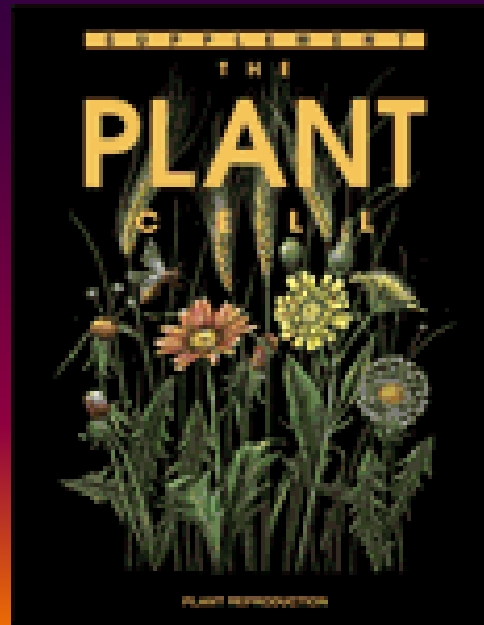


6) Vývoj květu a kontrola kvetení

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

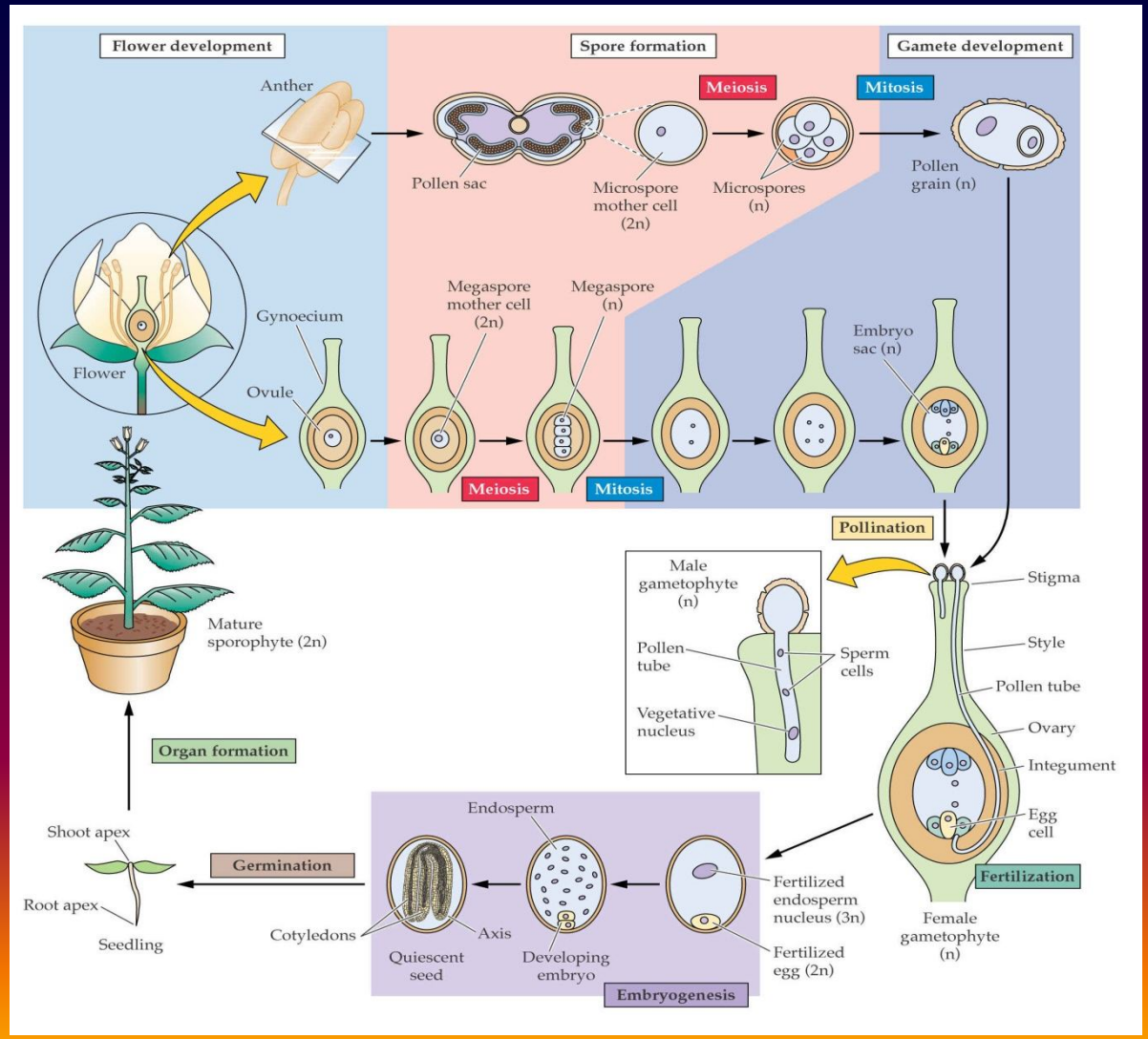


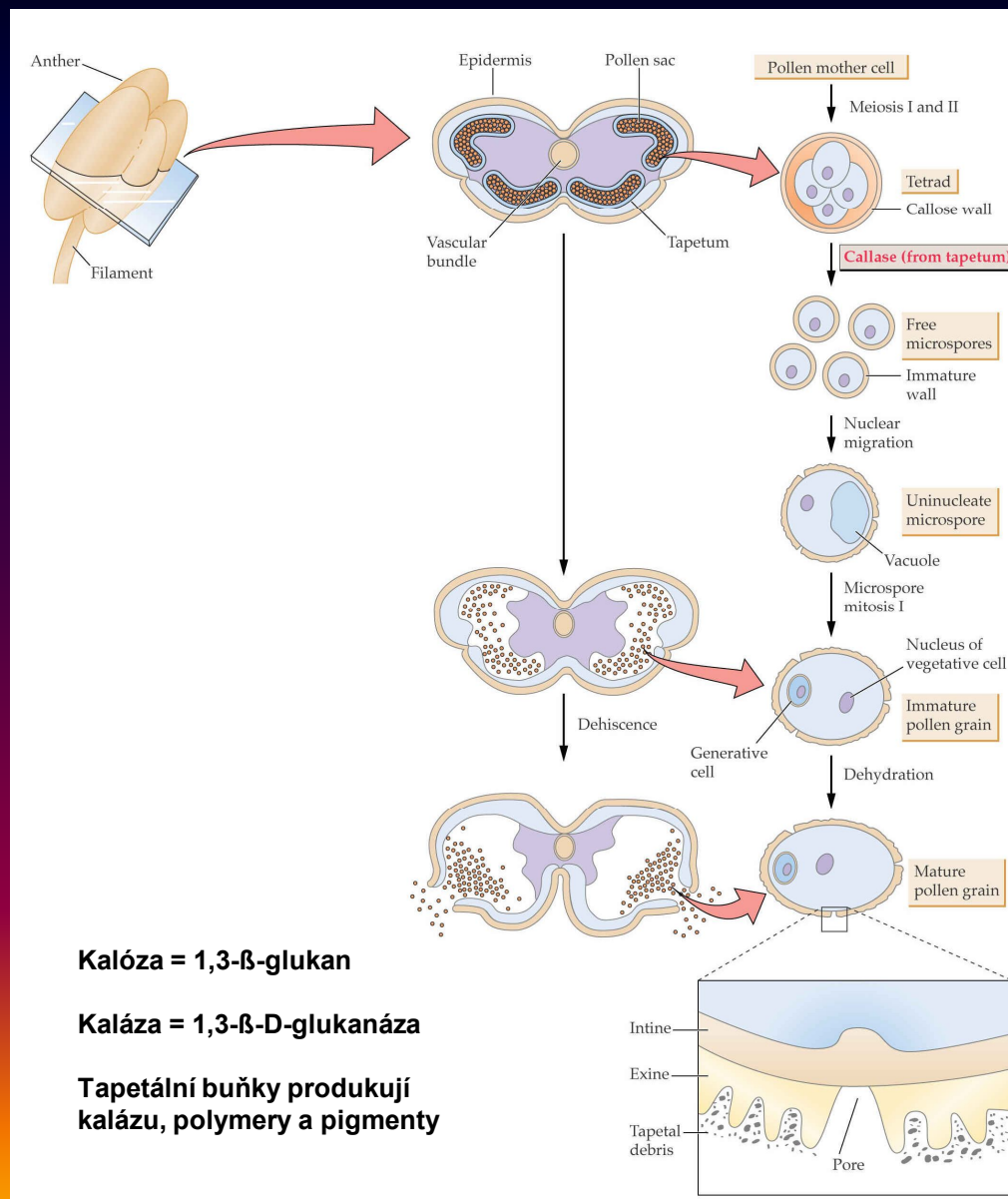
d) Vznik gamet

Životní cyklus rostliny

Mikrosporogeneze

Megasporogeneze





Kalóza = 1,3-β-glukan

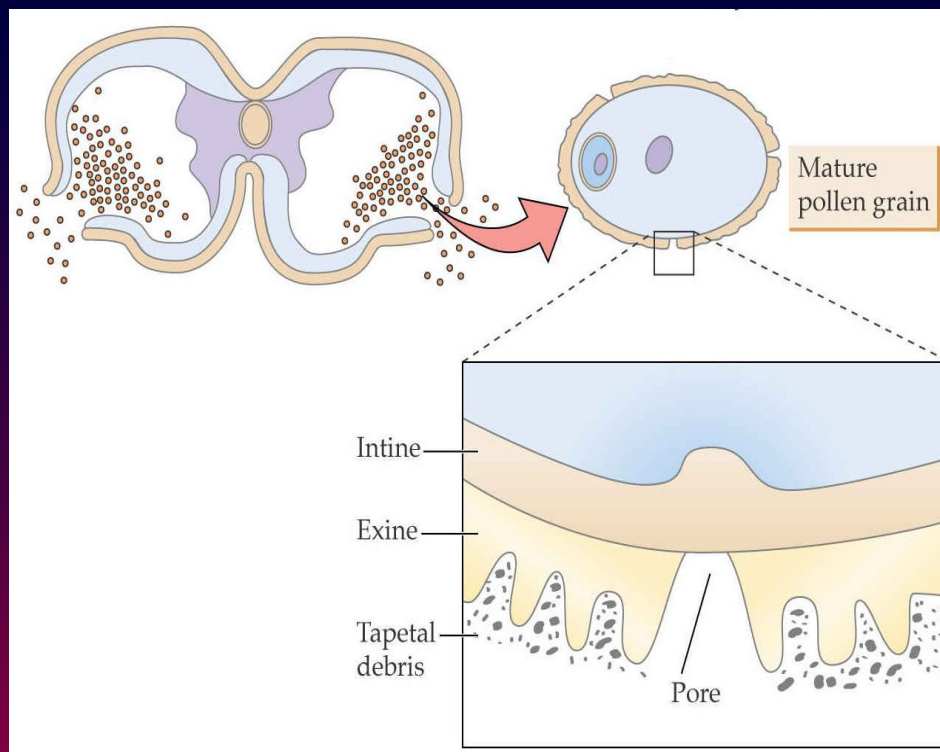
Kaláza = 1,3-β-D-glukanáza

Tapetální buňky produkují kalázu, polymery a pigmenty

Mikrosporogeneze = tvorba samčího gametofytu = pylových zrn



Samčí pohlavní buňka - pylové zrno



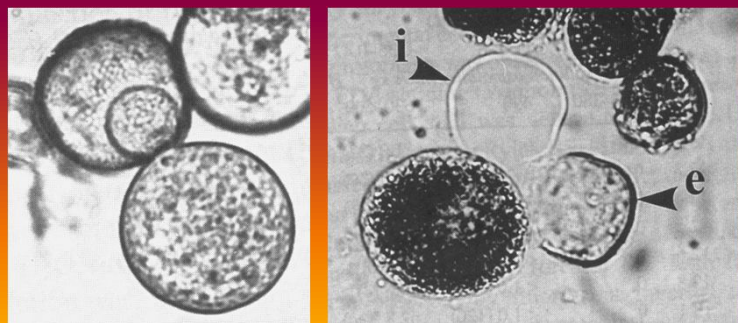
Exina = sporopolenin = polymer fenolů; extrémně rezistentní k chemickým látkám; **nejsou** známy geny, které utváření exiny kódují



