

# Haploidní techniky 10.

androgeneze  
gynogeneze

Jaroslava Dubová



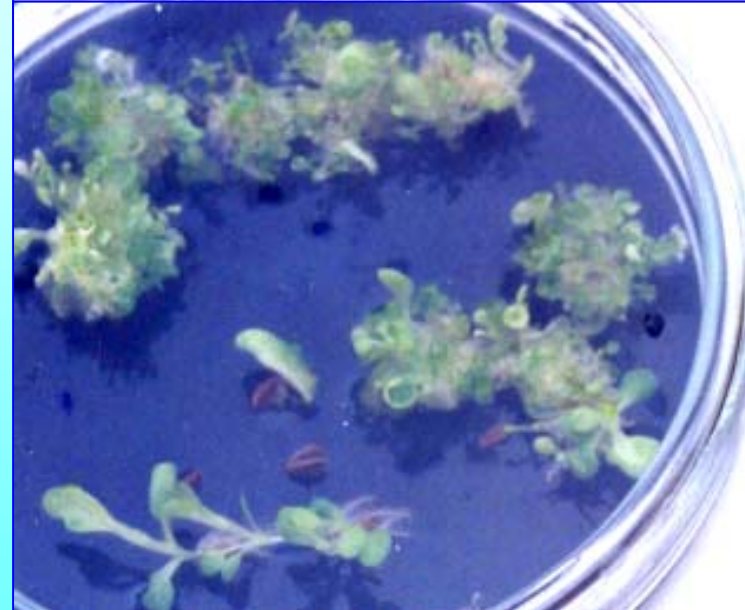
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Haploidní techniky

♂ **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

# 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

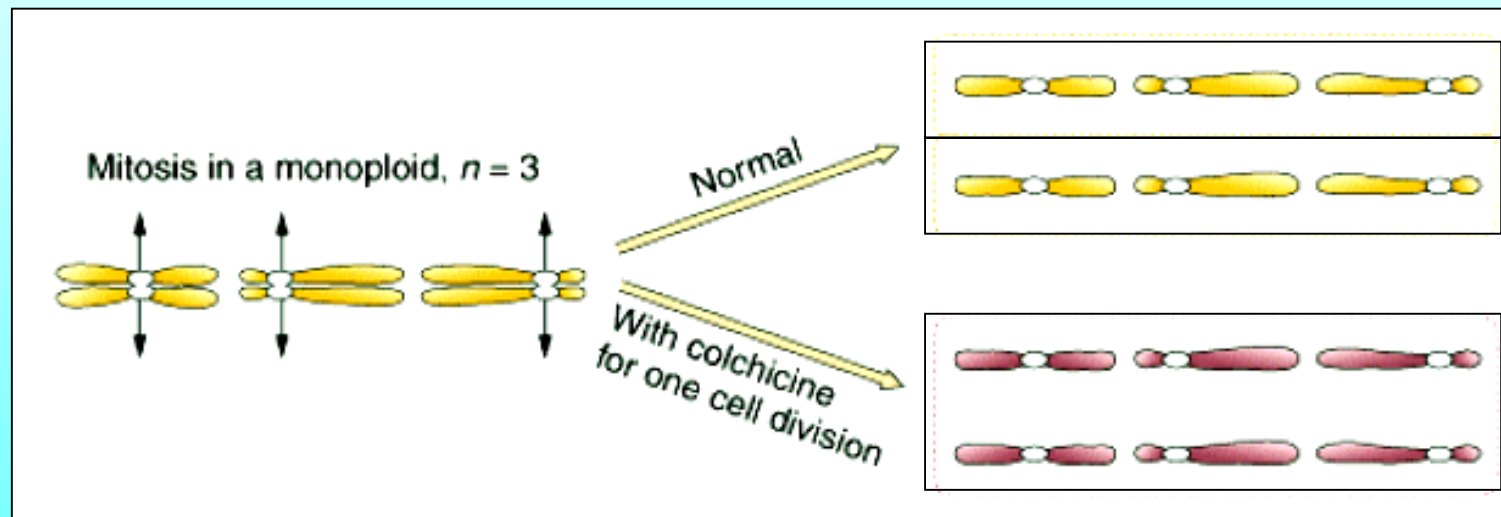
monohaploid  $n = x$

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

# 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

# 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

# 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** 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 poupat ze začátku období kvetení

