

Opylování *in vitro*

Test-tube
pollination/fertilization



Pulsatilla grandis, Brno Stránská skála, 6.4.2003

Rožmnořování u rostlin

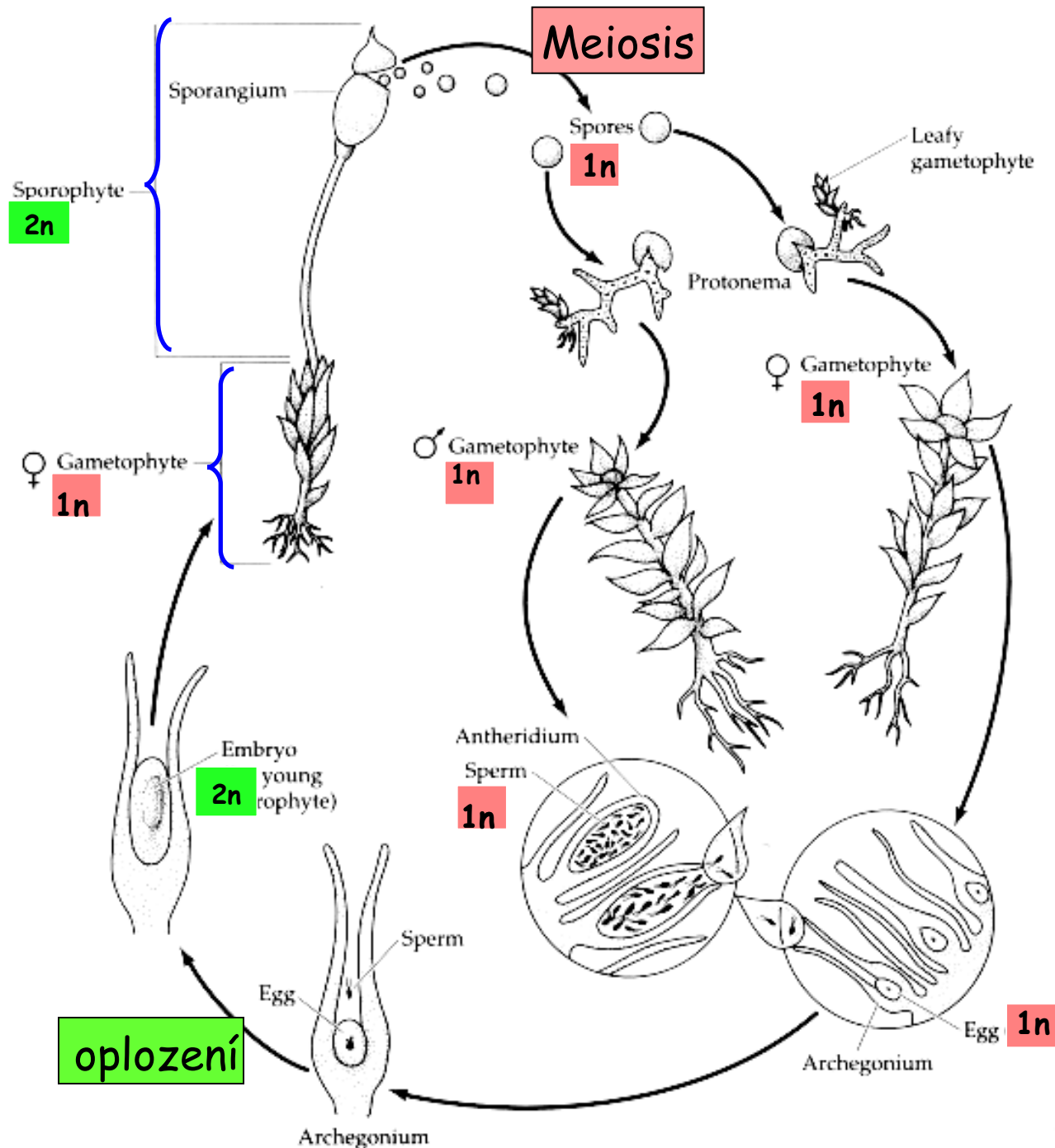
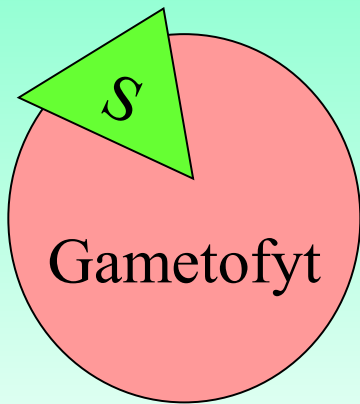
- **vegetativní rořmnořování (amixis)**
 - fragmentace
 - cibulky, hlízky
 - rhizomy
- **generativní rořmnořování (amfimixis)** - specializované struktury - vývoj pohlavních buněk + mechanismus zajiřtující jejich řúzi
- **apomixis** - zvlářtní varianty rořmnořování - „vegetativní množení z generativních orgánů“ - semena jsou tvořena bez oplození

Fáze životního cyklu u rostlin

- Životní cyklus = střídání fází = **rodozměna**
- **Sporofyt - $2n$** - diploidní generace produkující haploidní **spory**
- **Gametofyt - $1n$** - haploidní generace produkující samčí nebo samičí pohlavní buňky (**gamety**), jejichž splynutím vzniká diploidní **zygota**

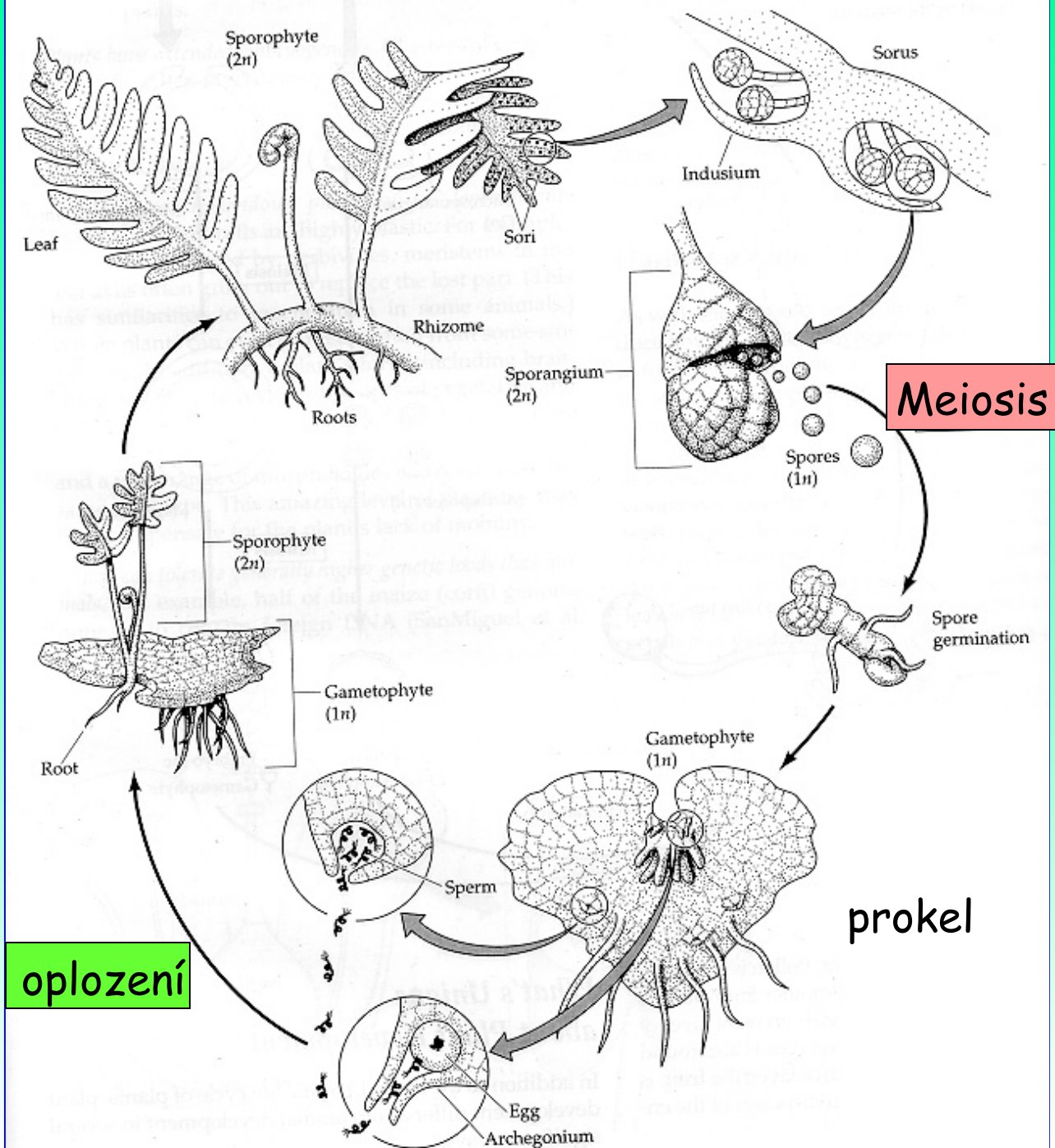
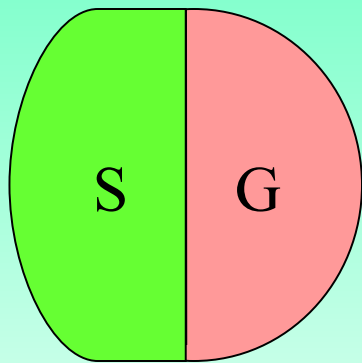
Rodozměna u mechorostů