Fosilní nálezy pylových zrn

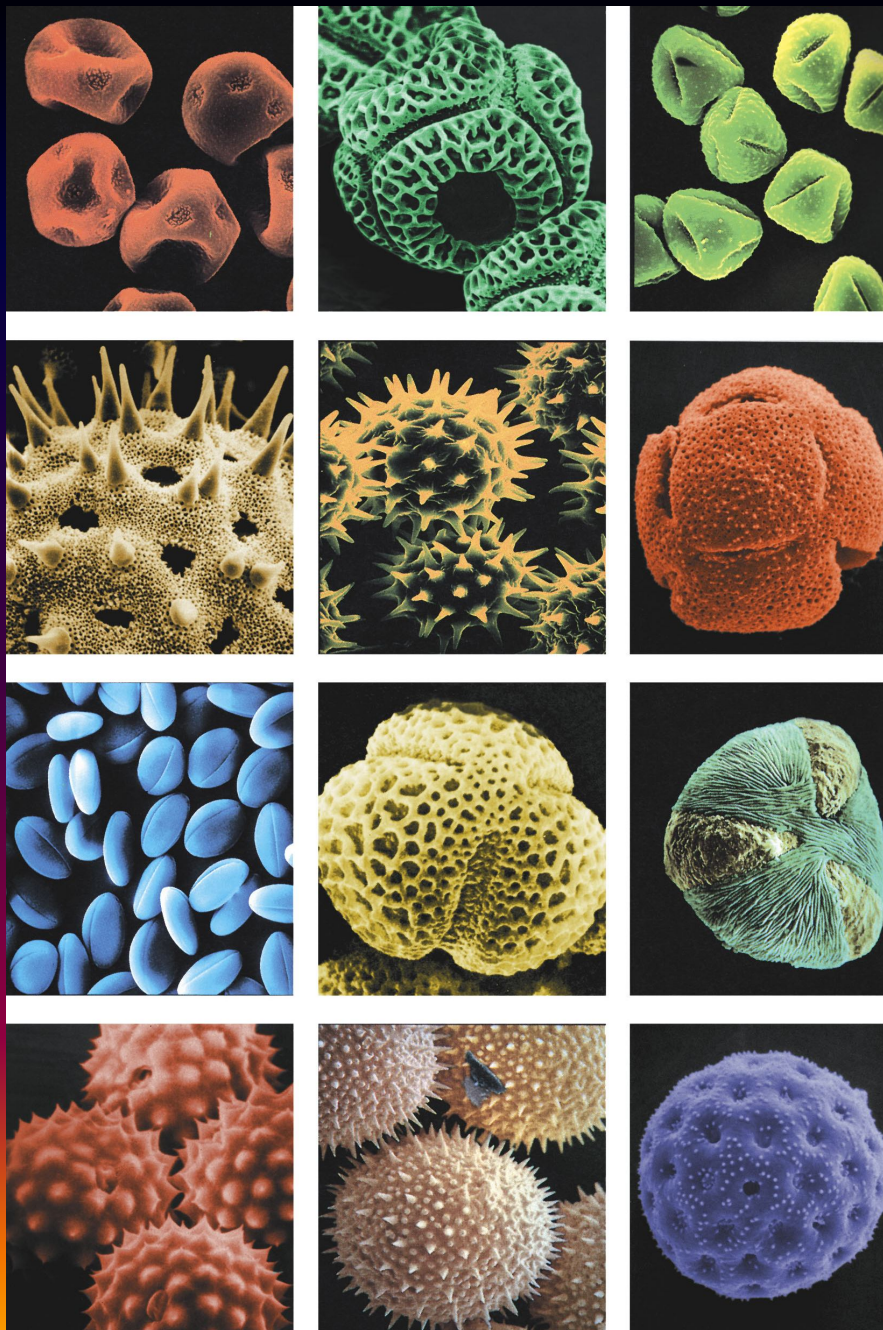


Vývojová biologie



Pylové protoplasty

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

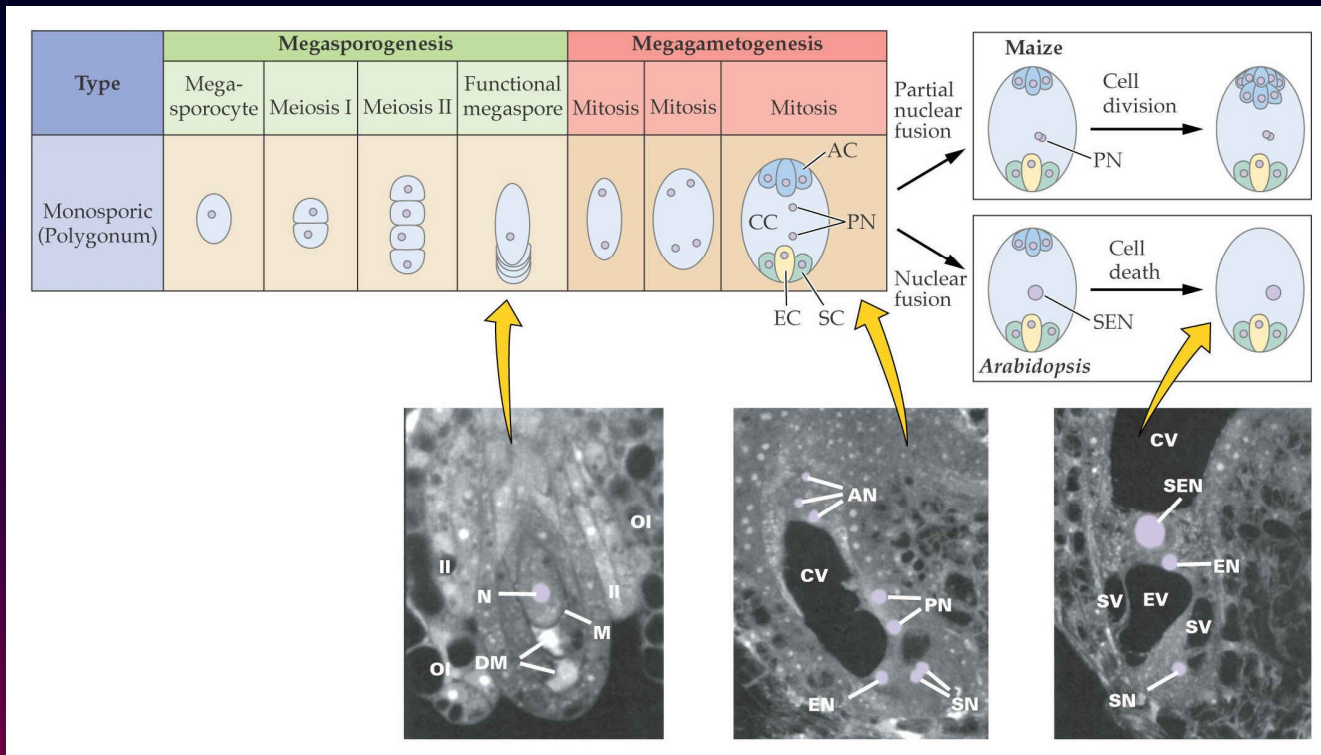


Pestré uspořádání exiny
pylových zrn



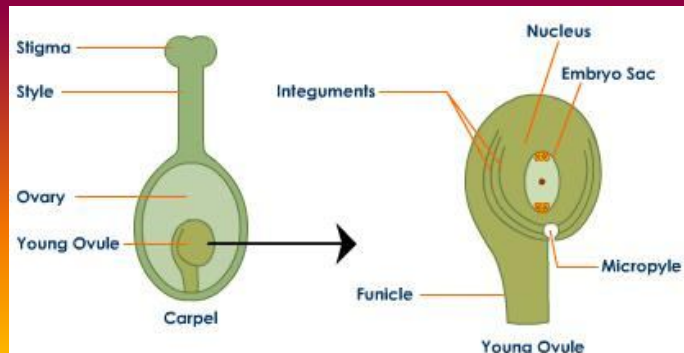
Praktické využití
(např. kriminalistika)