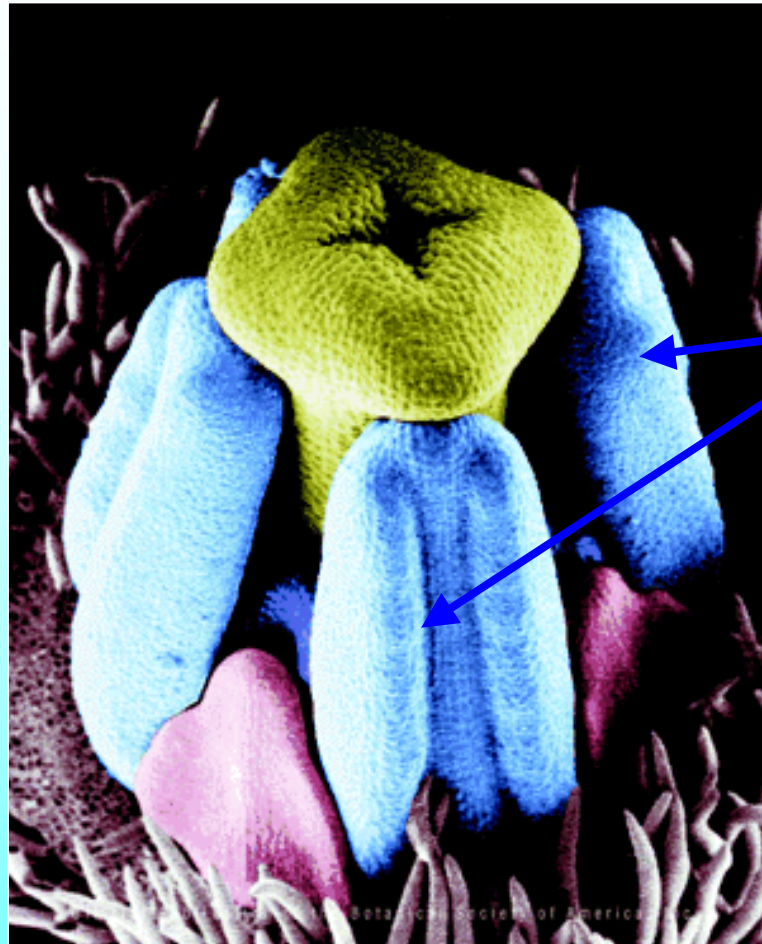
**výživa, dostupnost vody**

**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*)

Annals of Botany

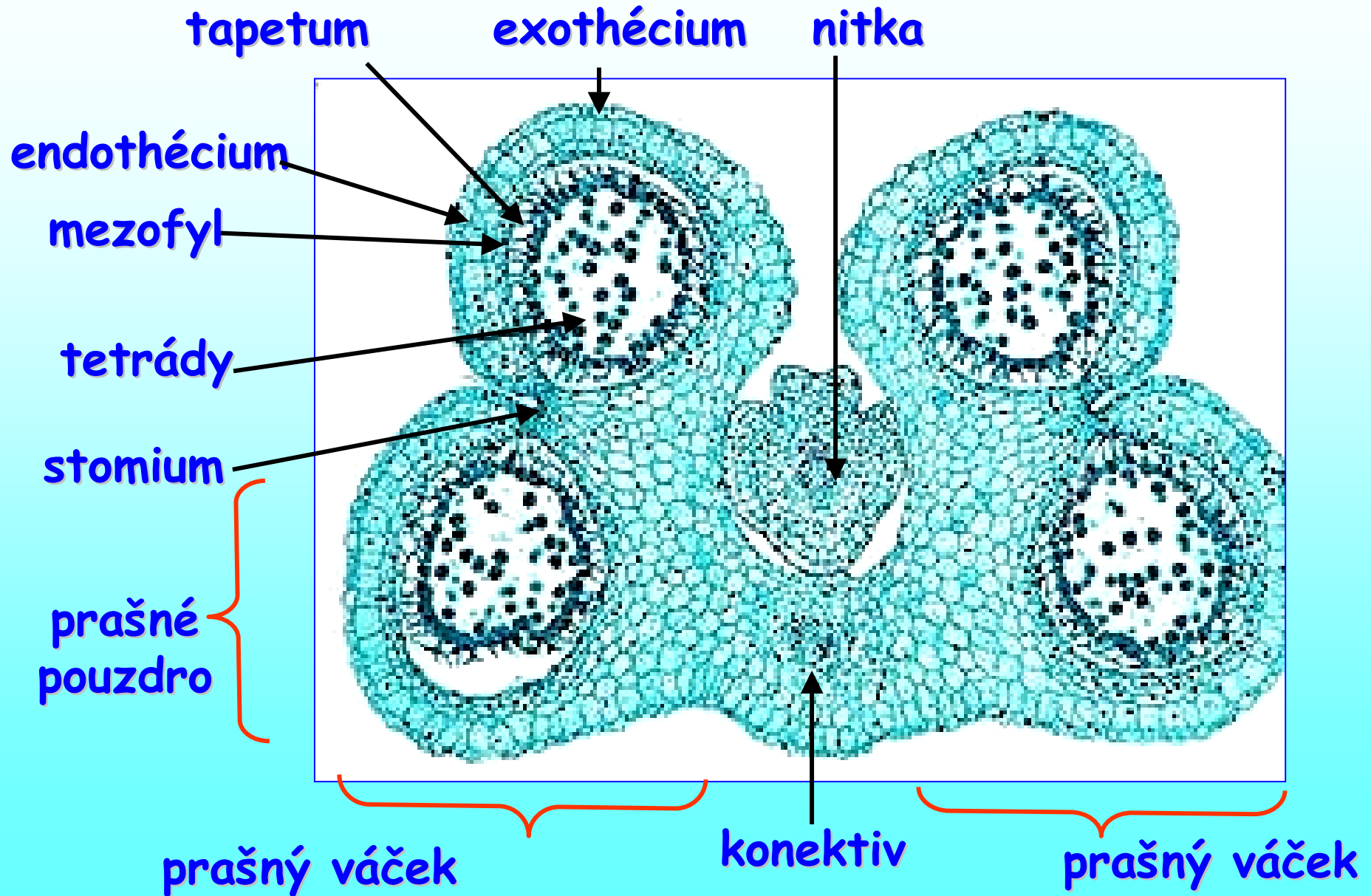


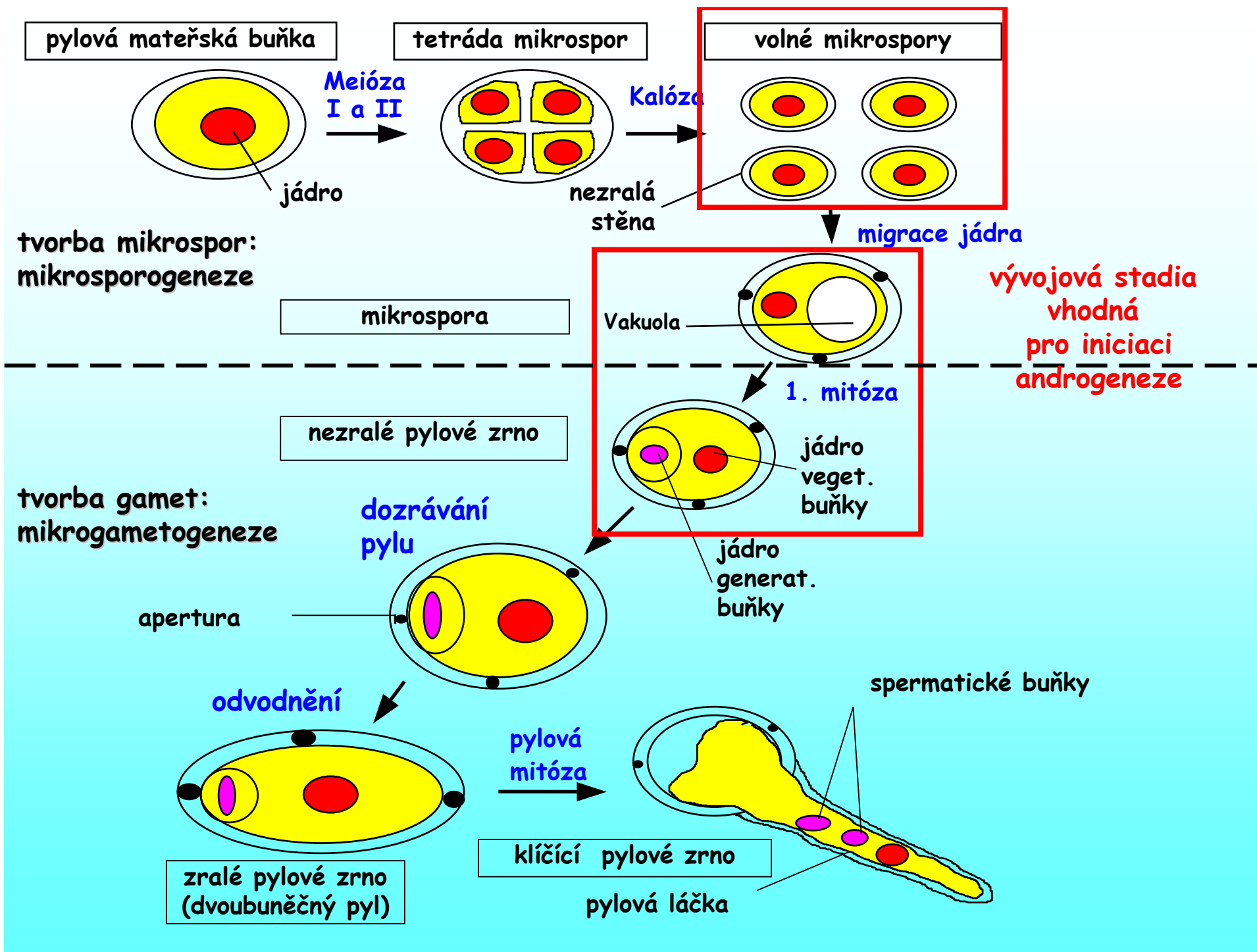
větší  
prašníky

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

