

# Opylování *in vitro*

Rostlinné explantáty

Mgr. Hana Cempírková, PhD.

# Rozmnožování u rostlin

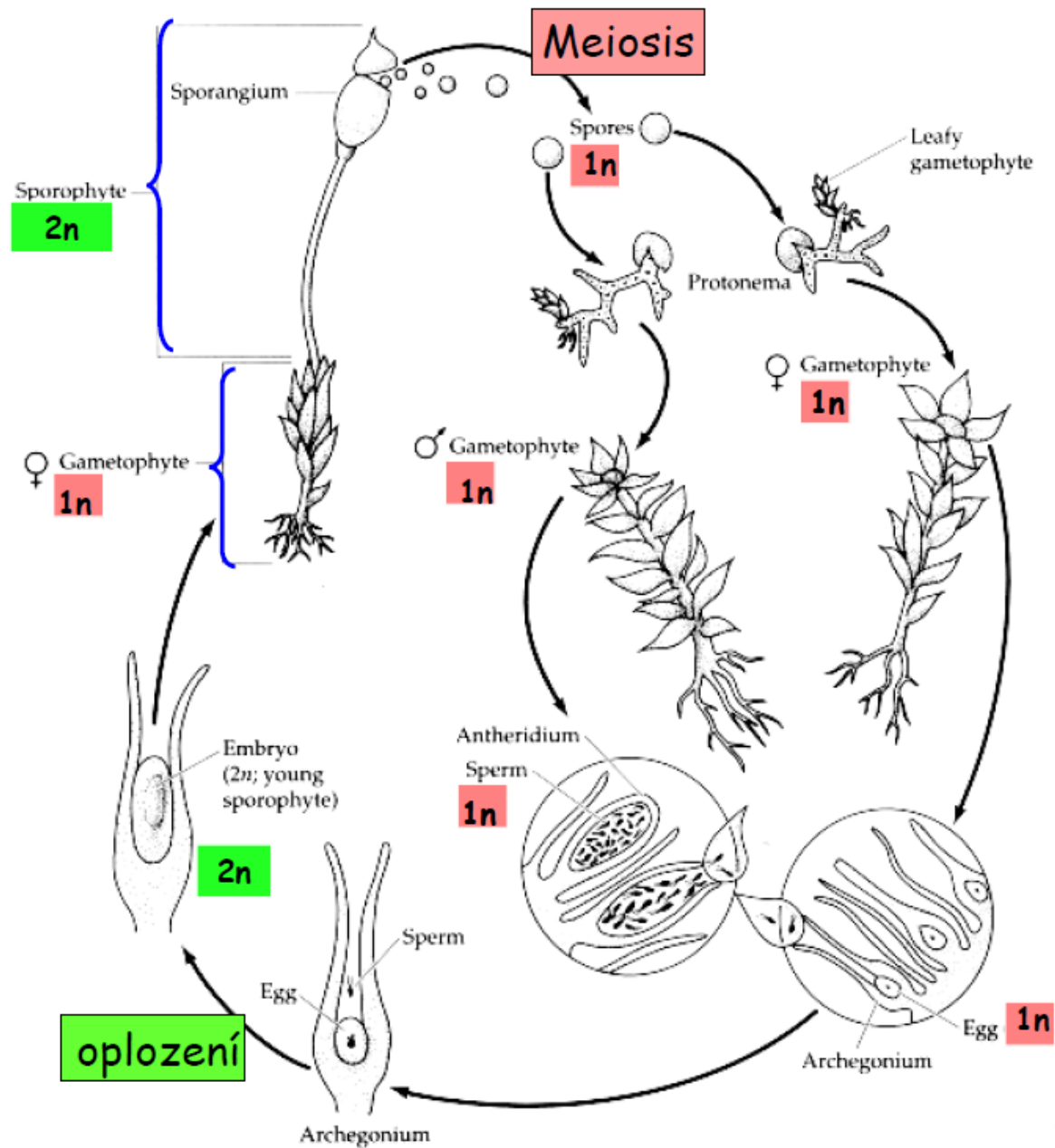
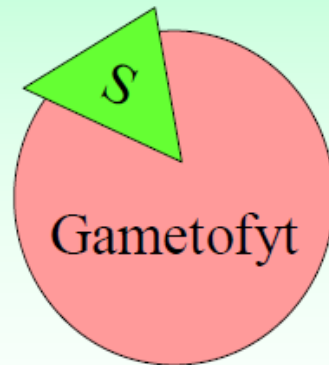
- **vegetativní rozmnožování (amixis)**
  - fragmentace
  - cibulky, hlízky
  - rhizomy
- **generativní rozmnožování (amfimixis)** - specializované struktury - vývoj pohlavních buněk + mechanismus zajišťující jejich fúzi
- **apomixis** - zvláštní varianty rozmnožování - „vegetativní množení z generativních 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**