Vývoj samičího gametofytu - megasporogeneze



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

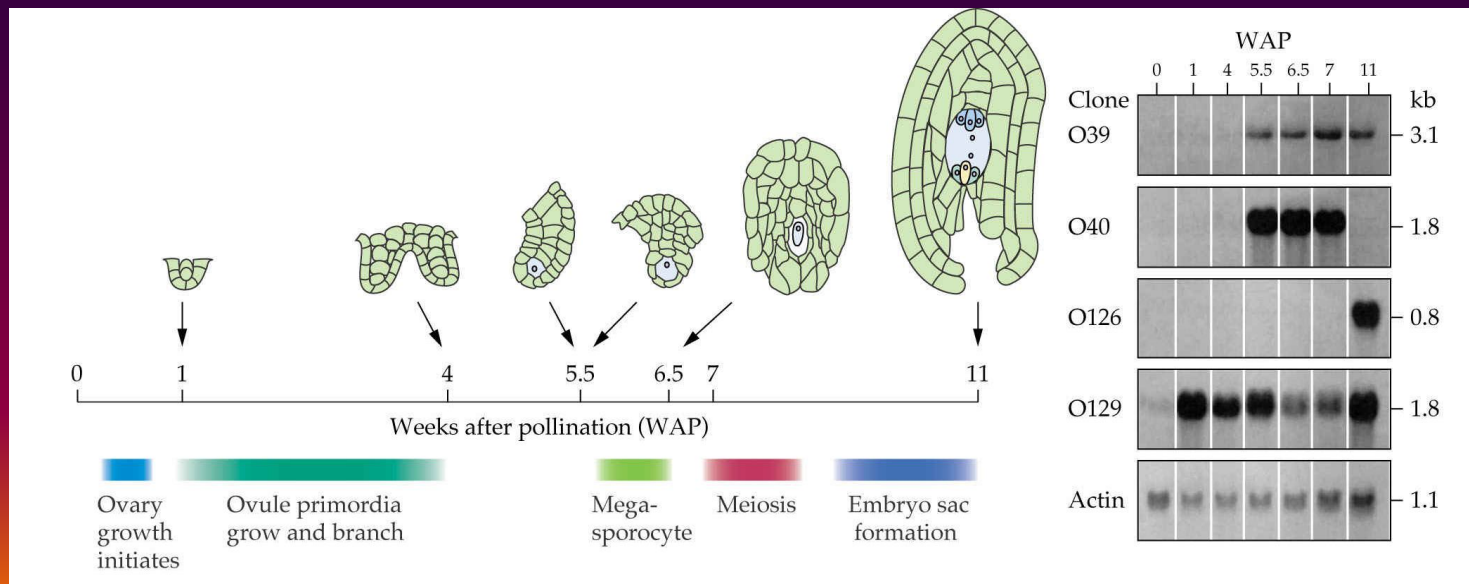
- 3 antipodální (AC)
- 2 synergické (SC)
- 1 centrální (CC)
- 1 vaječná (EC)



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

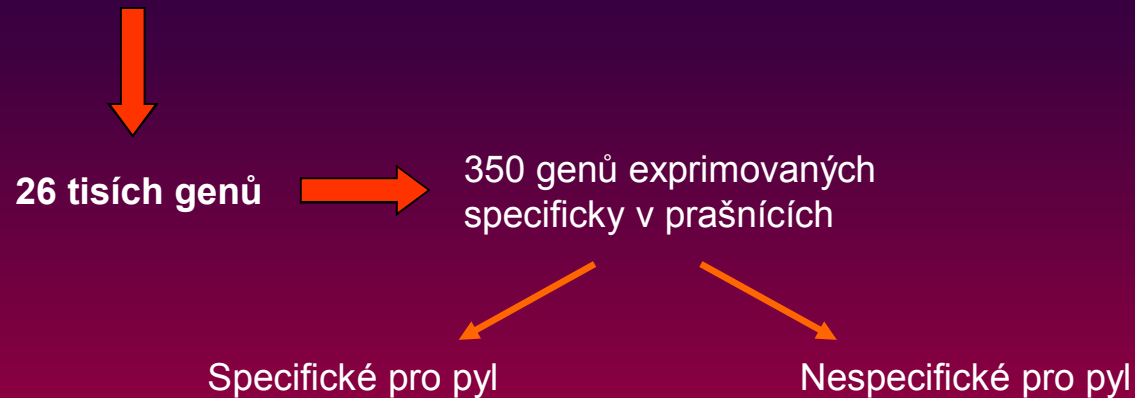
Sterilní mutanti s defektem ve vývoji vajíčka