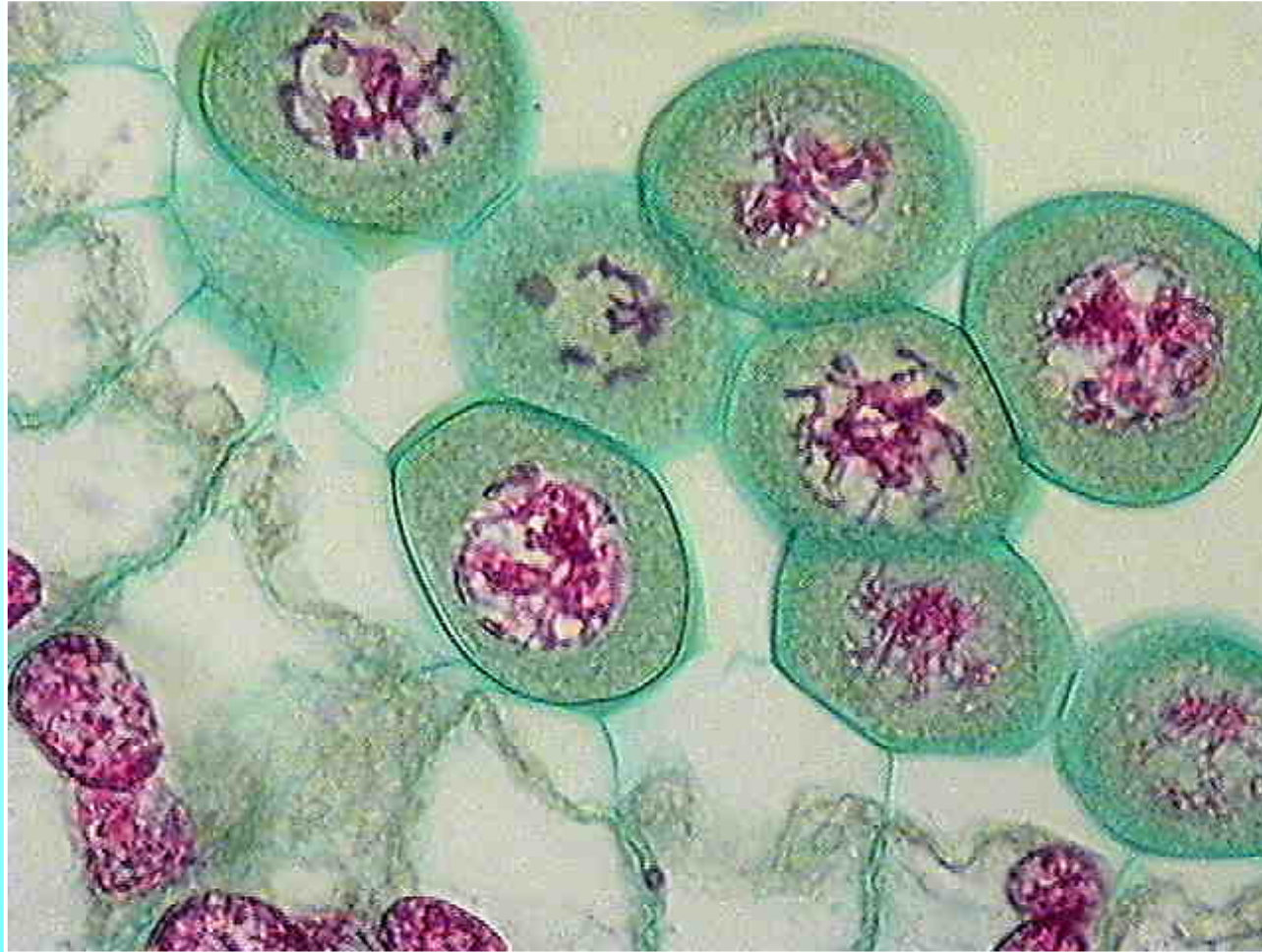






<http://images.iaspr.org/lily/male.shtml>

## Late-prophase I.

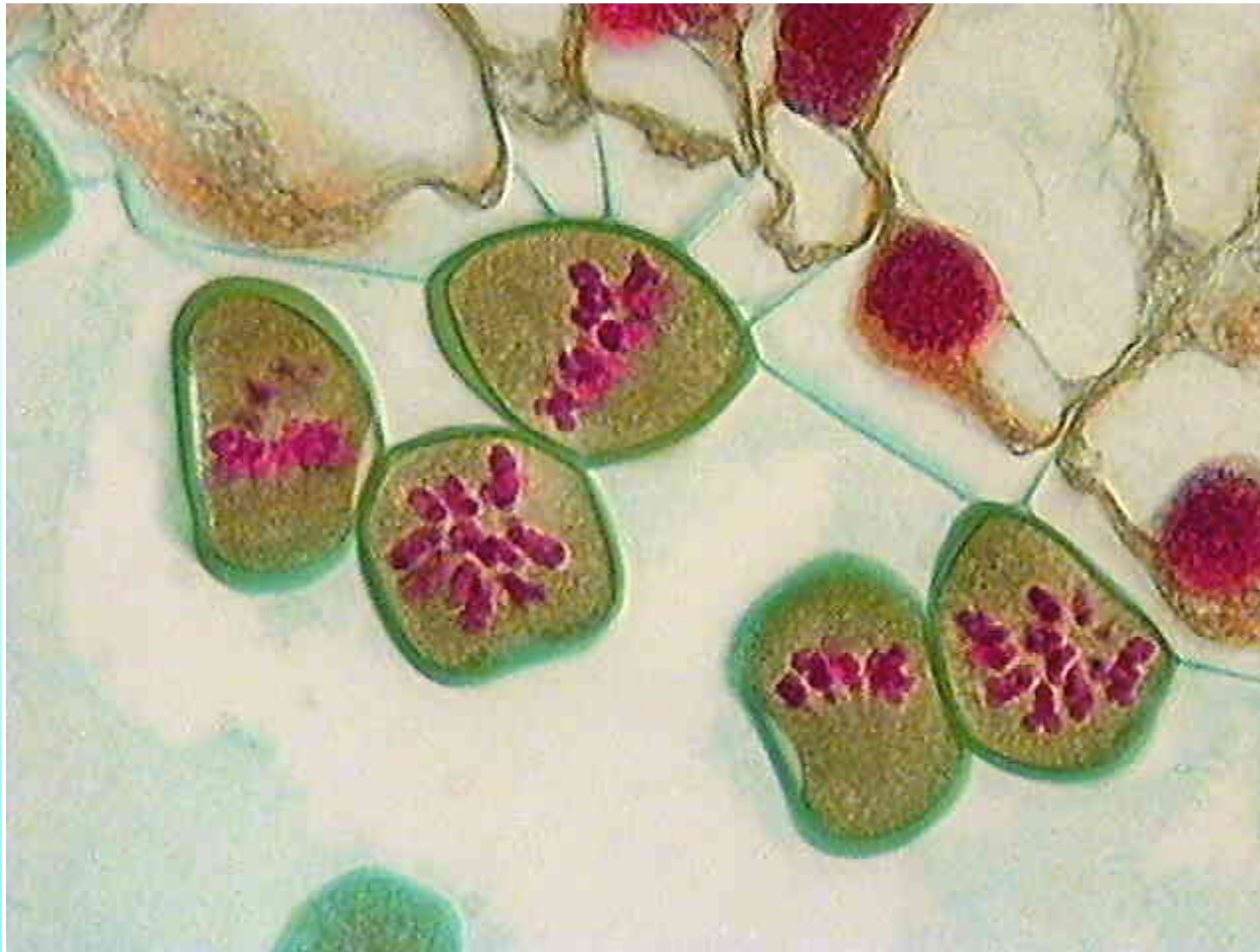


*Lilium*

*IASPR*

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

# Metaphase I.

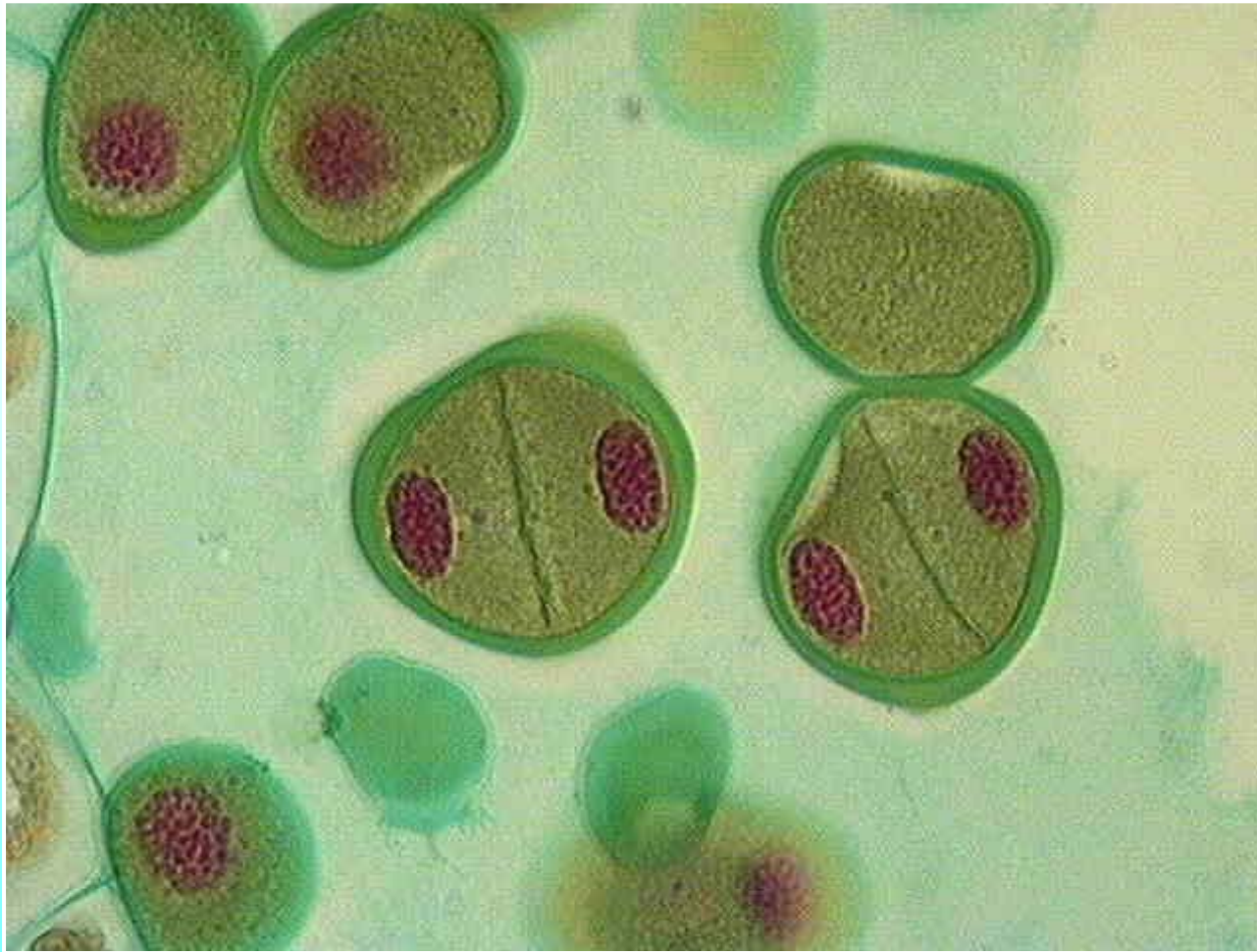


