

# 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

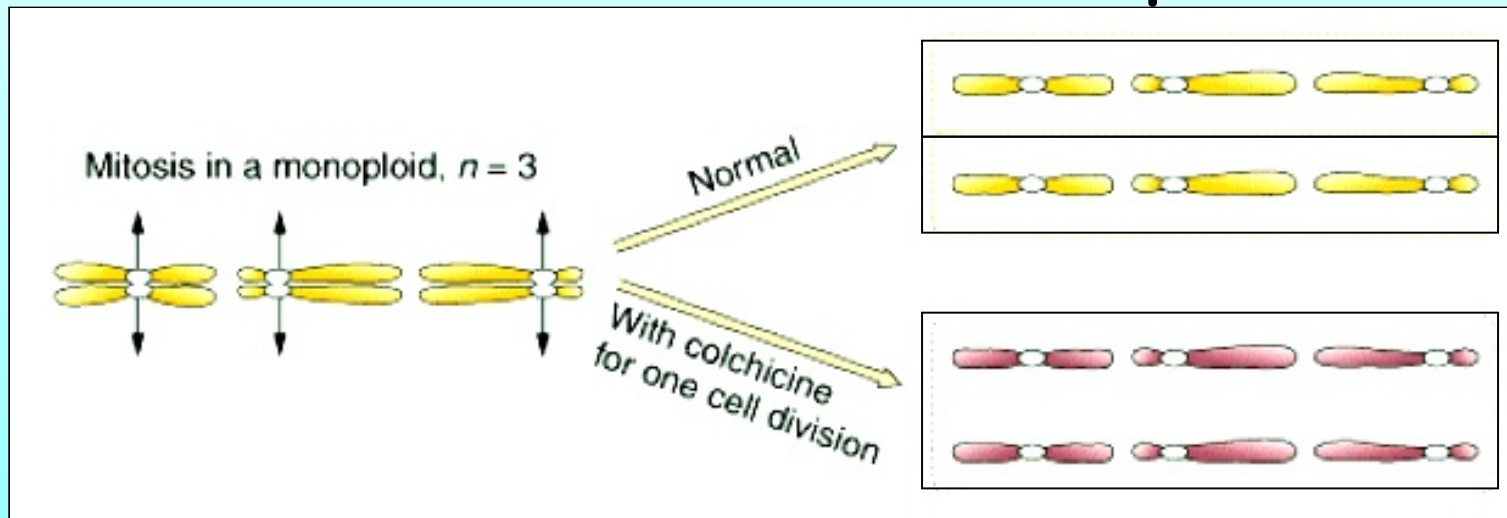
monohaploid  $n = x$

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

alternativy kolchicinu = oryzalin, trifluralin, amiprofos-methyl...

# 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 (odstranění prašníků) a izolace
  - opožděné opylování
  - opylení inaktivovaným pylem
  - vzdálená hybridizace - eliminace chromozómů

# Odvození haploidů u vyšších rostlin

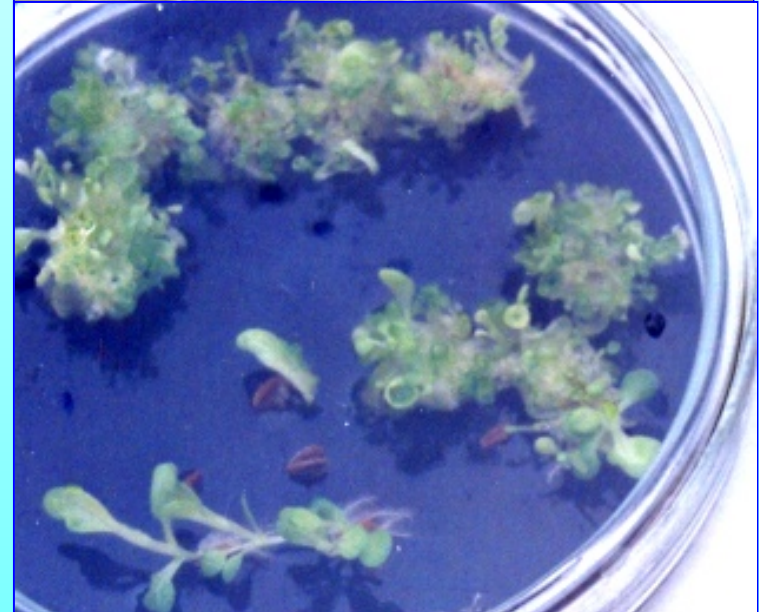
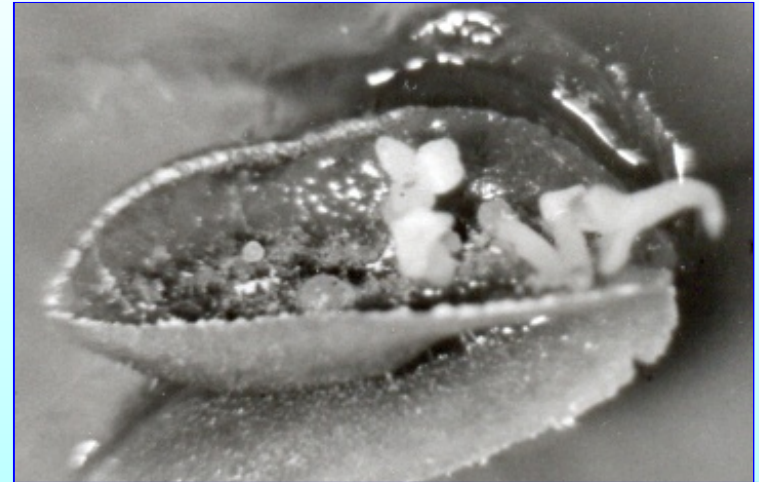
Experimentálně = explantátové metody

- prašníkové kultury
  - mikrosporové a pylové kultury
  - kultivace neoplozených semeníků
  - chromozomální redukce v kalusových, buněčných nebo protoplastových kulturách
- androgeneze
- gynogeneze



# 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

# 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*

1976 první zpráva o gynogenezi u řepy *Beta vulgaris* L

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*

# 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** - složení média:
  - aktivní uhlí
  - železo

# Mateřská rostlina

**optimální fyziologický stav** mateřské rostliny je pro prašnickové kultury velmi důležitý

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

**výživa, dostupnost vody**

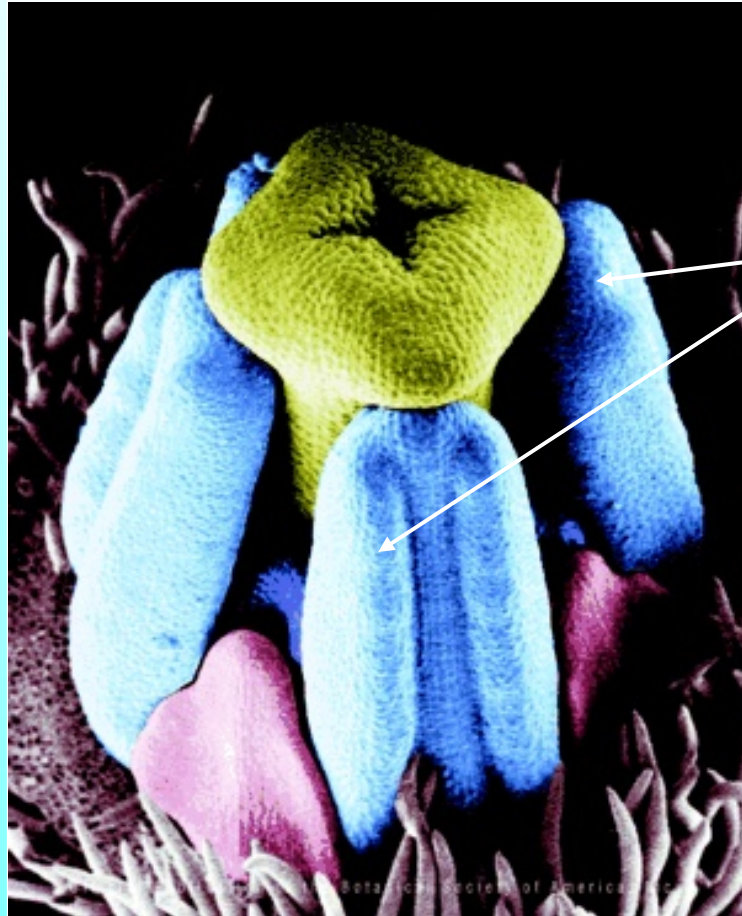
**teplota** - u některých druhů se výnos haploidních embryí zvyšuje při předpěstování mateřských rostlin při nízké teplotě (5°C)