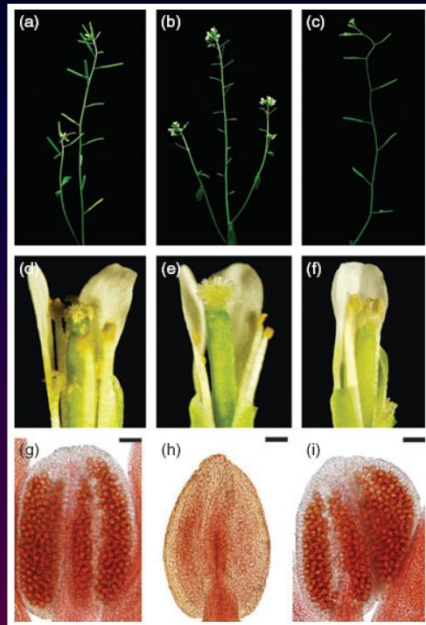
- defekt ve vývoji sporofytu
 - defekt ve vývoji megaspory
 - defekt ve vývoji embryonálního vaku a vajíčka – ovlivněno oplodnění
- } - ovlivněn vývoj vajíčka a ovlivněno oplodnění

Mutace ve vývoji samčího gametofytu

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

Sekvenování *Arabidopsis* genomu (2000)





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

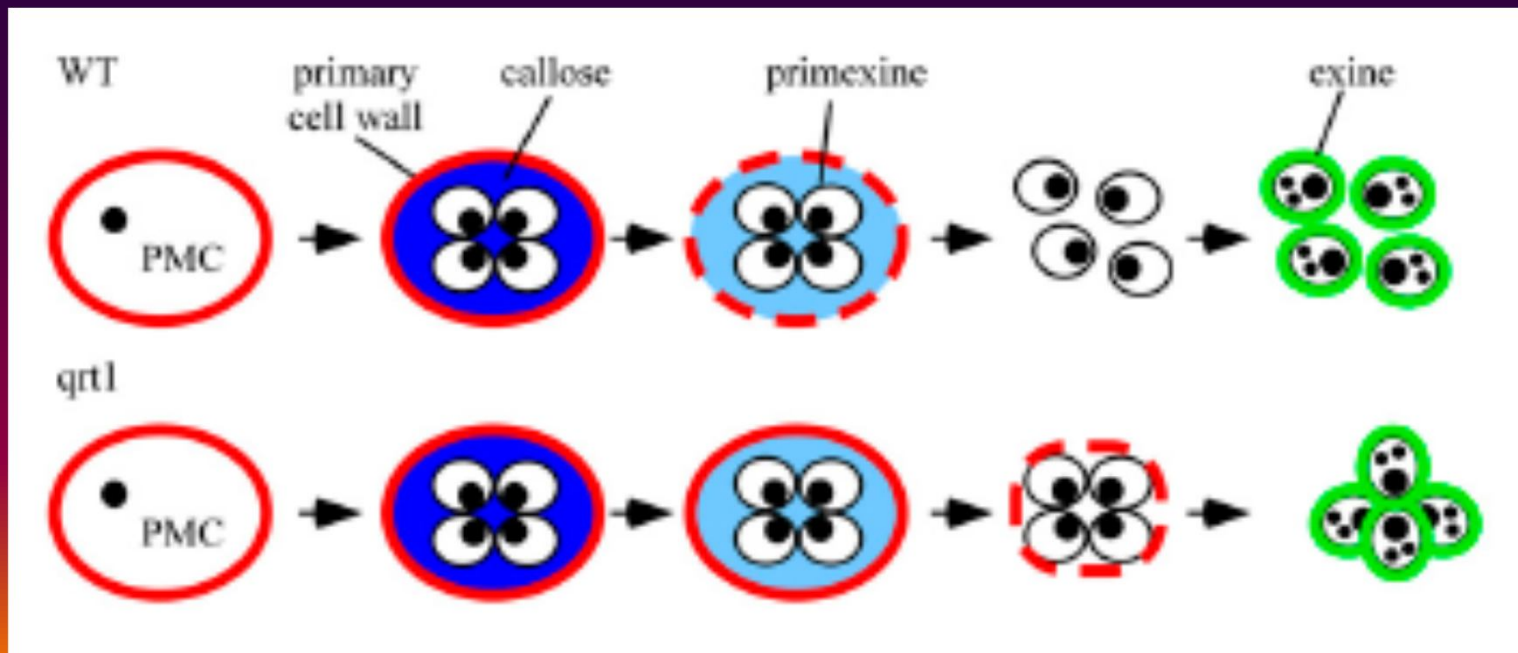
fkp1 – pylová zrna bez povrchové vrstvy

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



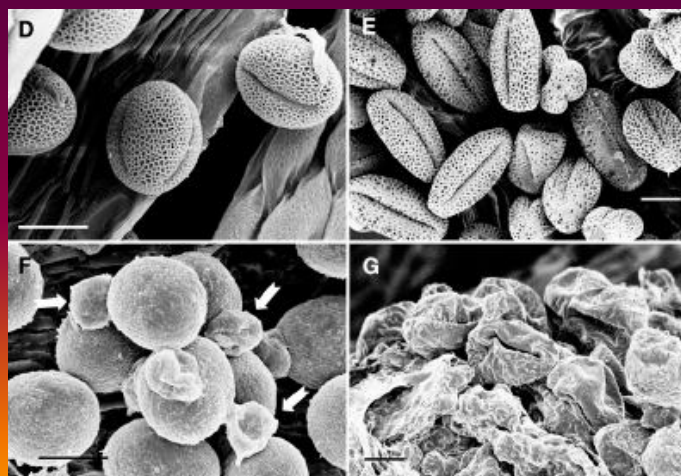
T-DNA mutant *cals5* – narušená fertilita, degenerované mikrospory

CALS5 kóduje kalóza-syntázu → syntéza kalózy → exina

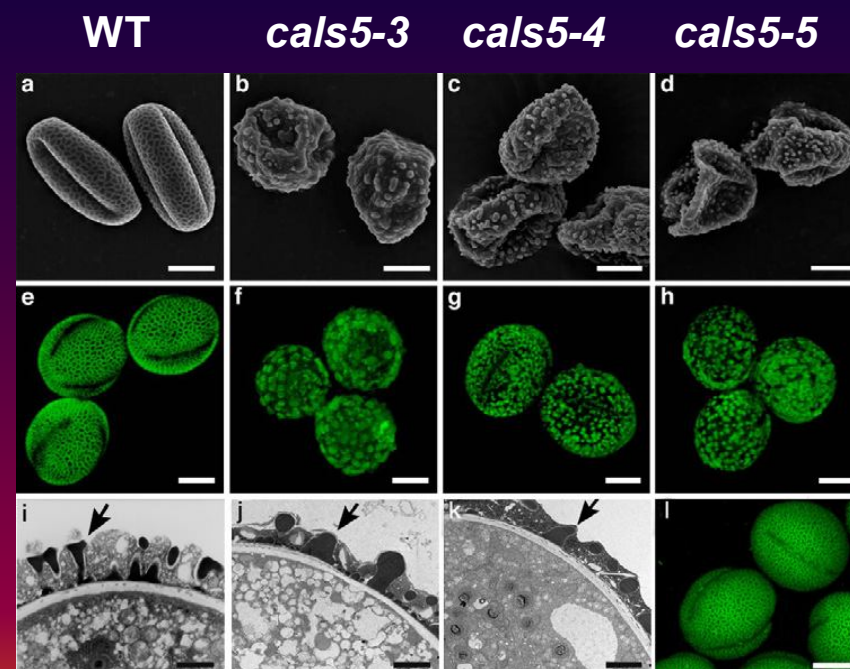
Knockout mutant *CYP703A2* (cytochrom P450)
CYP703A2 – katalyzuje hydroxylaci kys. laurové

