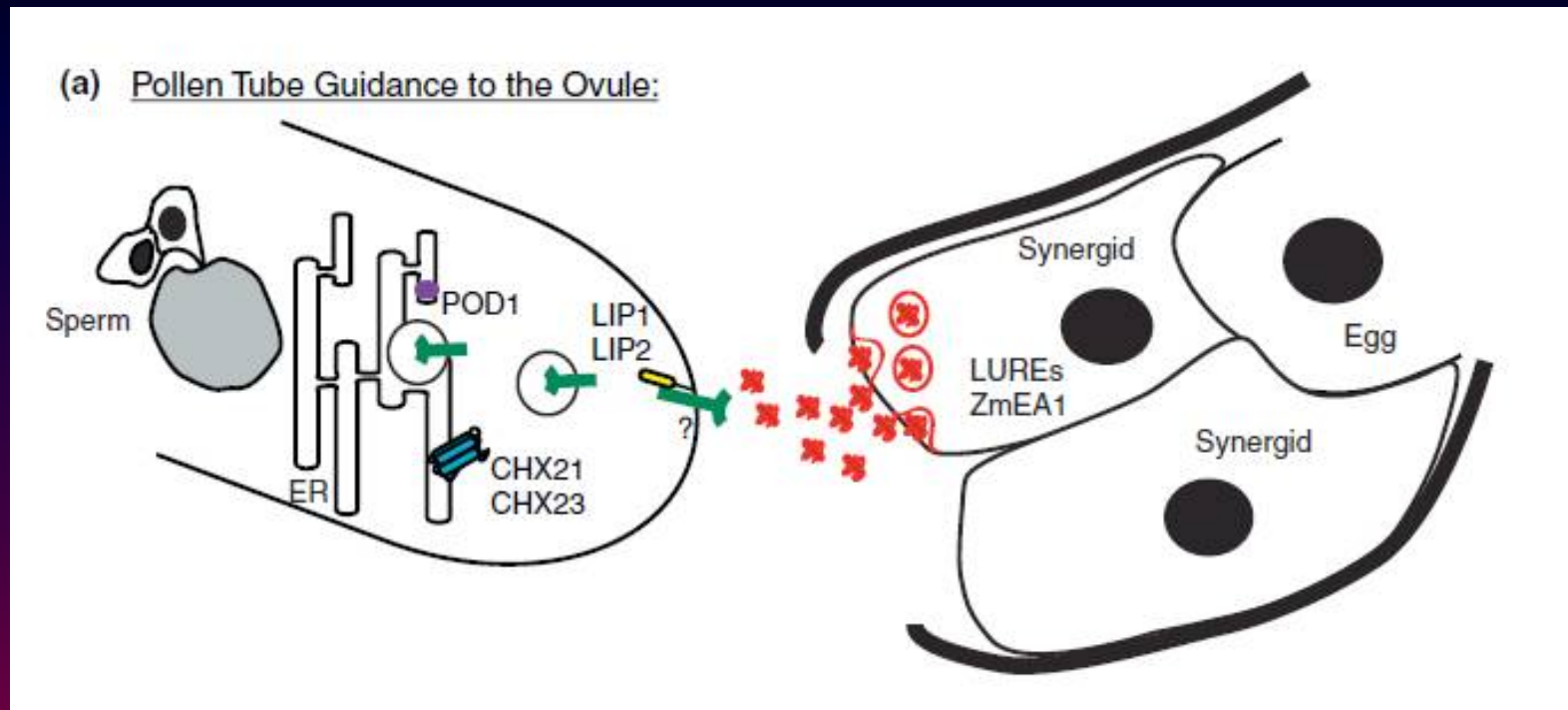


Beale KM, Johnson MA (2013) Current Opinion in Plant Biology 16: 1-8



Peptidy sekretované synergickou buňkou:

- Kukuřice: EGG APPARATUS1 (ZmEA1)**
- Torénie: LURE1/LURE2**
- Arabidopsis: AtLURE1**



Liu J et al. (2013) *Current Biology* 23: 1-6

***LIP1* a *LIP2* (*Lost In Pollen tube guidance 1* a *2*) – cytoplazmatická receptor-like kináza; k ní je ukotvený neznámý transmembránový protein – receptor (zelený). Neznámý receptor přijímá peptidy LURE a EA1.**

Vypnutí *LIP1* a *LIP2* vede ke ztrátě orientace růstu pylové láčky.