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

# *Clarkia xantania* (Onagraceae)

příklad stavby  
květního poupěte

Annals of Botany

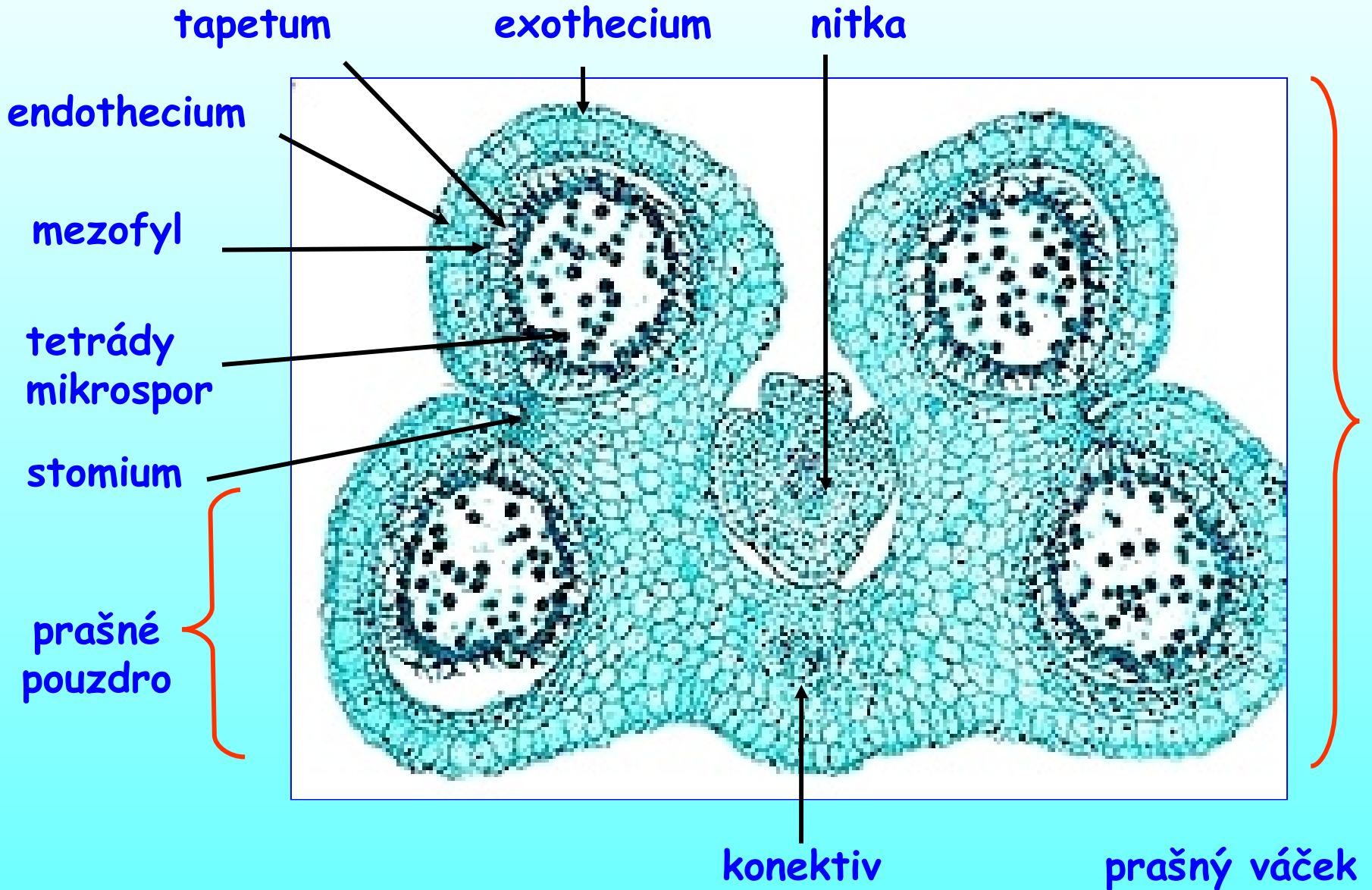


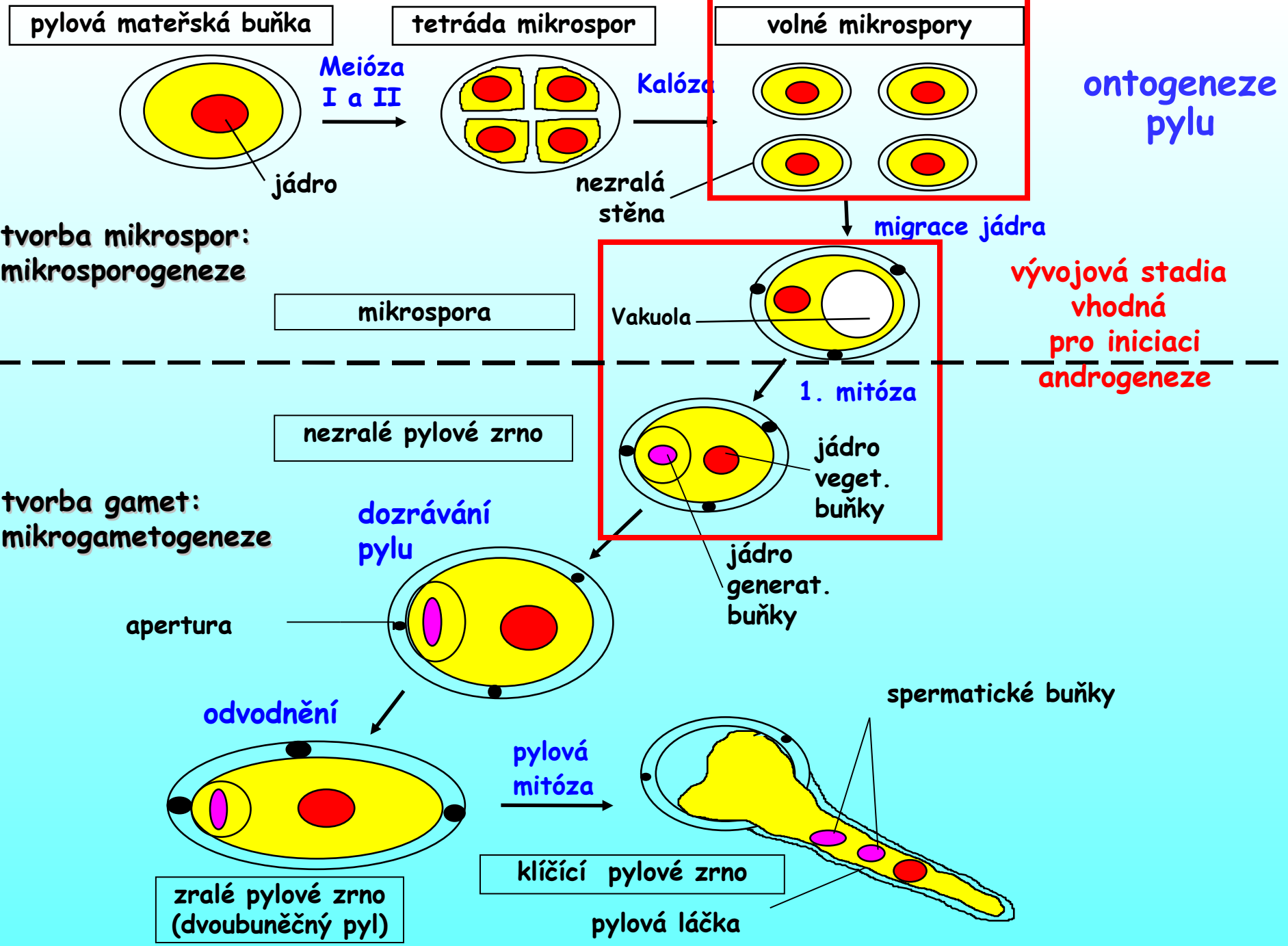
prašník

Photo:  
C. J. Runions

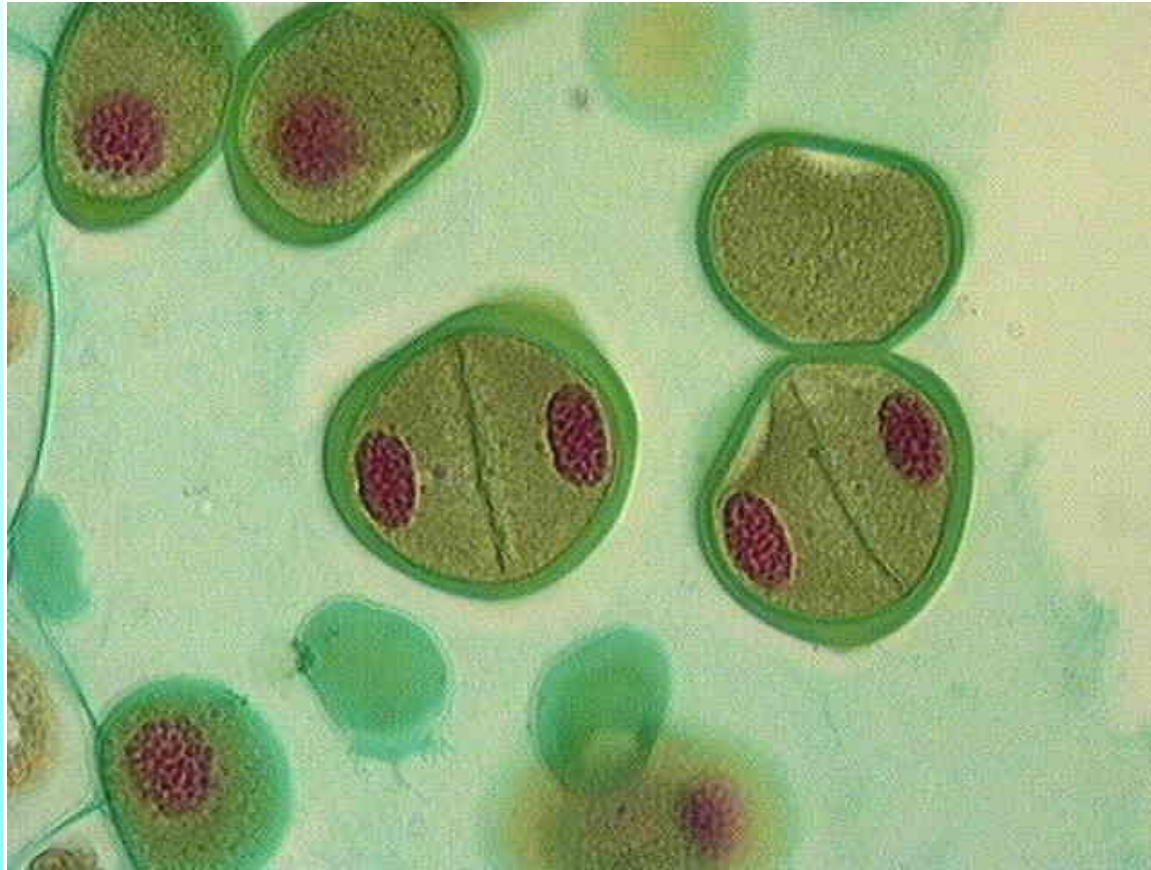
Scanning electron micrograph of an early floral developmental stage of the outcrossing subspecies of *Clarkia xantania* (Onagraceae). Sepals, which are