Sporopolenin – bloky hydroxylované
 kyseliny laurové

WT

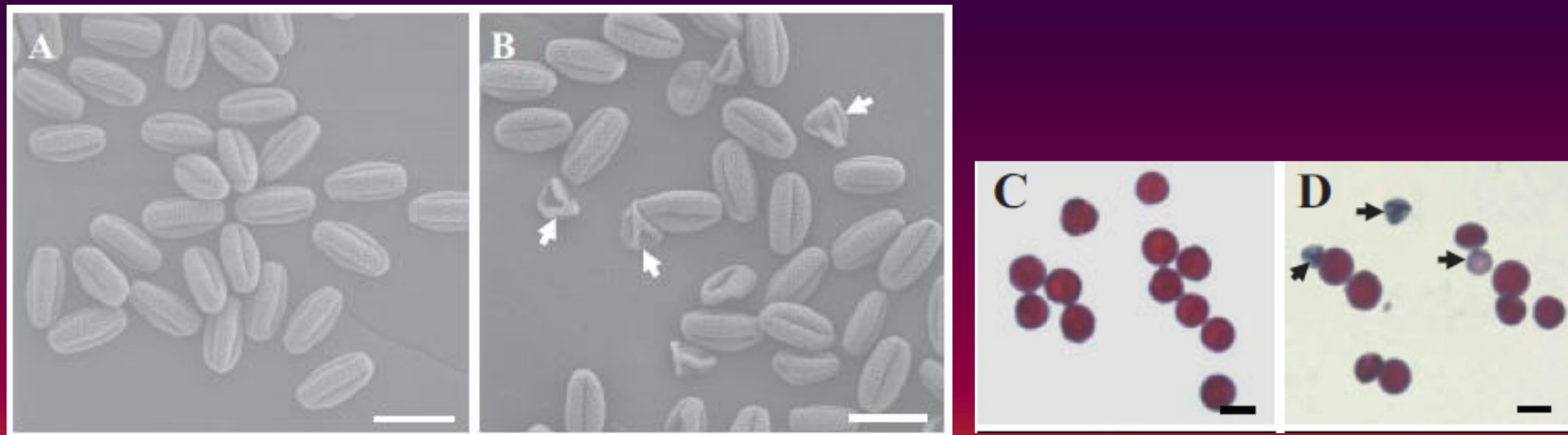


CYP703A2



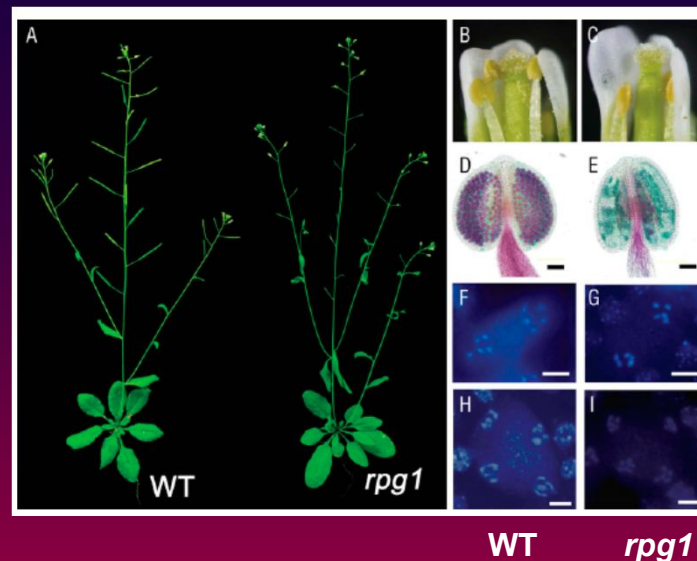
MGP1 (MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1) – kóduje F_a d podjednotku mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázy u *Arabidopsis*.

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



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

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

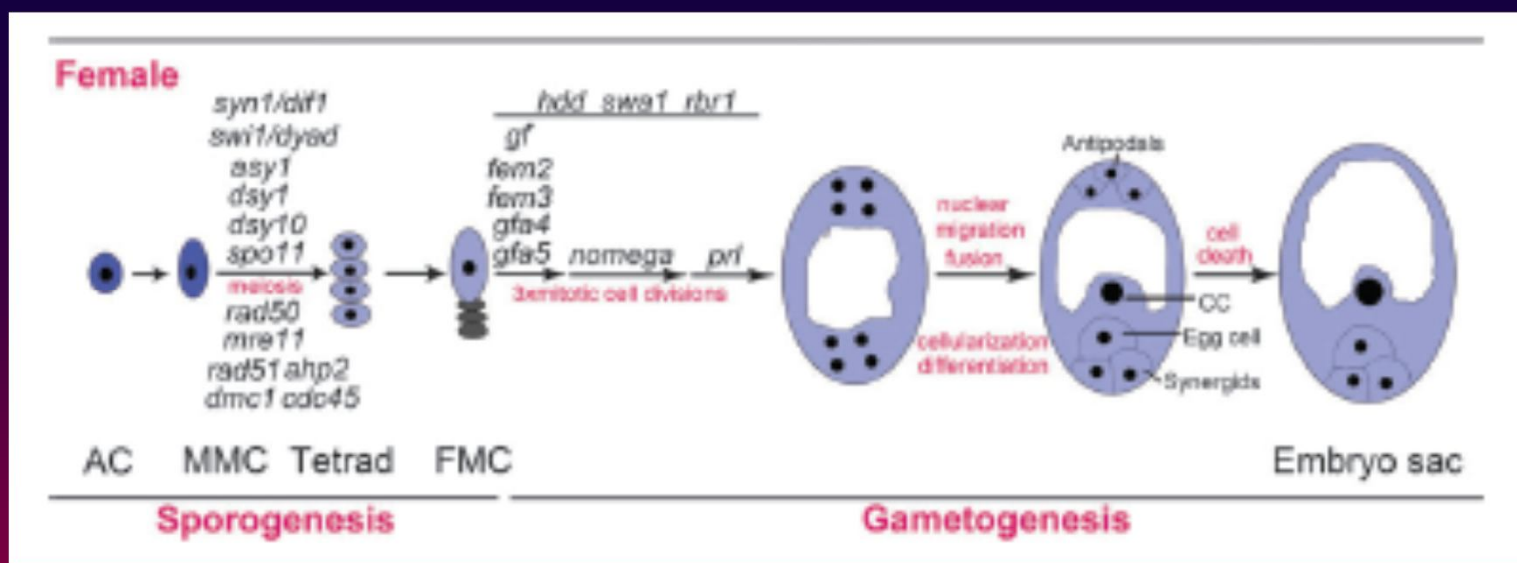


Guan Z-F et al. (2008) *Plant Physiol* 147: 852 - 863

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**

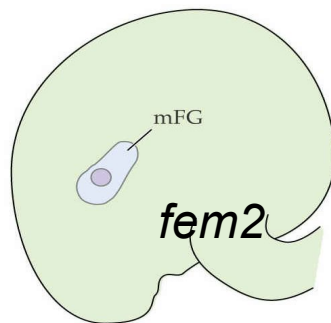
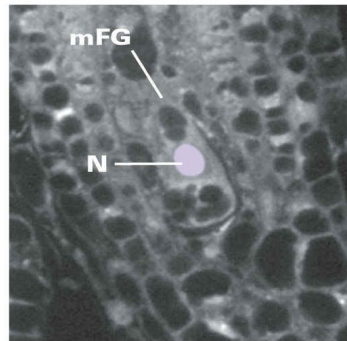


23 genů (funkce známa)

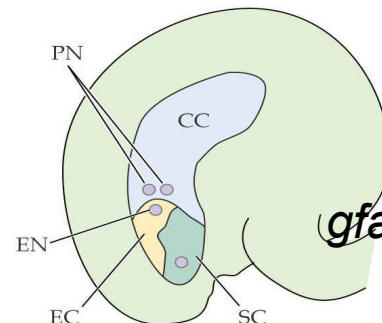
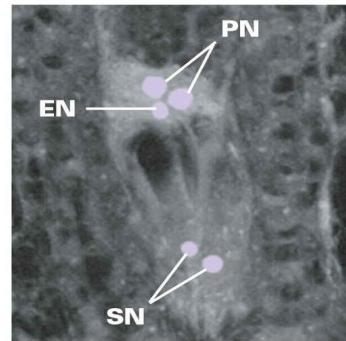
- 14 nespécifických (♂ + ♀)
- 9 specifických (♀)

