

Haploidní techniky

androgeneze

gynogeneze

Význam haploidních rostlin

- detekce recesivních alel (v haploidním stavu nejsou překryty dominantní alelou)
- zdvojený haploid poskytuje homozygotní linie
- materiál může být použit pro somatickou hybridizaci (fúze protoplastů) - není tak indukována polyploidie

Terminologie

- haploid = rostlina s gametickým počtem chromozómů

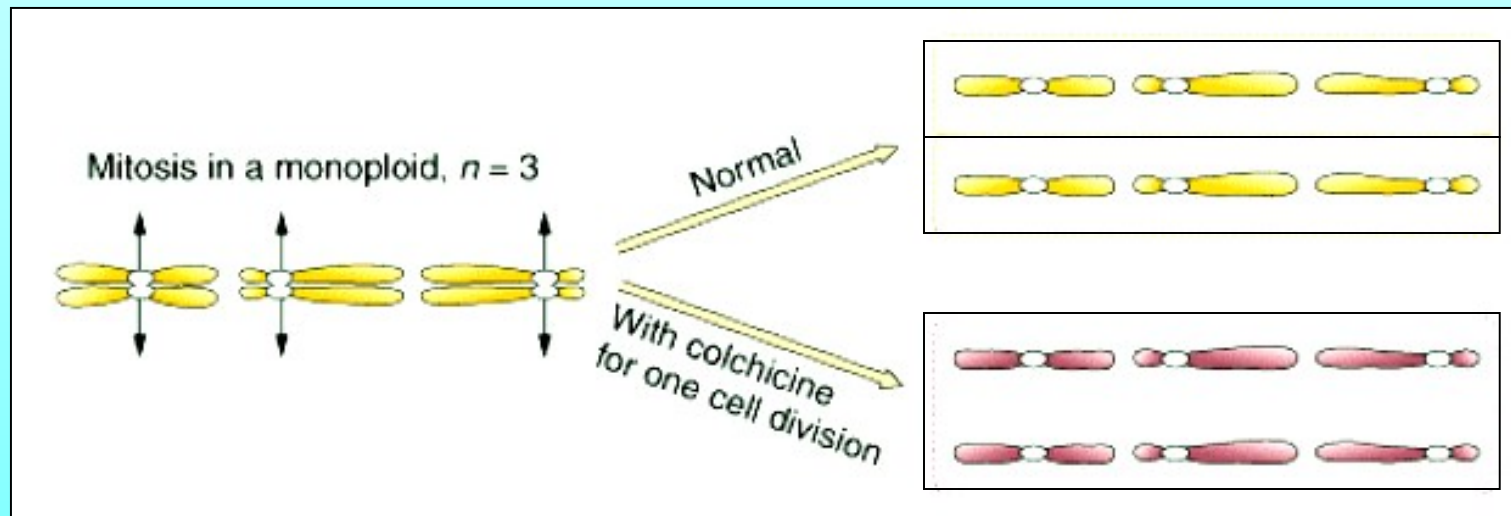
monohaploid $n = x$

dihaploid $n = 2x$ (haploid tetraploidních druhů)

- zdvojený haploid = doubled haploid plant
(D.H. plant)

Zdvojení počtu chromosomů působením kolchicinu

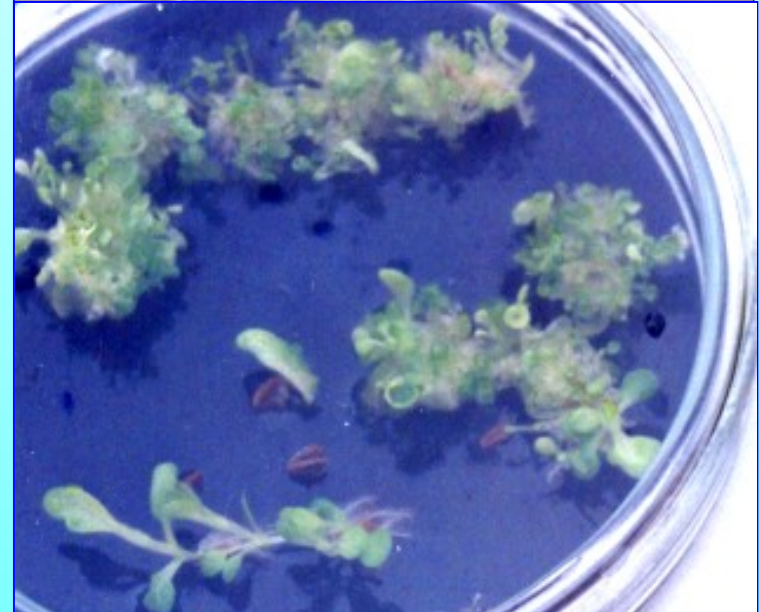
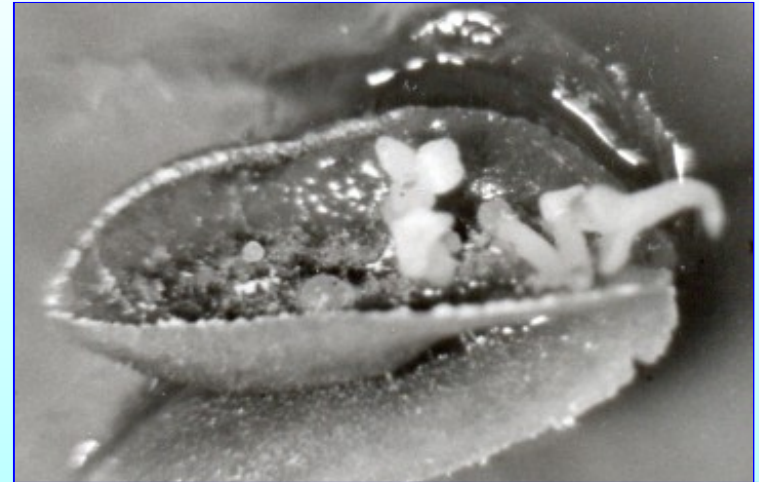
2 monoploidní buňky



1 diploidní buňka

Haploidní kultury

- **androgeneze** = regenerace haploidních rostlin ze **samčího gametofytu** - kultury nezralých prašníků nebo izolovaných mikrospor
- **gynogeneze** = regenerace haploidních rostlin ze **samičího gametofytu** - kultury neoplodněných vajíček



Prašníkové kultury tabáku
Nicotiana tabacum L.
Foto: J. Dubová

1. Androgeneze

Tvorba haploidních regenerantů
ze samčího gametofytu

Vznik haploidů u vyšších rostlin

- **SPONTÁNNÍ** frekvence 10^{-3} - 10^{-6}
 - haploidní partenogeneze
 - gynogeneze
 - androgeneze
- **EXPERIMENTÁLNÍ = INDUKOVANÁ**
 - klasické způsoby
 - explantátové metody

Vznik haploidů u vyšších rostlin

• Klasické způsoby

- působení fyzikálních faktorů (UV, X, teplotní šoky)
- působení chemických faktorů (kolchicin, maleinhydrazid)
- zásahy do procesu opylení a oplození
 - kastrace a izolace
 - opožděné opylování
 - opylení inaktivovaným pylem
 - vzdálená hybridizace - eliminace chromozómů

Historie haploidních kultur

1964 Guha a Maheshwari - kultivace nezralých prašníků a regenerace homozygotních rostlin durmanu *Datura innoxia* Mill.

1967 Bourghin a Nitsch - kultivace haploidních buněk (mikrospor) a regenerace homozygotních rostlin tabáku *Nicotiana tabacum*

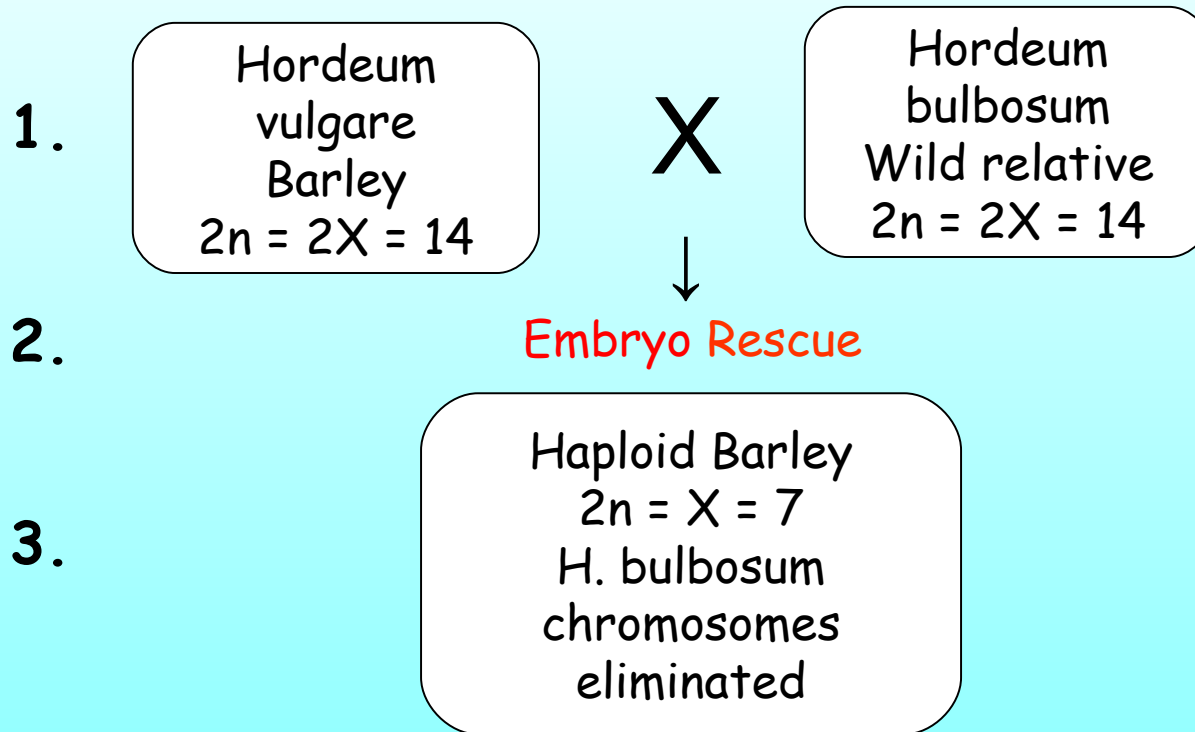
1996 Keller a Korzun - gynogeneze řepy *Beta vulgaris* L.,
Allium cepa L., *Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook

2000 šlechtitelské programy polních plodin (obiloviny, řepka) využívají haploidní kultury *in vitro*

Vznik haploidů u vyšších rostlin

- Explantátové metody
 - prašníkové kultury
 - mikrosporové a pylové kultury
 - kultivace semeníků
 - chromozomální redukce v kalusových, buněčných nebo protoplastových kulturách

Bulbosum Method of Haploid Production



- This was once more efficient than microspore culture in creating haploid barley
- Now, with an improved culture media (sucrose replaced by maltose), microspore culture is much more efficient (~2000 plants per 100 anthers)

Produkce haploidů a dihaploidů ječmene

1. mezidruhová hybridizace *H. vulgare* a *H. bulbosum* =
hybridní zygota
2. izolace hybridního embrya
3. eliminace chromozómů *H. bulbosum* =
haploidní rostlinka
4. zdvojení chromozómů působením kolchicinu =
diploidizovaný haploid

Faktory ovlivňující pylovou embryogenezi

zahrnují vnitřní fyziologický stav výchozí rostliny a její genetické zvláštnosti - druhová specificita

- druh rostliny, **genotyp**
- **fyziologický stav** výchozí rostliny (ontogenetické stáří, fotoperioda, výživa, použití herbicidů)
- **stadium vývoje** pylu
- **předpůsobení** na poupata a izolované prašníky (snížená teplota, centrifugace)
- **předpůsobení** izolovaných mikrospor nebo pylu (centrifugace, hladovění, kolchicin)
- **kultivační podmínky**
 - aktivní uhlí
 - železo

Mateřská rostlina

optimální fyziologický stav mateřské rostliny je pro prašnickové kultury velmi důležitý

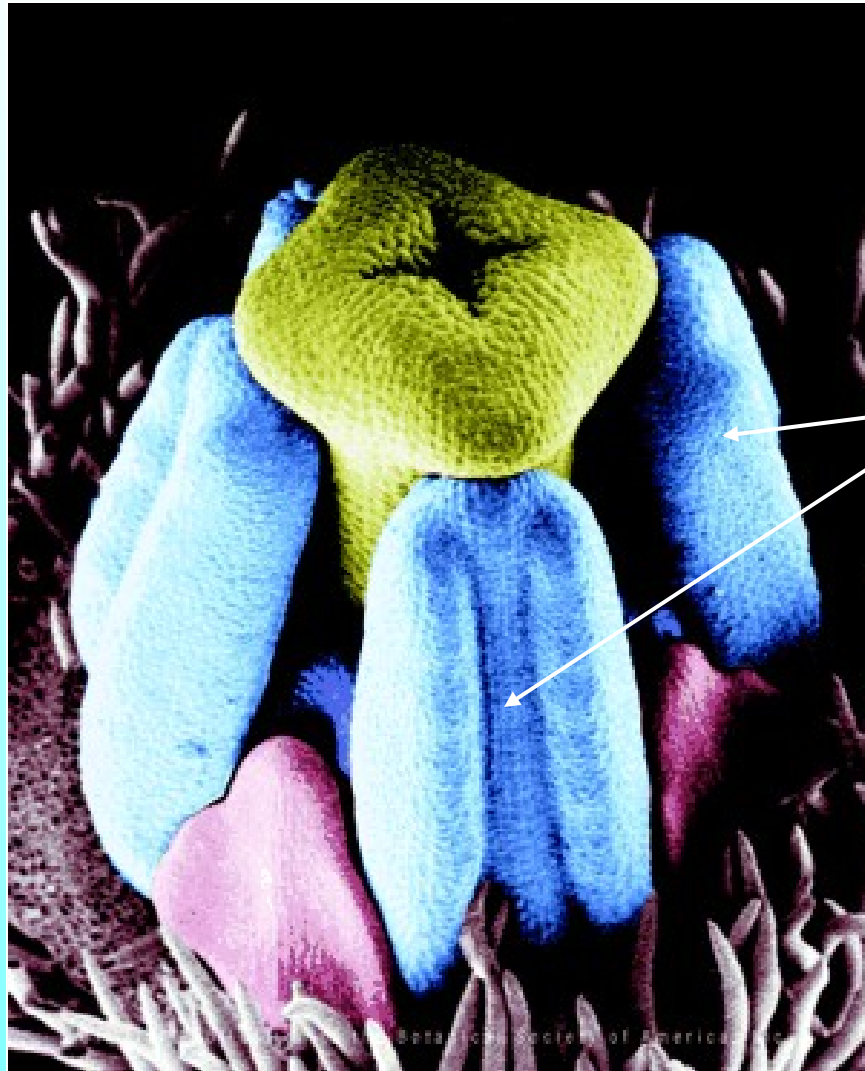
ontogenetické stáří - prašníky by se měly odebírat z pupat ze začátku období kvetení

výživa, dostupnost vody

teplota - u některých druhů se výnos haploidních embryí zvyšuje při předpěstování mateřských rostlin při nízké teplotě (5°C)

fotoperioda - vyšší výnosy haploidních embryí byly získány při pěstování donorových rostlin při krátkém dni a vysoké světelné intenzitě

Clarkia xantania (Onagraceae)



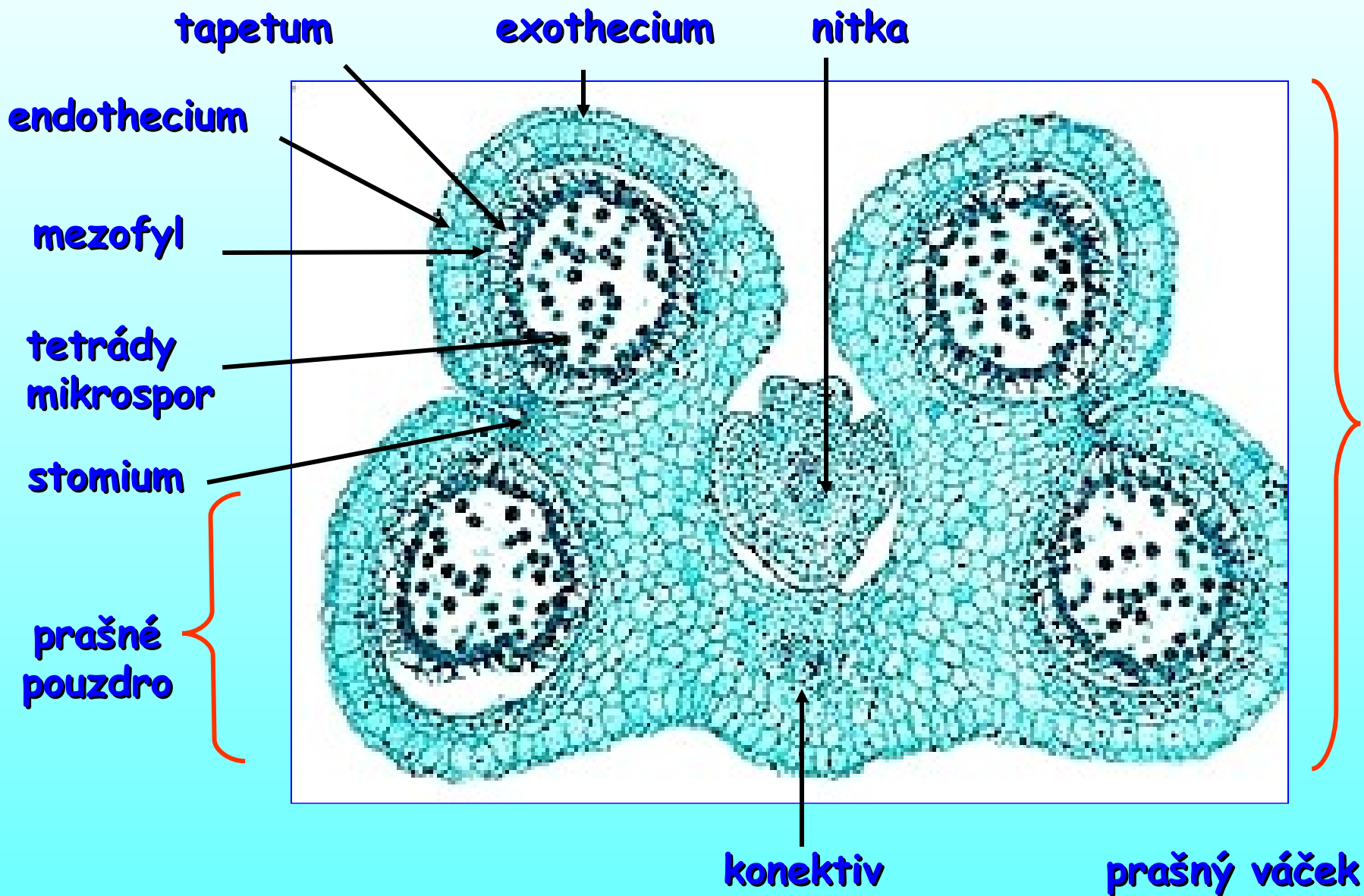
prašník

Photo:
C. J. Runions

Annals of Botany

Scanning electron micrograph of an early floral developmental stage of the outcrossing subspecies of *Clarkia xantania* (Onagraceae). Sepals, which are covered by trichomes, have been partially removed and floral organs have been falsely colored: style and stigma, yellow; large anthers, blue; small anthers, purple; petals, red.