embryo i zralý sporofyt jsou závislé na fotosyntéze gametofytu



Rodozměna u kapradin

sporofyt i gametofyt je schopný fotosyntézy



oplození

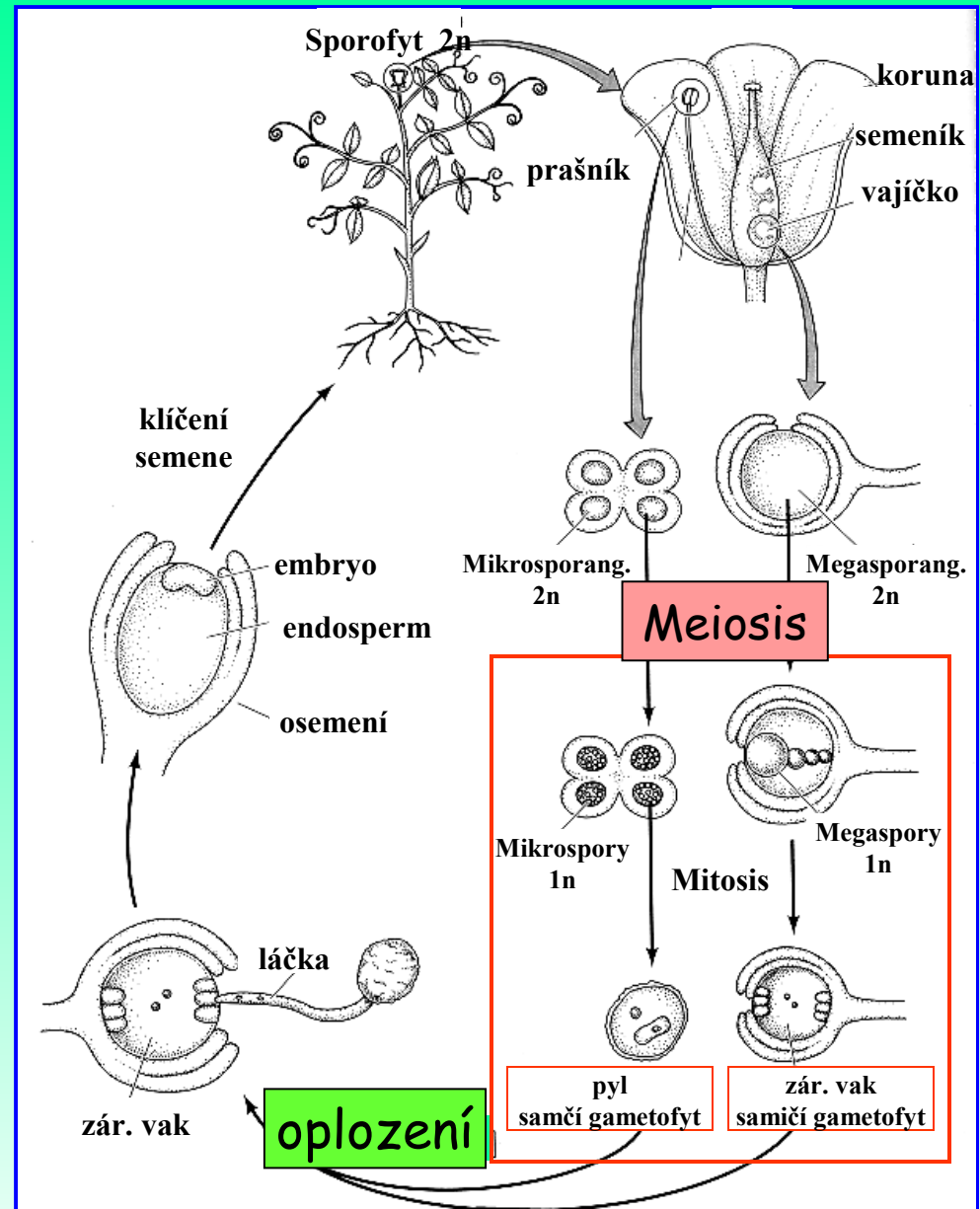
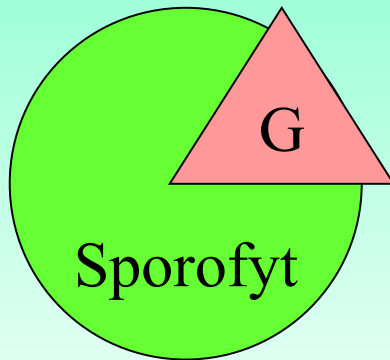
Meiosis

prokel

Rodozměna u krytosemenných rostlin

Gametofyty jsou závislé na fotosyntéze sporofytu

gametofyty jsou velmi redukované a rodozměna je tak zastřena



Funkce generací při oplození u krytosemenných rostlin

sporofyt tvoří:

struktury chránící a
vyživující gametofyt
struktury pro zachycení
a rozpoznání pylu
struktury umožňující
ochranu a rozšiřování
semen

gametofyt = tvořen malým
počtem silně
specializovaných buněk:
zárodečný vak s jedinou
vaječnou buňkou