*Lilium*

*IASPR*

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

# Telophase I.

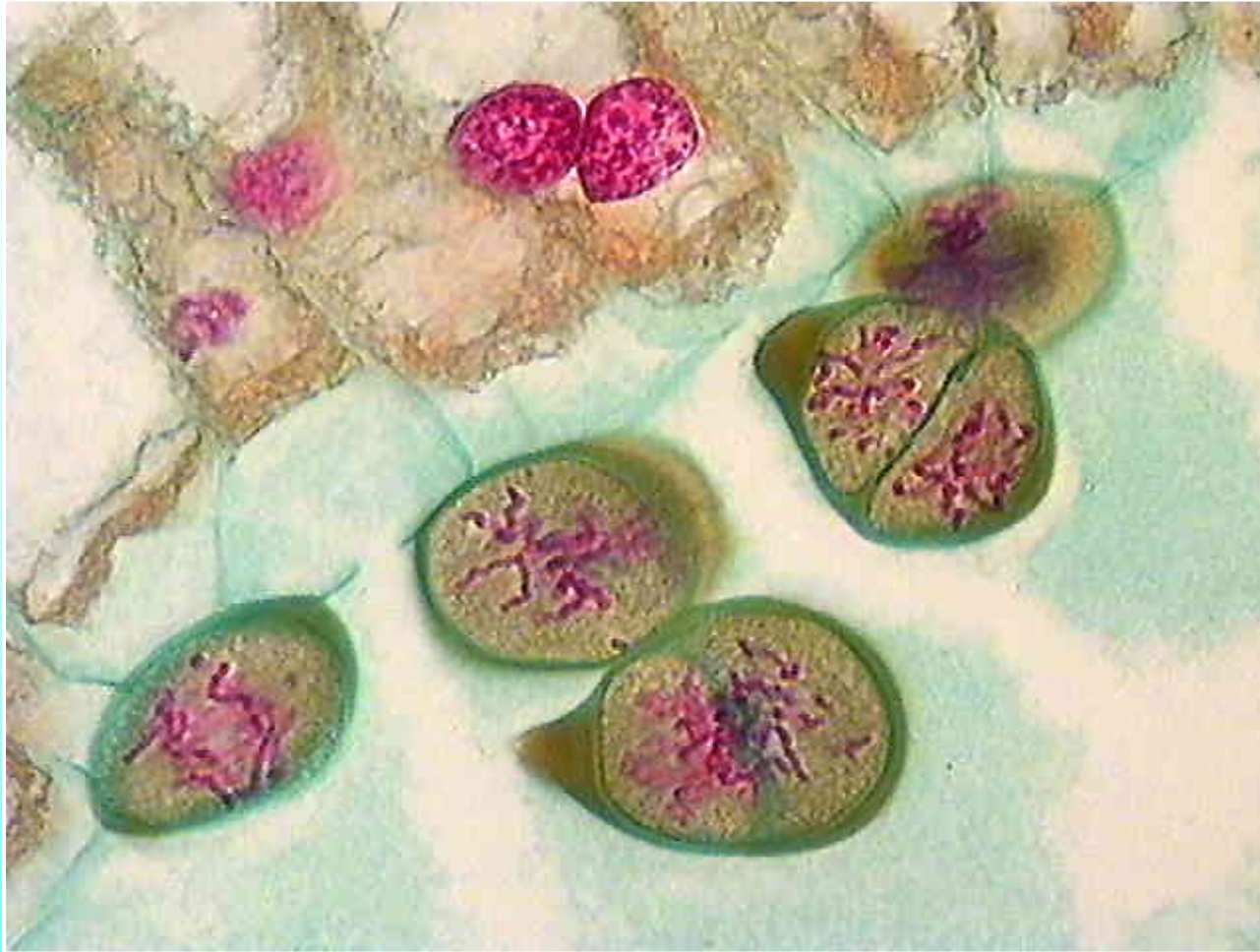


*Lilium*

*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.

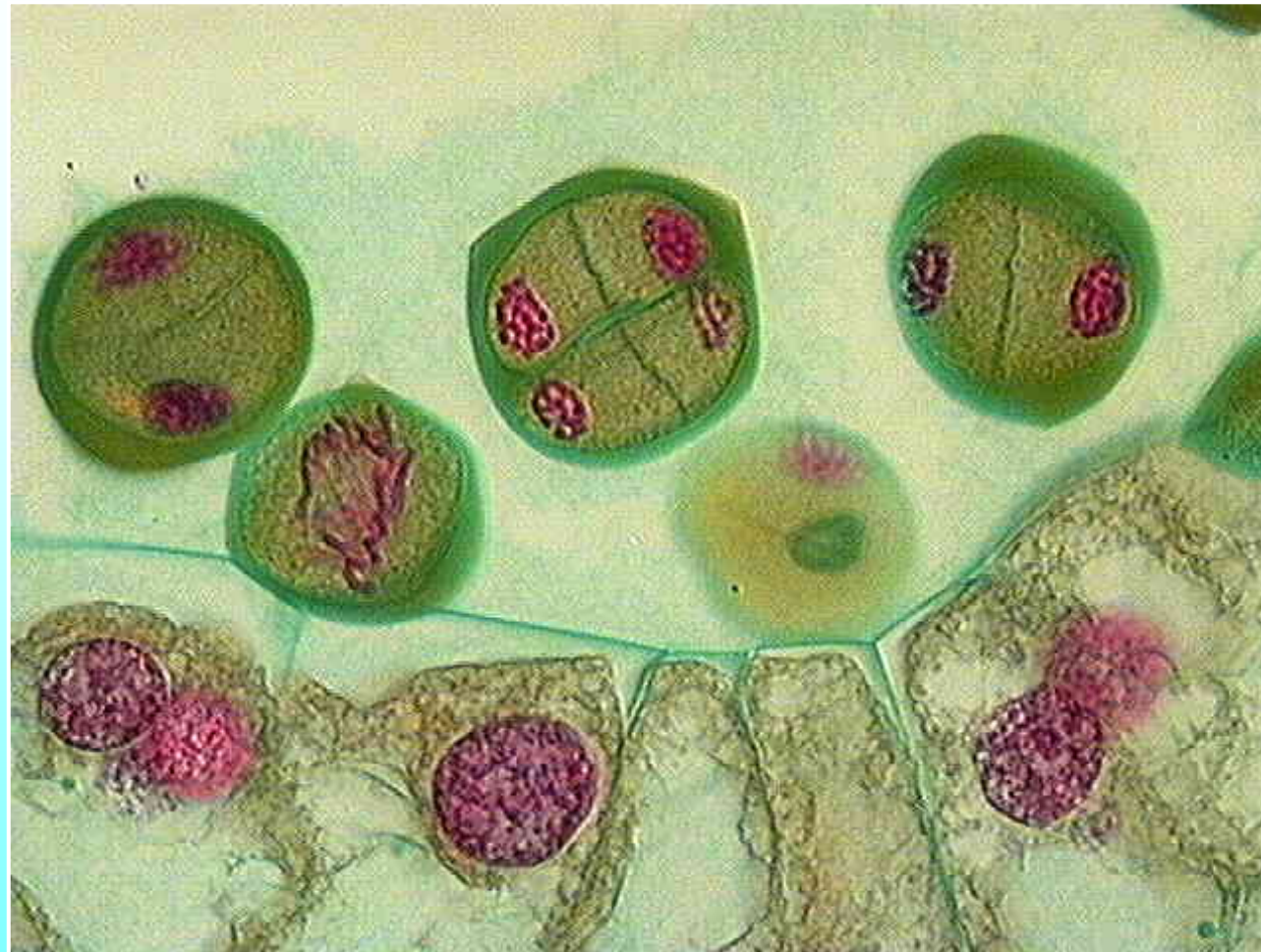
## Metaphase II.