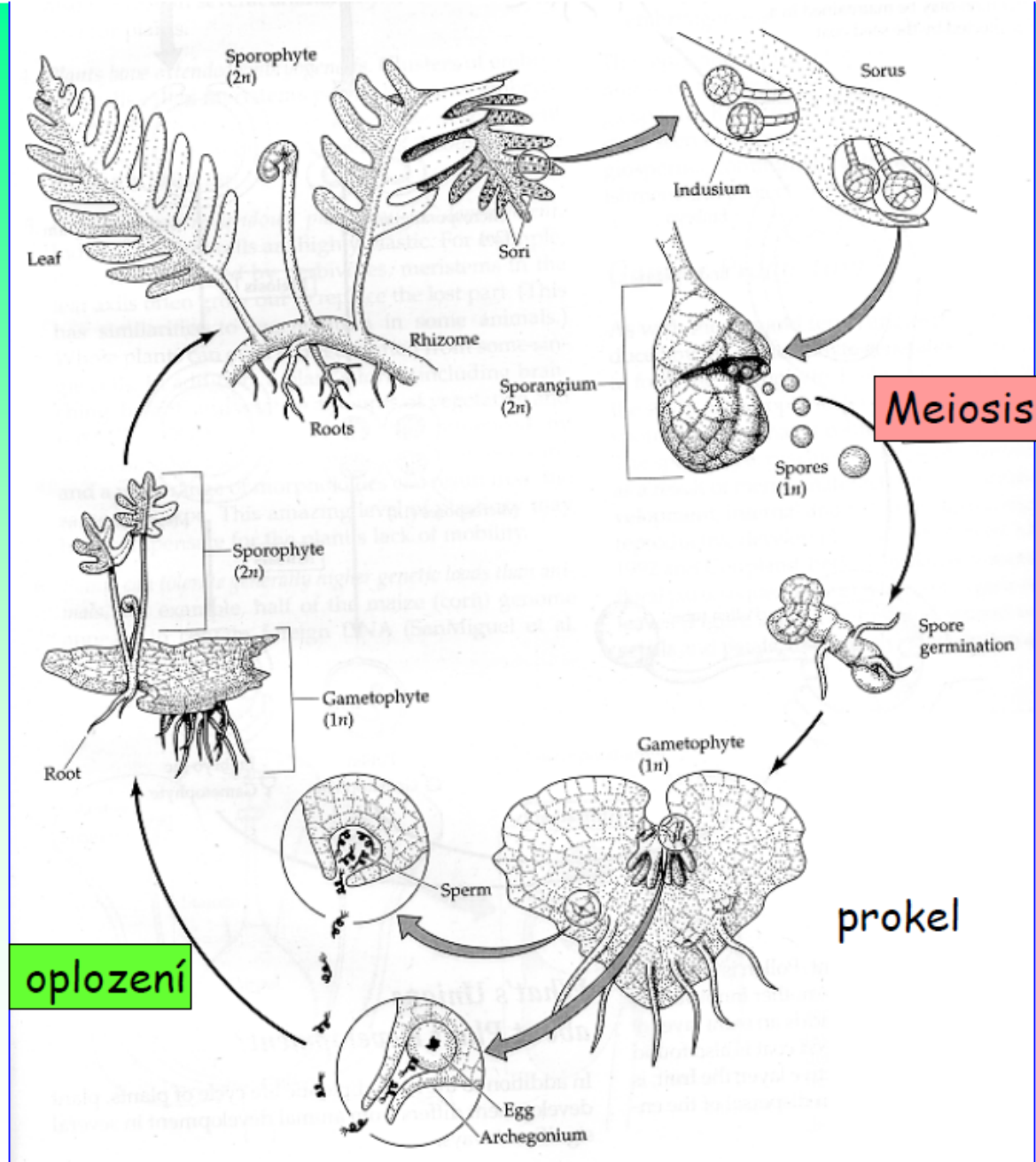
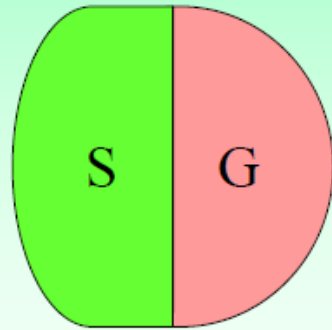
# Rodozměna u mechorostů