covered by trichomes, have been partially removed and floral organs have been falsely colored: style and stigma, yellow; large anthers, blue; small anthers,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

# Řez prašníkem lilie





# Tvorba tetrad mikrospor telofáze I. meiotického dělení



příklad  
sukcesivní  
tvorby  
tetrad

*Lilium*

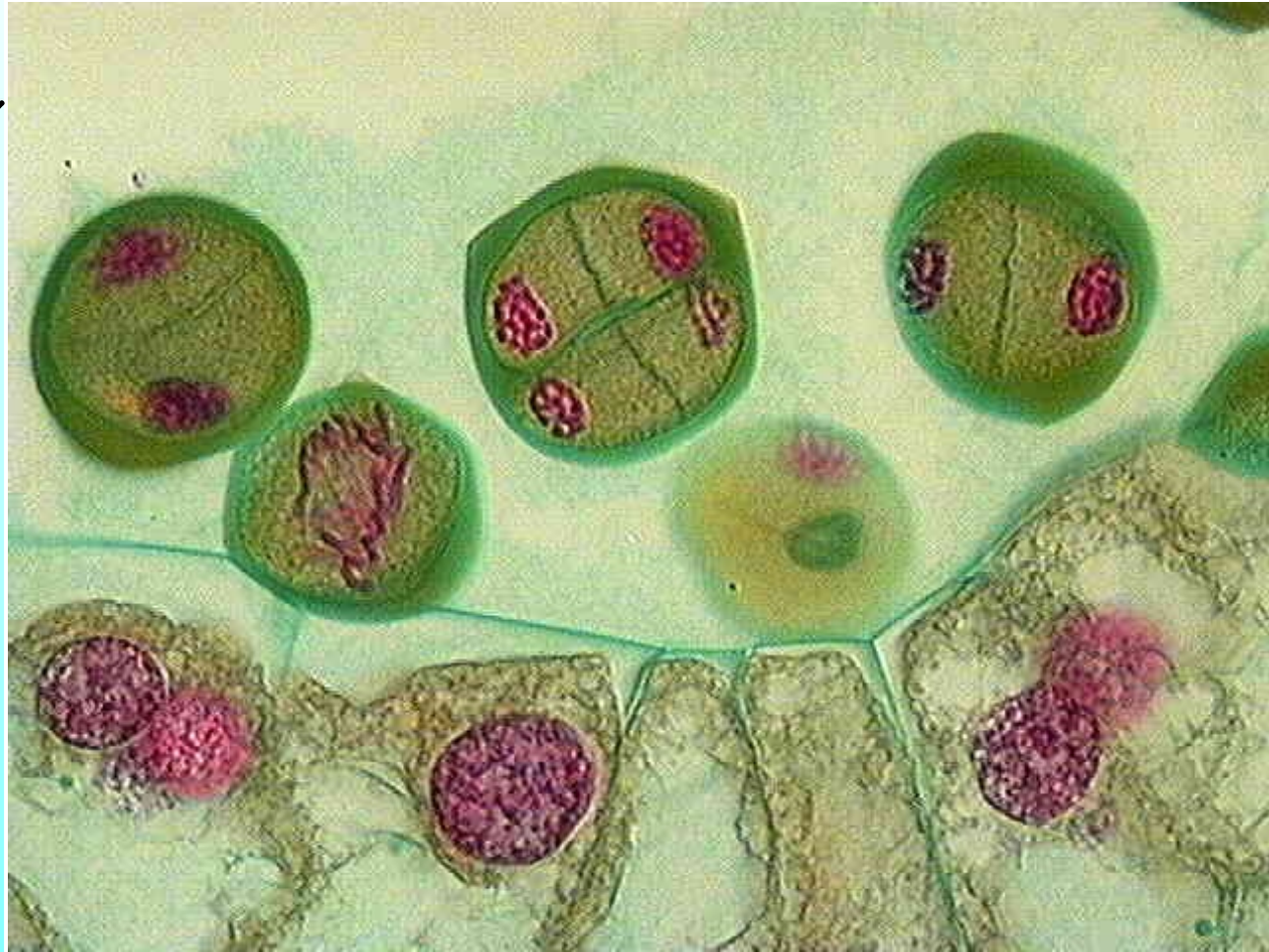
*IASPR*

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.