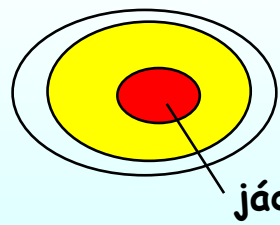
Řez prašníkem lilie



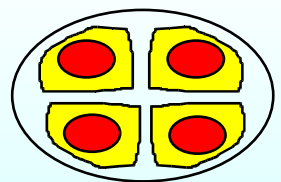
pylová mateřská buňka

tetráda mikrospor

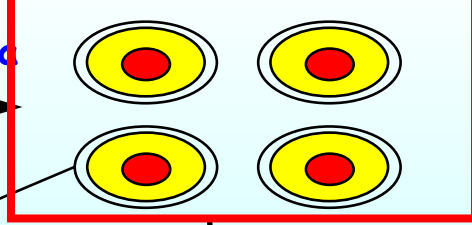
volné mikrospory



Meióza I a II

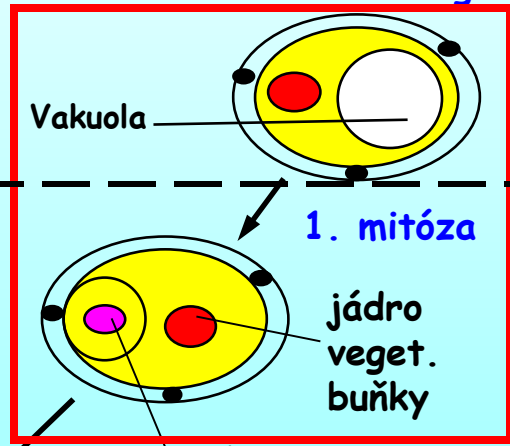


Kalóza



tvorba mikrospor: mikrosporogeneze

mikrospora



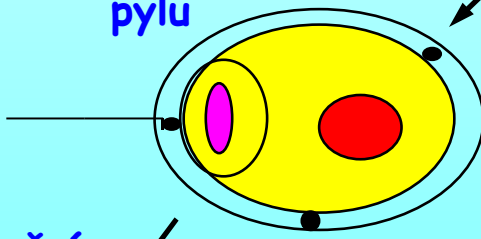
vývojová stadia vhodná pro iniciaci androgeneze

nezralé pylové zrno

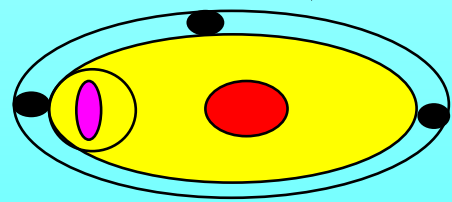
tvorba gamet: mikrogametogeneze

dozrávání pylu

apertura



odvodnění

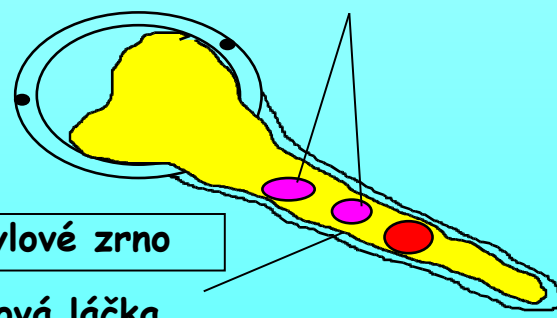


zralé pylové zrno (dvoubuněčný pyl)

pylová mitóza

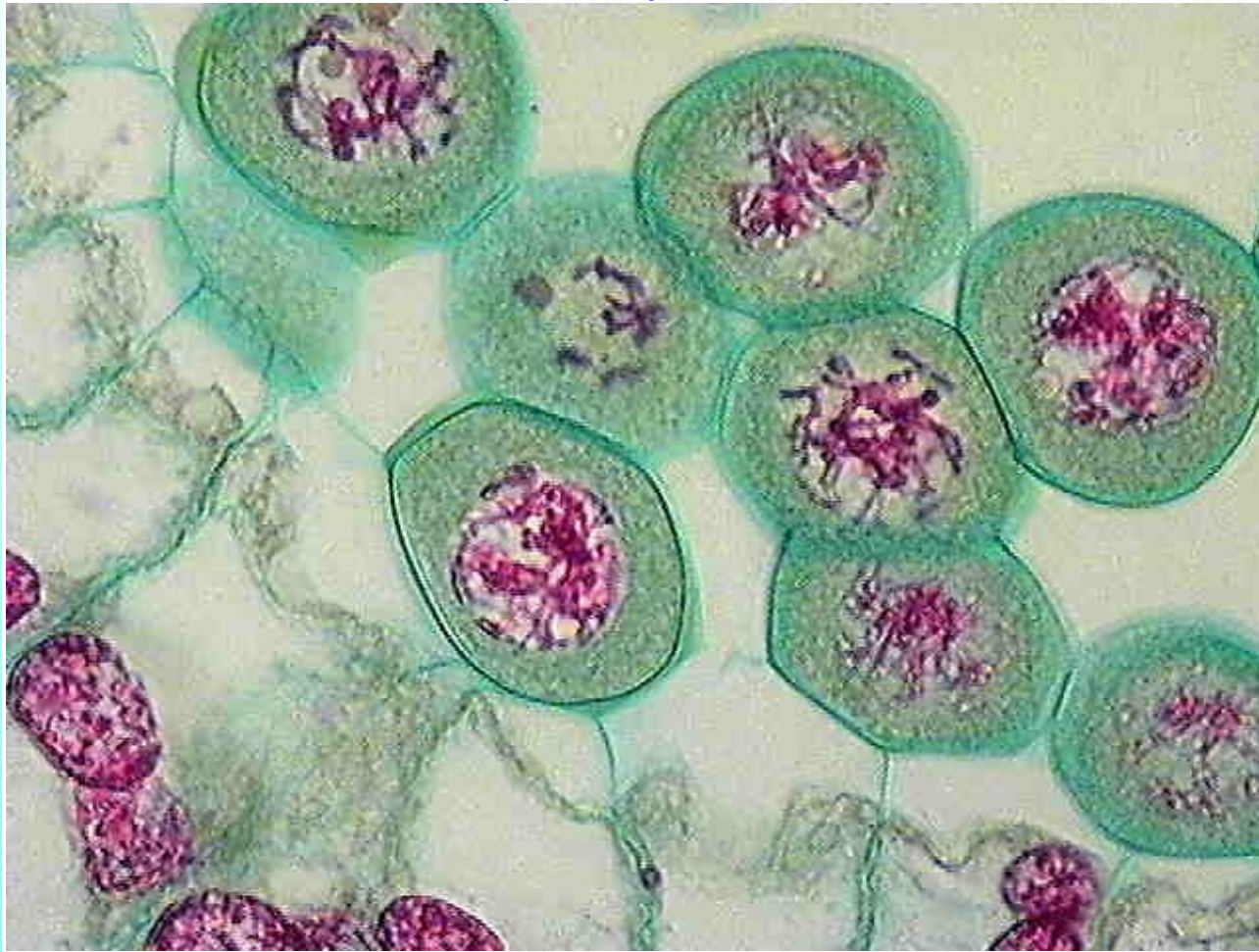
klíčící pylové zrno

pylová láčka



spermatické buňky

Late-prophase I.

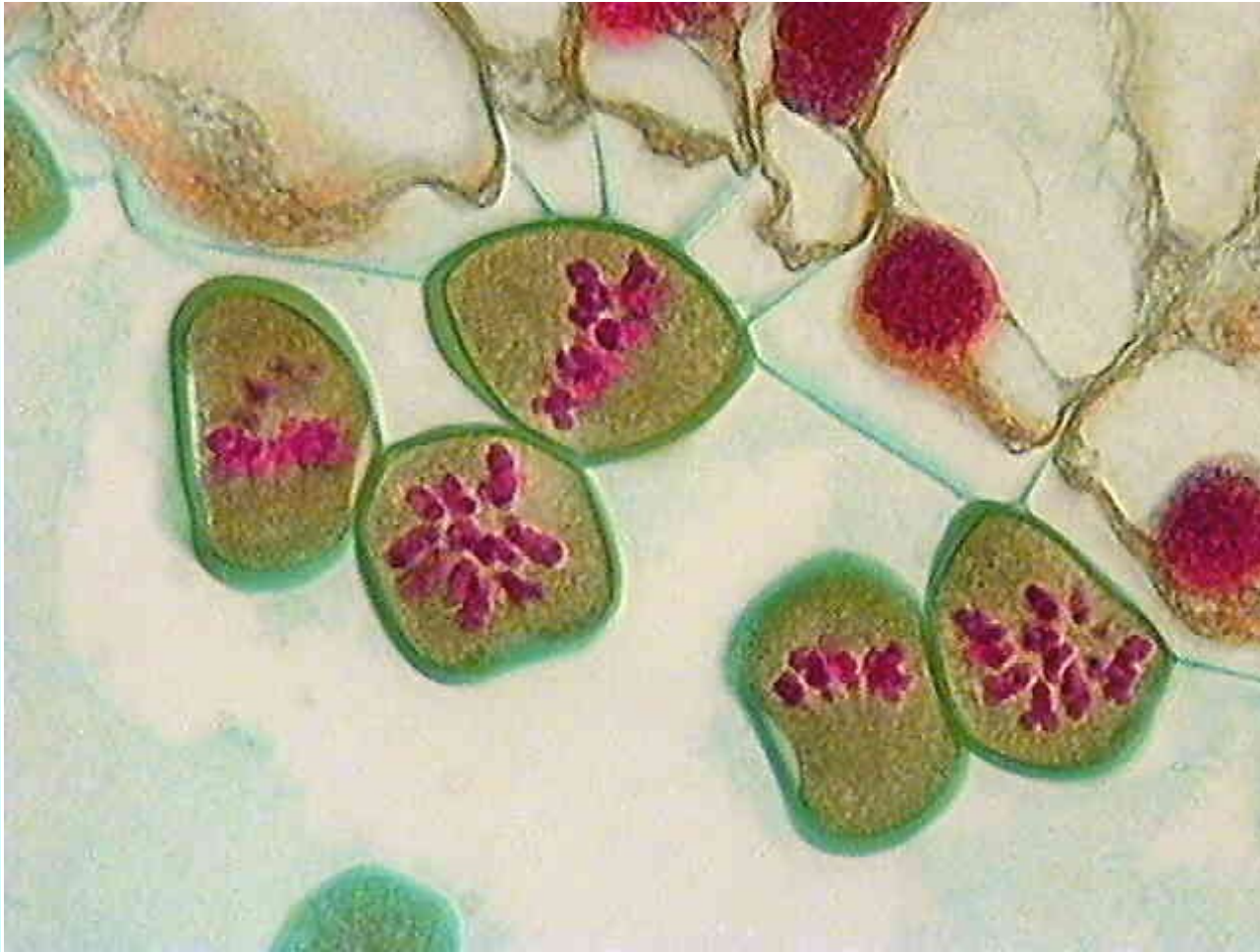


Lilium

IASPR

Homologous chromosomes continue to condense into their most compact forms as they are near **diakinesis**.