*Lilium*  
IASPR

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

# Telophase II.

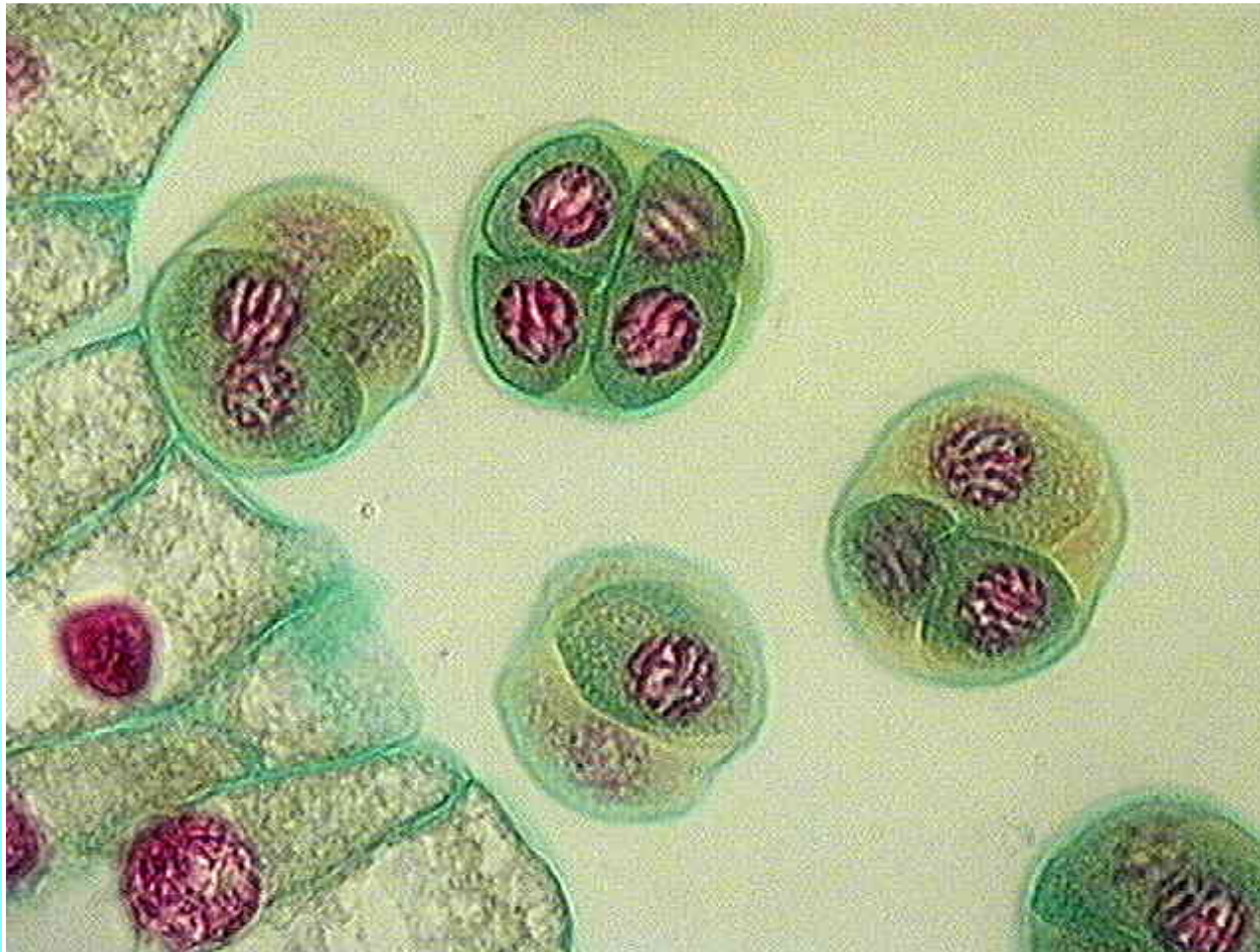


*Lilium*

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

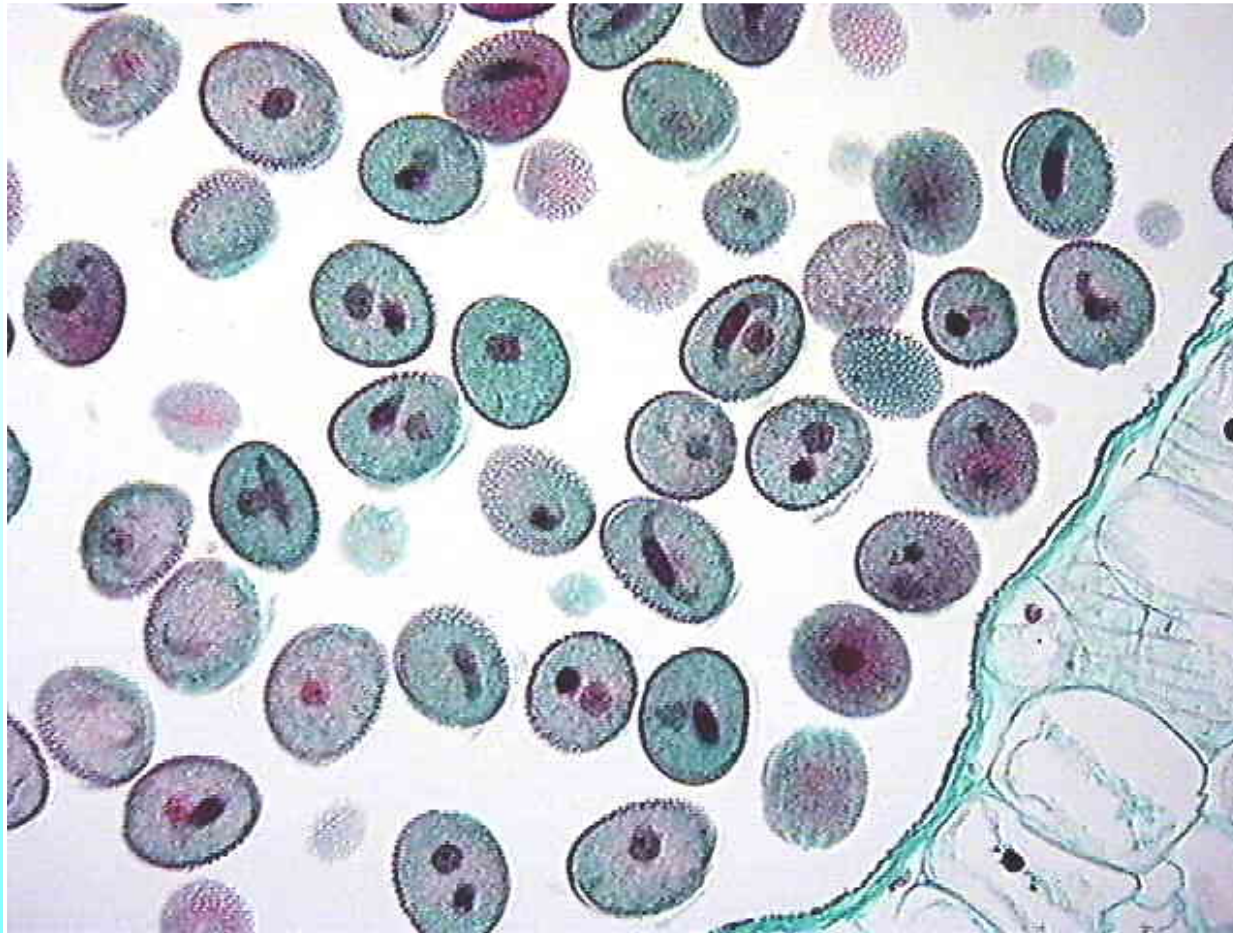


*Lilium*

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".





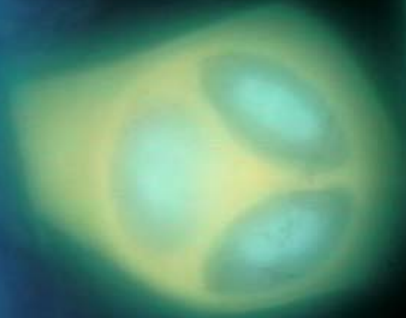
metafáze I.dělení



počátek tvorby tetrád

*Nicotiana tabacum L.*

tetrády



mikrospora se zbytky kalózy

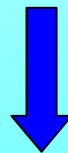


# Androgeneze

= vývoj rostlin ze samčího gametofytu

umožňuje manipulace se stupněm ploidie  
a rychlejší získání homozygotních rostlin

1. **regenerace haploidních rostlin** z mikrospor nebo mladých pylových zrn = **mikrosporové** nebo **prašníkové kultury**
2. zdvojení haploidního genomu = **dihaploidizace**



**získání homozygotního materiálu v kratší době  
ve srovnání s klasickou genetickou metodou**

# Typy androgeneze

**přímá androgeneze =**

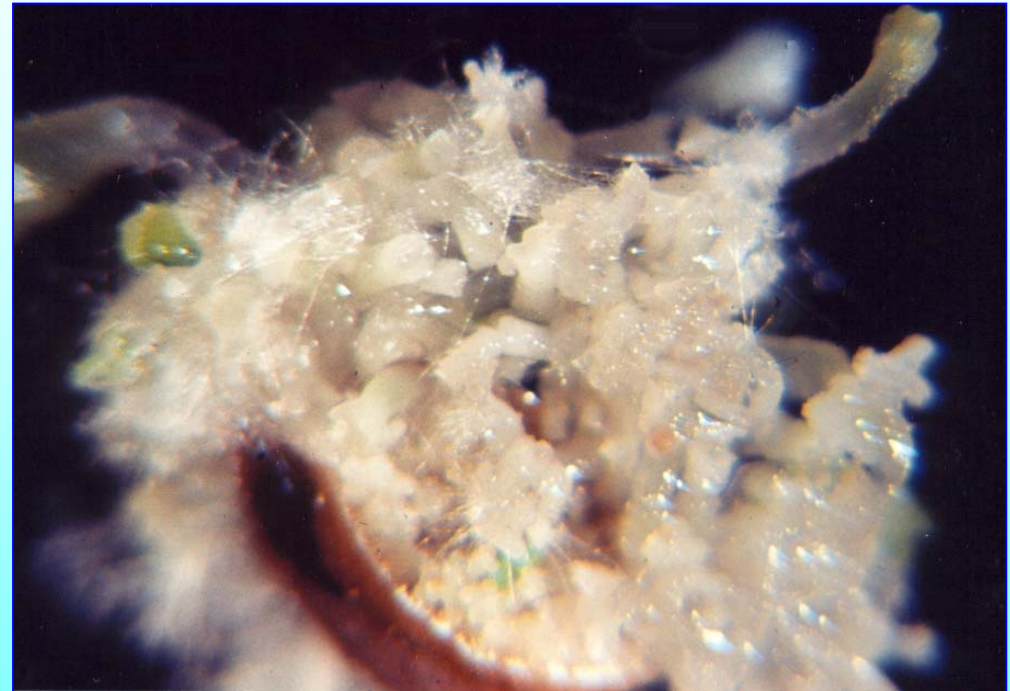
vývoj globulárního embrya a následně haploidní rostliny **přímo** z pylového zrna nebo mikrospory

**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 indukcí embryogeneze opakovaným dělením mikrospory nebo mladého pylového zrna