pylová láčka se dvěma
spermatickými buňkami

Schéma stavby květu a prašníku

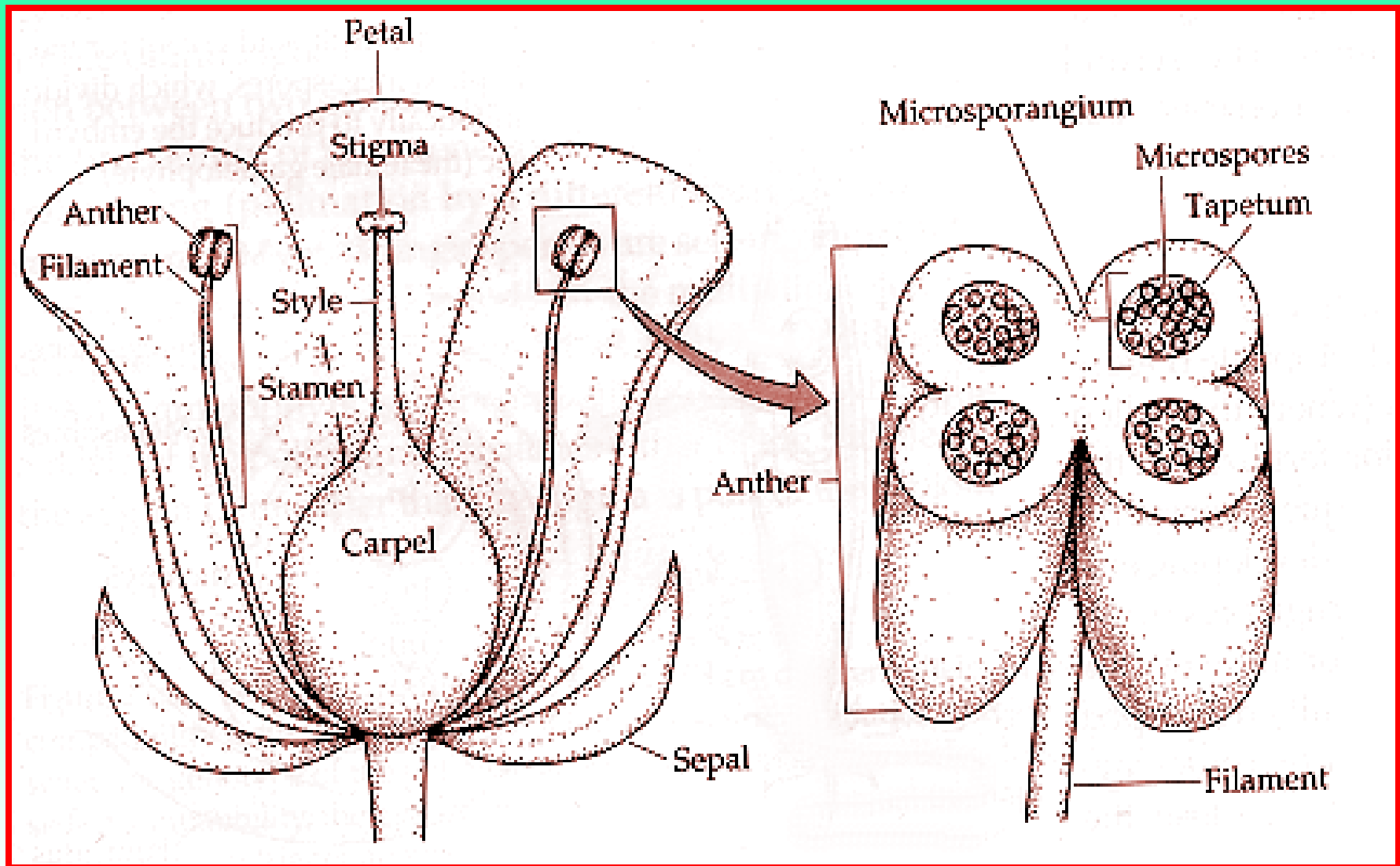
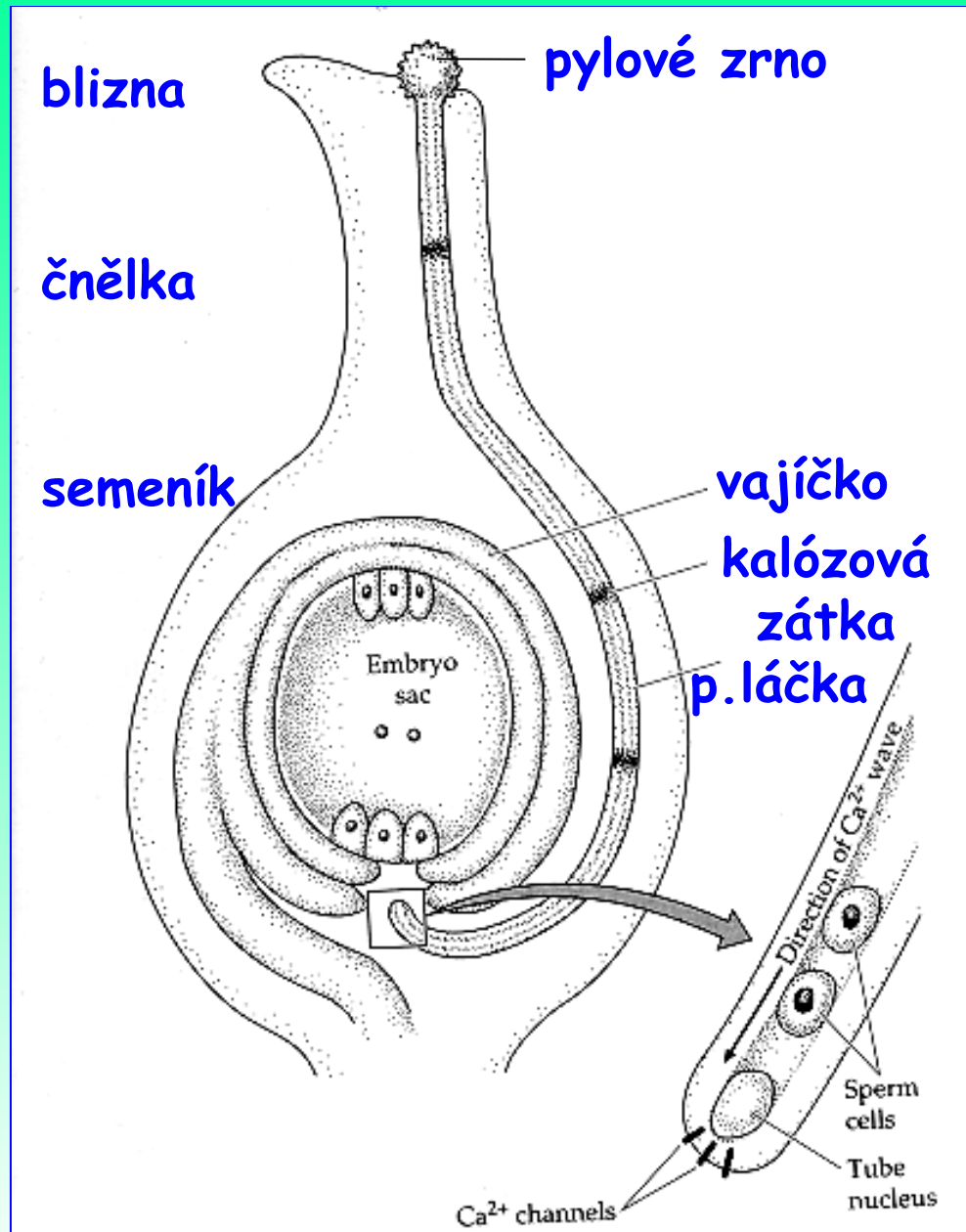