embryo i zralý sporofyt jsou závislé na fotosyntéze gametofytu



# Rodozměna u kapradin

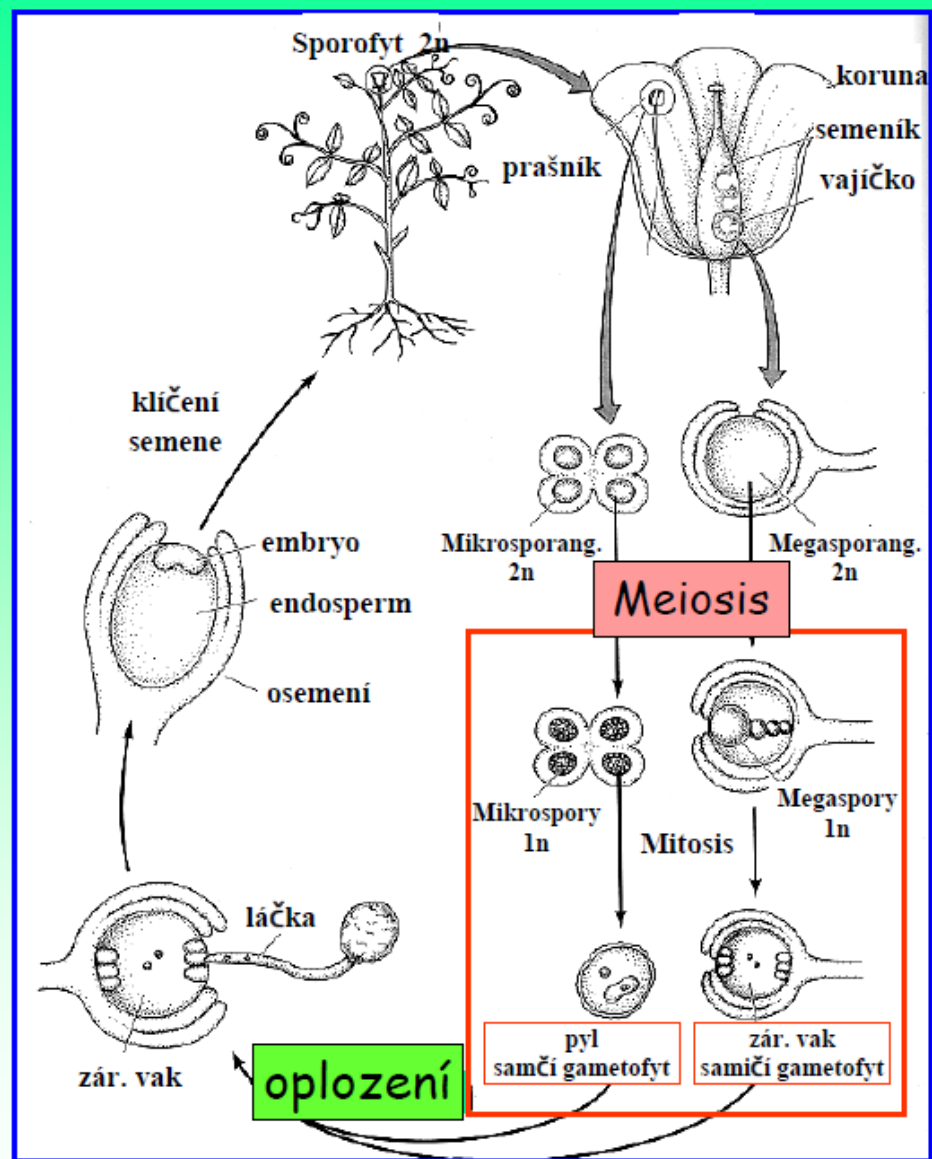
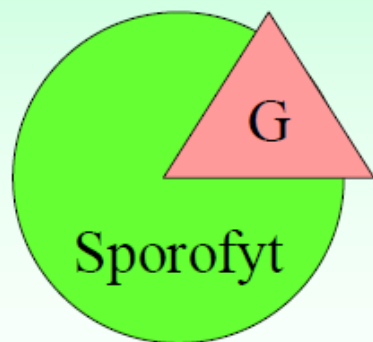
sporofyt i gametofyt je schopný fotosyntézy