Metaphase I.

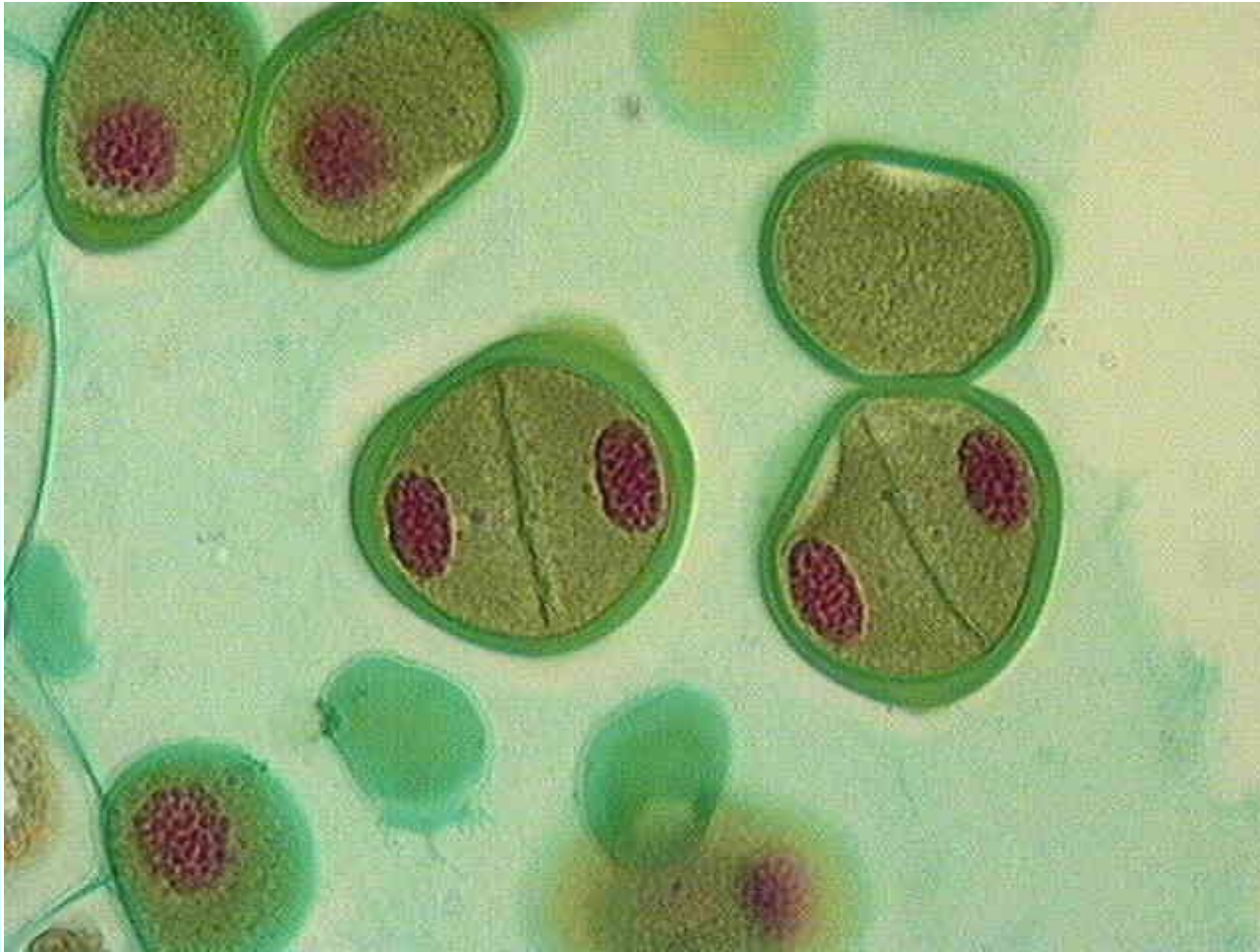


Lilium

IASPR

This view shows metaphase chromosome assemblages both in longitudinal view and in polar view (end-on).

Telophase I.



Lilium

IASPR

A distinct layer of cell wall is laid down between the two phases of meiosis in lily. The phases in the second half of meiosis occur rapidly.

Metaphase II.

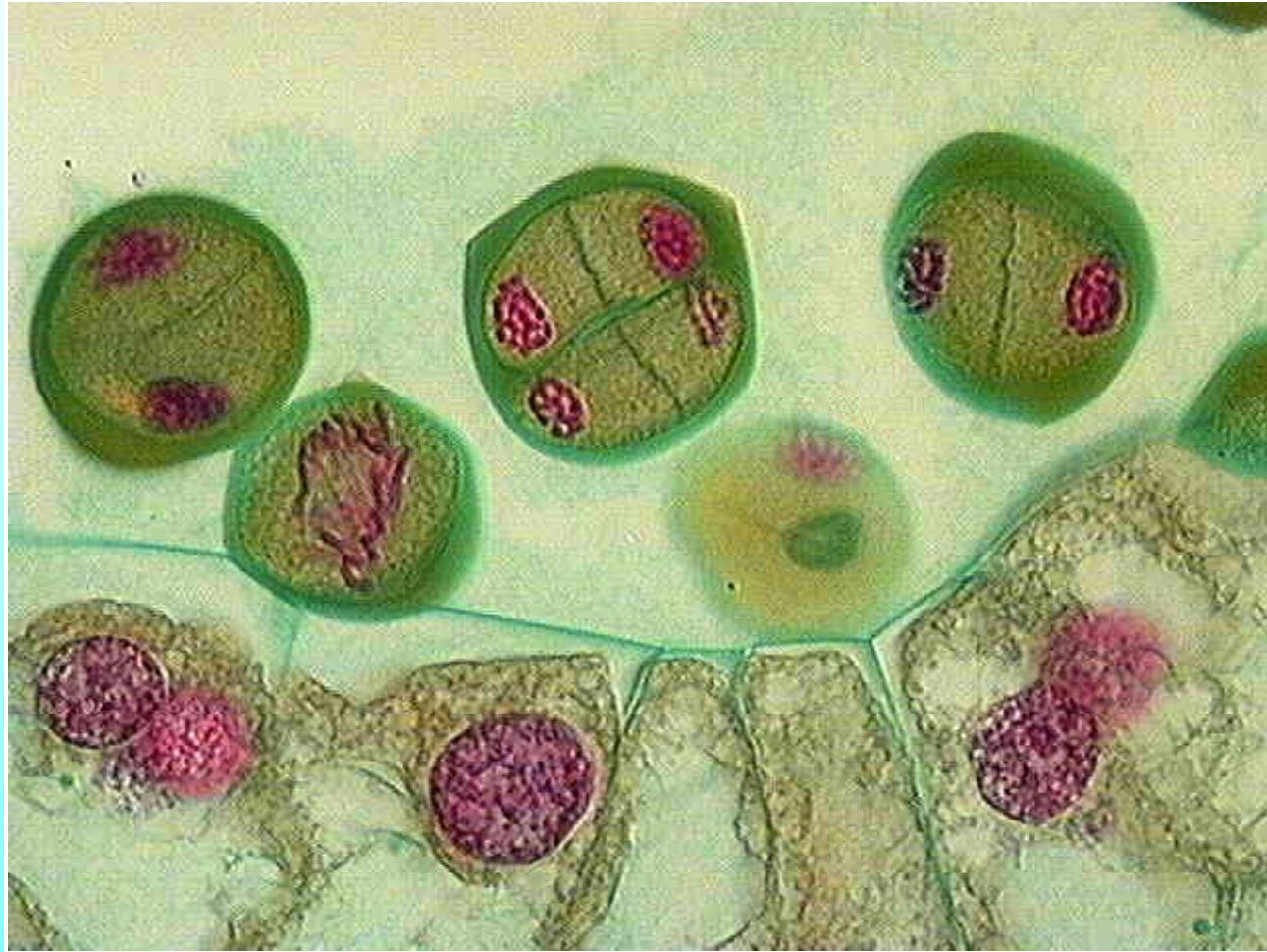


Lilium

IASPR

The chromosomes undergo a separation of chromatids during the second half of meiosis in a cycle similar to mitosis

Telophase II.