Identifikován receptor atraktantů LURE1 a 2

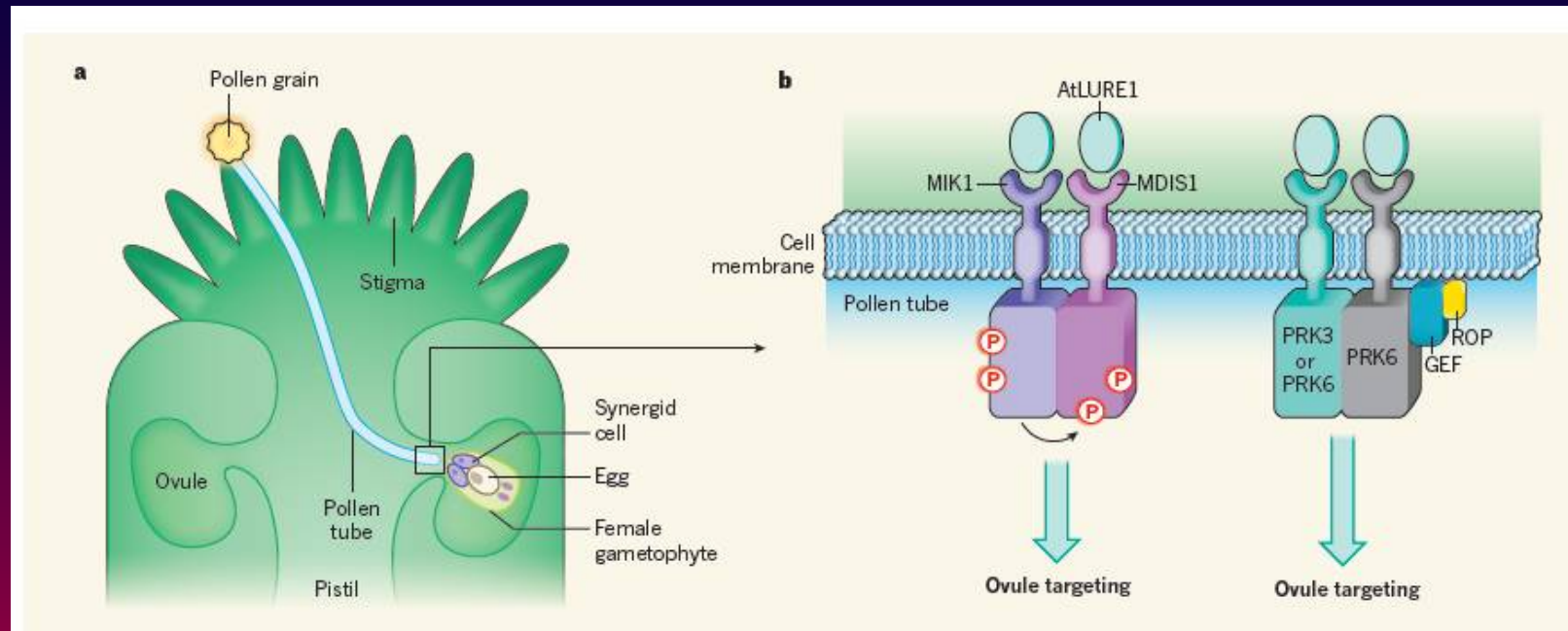
Update 2016

Takeuchi M, Higashiayma T (2016) Nature 531: 245 – 248

Wang T et al. (2016) Nature 531: 241 – 244

Wang T et al.

Takeuchi M, Higashiayma T



1) Dimer proteinů RLK MIK1 a MDIS1; vazba LURE1 vede ke vzniku dimeru a k autofosforylaci MIK1 a přenosu P z MIK1 na MDIS1

2) RLK PRK6 interaguje s druhým PRK6 nebo s PRK3, s guanin-exchange faktorem (GEFs), který aktivuje RhoGTPase protein from plants (ROPs).