Specifické geny

fem2: Never progresses beyond megasporogenesis



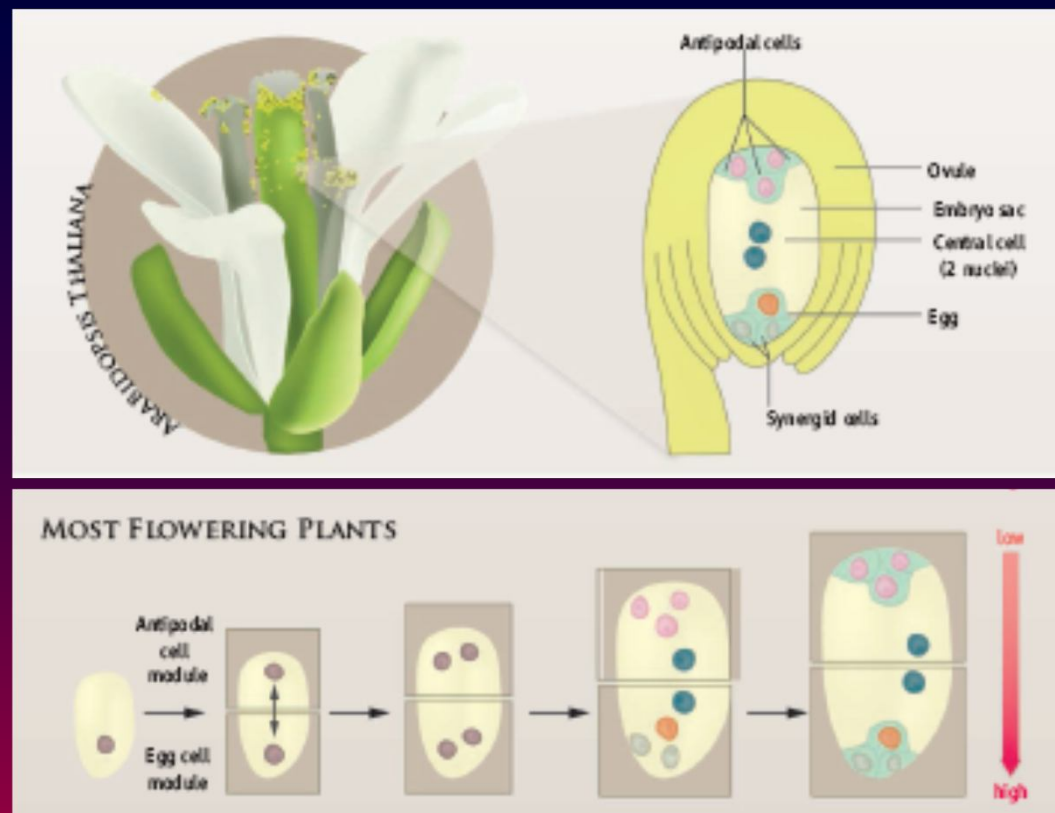
gfa2: Polar nuclei fail to fuse



Arabidopsis mutant *fem2* – zastaven vývoj vajíčka před megasporogenezí

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

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

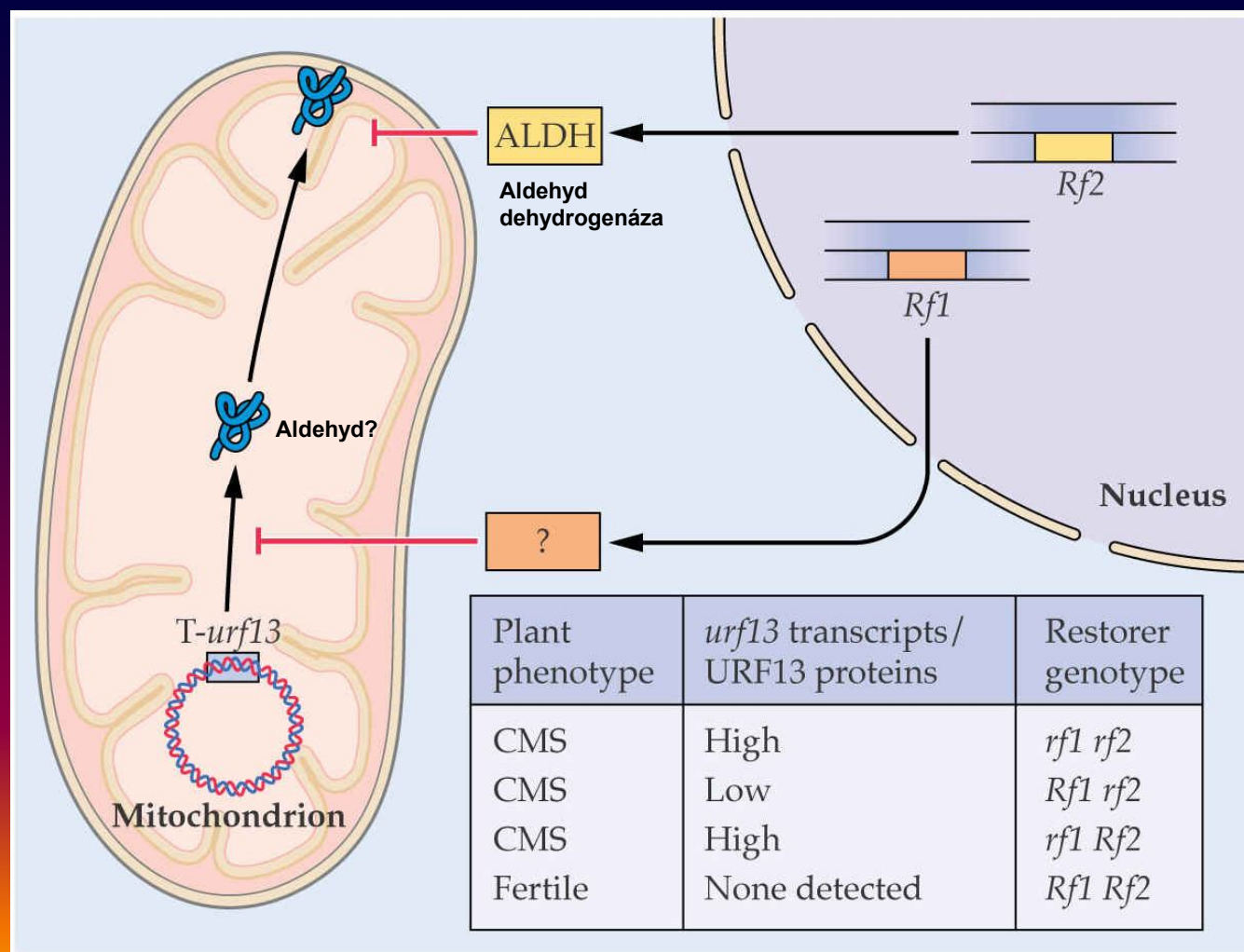
Nízká koncentrace auxinu → Antipodální buňky

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.