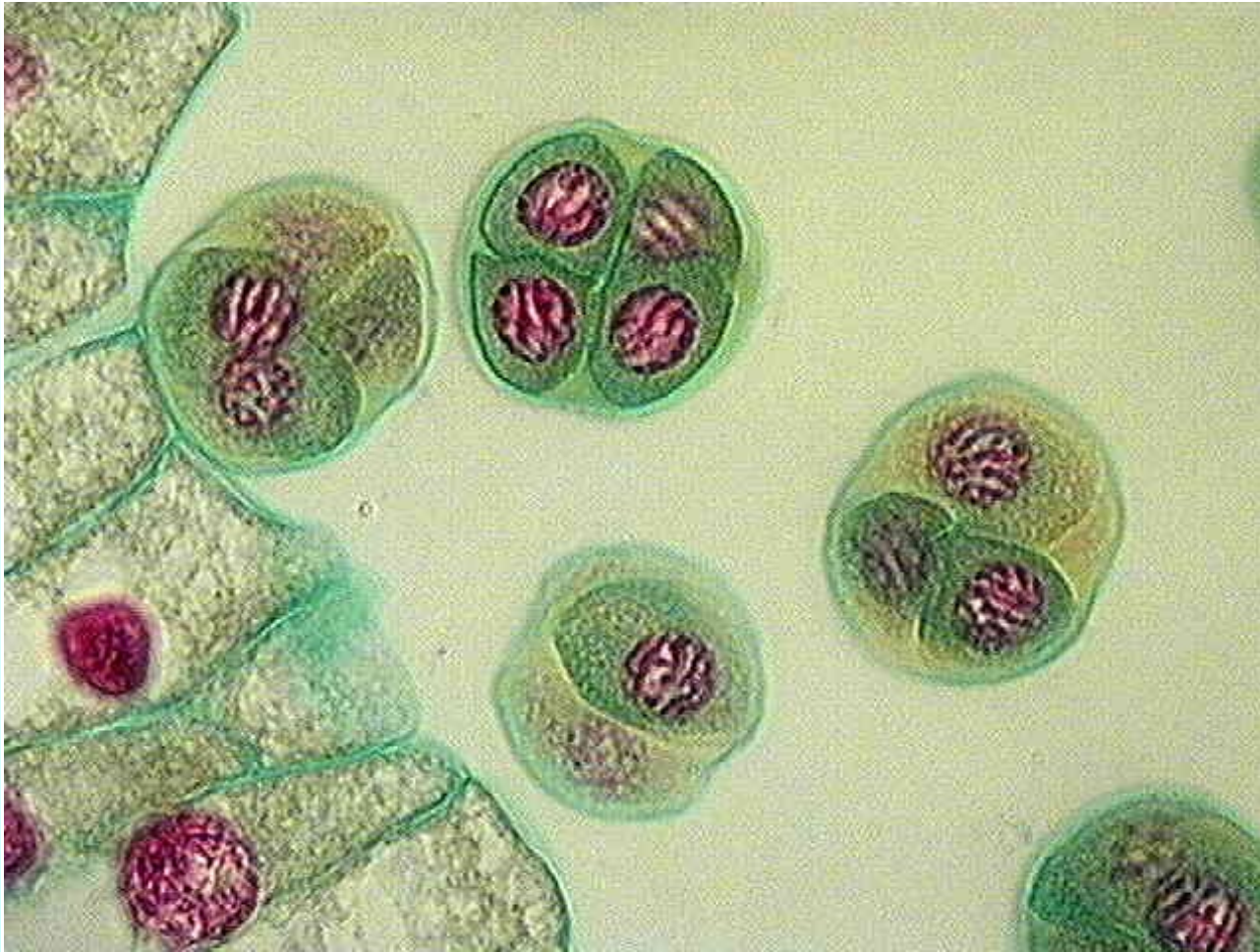


Lilium

IASPR

Cytokinesis between the members of **the tetrads** is completed. Separation of the cells from the microsporocyte wall occurs soon after.

Tetrads completing the callose stage

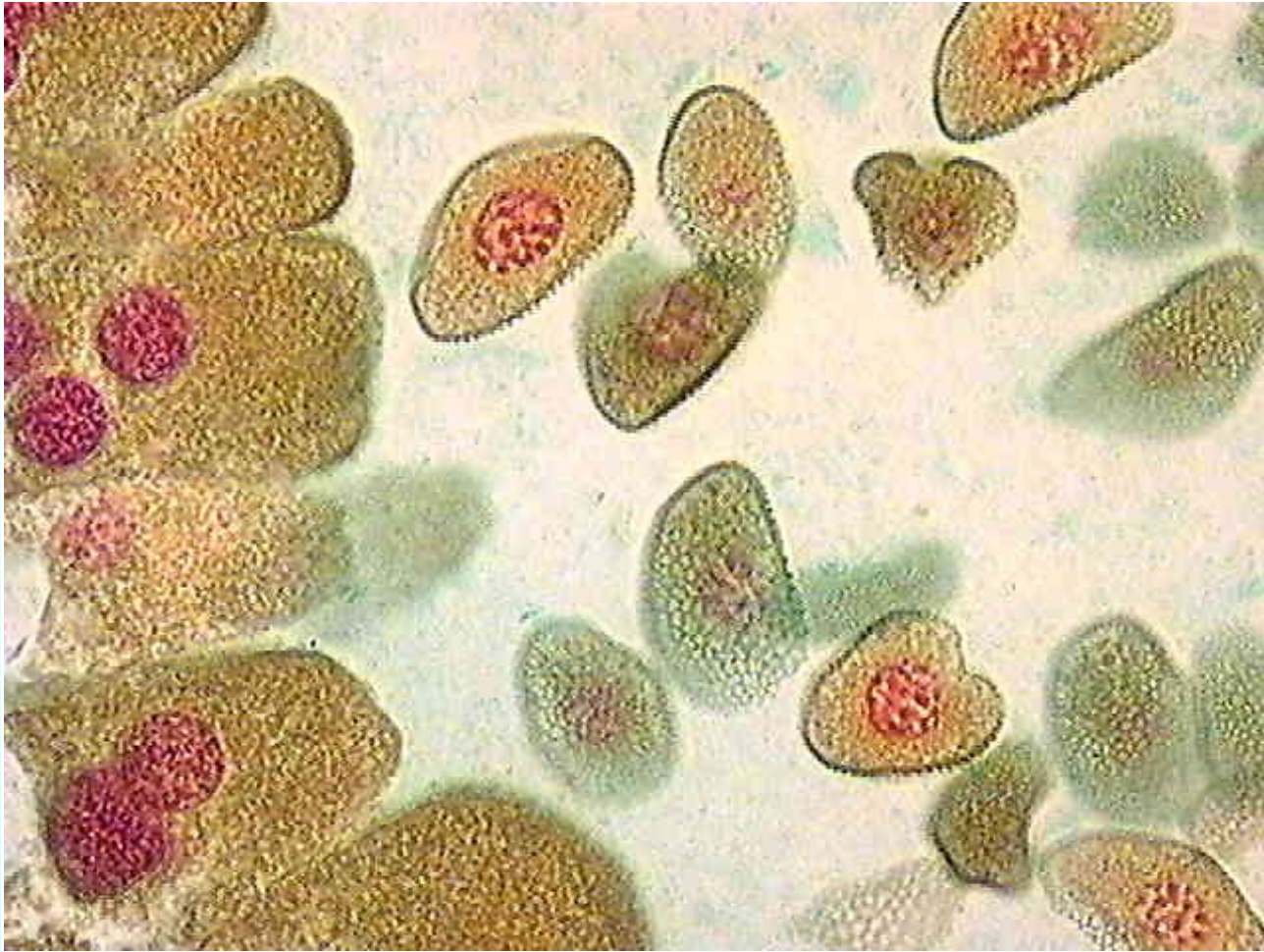


Lilium

IASPR

As microspores complete this stage, they elongate somewhat, becoming a bit football shaped

Released microspores

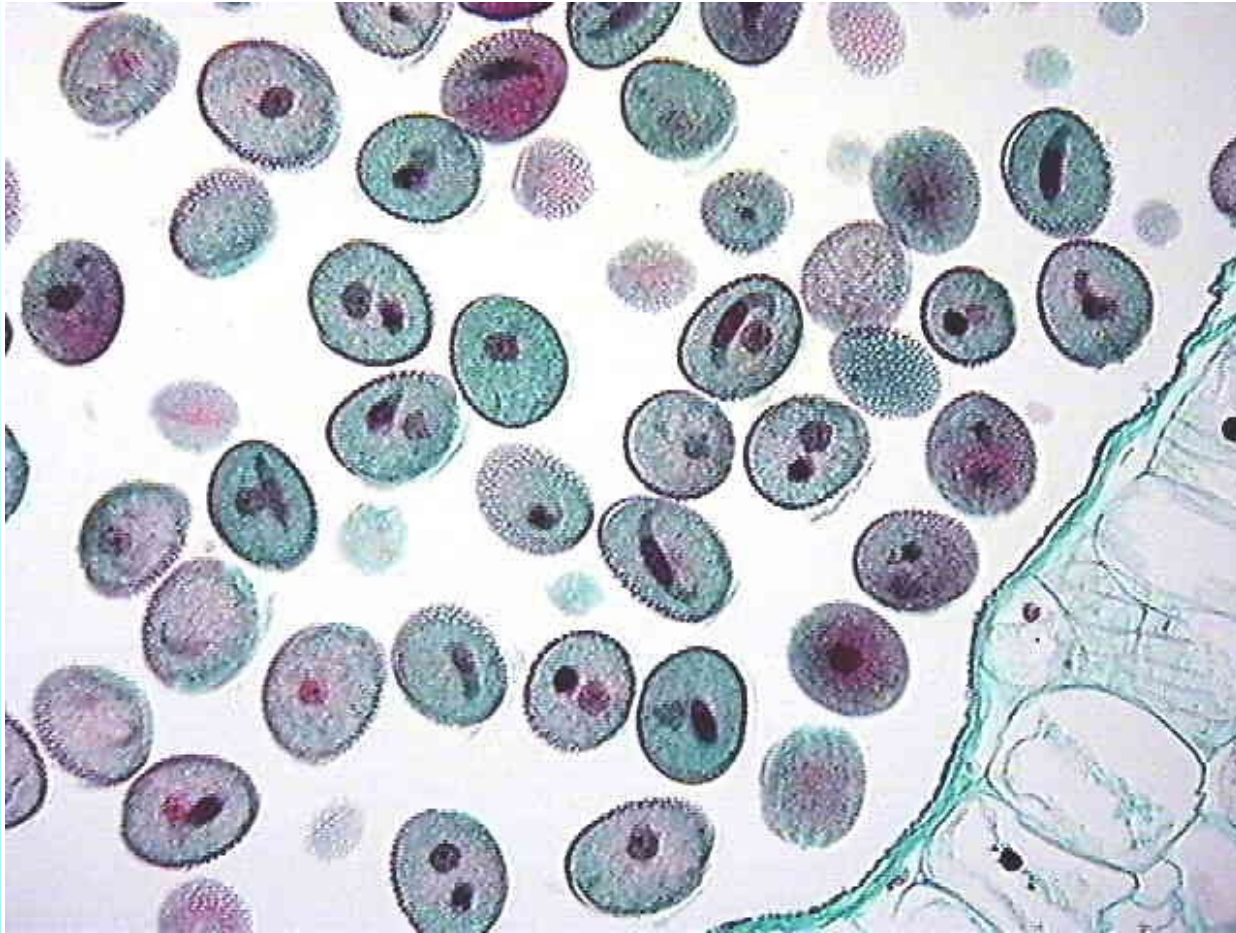


Lilium

IASPR

At this stage, microspores have an **exine** (outer wall of sporopollenin) but are still filling with storage materials and remain pliable for a short time.