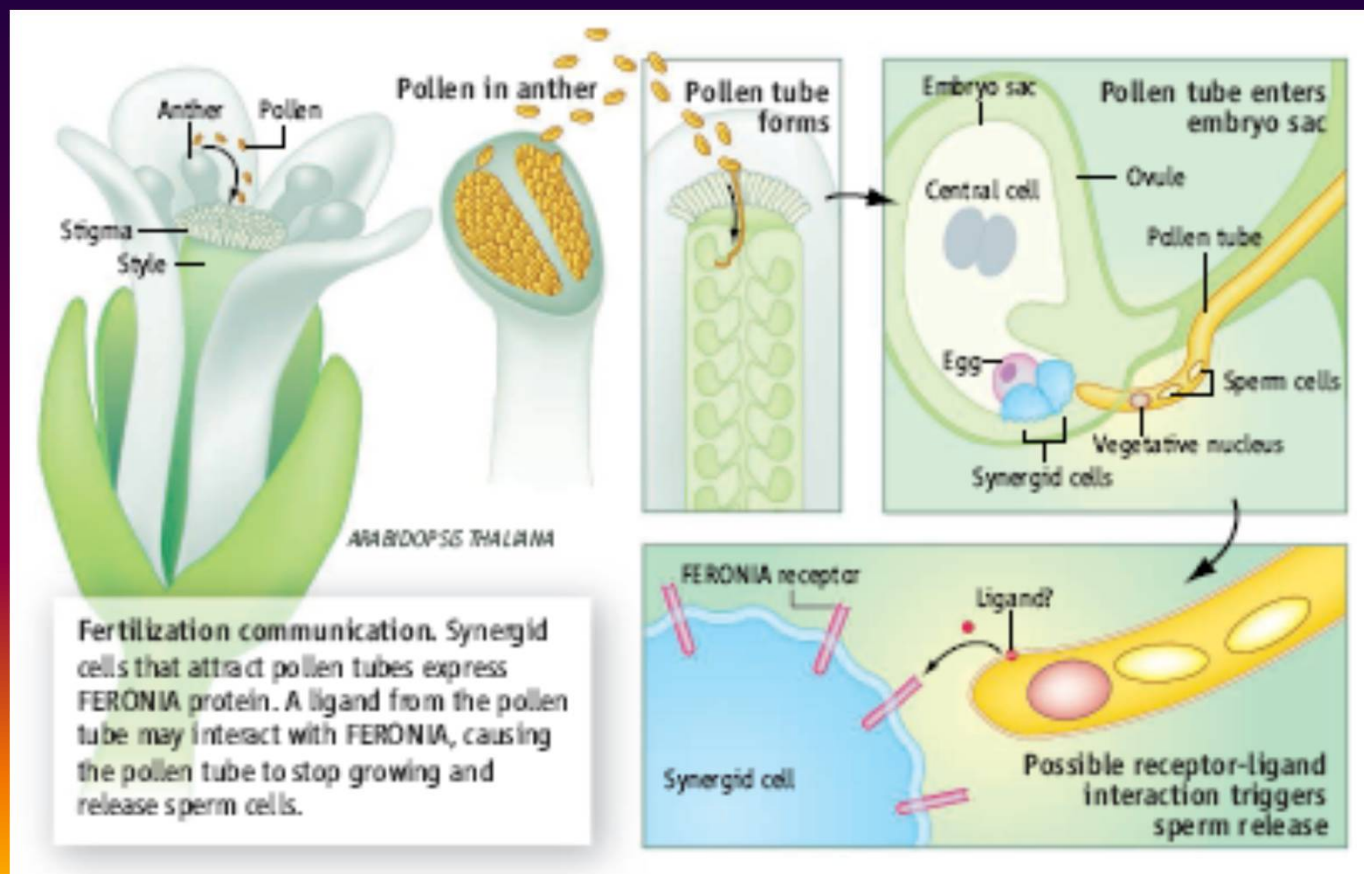
Vazba LURE na tyto transmembránové receptory => nasměrování růstu a vniknutí pylové láčky do synergidy

2) Co způsobuje přijetí pylové láčky, její prasknutí a uvolnění spermatických buněk?

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

Synergické buňky exprimují protein **FERONIA** (FER, receptor-like kináza)