# Telophase II.

příklad  
sukcesivní  
tvorby  
tetrád

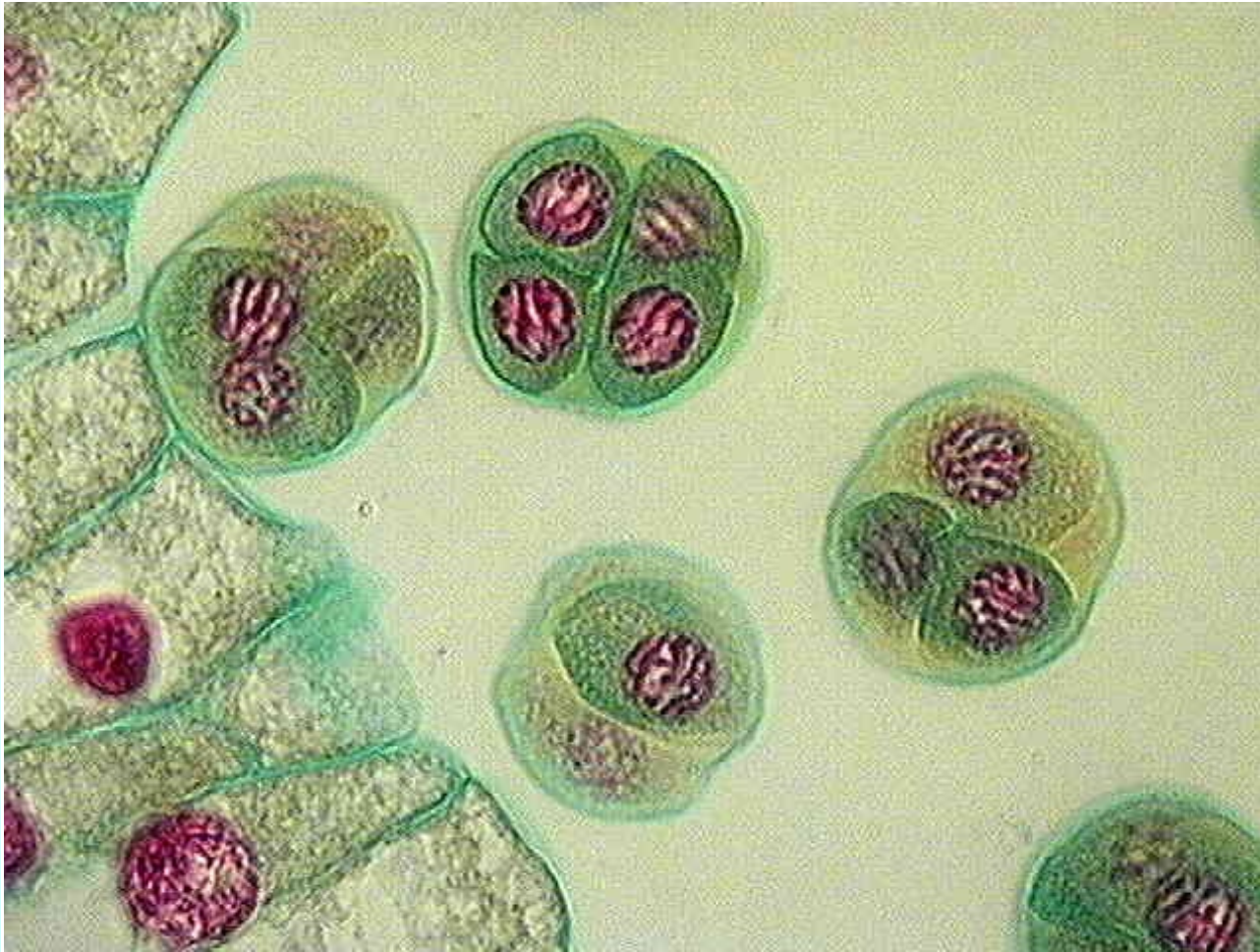


*Lilium*

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

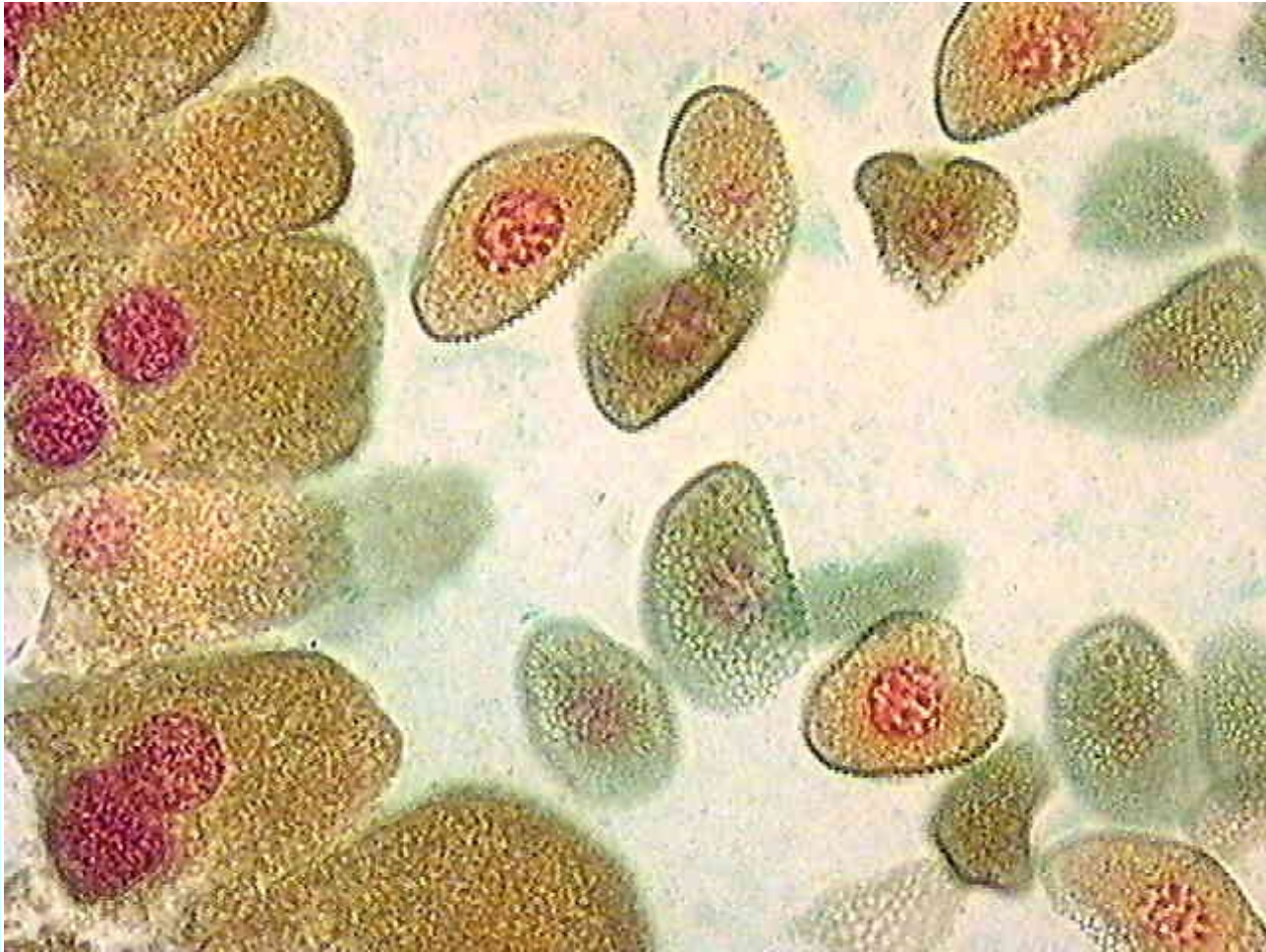


*Lilium*

**IASPR**

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

# Released microspores

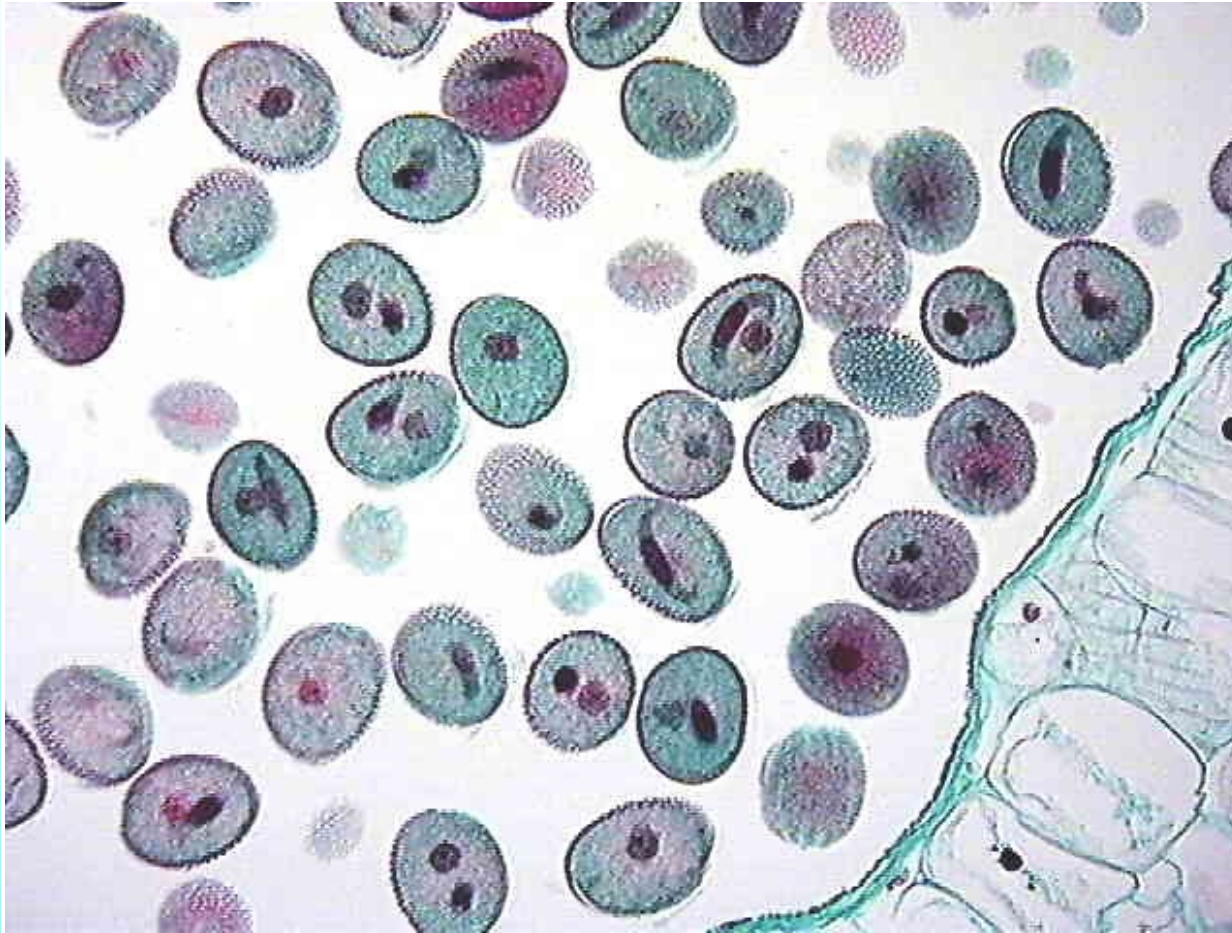


*Lilium*

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.