## 2. nepřímá androgeneze

získání haploidního kalusu a z něj regenerace haploidních rostlin

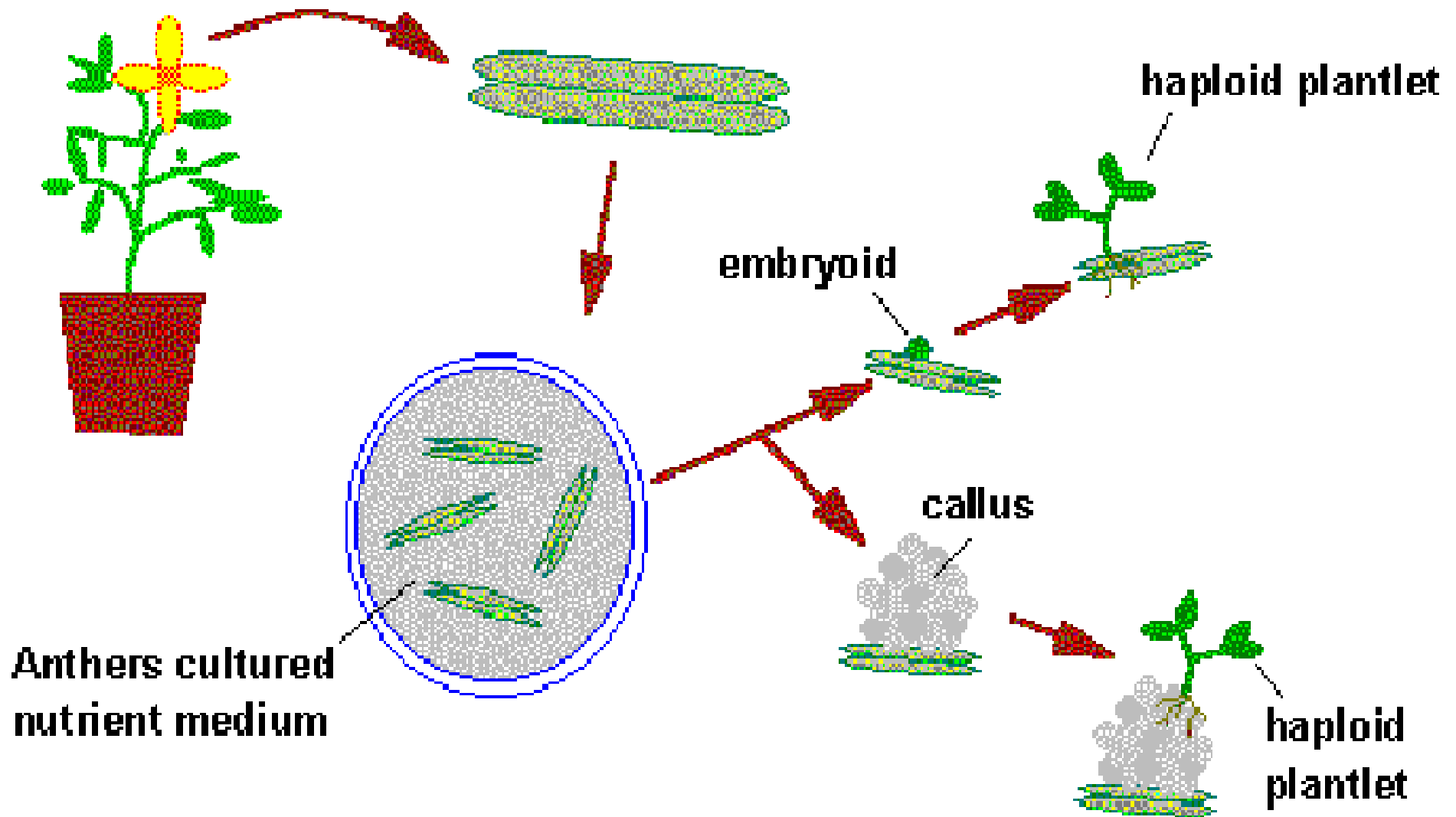
obnovení diploidního stavu

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**

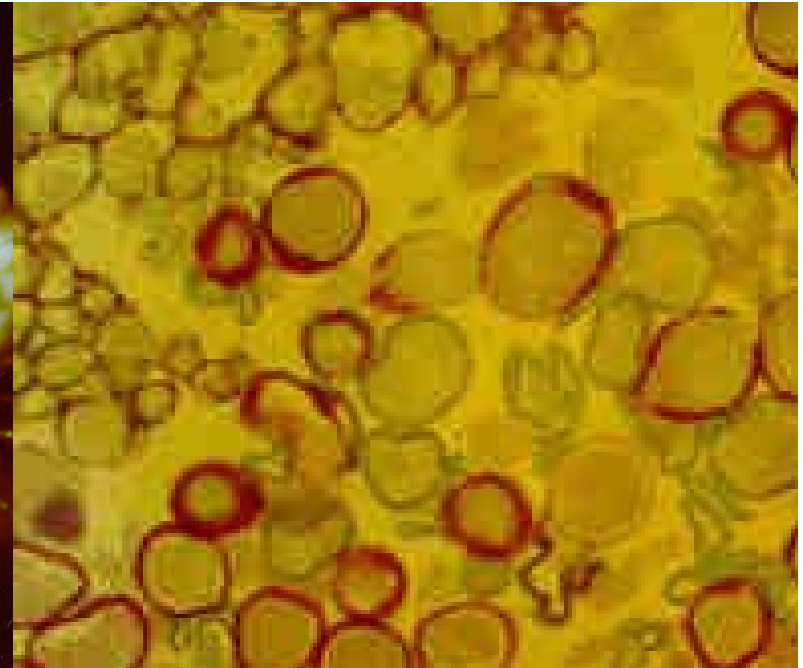
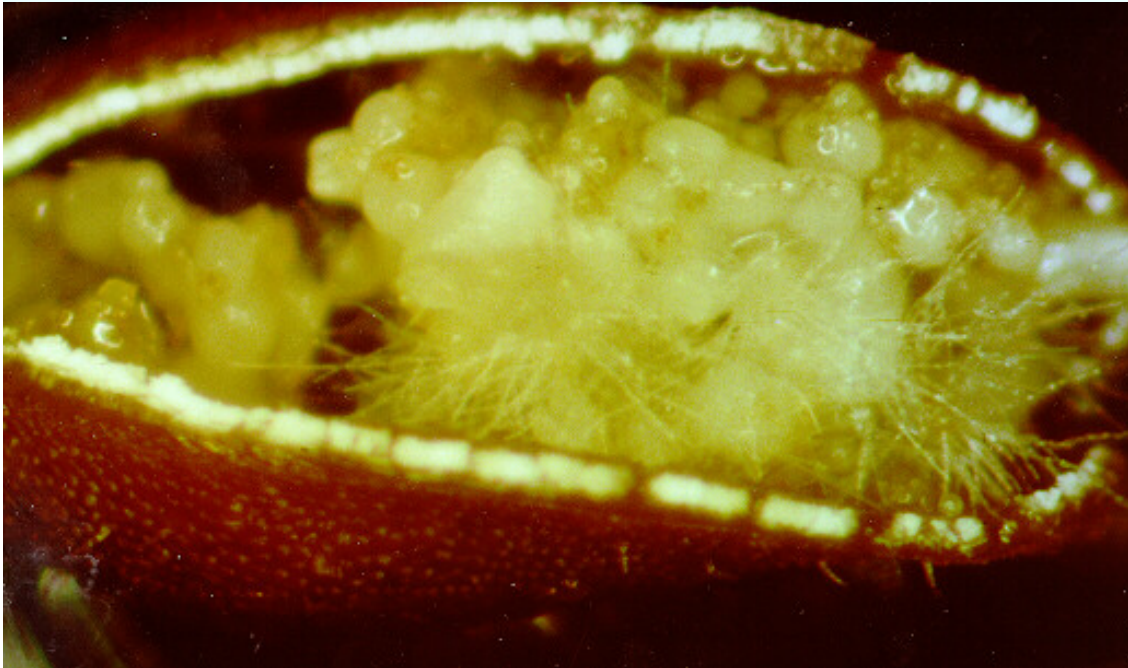
**změny uspořádání mikrotubulů**