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

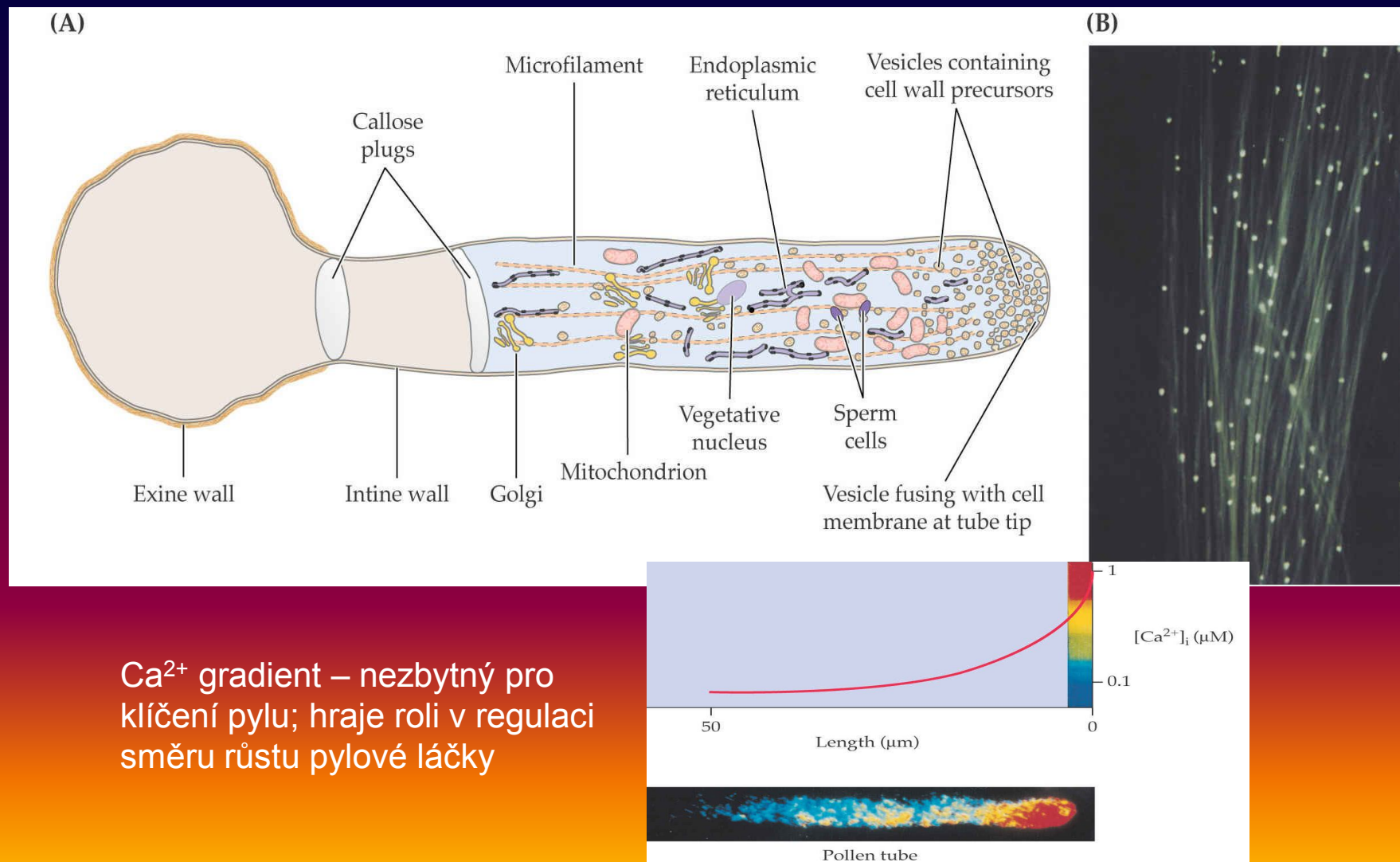
2) Rostliny se **suchou bliznou** – vlhkost je zajištěna **lipidy** na povrchu pylového zrna. Lipidy hrají významnou roli v klíčení pylu.

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

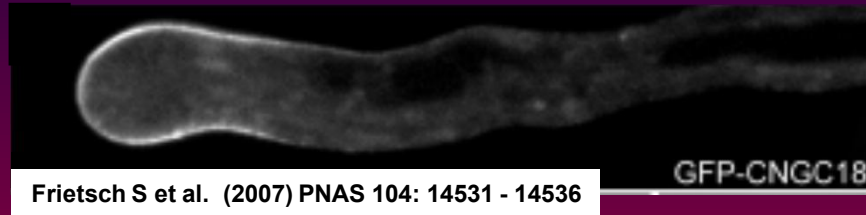


Není známo, jak je Ca^{2+} signál přeložen do finální reakce prodlužování pylové láčky.

cngc18 – nulový mutant s pylovou sterilitou

CNGC18 – kóduje kationtový kanál regulovaný cyklickými nukleotidy

GFP:CNGC18 analýza

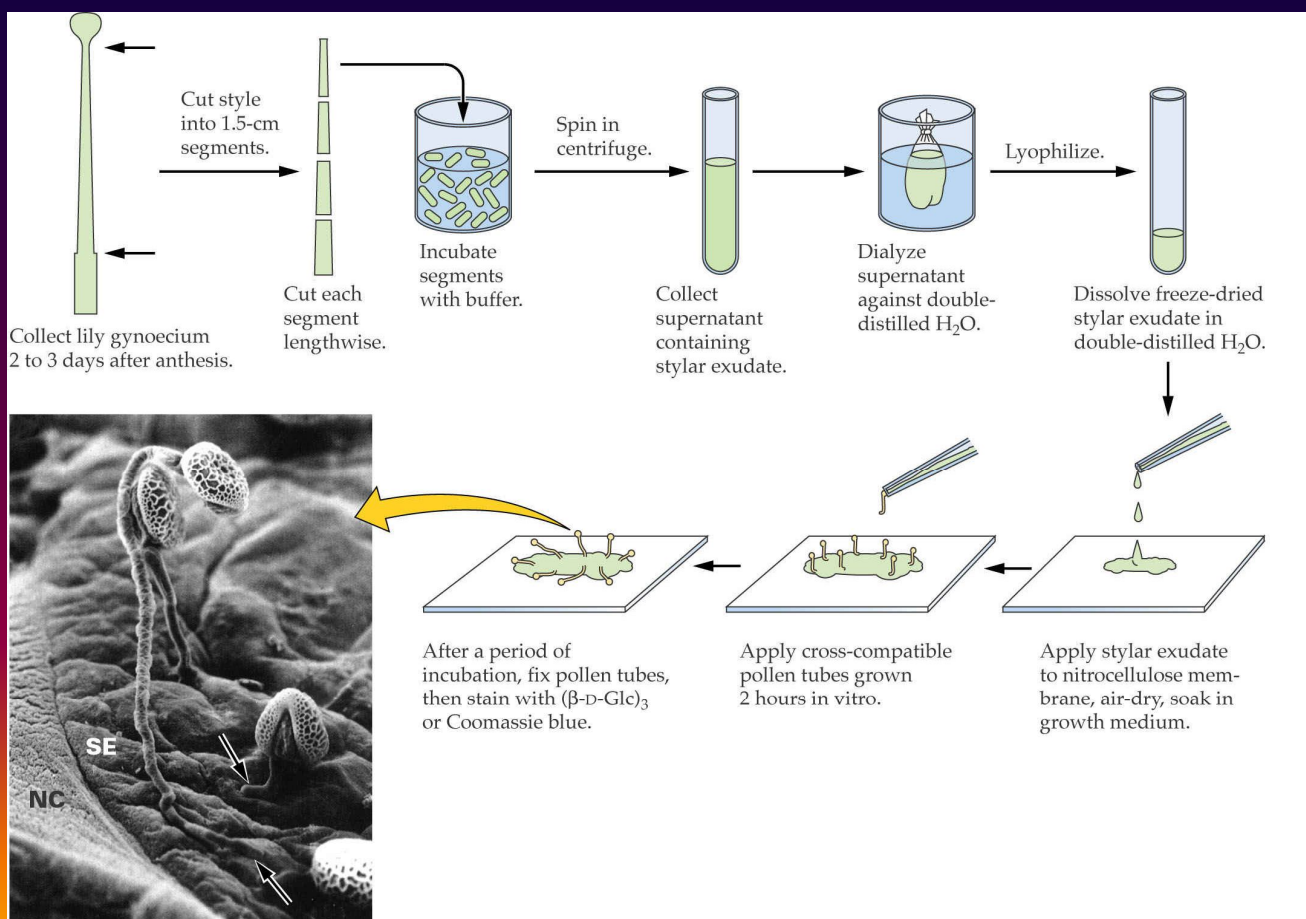


cngc18: komplementovaný GFP:CNGC18

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

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



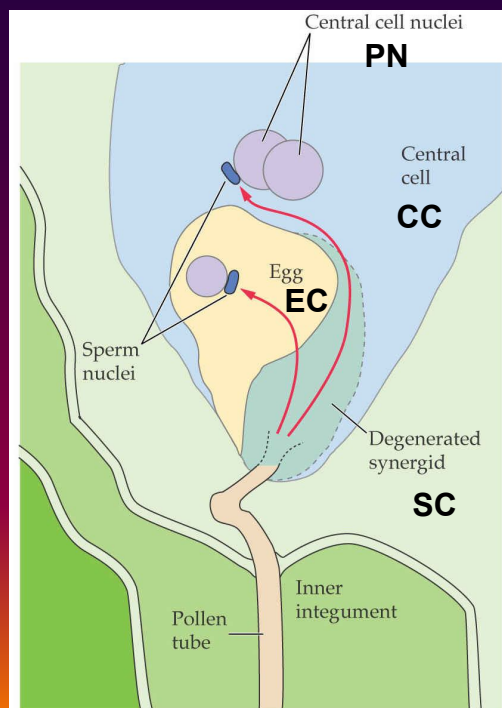
Clouse et al. (1996)
Plant Physiol 111: 671-678