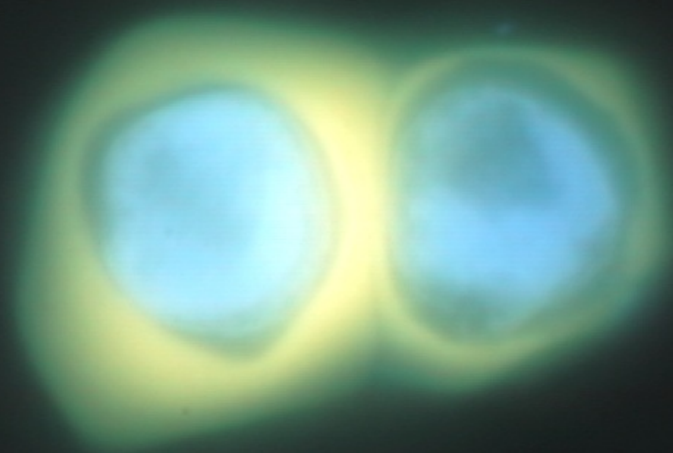
# Bicellular pollen



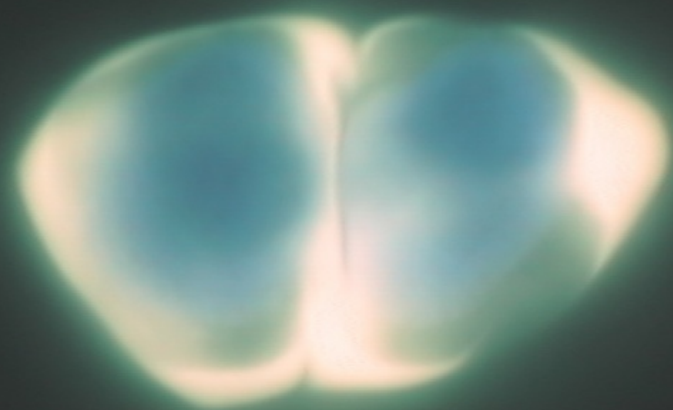
*Lilium*

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



# Vývojová stadia

nejdůležitějším faktorem pro získání haploidů je určité vhodné **vývojové stadium** odběru materiálu do kultury pyl může být frakcionován centrifugací na **percollovém gradientu**.

nutné testování série pupenů, aby byla zřejmá vývojová stadia.

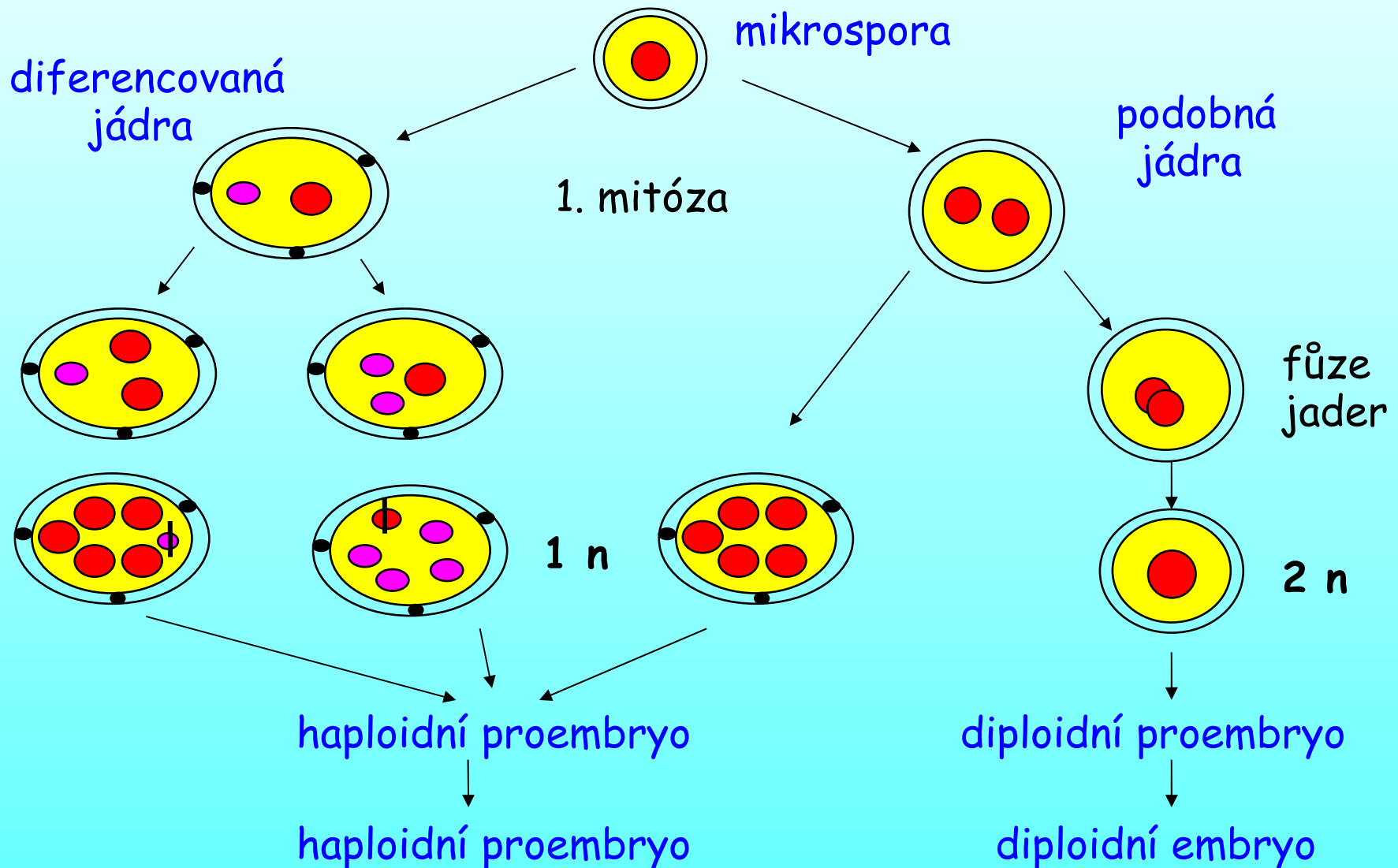
Některé snadno rozlišitelné znaky se potom používají pro charakteristiku žádaného vhodného stadia (délka poupěte, poměry délek květních obalů ...)

# Vývojová stadia poupat tabáku *Nicotiana tabacum* L.



poměr délek květních obalů: **stadium 2** = koruna jen o něco málo delší než kališní ušty - vhodné pro prašníkové kultury).

# Možnosti vývoje mikrospory *in vitro*





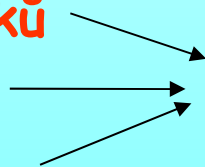
# Možnosti zvýšení účinnosti androgeneze - předpůsobení poupat

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

# Možnosti zvýšení účinnosti androgeneze - předpůsobení poupat

Druh	délka	teplota
<i>Hordeum vulgare</i>	2 dny	3°C
<i>Triticum aestivum</i>	2 - 6 dní	4 - 5°C
<i>Zea mays</i>	14 dní	4°C
<i>Zea mays</i>	7 + 7 dní	4°C, 8°C
<i>Petunia hybrida</i>	2 dny	6°C
<i>Brassica napus</i>	14 dní	30°C

# Typy androgeneze

**přímá androgeneze =**

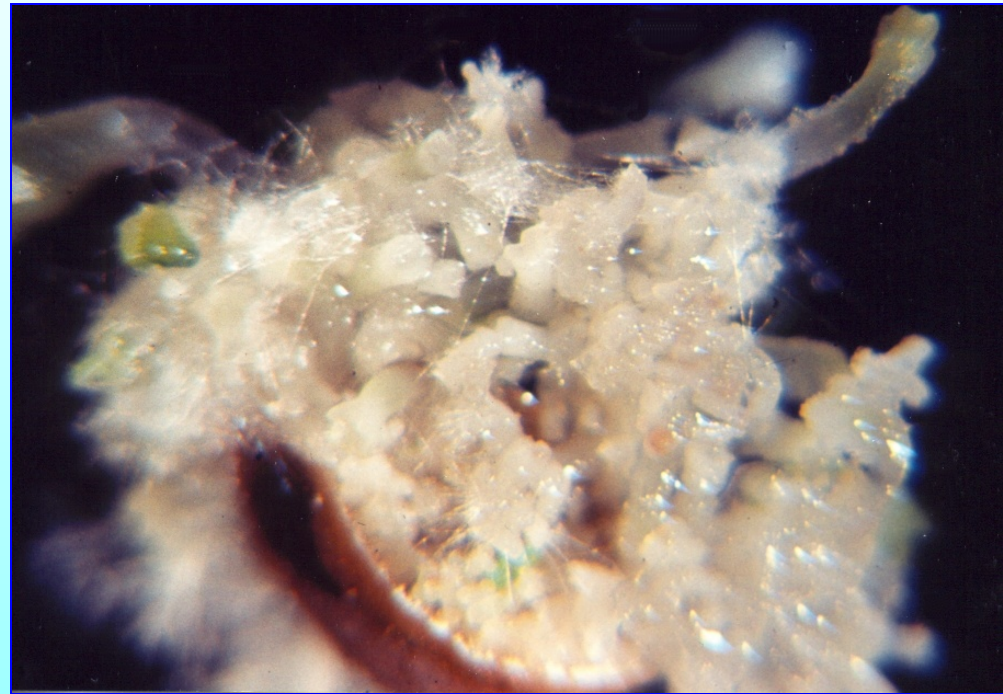
vývoj globulárního embrya a následně haploidní rostliny **přímo** opakovaným dělením jádra pylového zrna nebo mikrospory