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

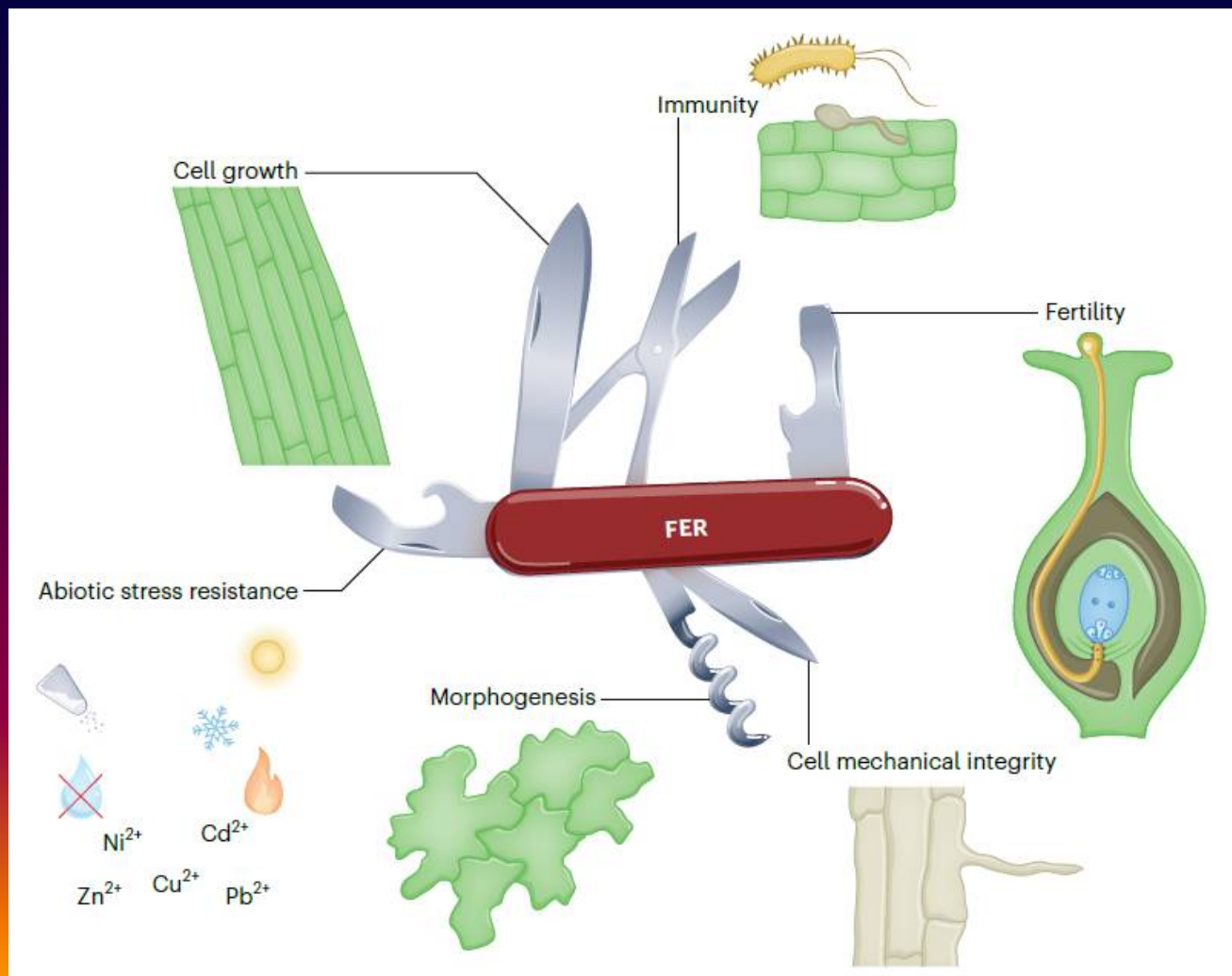


Update 2023

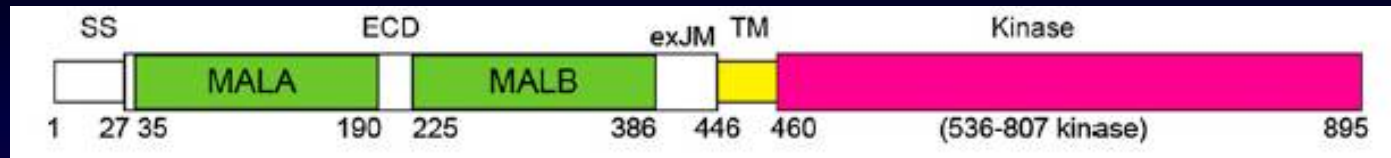
Malivert A, Hamant O (2023) Nature Plants 9: 1018 – 1025

Review o úloze proteinu FERONIA v rostlinách

Protein FERONIA hraje důležitou úlohu v mnoha vývojových procesech rostlin – je pleiotropní

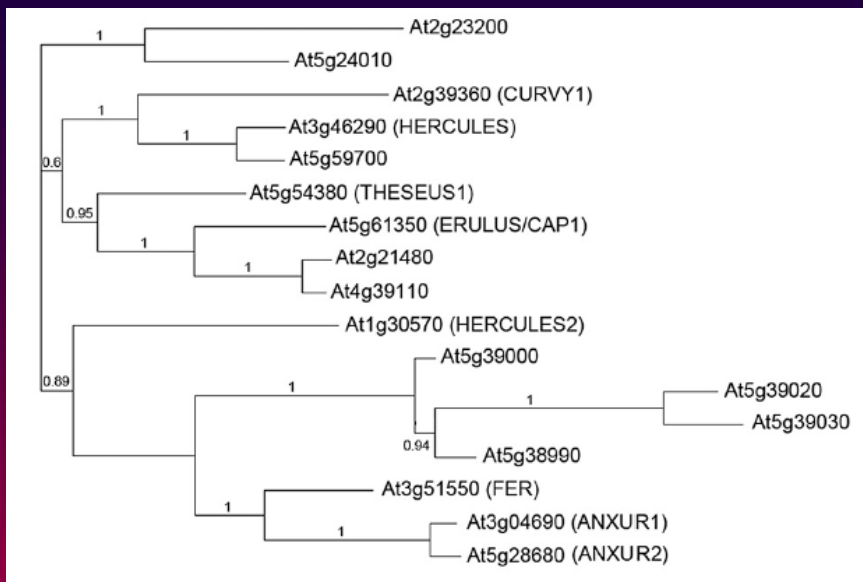


Struktura a funkce FERONIA



SS – signální peptid; **ECD** – extracelulární doména; **TM** – transmembranová doména

MALA, MALB – tandemové malectin-like domény; **exJM** – extracelulární juxtamembranová oblast



FERONIA – kontroluje růst a samičí fertilitu, zprostředkuje patogenem indukované reakce, nutný pro normální vývoj buněčné stěny.