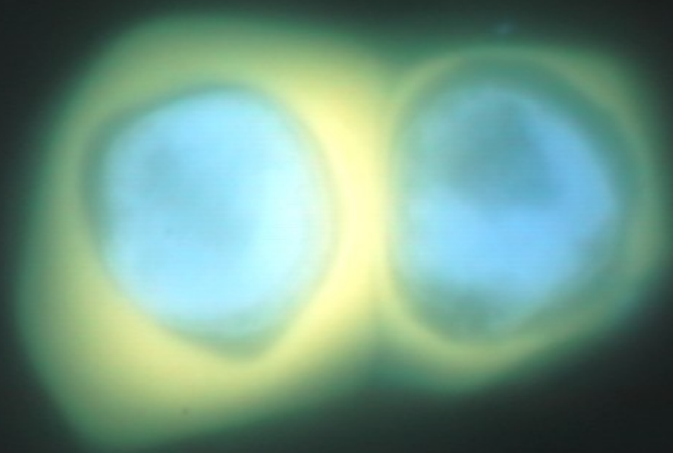
Bicellular pollen



Lilium

IASPR

Generative cells are first formed in contact with the intine (inner pollen wall), but the cells then become immersed in the cytoplasm - truly becoming "a cell within a cell".



metafáze I.dělení



počátek tvorby tetrád

Nicotiana tabacum L.

tetrády



mikrospora se zbytky kalózy



Typy androgeneze

přímá androgeneze =

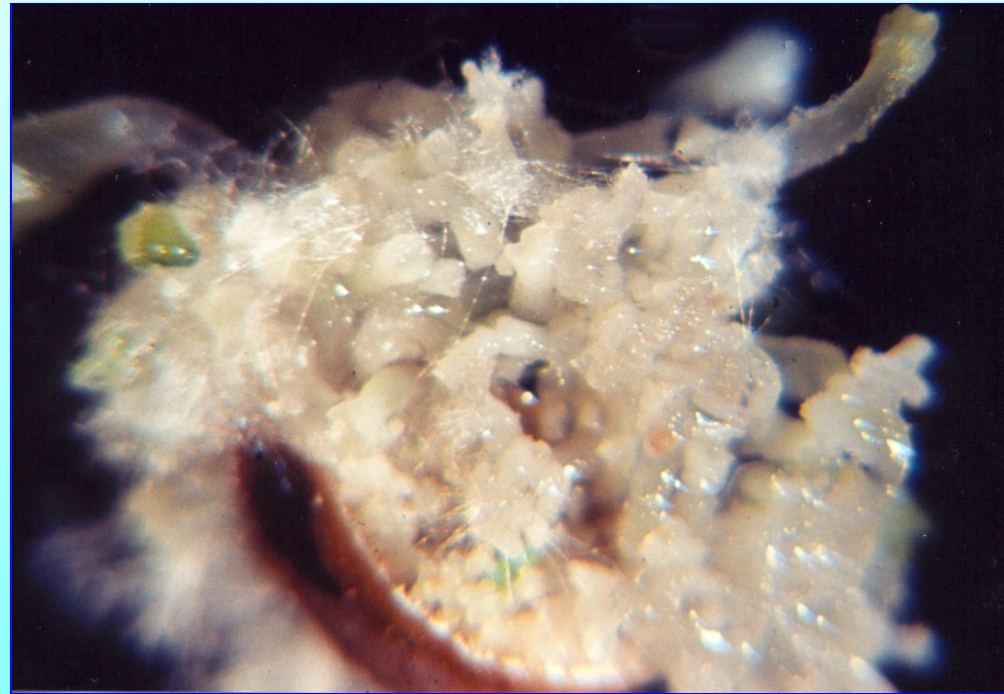
vývoj globulárního embrya a následně haploidní rostliny **přímo** z pylového zrna nebo mikrospory

nepřímá androgeneze =

z pylového zrna nebo mikrospory se vyvine napřed **haploidní kalus**

→ v něm indukce organogeneze

→ regenerace haploidní rostliny



přímá androgeneze na prašníku tabáku
Nicotiana tabacum L.

Foto: J. Dubová

Typy regenerace v prašниковých a mikrosporových kulturách

1. přímá androgeneze

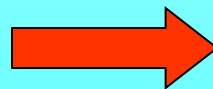
produkce haploidních rostlinek indukci embryogeneze opakovaným dělením mikrospory nebo mladého pylového zrna

2. nepřímá androgeneze

získání haploidního kalusu a z něj regenerace haploidních rostlin

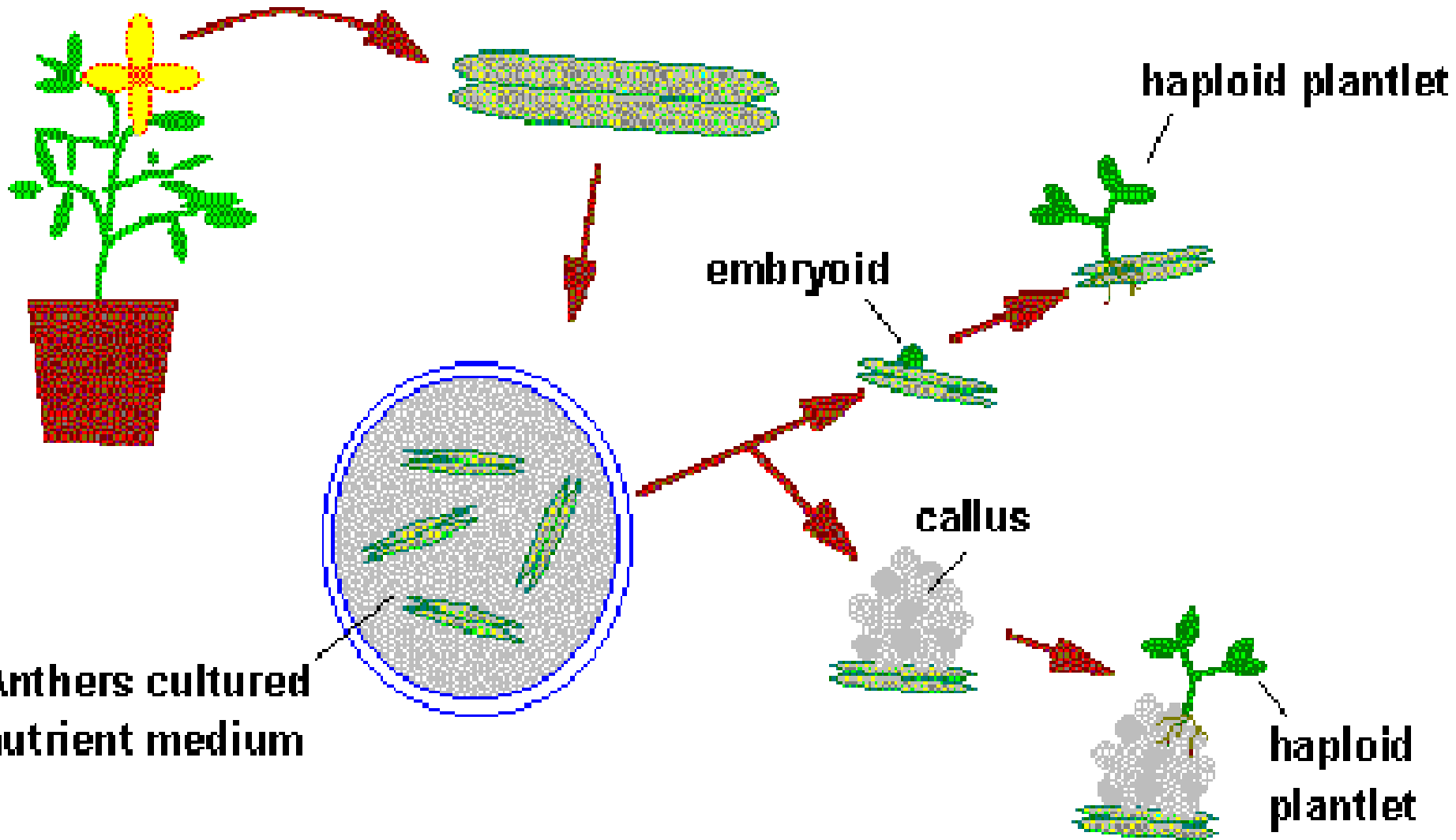
obnovení diploidního stavu

působením kolchicinu



fertilní homozygoti

přímá androgeneze



nepřímá androgeneze

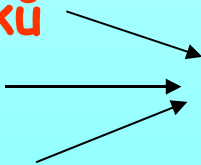
Předpůsobení

stres nízkou nebo vysokou teplotou

2-30 dny při teplotách 3-10°C (*Nicotiana*, *Datura*, *Brassica*)
nebo 35°C (*Capsicum*) může stimulovat embryogenesi