Schéma gynecea s vajíčkem

pestík =
soubor plodolistů =
gynaecium



Místa interakcí v pestíku

Povrch pylového zrna:
pylový tmel
proteiny ve sporodermě

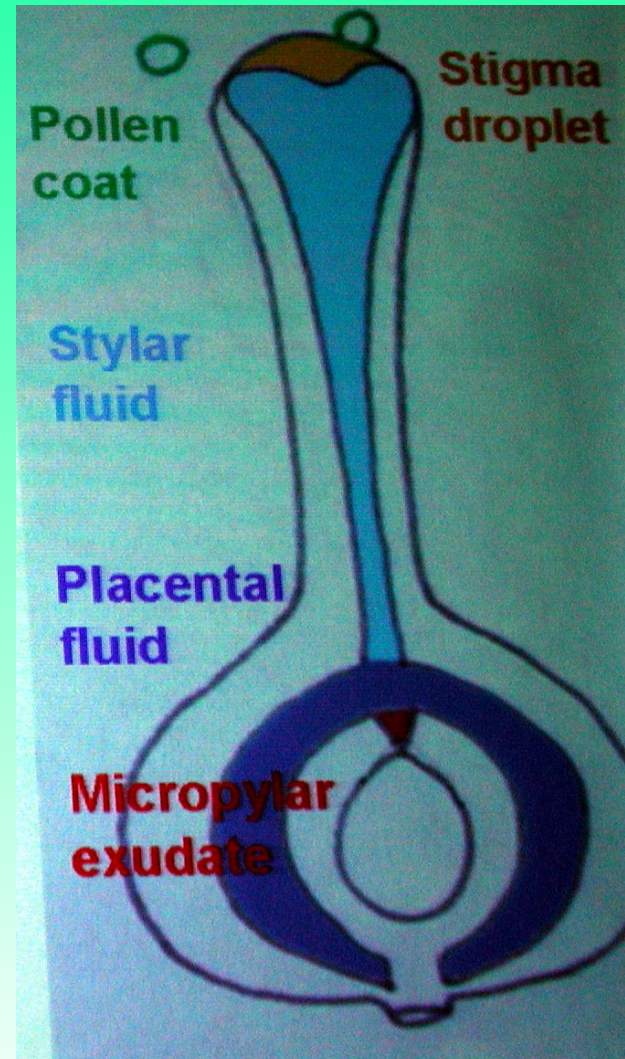
Bliznový exudát

Tekutina kanálu čnělky

Placentární tekutina

Exudát mikropyle

Willemssee (*Haworthia*)



Bariéry oplození

- **vnější**

- nepřiměřená teplota a vlhkost
- nedostatečná výživa
- působení fyzikálních nebo chemických vlivů

- **vnitřní**

- prezygotické**

- inkompatibilita
- inkongruita (nedostatek informace a koordinace)
- samčí nebo samičí sterilita

- postzygotické**

- malformace vývoje endospermu
- bariéry klíčení embrya

Inkompatibilita (neslučitelnost)

- neschopnost rostlin tvořit semena, přestože mají funkční gamety
- před 200 lety - **Kölreuter** - *Verbascum* - po samoopylení netvořila semena, zatímco po cizosprášení ano
- **Stout (1917)** - studium fertility *Cichorium intybus*

Typy inkompatibility

- **vnitrodruhová** (autoinkompatibilita)
 - heteromorfní (distylie, tristylie)
 - homomorfní
 - sporofytického typu
 - gametofytického typu
- **mezidruhová**
- **mezirodová**

Funkce inkompatibility

- **zabránění samoopylení**
 - podporuje cirkulaci genů v populaci

- **zabránění mezidruhovému nebo vzdálenějšímu (mezirodovému) křížení (zábrana „gene flow“)**
 - podporuje stabilitu druhu

Inkompatibilita sporofytického typu

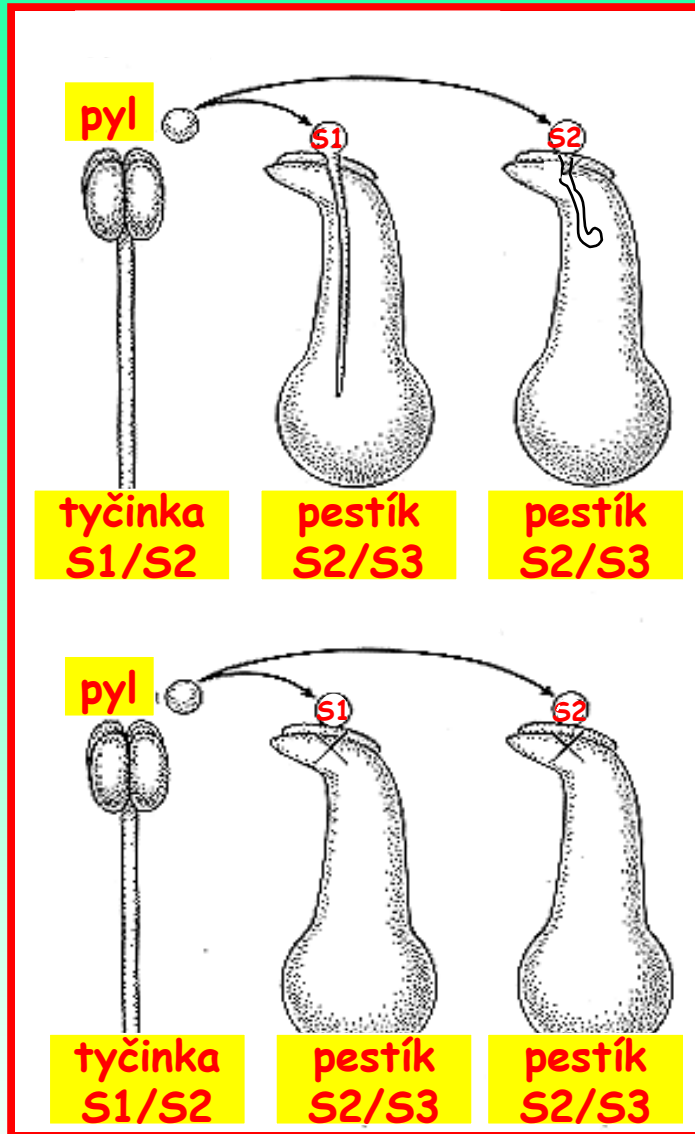
- je daná genotypem rostliny, která produkuje pyl (**sporofytem**). Bez ohledu na genotyp si pyl ponechává fenotypovou reakci dominantní alely
- projevuje se **již na povrchu blizny** (proteiny z tapeta)
- suché blizny a 3 buněčný pyl

Inkompatibilita gametofytického typu

- je určována genotypem samotného pylového zrna (**gametofytu**)
- projevuje se **až při prorůstání pylových láček** přes pletiva čnělky a zárodečného vaku - zastavování růstu pyl. láček
- vlhké blizny
 - u čeledí *Viciaceae*, *Solanaceae*