RALF = Rapid ALkalinization Factor = malý peptidový růstový regulátor, inhibuje růst hypokotylu a kořene; **první známý ligand receptoru FERONIA**

THESEUS1 – příbuzný k FERONIA – funguje jako odhadce stavu buněčné stěny

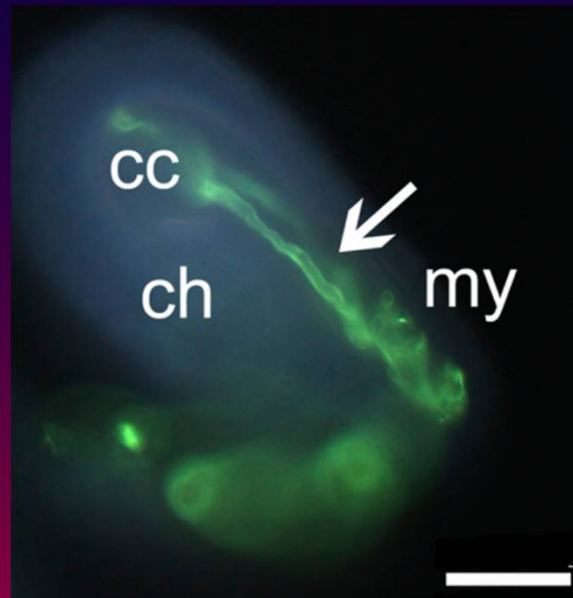
ANXUR1 a 2 – homology FERONIA – zajišťují integritu pylové láčky a samčí sterilitu

Interakce pylové láčky a synergických buněk vede k programové smrti (PCD) pylové láčky a jedné ze synergid. Synergidy kontrolují tento proces - koordinují hladiny Ca^{2+} synergid v reakci na dynamiku Ca^{2+} v pylové láčce a růstové chování láčky.

FERONIA je vyžadován k iniciaci a modulaci reakcí k Ca^{2+} a jejich spojení s PCD.

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

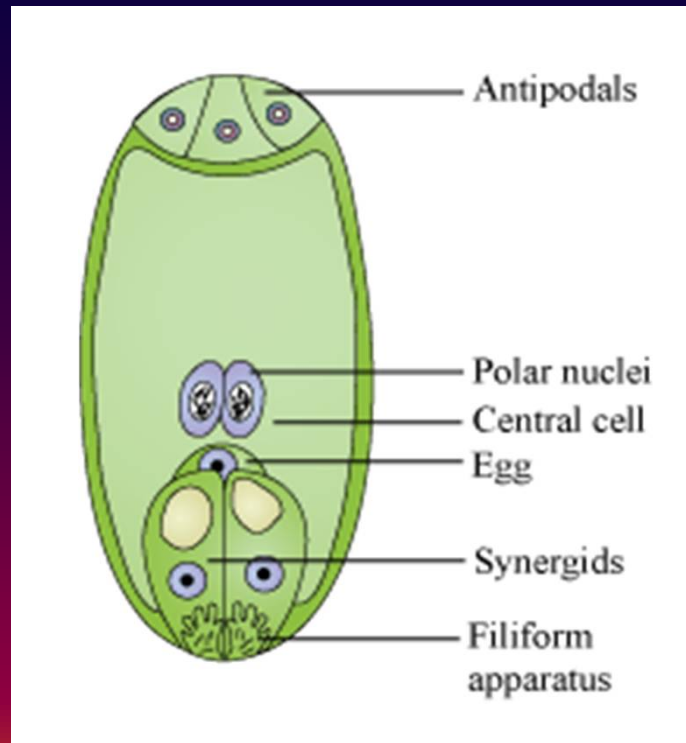
LORELEI (LRE) - exprimován v synergických buňkách