máčení oddělených květenství ve vodě po několik dnů =
stres hypoxický

centrifugace prašníků
aplikace vakua
aplikace kolchicinu



změny uspořádání mikrotubulů

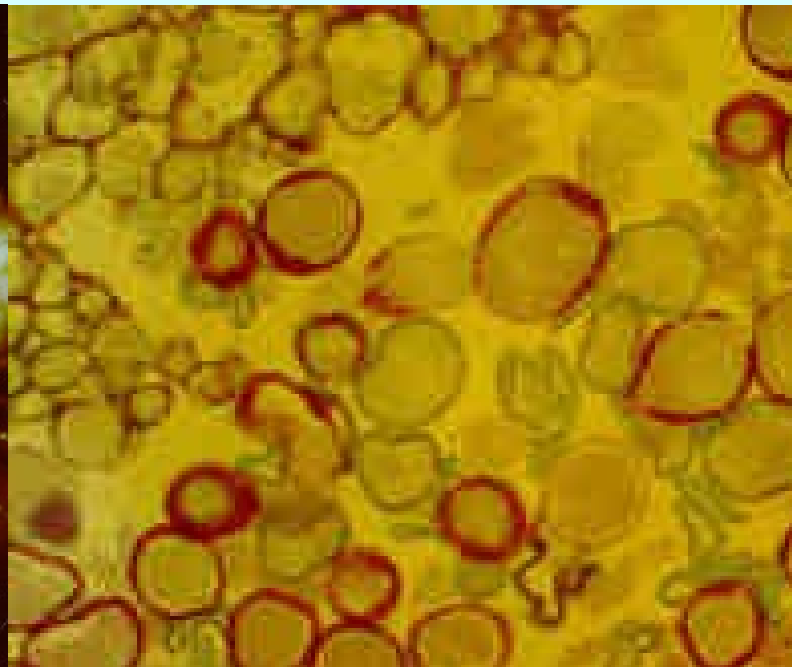
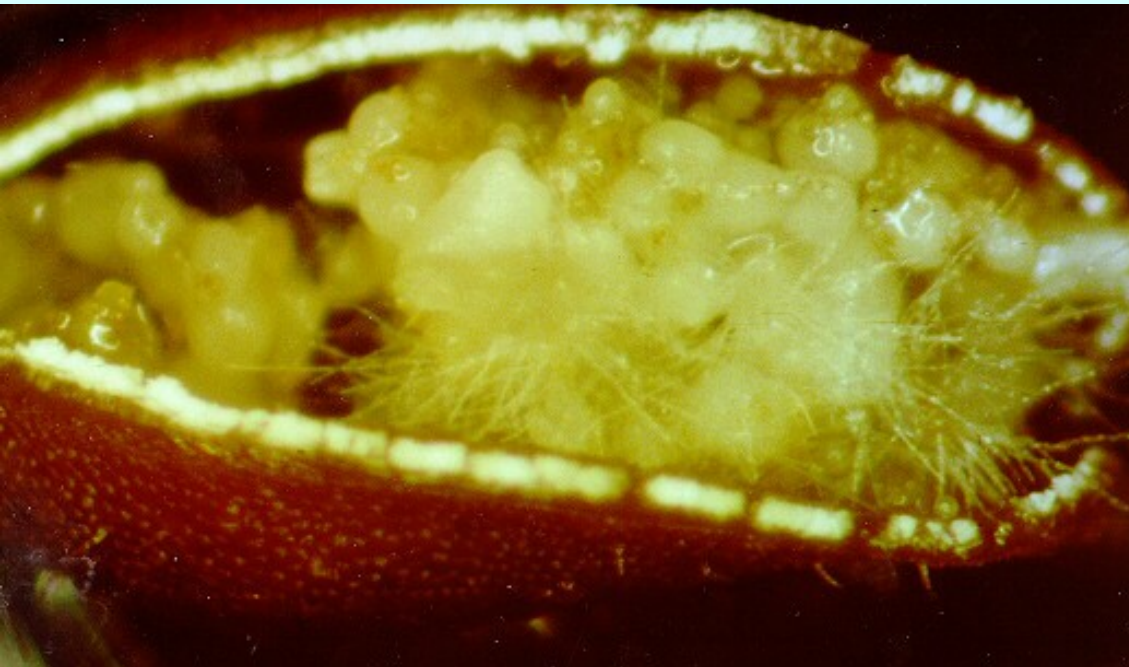
hladovění



změna polohy jádra

Androgeneze u tabáku

7 dní



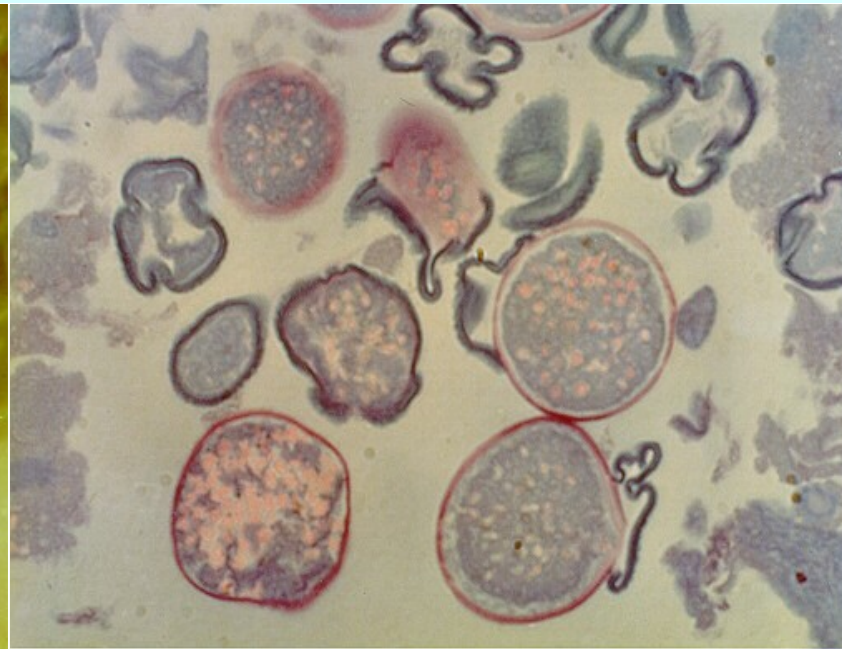
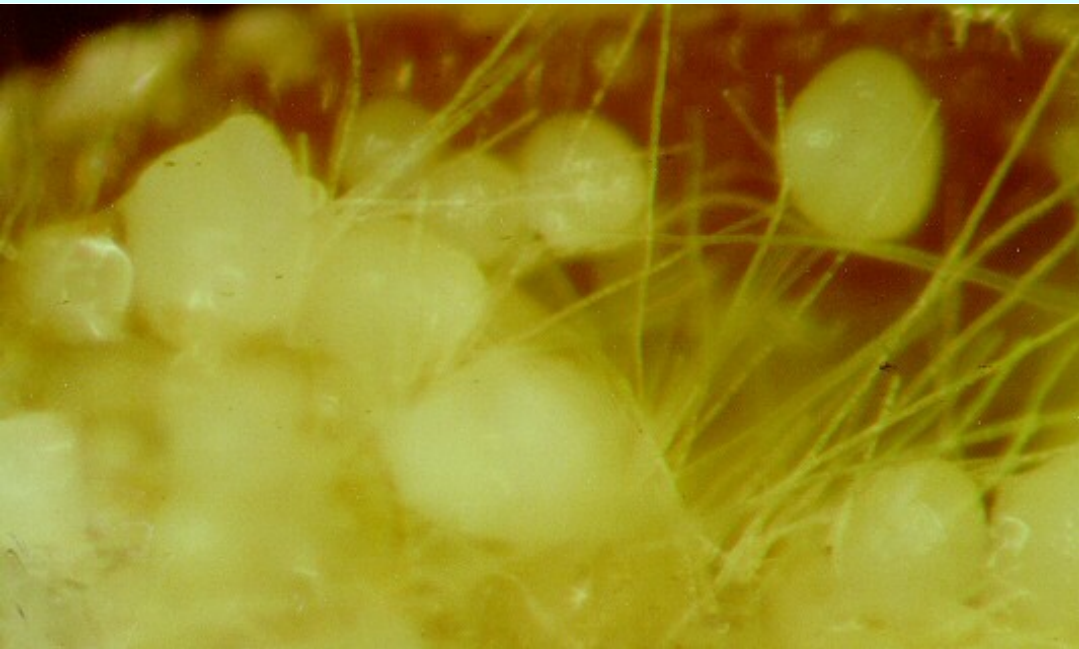
prašník s embryoidy