Inkompatibilita

gametofytického
typu



sporofytického
typu

Překonání inkompatibility

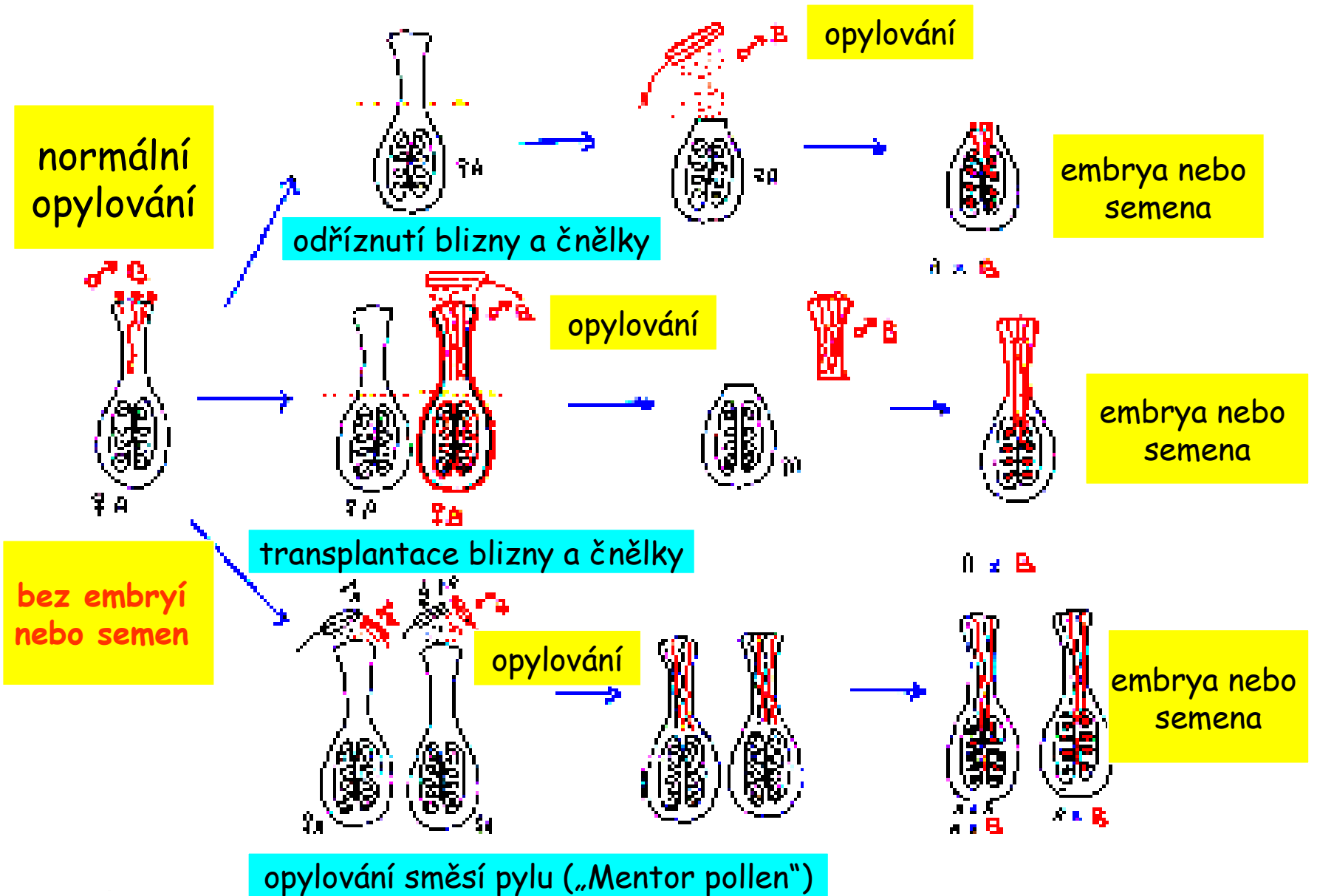
umělé opylování *in situ*

opylování *in vitro*

Umělé opylování *in situ*

- opylení nezralých blizen
- teplotní šoky
- ovlivnění blizen (organická rozpouštědla, růstové regulátory, vitamíny, cukry, extrakty z kompatibilních blizen, „mentor pollen“)
- odříznutí blizny a čnělky
- intraovarijní opylení
- transplantace blizen

Umělé opylování *in situ*



Opylování *in vitro*

1. intraovarijní - pyl v suspenzi
2. bliznové
3. placentární
4. izolovaná vajíčka
5. oplození izolovaných gamet

Předpoklady úspěchu

- znalost vhodného vývojového stadia
- zajištění média pro klíčení pylu i vývoj embrya

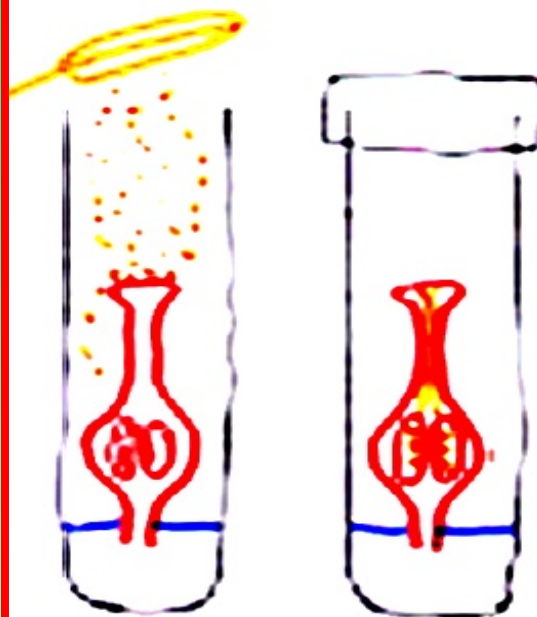
Intraovarijní opylování *in situ*

- Capelleti (1937) *Digitalis*
- Bossio (1940) *Helleborus, Paeonia*
- Dahlgren (1926) *Codonopsis*
- Kanta (1960) *Papaver, Escholzia*
- Niemirowicz-Szczytt *et* Kubicki (1979)
Cucurbita x Cucumis

opylování *in vitro*



Johri 1984



*bliznové
opylování*



*placentární
opylování*

Bliznové opylování *in vitro*

- Usha (1965) *Antirrhinum*
- Balatková *et* Tupý (1973) *Antirrhinum*
- Dulieu (1966), Rangaswamy (1972) *Nicotiana*
- Sladký *et* Havel (1976), Gengenbach (1977), Raman (1980) *Zea*
- Uralec (1981) *Lycopersicon*

Placentární opylování *in vitro*

- Kanta (1960) *Papaver*
- Zenkteler (1965) *Dianthus, Melandrium, Silene*
- Balatková *et* Tupý (1968) *Nicotiana, Narcissus*
- Zůbková *et* Sladký (1975) *Nicotiana, Papaver, Agrostemma, Melandrium*
- Sladký *et al.* (1982) *Chionodoxa*

Segment placenty máku 1T po izolaci a opylení in vitro



Podmínky pro opylování *in vitro*

- semeníky mají **velký počet vajíček** (*Solanaceae*, *Papaveraceae*, *Silenaceae*)
- **minimální poškození** vajíček při izolaci
- **životaschopný pyl**, klíčivý
- **masivní růst** pylových láček
- znalost **receptivity**

Klíčící pyl *Galanthus nivalis* *in vitro*

pylové zrno

pylová láčka



Podmínky pro opylování *in vitro*

- znalost času anthesis
- znalost dehiscence prašníků
- informace o klíčení pylu a rychlosti růstu pylové láčky
- životaschopnost a receptivita vajíček