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

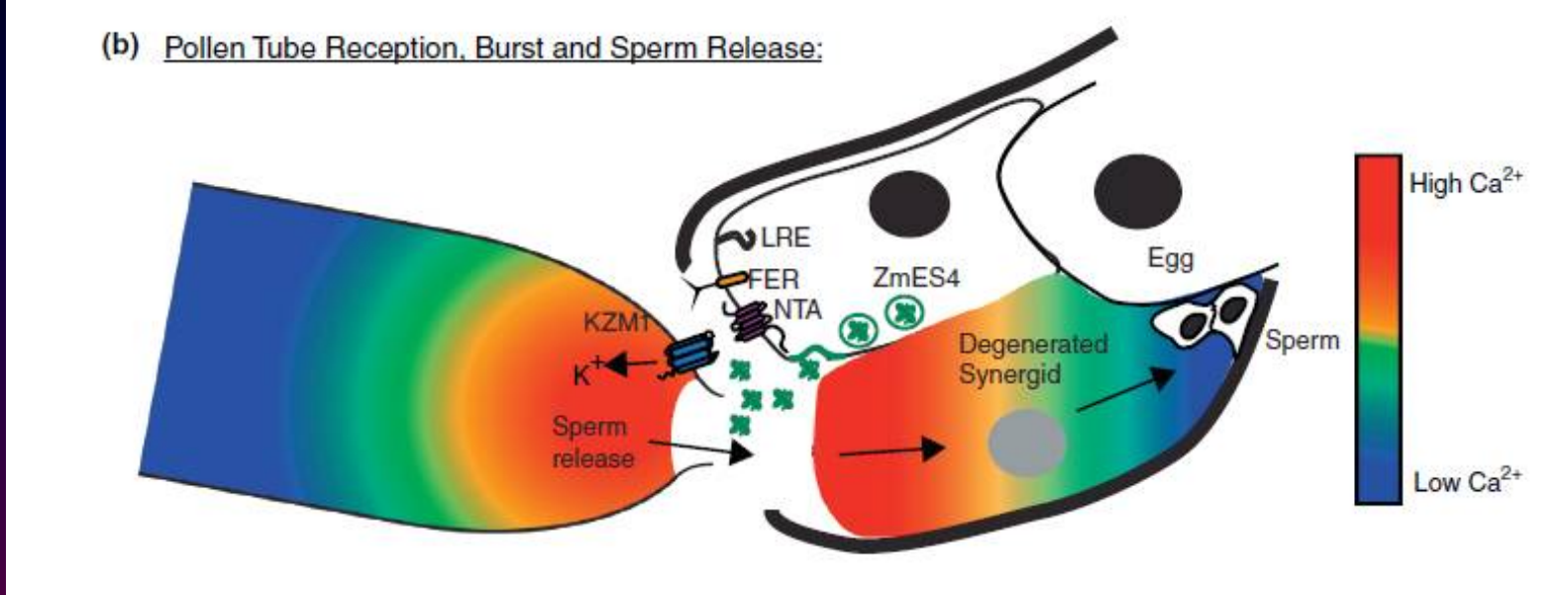
Update 2016

Liu X et al. (2016) Plant Cell 28: 135 – 1052

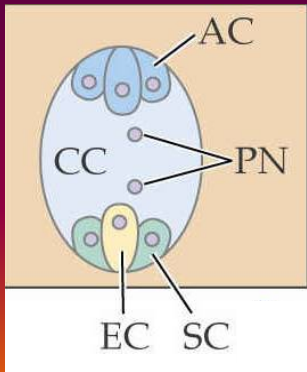
Protein LORELEI (LRE) je exprimován v tzv. filiform aparátu – membránová struktura, která je prvním místem styku pylové láčky se samičím gametofytem.



Ve filiform aparátu je rovněž exprimován receptor FERONIA; proteiny LORELEI a FERONIA spolupracují; LORELEI indukuje expresi FERONIA.



Beale KM, Johnson MA (2013) Current Opinion in Plant Biology 16: 1-8



Přiblížení pylové láčky k vaječné buňce

Ca²⁺ ↑, exprese proteinů FER, LRE a NTA

Prasknutí pylové láčky, uvolnění spermatických buněk

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



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

Funkce *ANX1* a *ANX2* : konstitutivní inhibice prasknutí pylové láčky; specificky exprimované v pylové láčce

Pylová láčka dosahuje samičího gametofytu



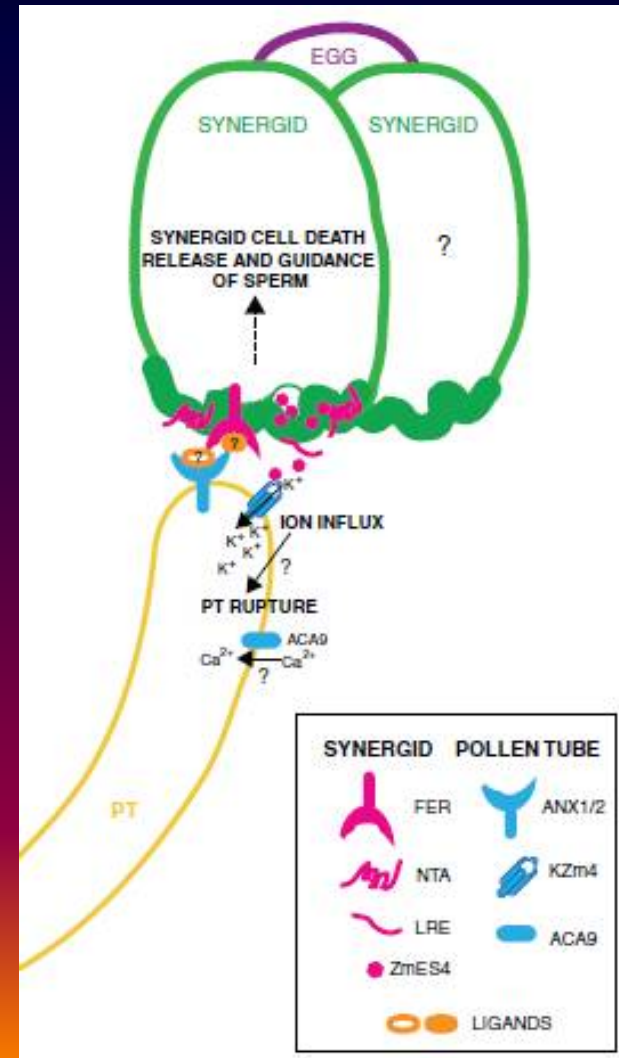
Aktivace dráhy *FERONIA*



Deaktivace *ANX1/ANX2*



Prasknutí pylové láčky, uvolnění spermatických buněk.