**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.

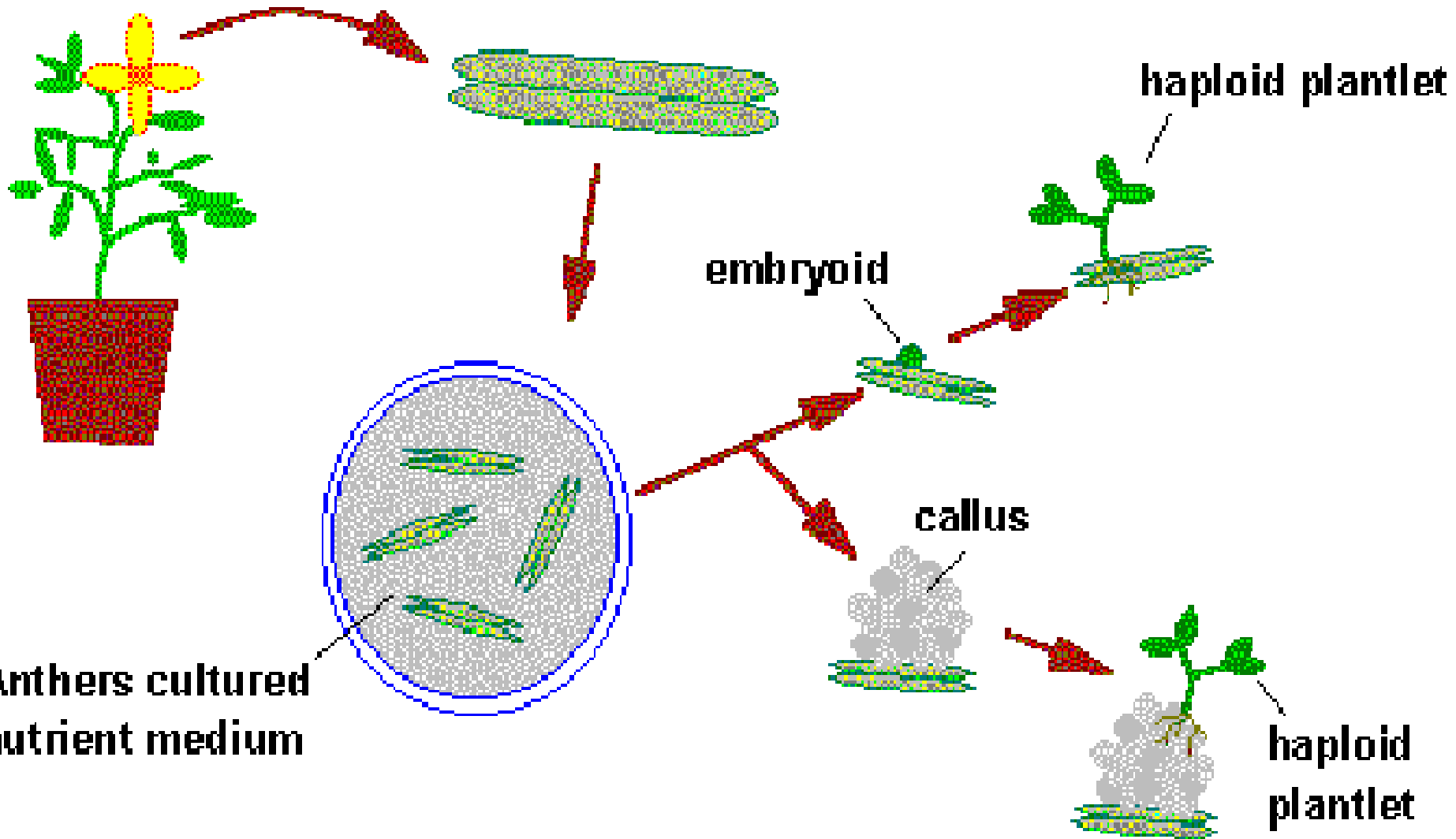
**obnovení diploidního stavu**

**působením kolchicinu**



**fertilní homozygoti**

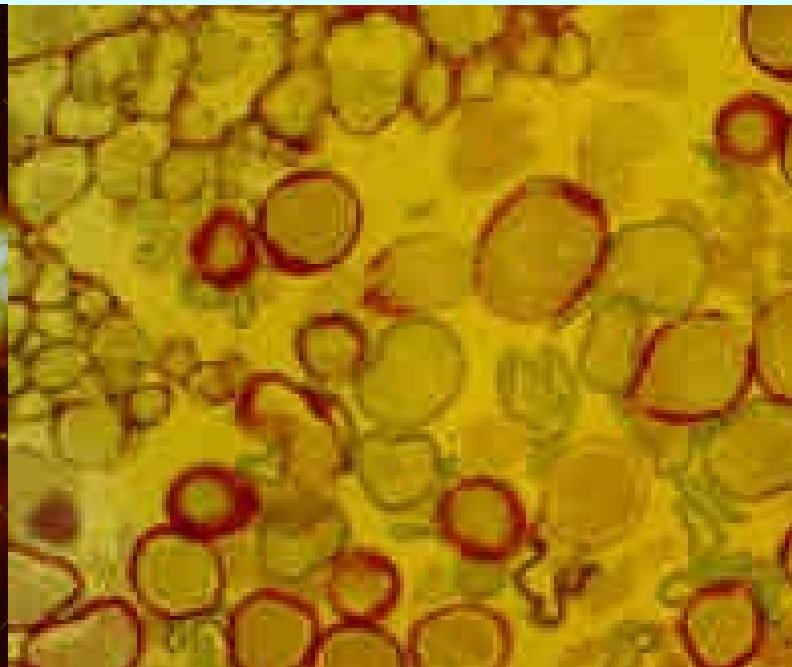
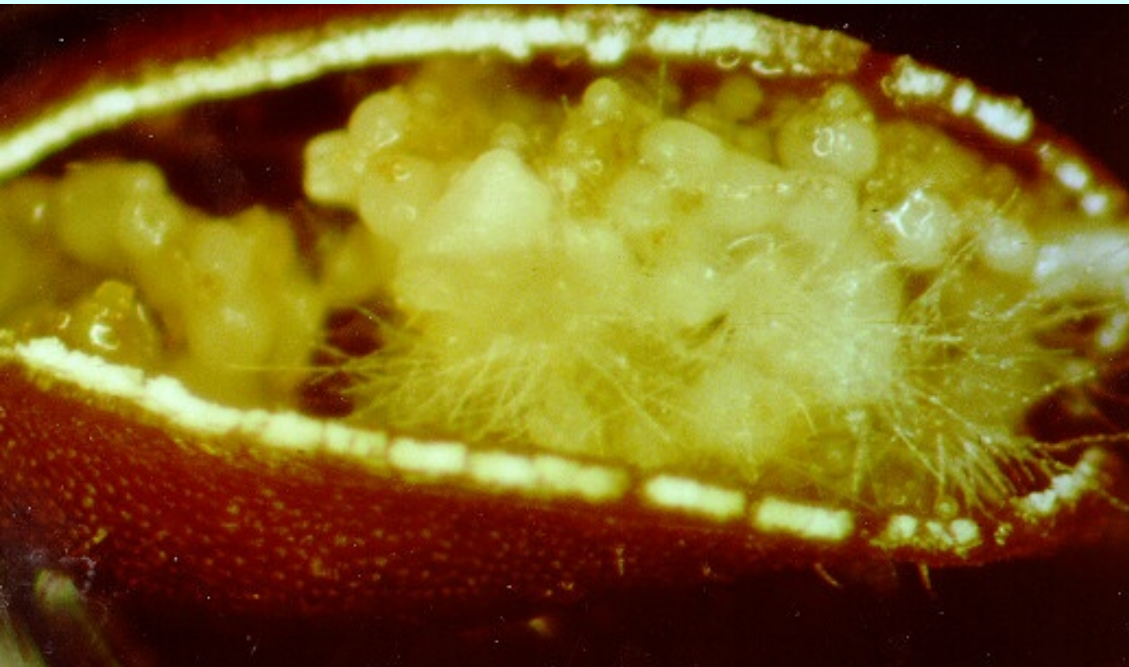
## přímá androgeneze