Opylování izolovaných vajíček

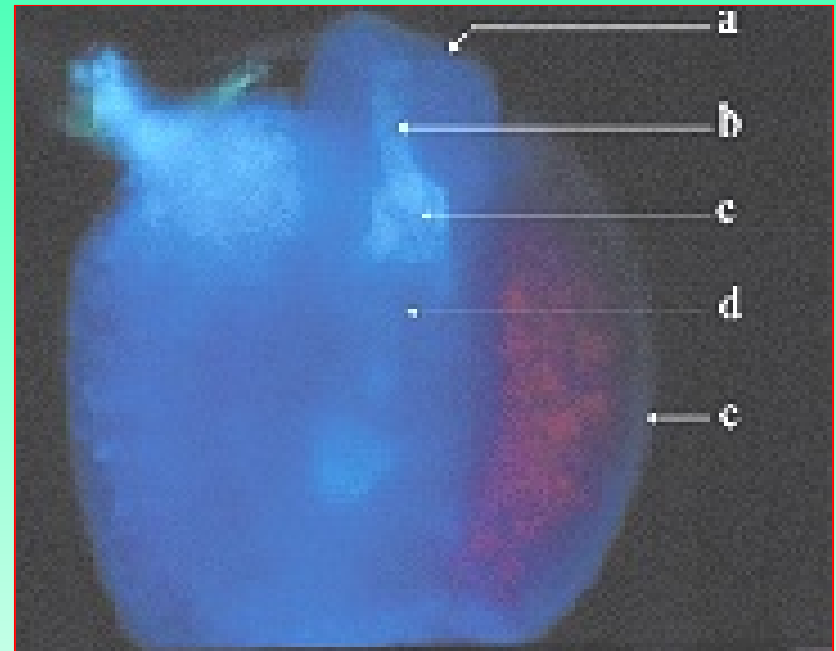
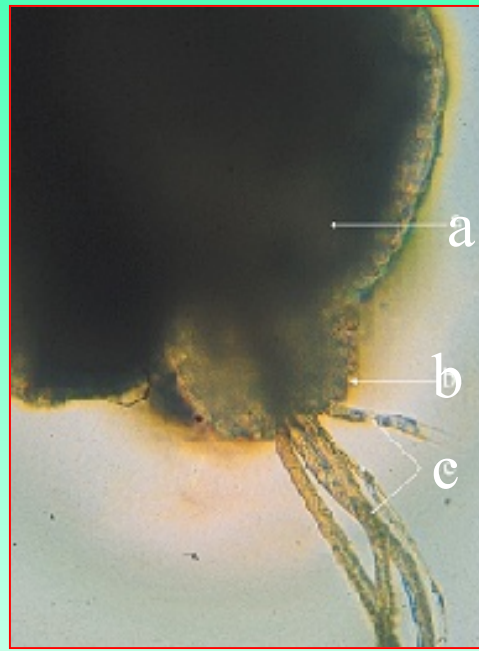
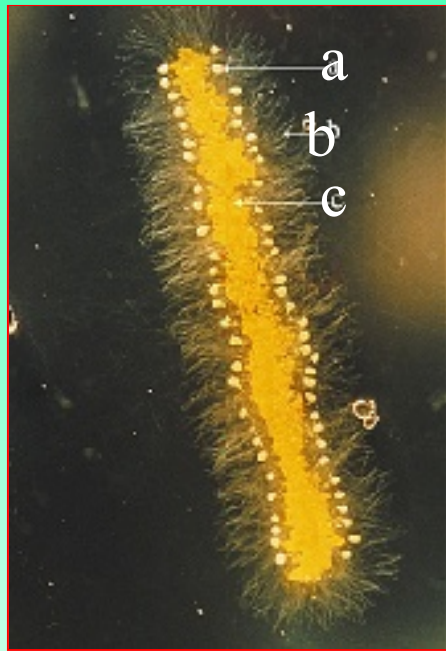
- Kameya (1966, 1970)
- Chi (2000)

Brassica

Lilium

Opylování izolovaných vajíček

CHI (Bot. Bull. Acad. Sinn. (2000) 41: 143 - 149



a = vajíčka
b = pyl.láčky
c = pyl

detail mikropyle
s pyl. láčkami (c)

pylové láčky v mikropyle (b)
a synergidách (c)

Oplození izolovaných gamet *Zea* (Kranz *et* Lörz, Univ. Hamburg)

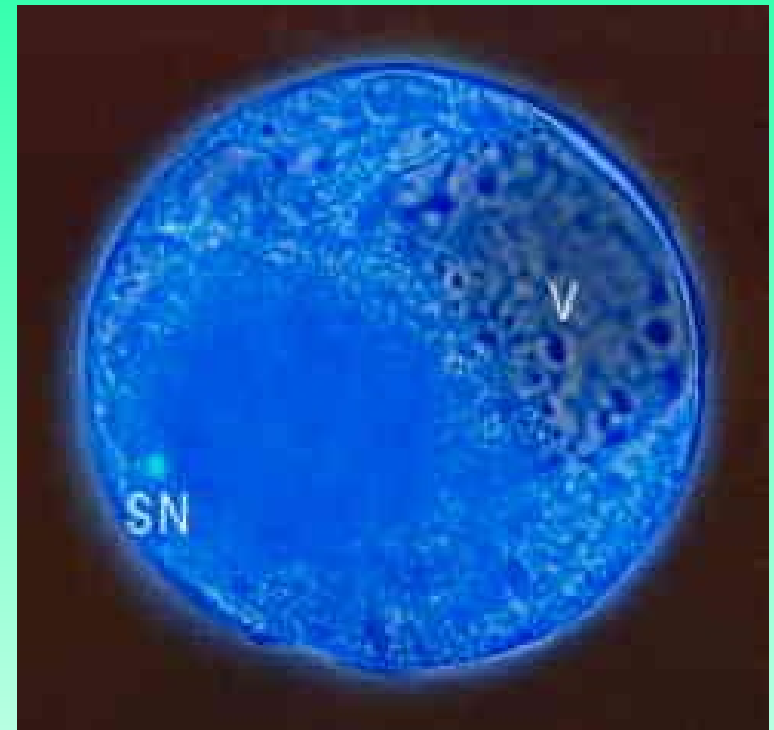
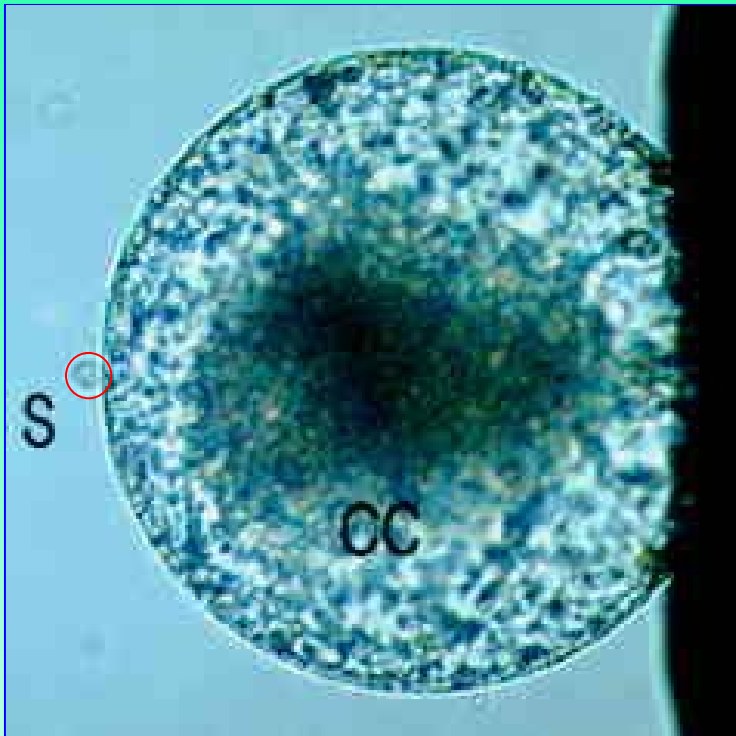


enzymatická izolace buněk
zárodečného vaku

Izolované a spojené buňky zárodečného vaku kukuřice:
vaječná buňka (E), centrální buňka (CC) a dvě synergidy (SY)