f) Opylení, oplodnění

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

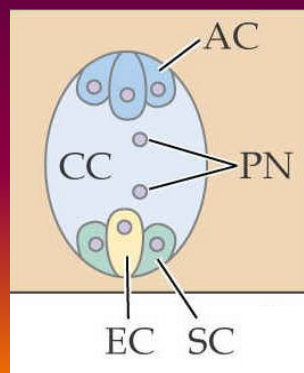
1. Oplodnění:

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



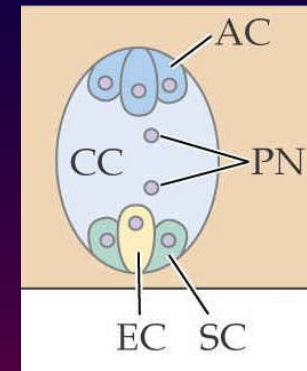
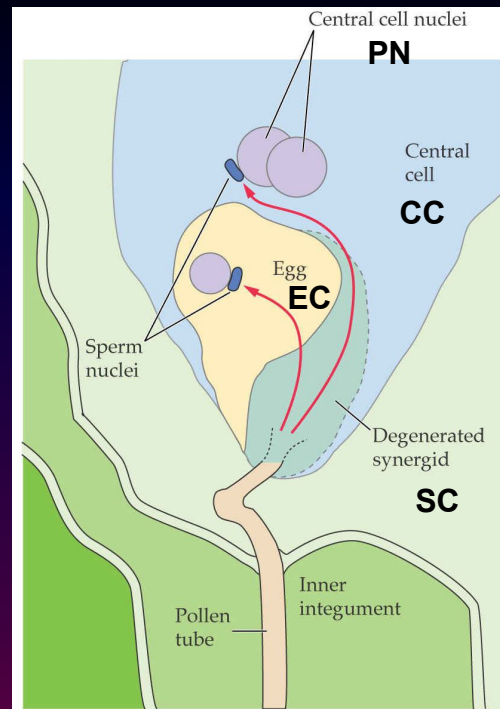
2. Oplodnění:

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 láčkou k vajíčku

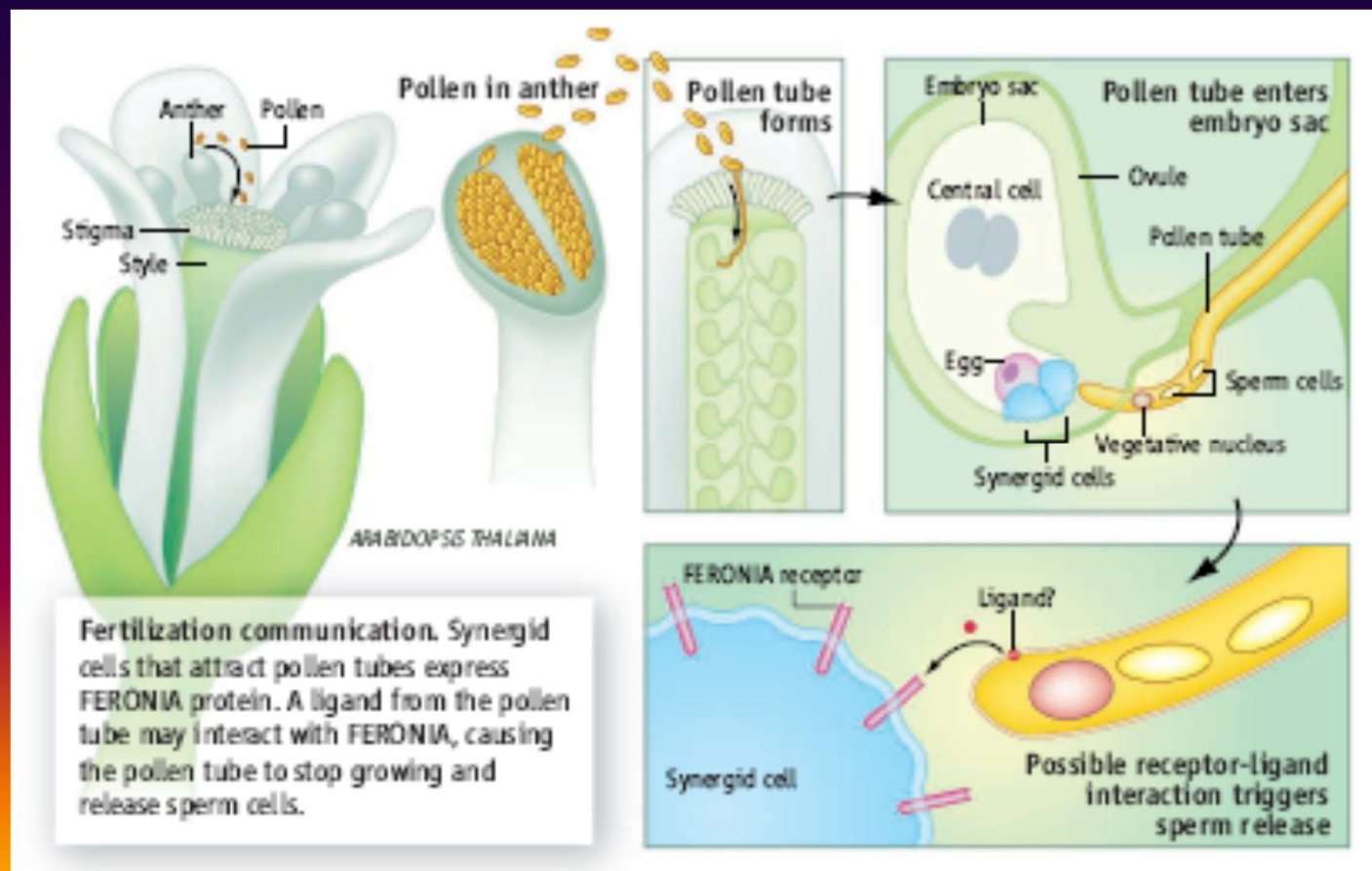
GEX3 – správná exprese genu ve vaječné buňce a spermatických buňkách – směřování pyl. láčky k vajíčku

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

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



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

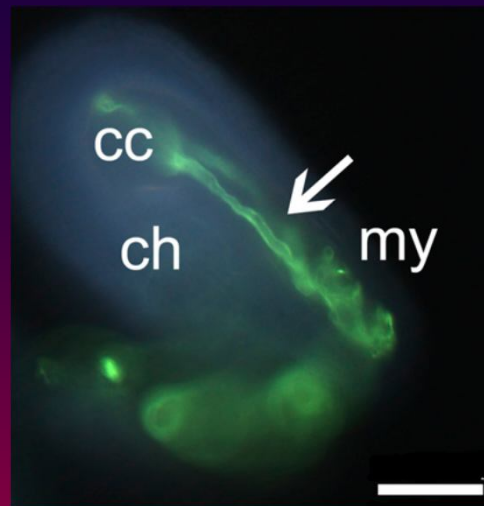
Deaktivace dráhy ANX



Prasknutí pylové láčky a uvolnění spermatických buněk.

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.