## nepřímá androgeneze

# Androgeneze u tabáku

7 dní



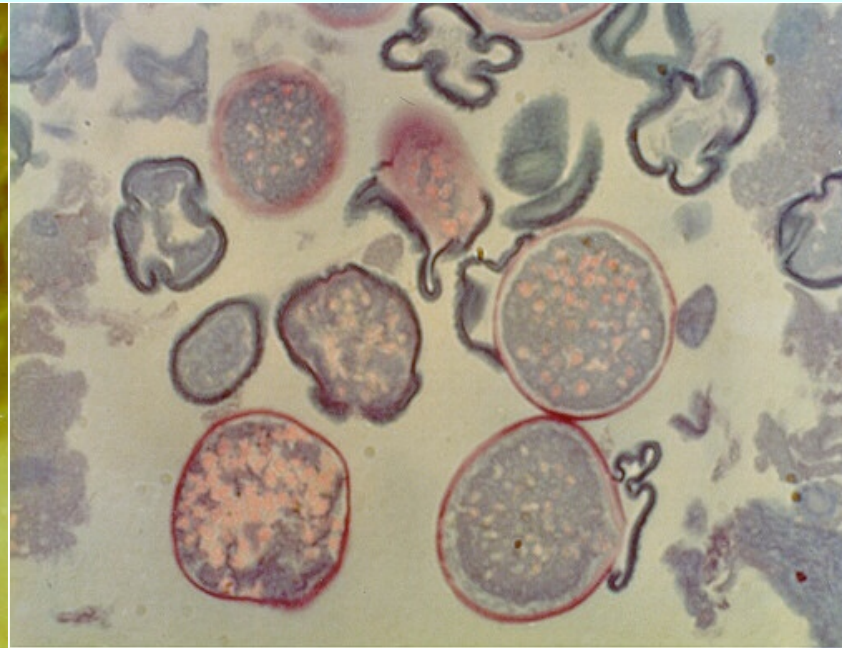
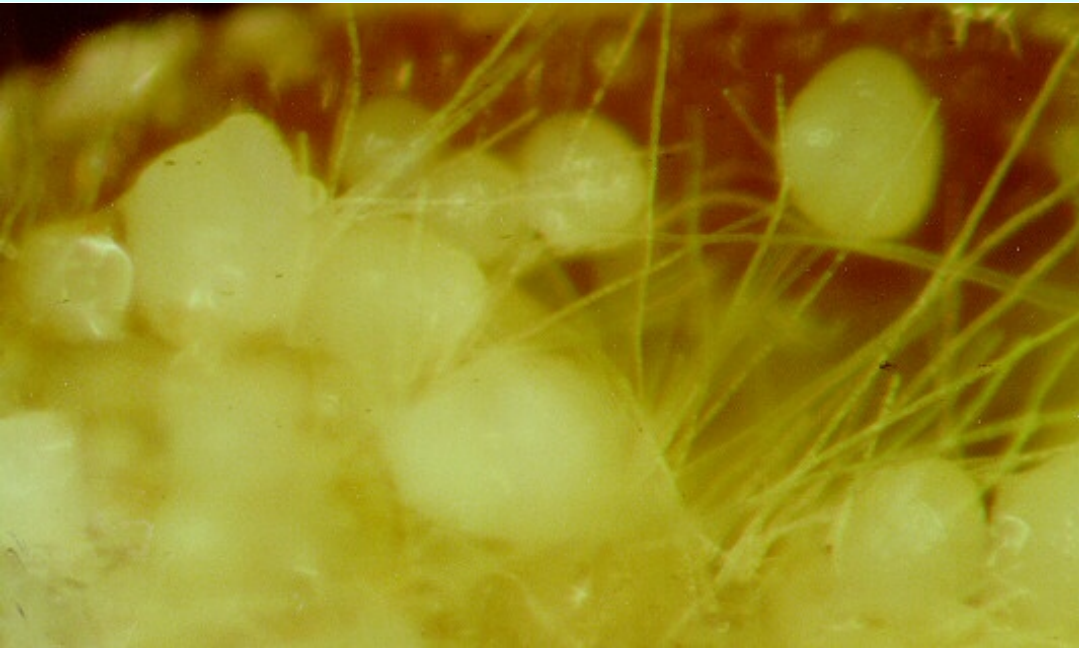
prašník s embryoidy

řez embryoidy

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

# Androgeneze u tabáku

14 dní



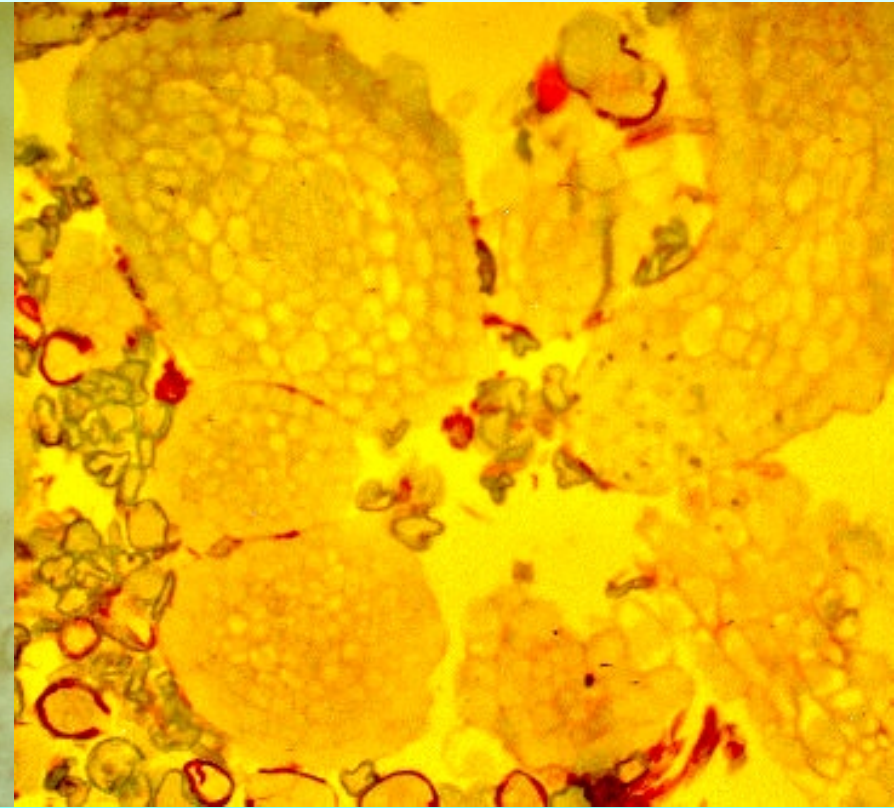
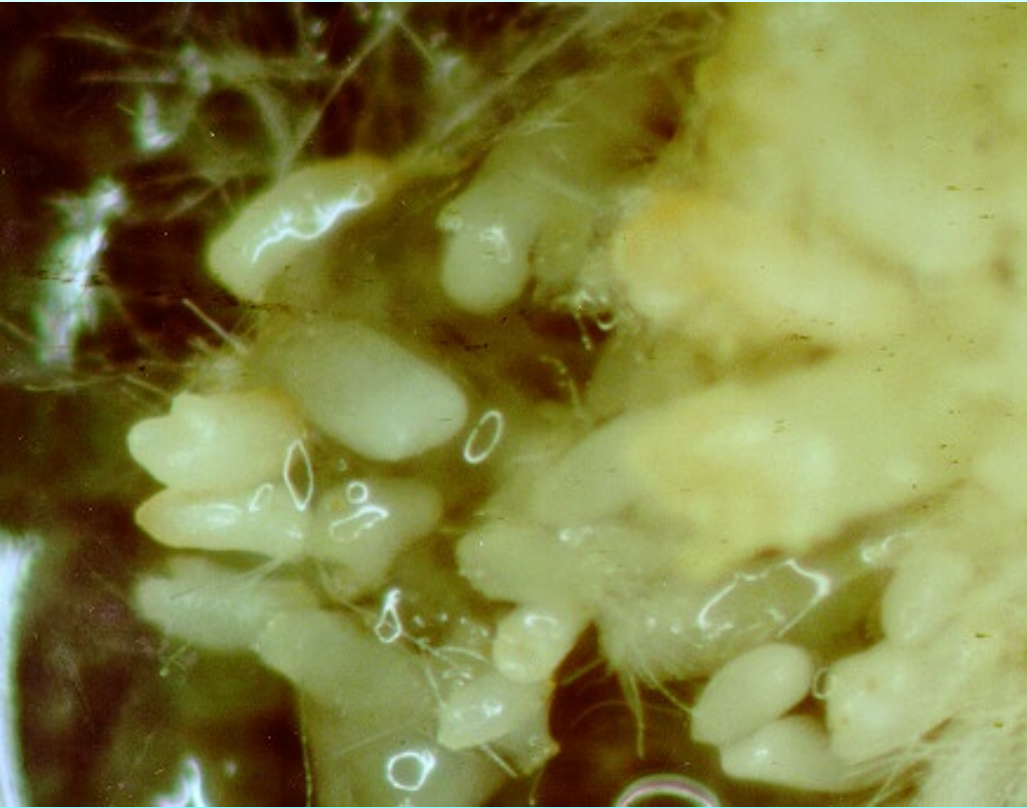
prašník s embryoidy