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/kranz/1996.htm>

Oplození izolovaných gamet centrální a spermatická buňka kukuřice



vlevo: spermatická buňka (S) a centrální buňka (CC) připojené na jednu elektrodu před fúzí buněk

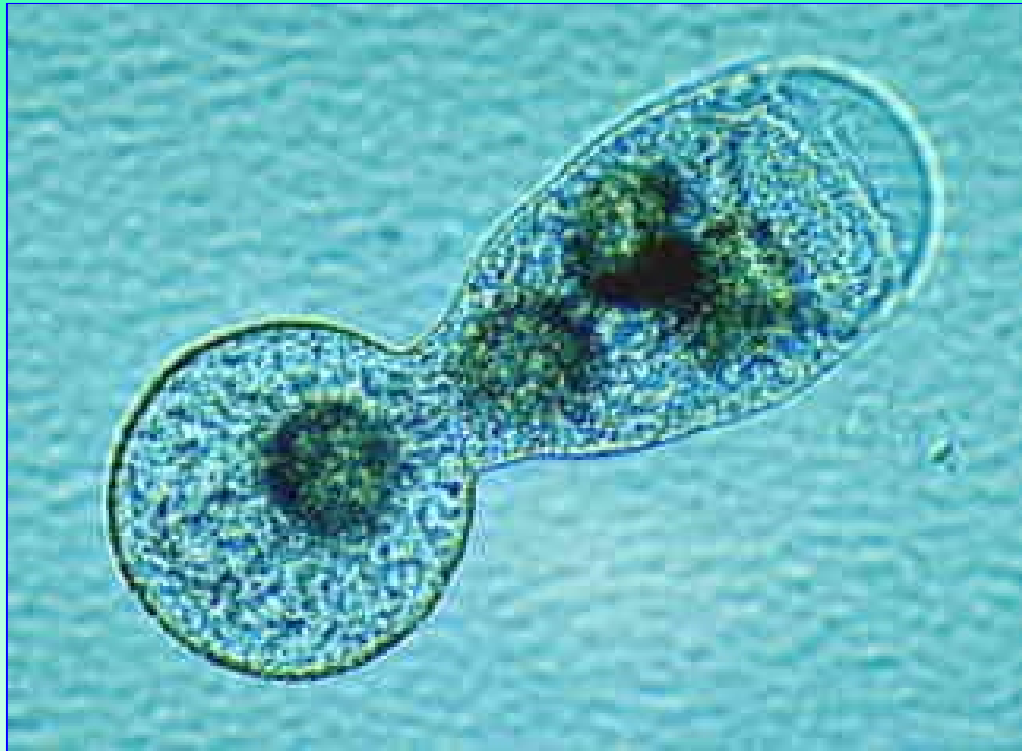
vpravo: jádro spermatické buňky (SN) uvnitř *in vitro* oplozené centrální buňky, barvení DAPI 1 hod. po fúzi buněk, pozorováno epifluorescenčním mikroskopem, (V) velká vakuola. (Kranz *et al.*, 1998)

Oplození izolovaných gamet kukuřice - splývání jader (Univ. Hamburg)



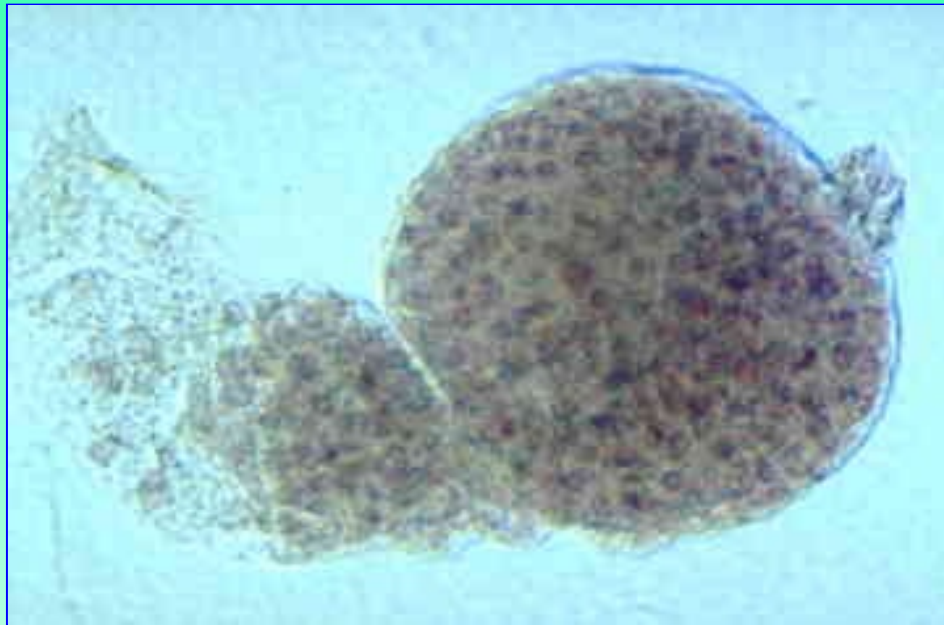
Izolované jádro centrální buňky kukuřice s integrovaným jádrem spermatické buňky (SN). Karyogamie po 150 min po *in vitro* fúzi spermatické a centrální buňky. (N) velké jádérko. Světelná/epifluorescenční mikroskopie po DAPI barvení (Kranz *et al.*, 1998)

Oplození izolovaných gamet primární endospermální buňka kukuřice (Univerzita Hamburg)



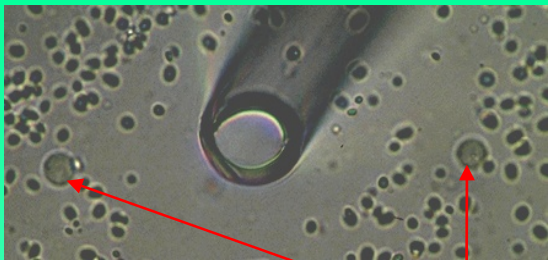
primární endospermální buňka kukuřice vytvořená *in vitro*
po 1 dnu kultury (Kranz *et al.*, 1998)

Oplození izolovaných gamet endosperm kukuřice po 5 DK (Univ. Hamburg)



Feulgenovou reakcí barvené buňky endospermu kukuřice vytvořené *in vitro* -
po 5 dnech kultury. (Kranz *et al.*, 1998)