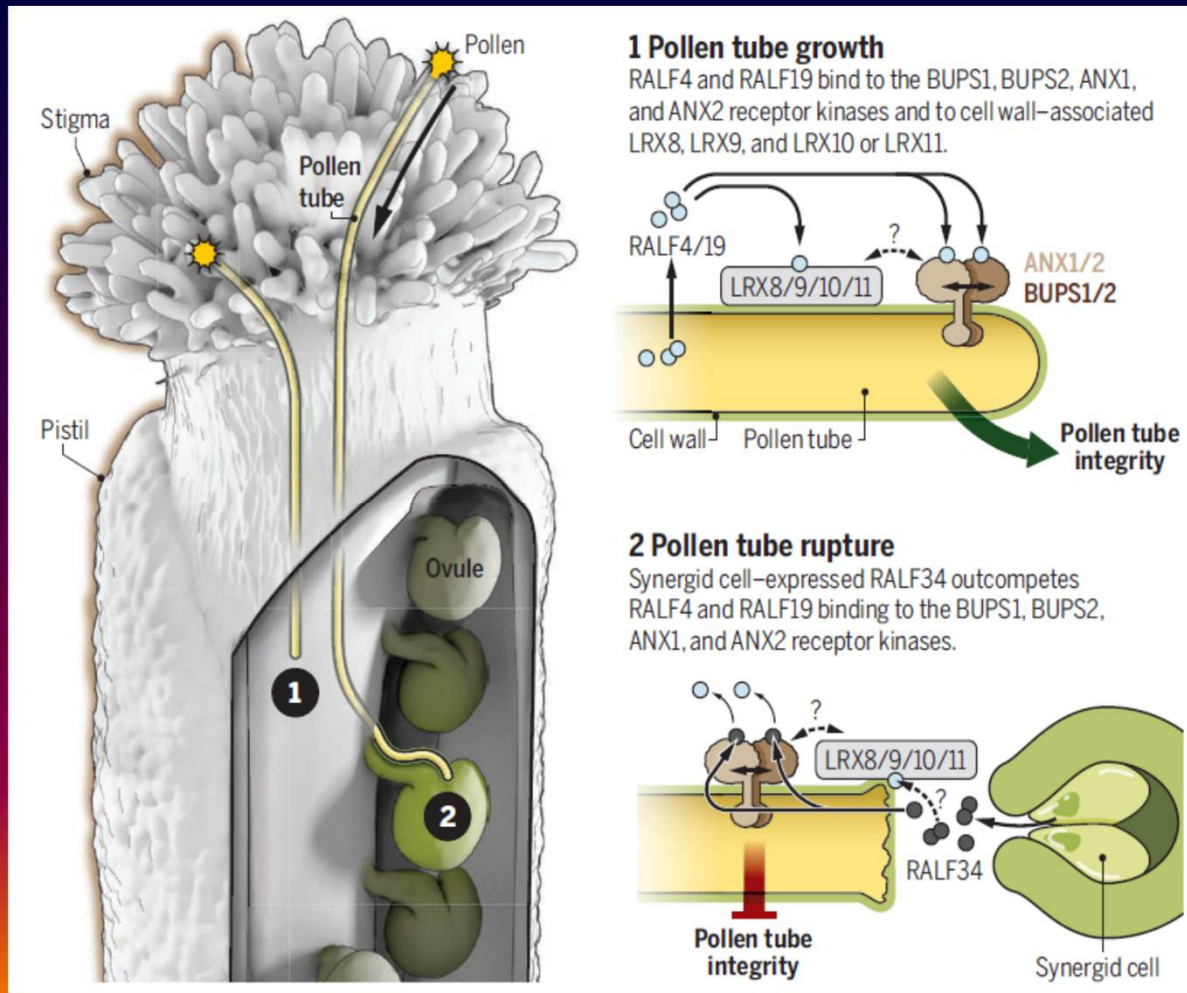


Kessler SA, Grossniklaus (2011)
Current Opinion in Plant Biology 14: 622-627

Update 2017

Ge Z et al. (2017) Science 358, 1596–1600

Mecchia MA et al. (2017) Science 358, 1600-1603



BUPS1/2 – receptory na pylové láčce
ANX1/2 – receptory na pylové láčce

BUPS, ANX = receptor-like kinázy

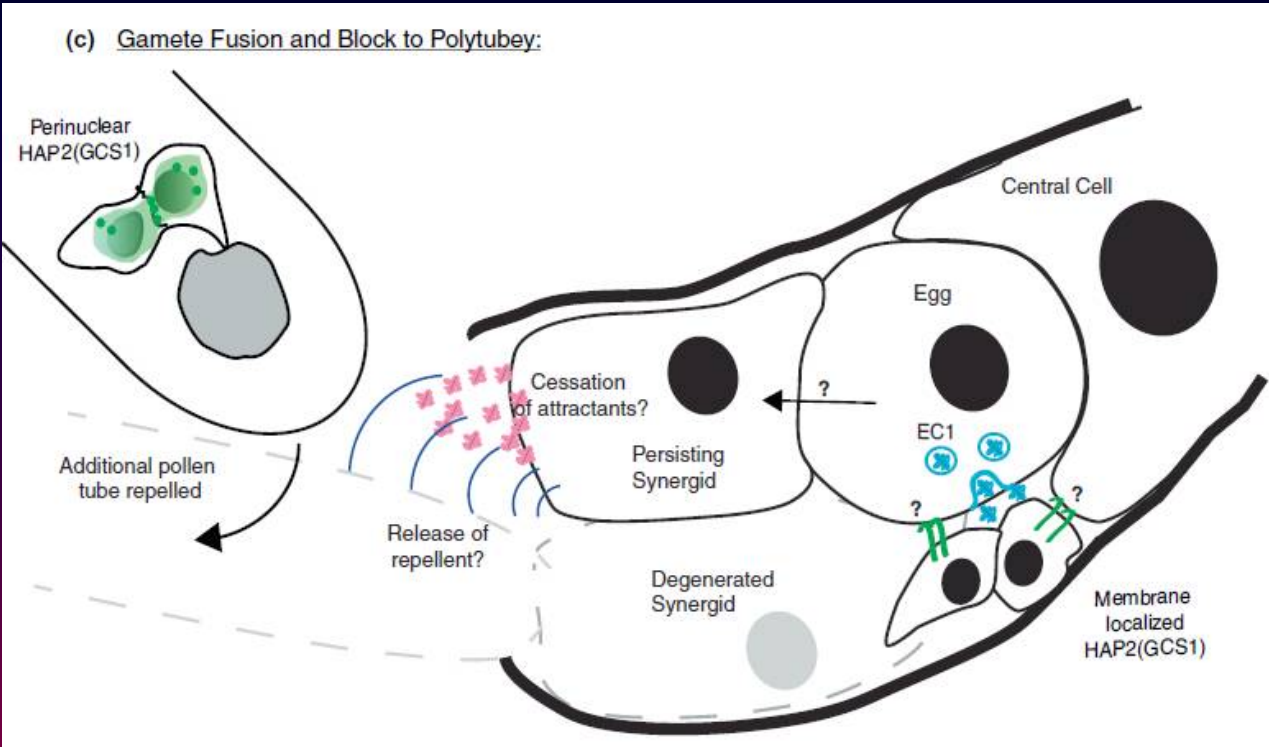
LRX8/9/10/11 – proteiny pylové láčky, funkce není známa, hrají roli ve vývoji buněčné stěny

RALF4, RALF19 – peptidové ligandy pylu; interagují s LRX => monitorují změny buněčné stěny – přenáší signál dovnitř pylové láčky = udržování integrity pylové láčky

Receptor-ligandové interakce ANX/BUPS s RALF4/19 soutěží se samičím ligandem RALF34 => deregulace signalizace ANX/BUPS => prasknutí pylové láčky.

Fig. z Stegmann M and Zipfel C (2017) Science 358, 1544–1645 – shrnuje závěry obou skupin

3) Co způsobuje fúzi gamet a zablokování pronikání další pylové láčky?



Beale KM, Johnson MA (2013) Current Opinion in Plant Biology 16: 1-8

Mechanismus fúze gamet není znám.

Signál z vaječné buňky (EC1) vede k relokizaci proteinů HAP2 ve spermatické buňce – reorientace proteinu směrem k membráně. Ve fúzi gamet jsou zapojeny neznámé proteiny.

- Dva navržené mechanismy zablokování dalšího oplodnění:
- 1) Přerušení tvorby atraktantů sekretovaných synergickou buňkou (růžová)
 - 2) Uvolnění odpuzovačů sekretovaných vaječnou buňkou (modrá)

Zapojení pektinů a NO v interakci mezi pylovou láčkou a embryonálním vagem

Pylová láčka dosahuje samičího gametofytu.

↓
Vlivem **FERONIA** a prostřednictvím de-esterifikace pektinů se ve filiform aparátu akumuluje NO.

↓
Nitrosylace peptidů LURE1 v synergické buňce

↓
Inhibice interakce LURE1 s receptorem

↓
Potlačení přitažlivosti pylové láčky k embryonálnímu vaku