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

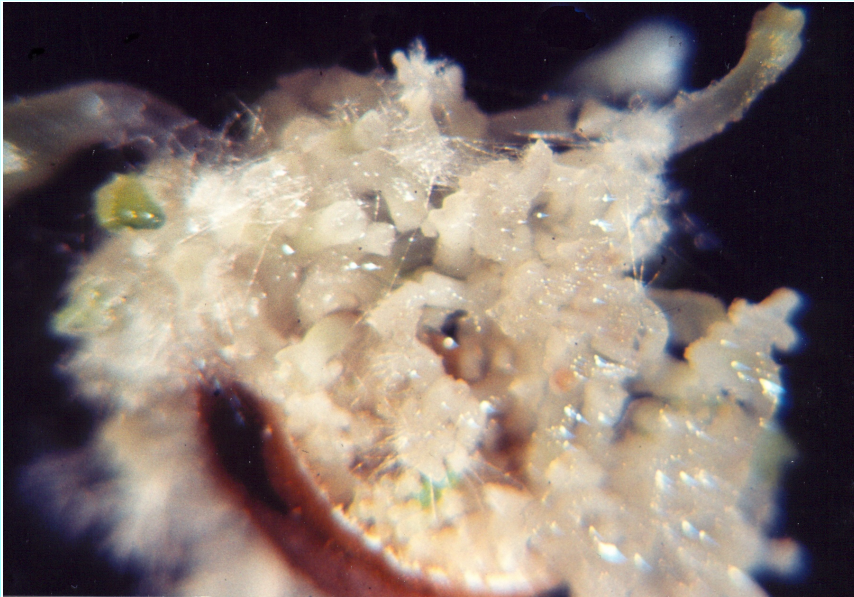


Prašník tabáku s vyvíjejícími se haploidními rostlinkami, vzniklými z mikrospor

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

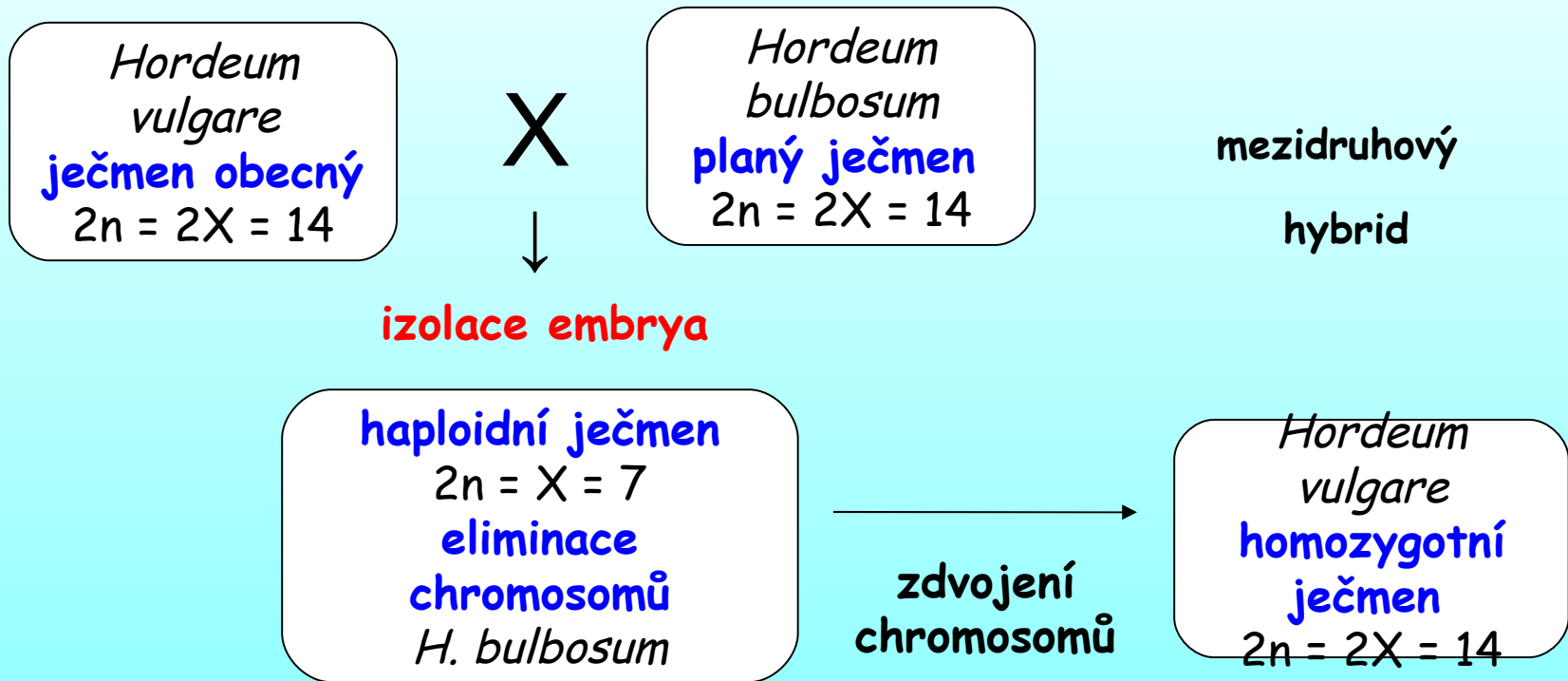


# Prašníkové kultury a regeneranti transgenní tabák - se Zmp60.1+MTX®



kvetoucí, ale sterilní  
haploidní rostlina

# Metoda produkce haploidů u ječmene



dříve mnohem účinnější než mikrosporové kultury

(ale má použití jen u ječmene)

nyní, při použití zlepšeného média (sacharosa nahrazena maltosou), je mikrosporová kultura mnohem účinnější (~2000 rostlin ze 100 prašníků)

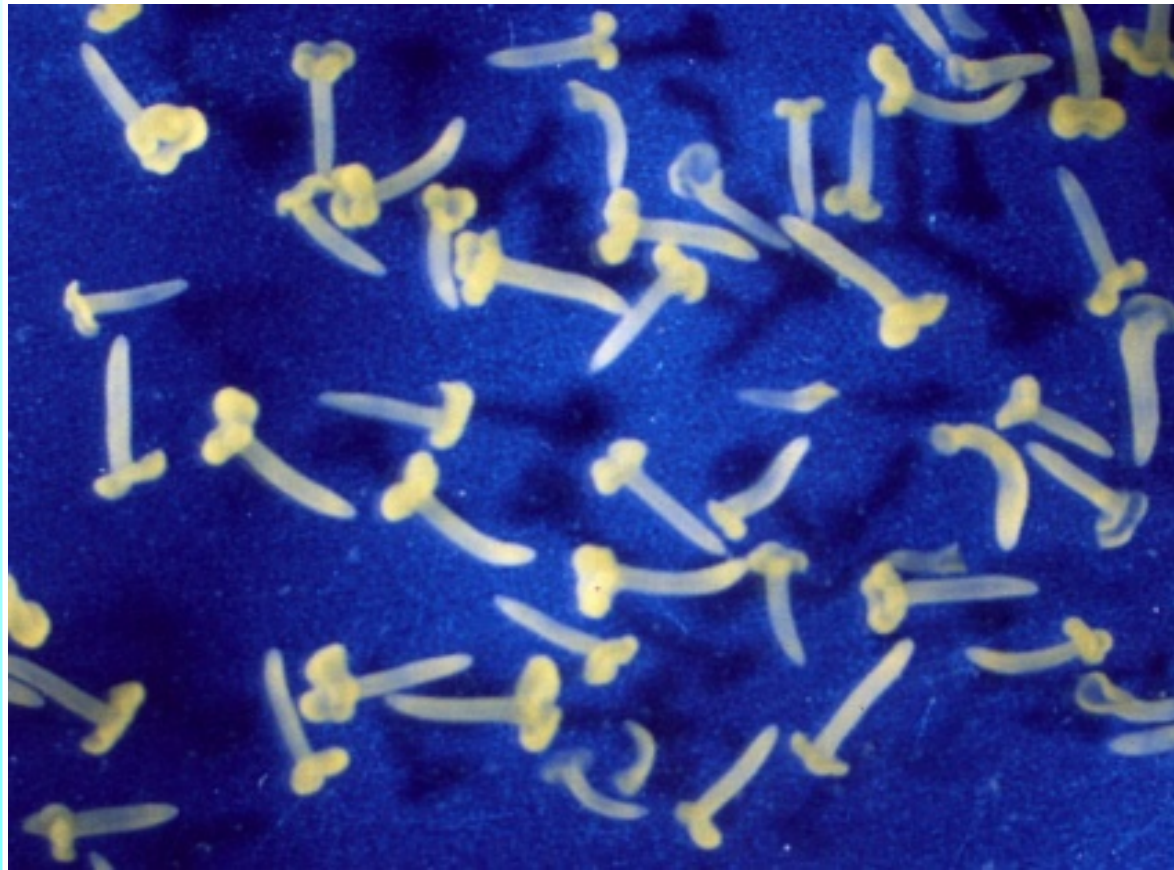
# Produkce haploidů a dihaploidů ječmene

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

# Výhody mikrosporových kultur oproti kulturám prašnickovým

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

# Suspenze embryí z mikrospor *Brassica napus*



R. Wellens - in: katalog Duchefa 1996

## 2. Gynogeneze

původ haploidních regenerantů  
ze samičího gametofytu

# Gynogeneze

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

# Poznámky na závěr

- haploidní rostliny se častěji odvozují cestou **androgeneze**
- žádná z metod pro získání haploidů **není univerzální** pro všechny druhy rostlin
- všechny dosud užívané cesty k haploidii je možné využít (indukovat) pouze **ve velmi omezeném = krátkém vývojovém stadiu** života rostliny.
- **gynogeneze** je zatím omezena jen na několik druhů (*Beta*, *Allium*, *Oryza*, *Hordeum*, *Triticum*)
- rostliny vzniklé cestou gynogeneze jsou lepší kvality než původem z androgeneze - např. u obilovin byl překonán problém **albinismu**