Okamoto
Brno 2003

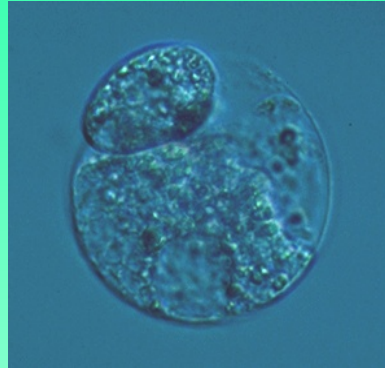


Sperm cell



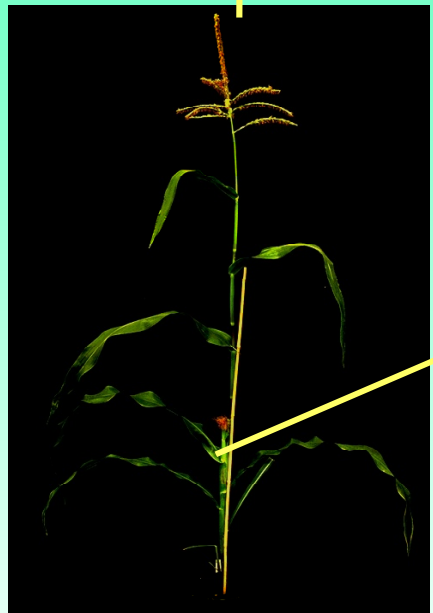
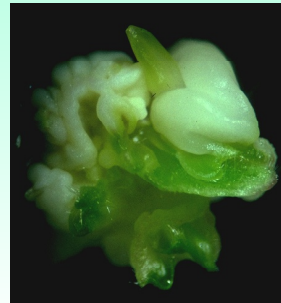
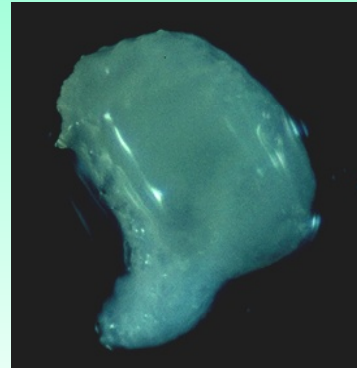
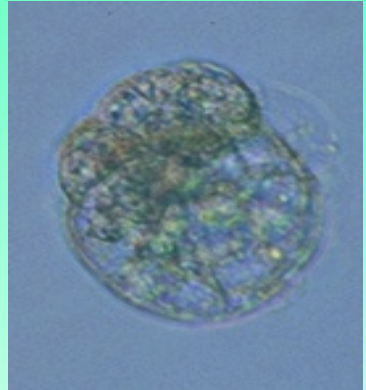
Egg cell

oplození

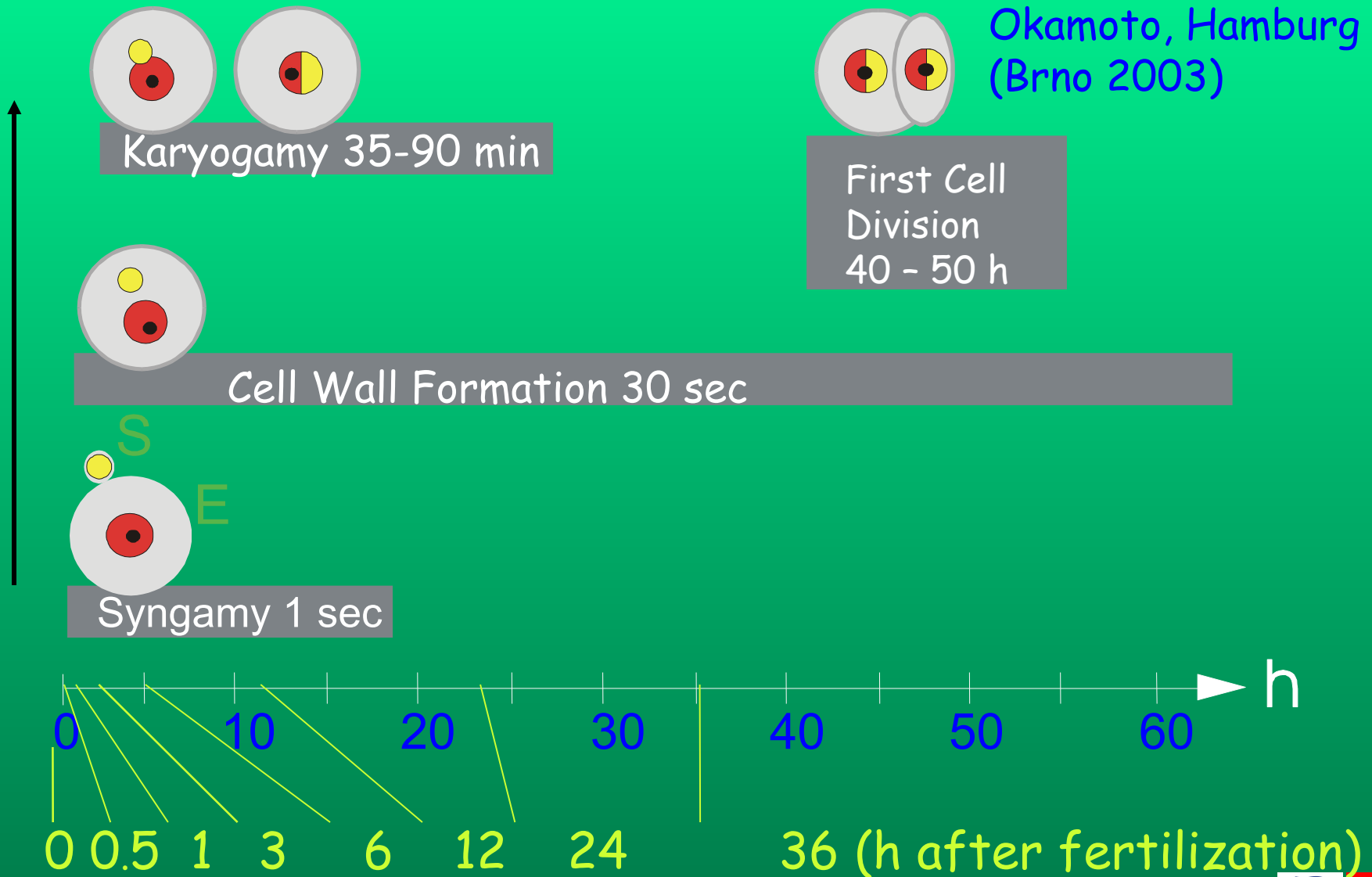


Oplození *in vitro* u kukuřice

vývoj embrya



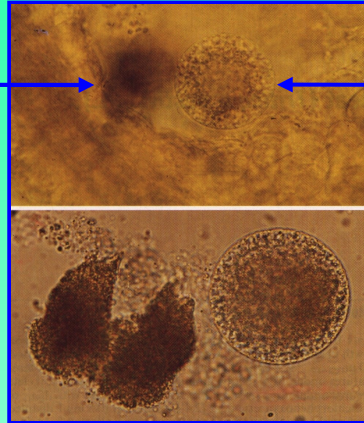
Time course of the early events of *in vitro* zygote development in maize,



Mikromanipulace se samičím gametofytem pšenice, Barnabas, Maďarsko (Brno 2003)

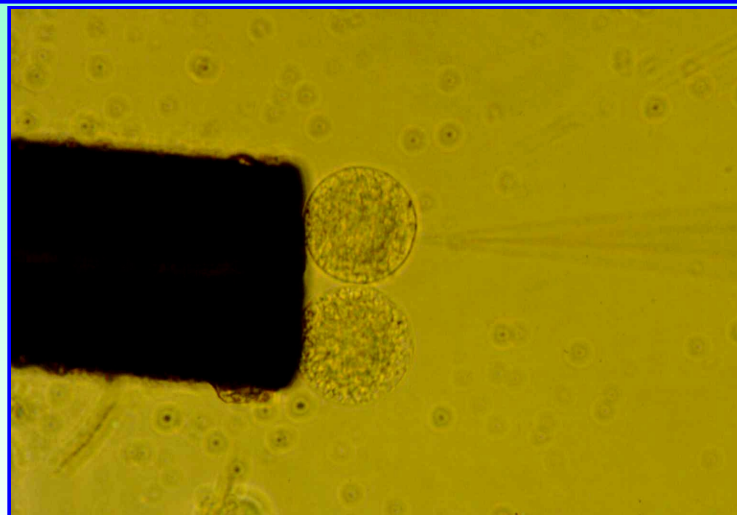
Mikrochirurgická izolace

synergida



vaječná buňka

Imobilizace vaječné buňky s použitím elektrického proudu



Mikroinjekce DNA
do imobilizované
vaječné buňky