**hladovění**

**změna polohy jádra**

# Androgeneze u tabáku

7 dní



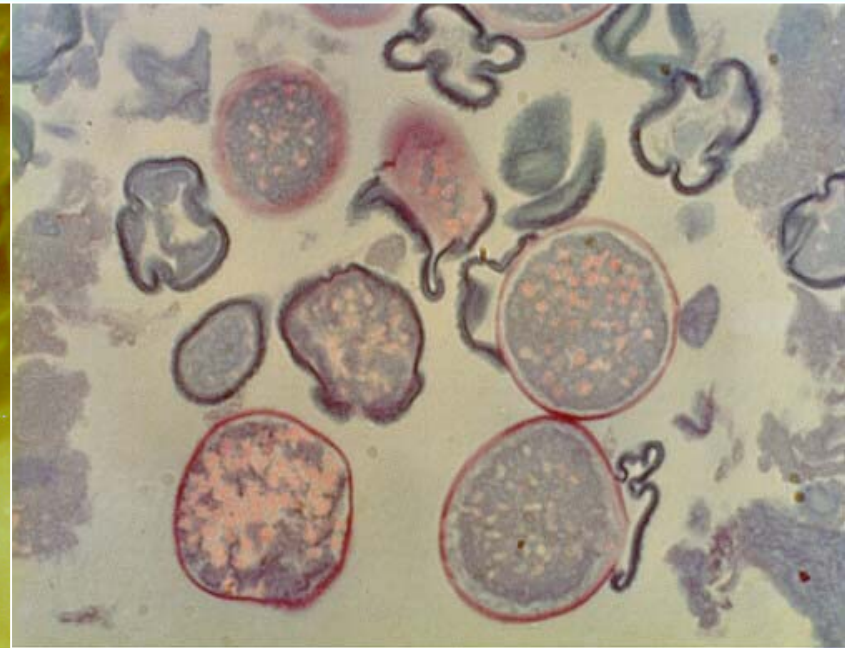
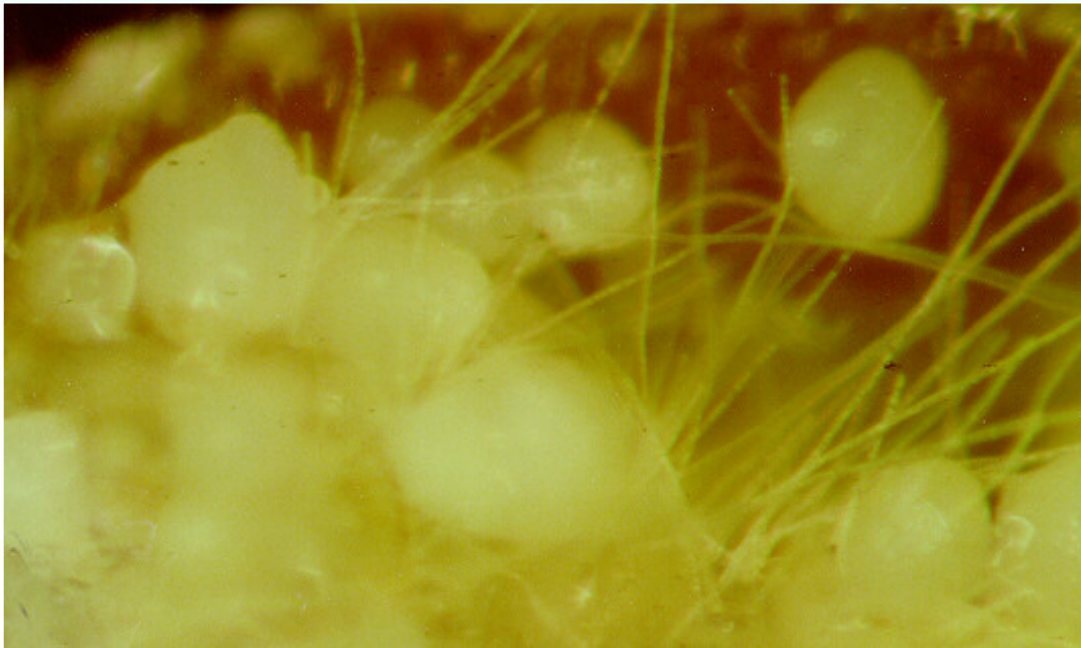
**prašník s embryoidy**

**řez embryoidy**

<http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>

# Androgeneze u tabáku

14 dní



**prašník s embryoidy**

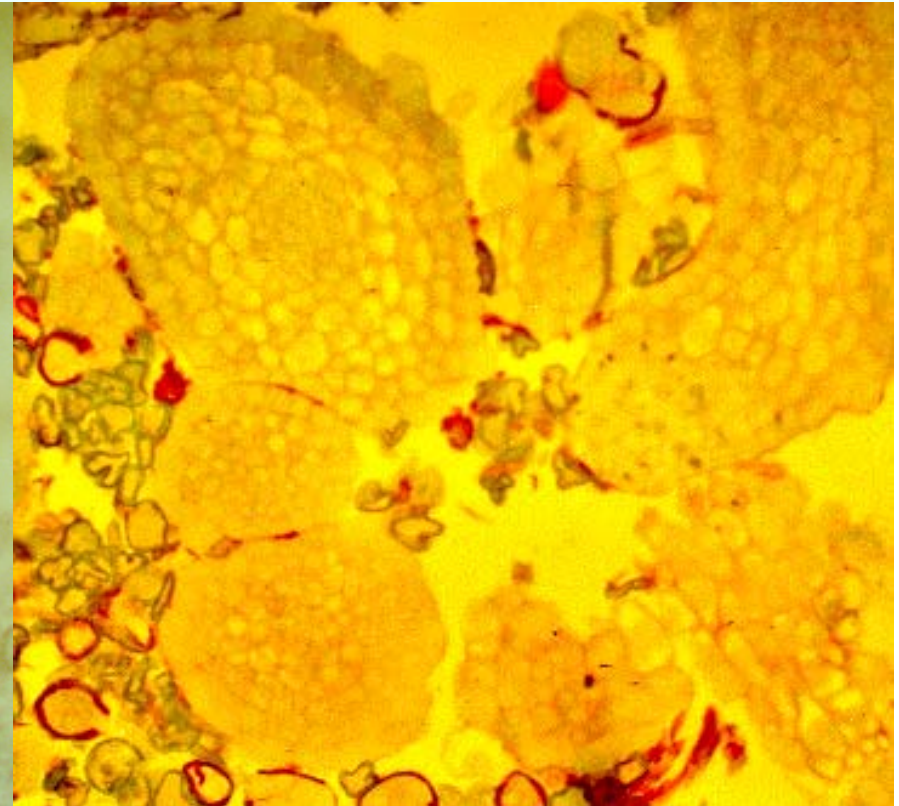
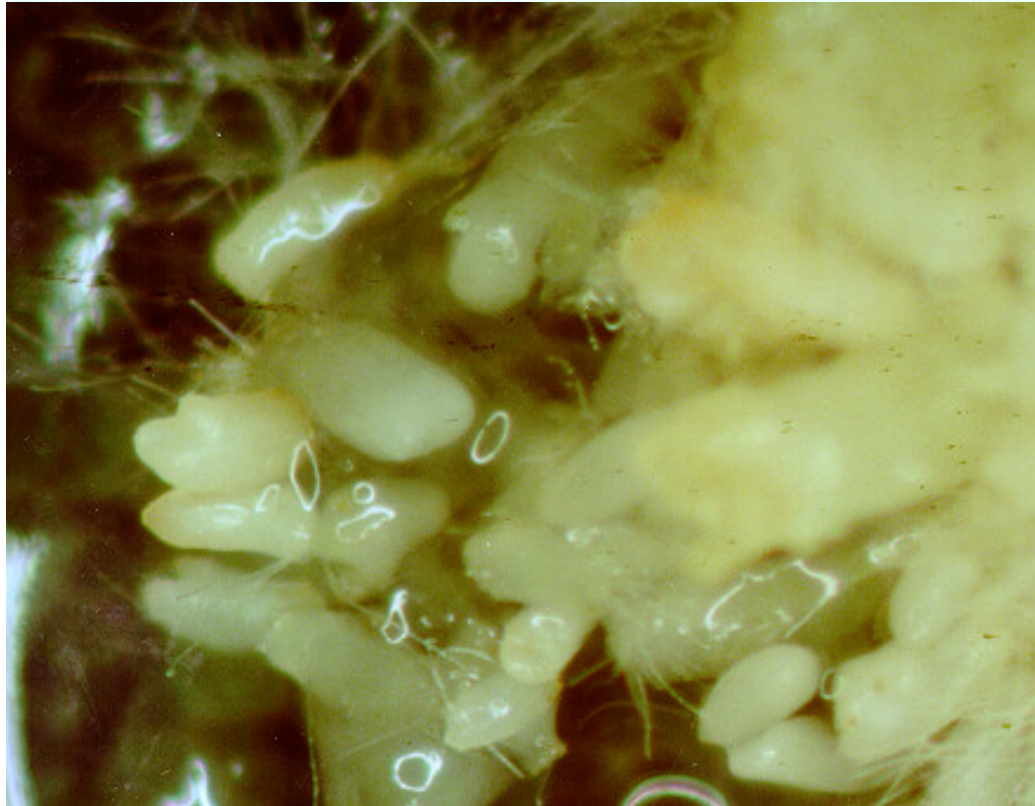
**řez embryoidy**