řez embryoidy

<http://users.ugent.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>

Androgeneze u tabáku

14 dní



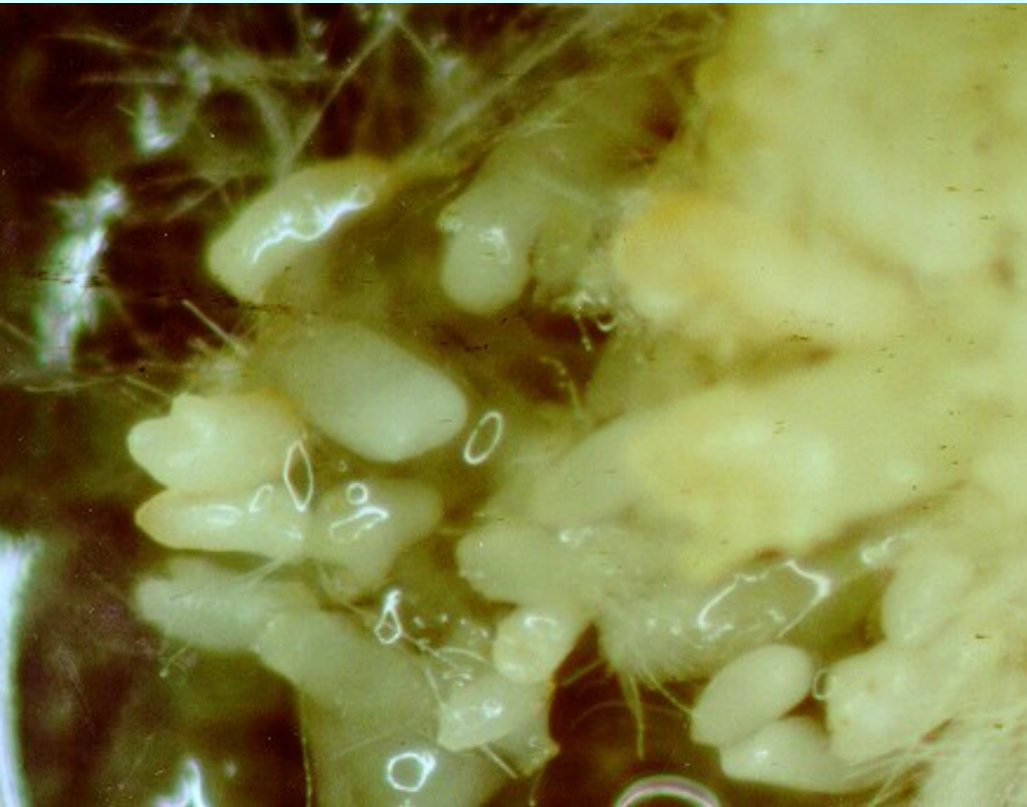
prašník s embryoidy

řez embryoidy

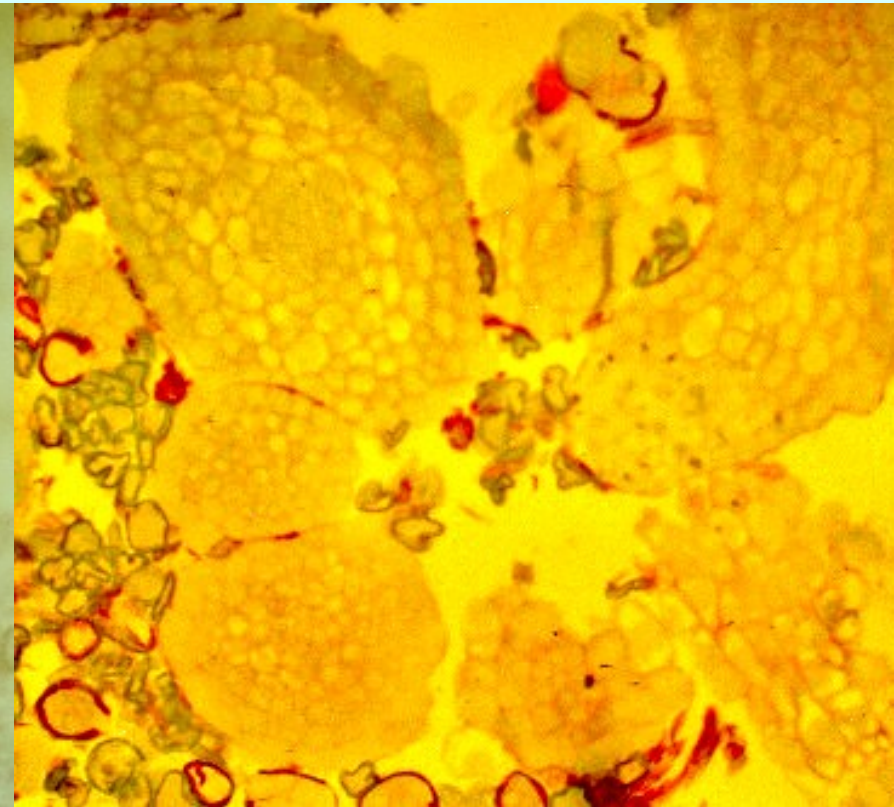
<http://users.ugent.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>

Androgeneze u tabáku

21 dní



prašník s embryoidy



řez embryoidy

<http://users.ugent.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>

Androgeneze u tabáku

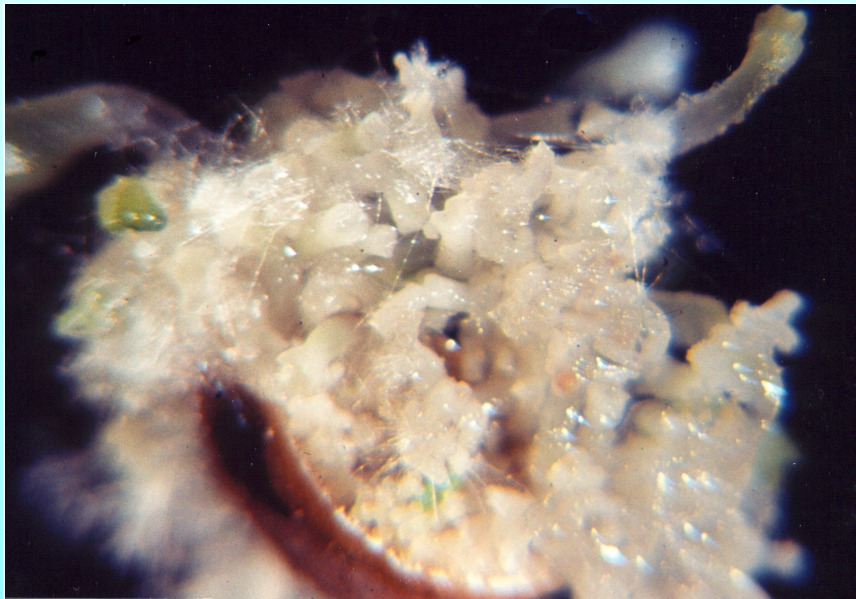
později



Prašník tabáku s vyvíjejícími se haploidními rostlinkami, vzniklými z mikrospor

<http://users.ugent.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>

Prašníkové kultury a regeneranti transgenní tabák - se Zmp60.1+MTX®



kvetoucí, ale sterilní
haploidní rostlina

Výhody mikrosporových kultur oproti kulturám prašnickovým

- v **prašnickových kulturách** často nedochází k indukci dělení mikrospor vlivem inhibičních látek z prašníku nebo nedostatečným kontaktem s živinami
- u **prašnickových kultur** se může vyskytnout rychlá proliferace diploidního pletiva stěny prašníku, nežádoucím výsledkem je pak heterozygotní diploid
- výsledkem **mikrosporové kultury** je vždy homogenní populace homozygotních rostlin
- u **mikrosporových kultur** je větší nebezpečí infekce

Vývojová stadia

nejdůležitějším faktorem pro získání haploidů je určité vhodné **vývojové stadium** v době odběru materiálu do kultury.

u některých krytosemenných rostlin mohou být selektována poupata, která obsahují prašníky v různých vývojových stadiích.

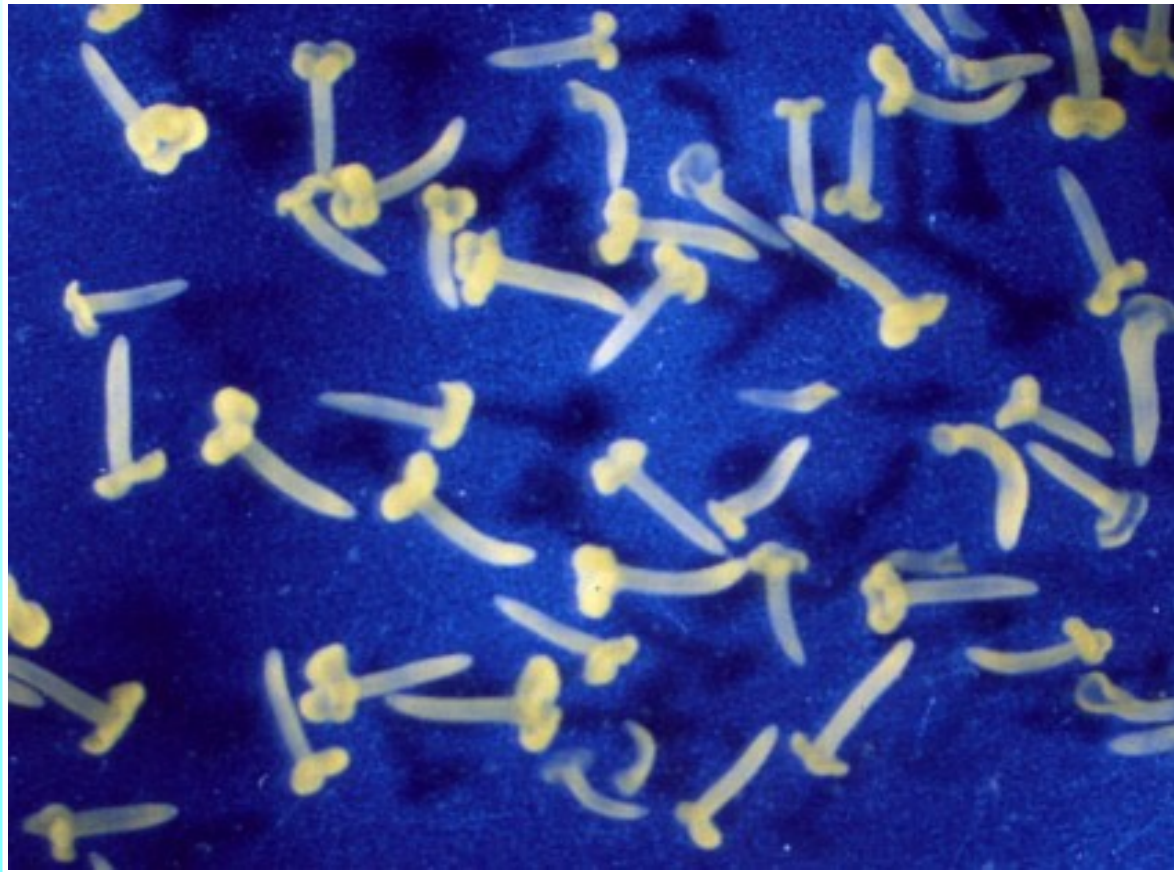
pyl může být frakcionován centrifugací na **percollovém gradientu**.

u druhů **s určitým počtem prašníků** ve květu je nutno testovat celou sérii pupenů, aby byla zřejmá vývojová stadia. Některé snadno rozlišitelné znaky se potom používají pro charakteristiku žádaného vhodného stadia (délka poupěte, poměr délek květních obalů: např. u tabáku - koruna je jen o něco málo delší než kališní ušty; stadium 2).

Vývojová stadia poupat tabáku *Nicotiana tabacum* L.



Suspenze embryí z mikrospor *Brassica napus*



R. Wellens - in: katalog Duchefa 1996

2. Gynogeneze

Tvorba haploidních regenerantů
ze samičího gametofytu

Gynogeneze

- tvorba haploidních rostlin z neoplozené vaječné buňky (samičí partenogeneze)
- embryo tak obsahuje pouze mateřské chromosomy, protože nedošlo k fúzi spermatické buňky s buňkou vaječnou
- indukce gynogeneze *in vitro* = kultivace vajíček nebo semeníků

Poznámka na závěr

- Žádná z metod pro získání haploidů **není univerzální** pro všechny druhy.
- Všechny dosud užívané cesty k haploidii je možné využít (indukovat) pouze **v omezeném = krátkém vývojovém stadiu** života rostliny.