<http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>



# Androgeneze u tabáku

21 dní



**prašník s embryoidy**

**řez embryoidy**

<http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/gam/gam2dp2.htm>

# Androgeneze u tabáku

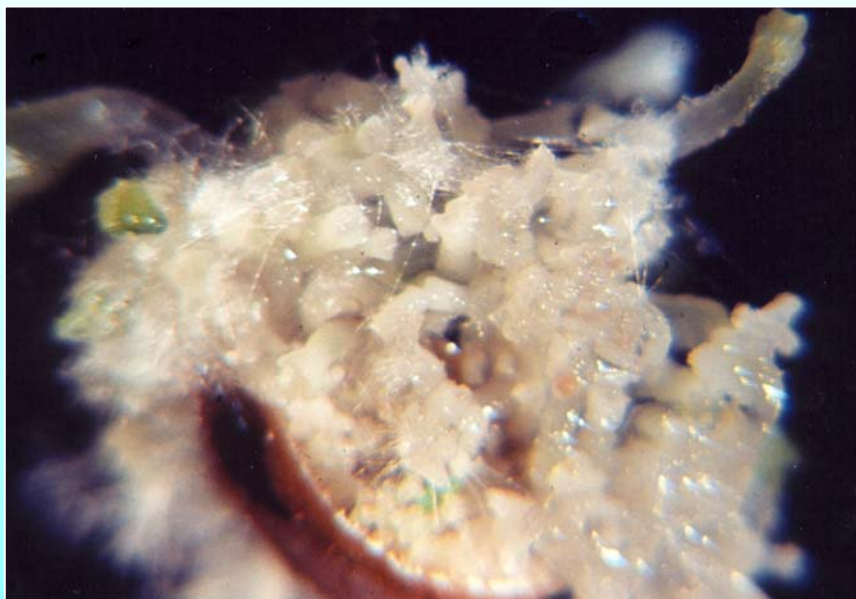
později



Prašník tabáku s vyvíjejícími se haploidními rostlinkami, vzniklými z mikrospor

<http://allserv.rug.ac.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

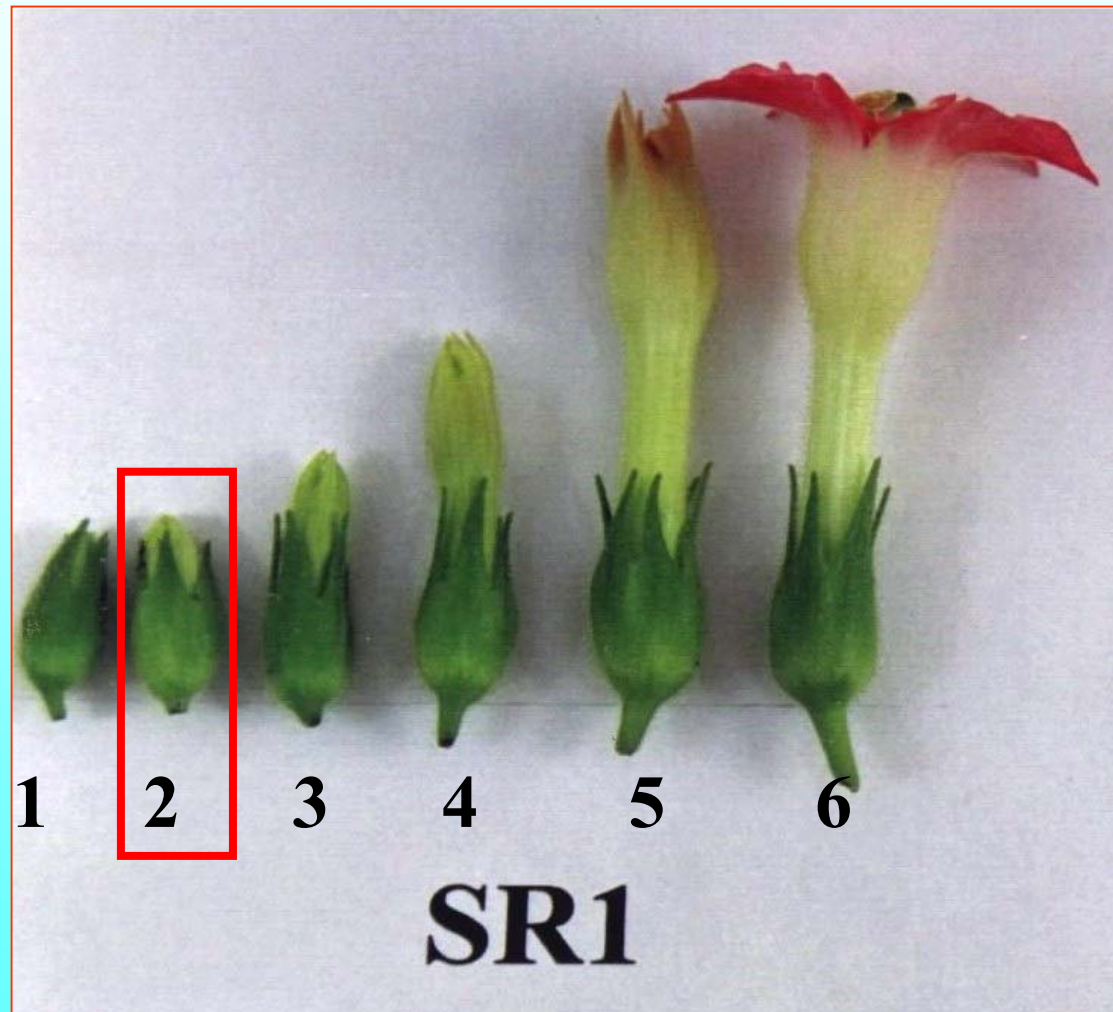
Nejdůležitějším faktorem pro získání haploidů je určité vhodné **vývojové stadium** v době odběru materiálu do kultury.

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

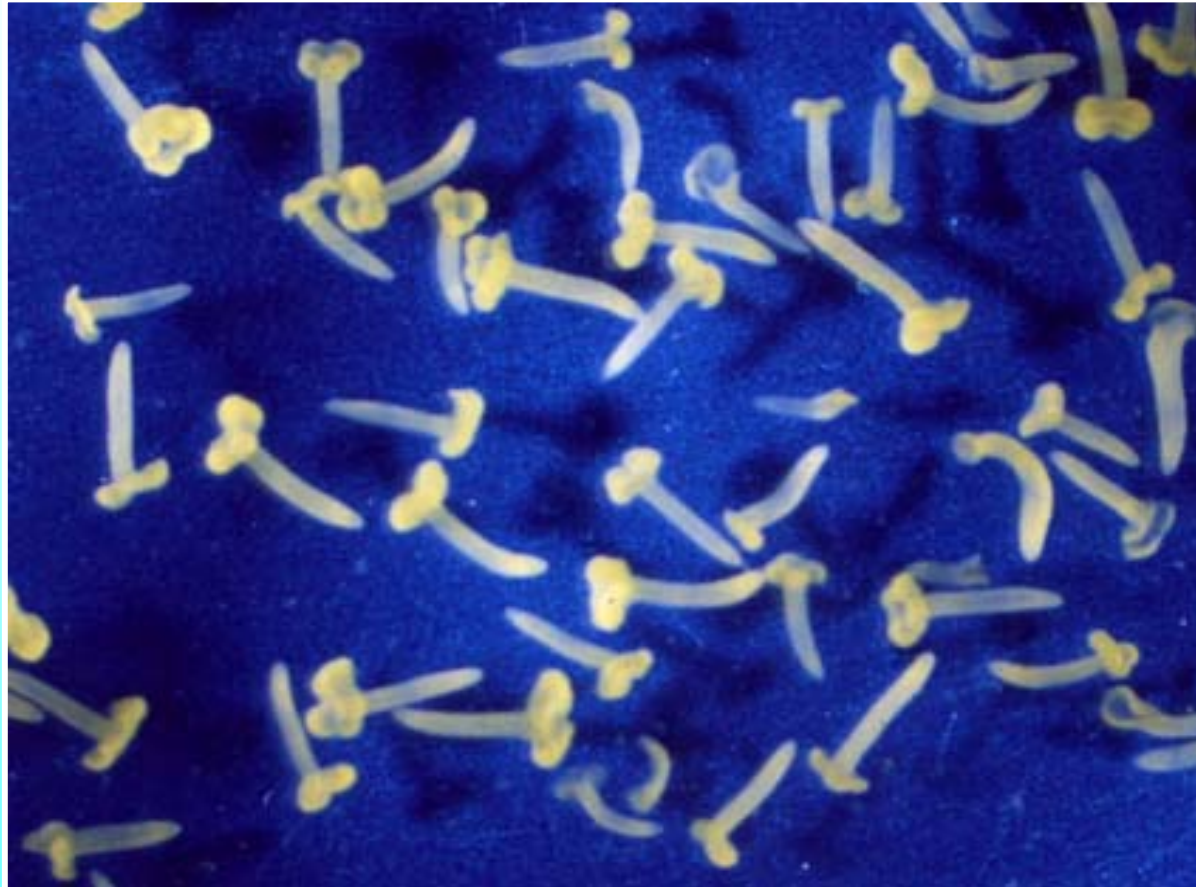
Pyl může být frakcionován centrifugací na **percollovém gradientu**.

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*



katalog firmy

## 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

## 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.