# Rodozměna u krytosemenných rostlin

gametofyty jsou závislé na fotosyntéze sporofytu

gametofyty jsou velmi redukováné a rodozměna je tak zastřena



# Funkce generací při oplození u krytosemenných rostlin

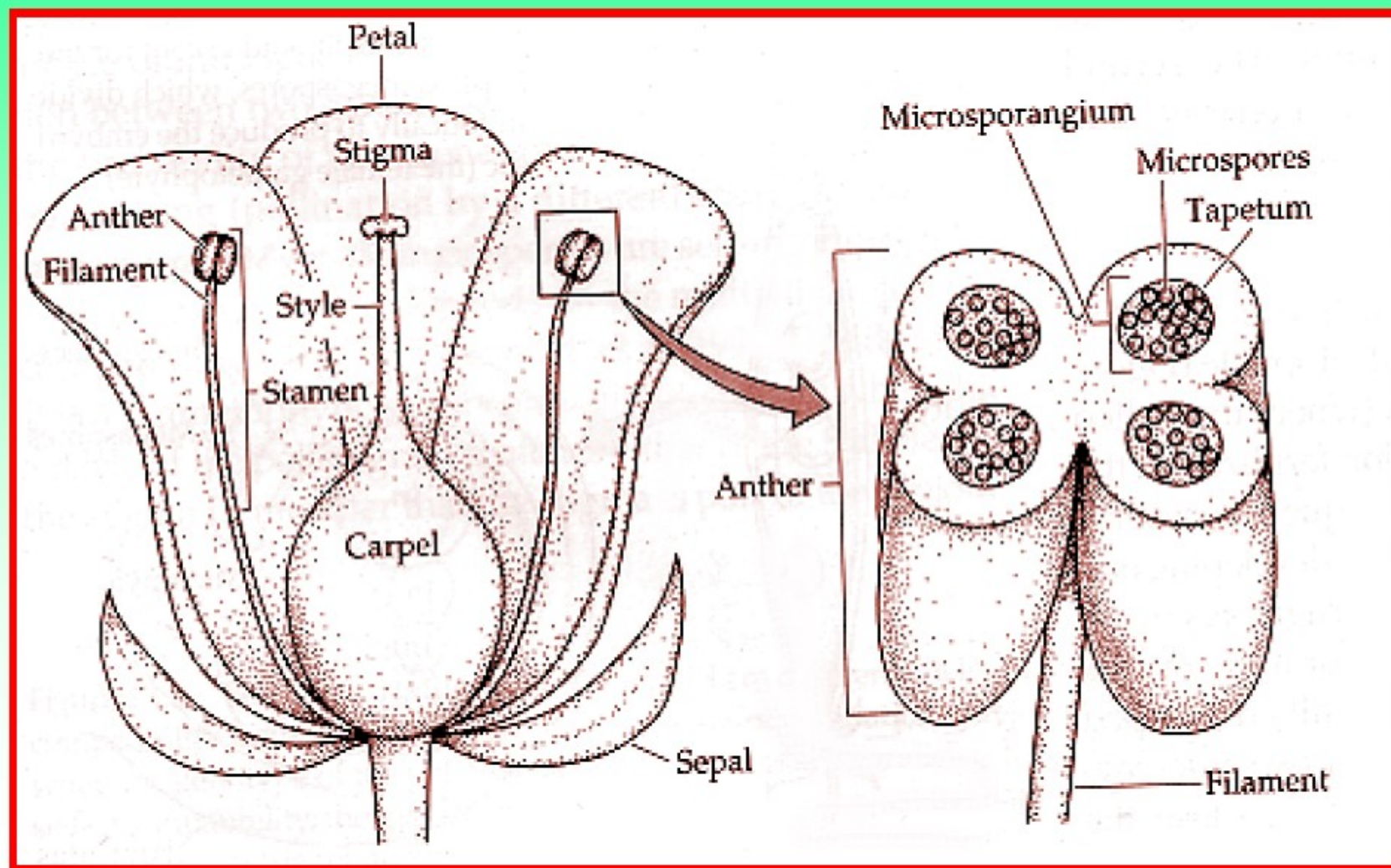
**sporofyt** tvoří:

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

**gametofyt** = tvořen malým počtem buněk, silně specializovaných :

- **zárodečný vak s jedinou vaječnou buňkou**
- **pylová láčka se dvěma spermatickými buňkami**

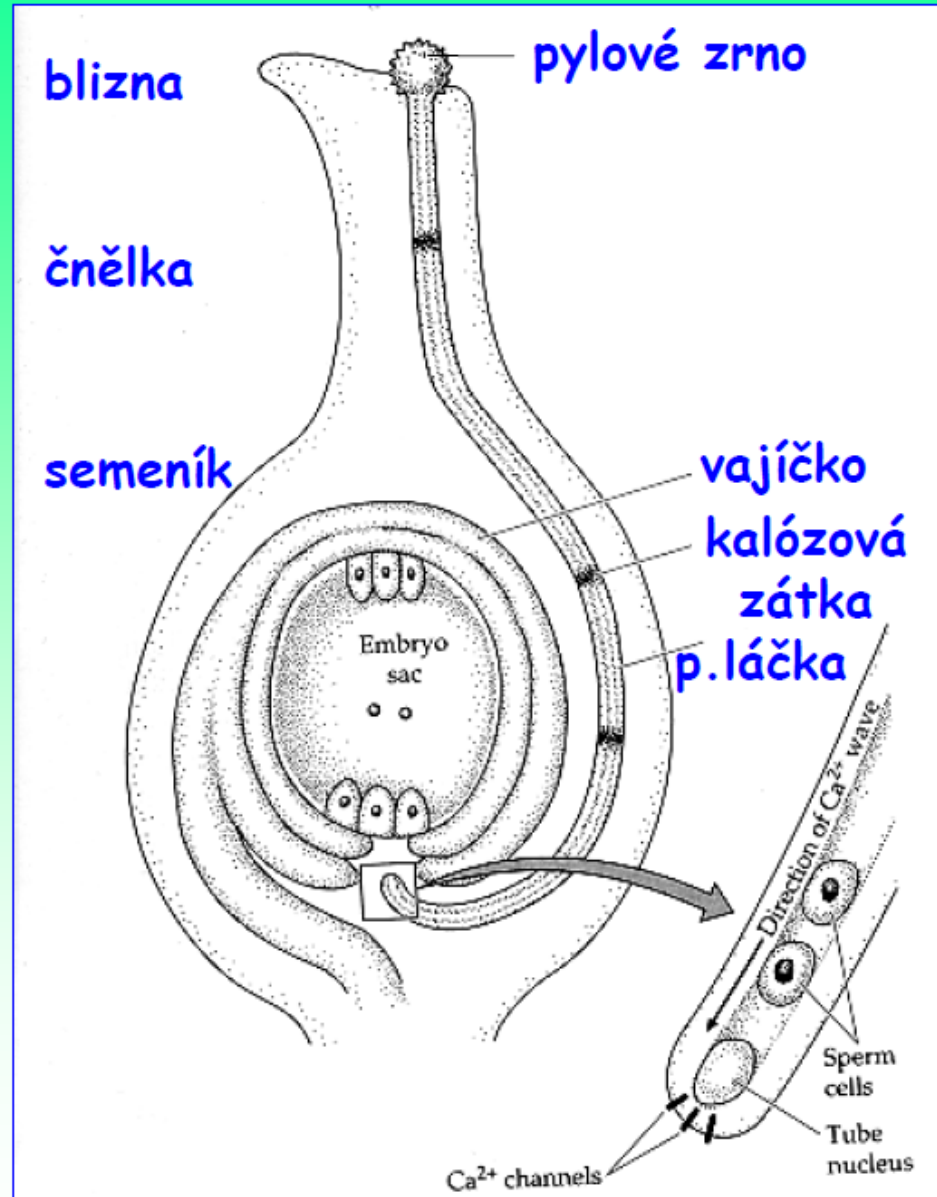
## Schéma stavby květu a prašníku





# Schéma gynecea s vajíčkem

pestík =  
soubor plodolistů =  
gynaecium



# Místa interakcí v pestíku

Povrch pylového zrna:  
pylový tmel  
proteiny ve sporodermě

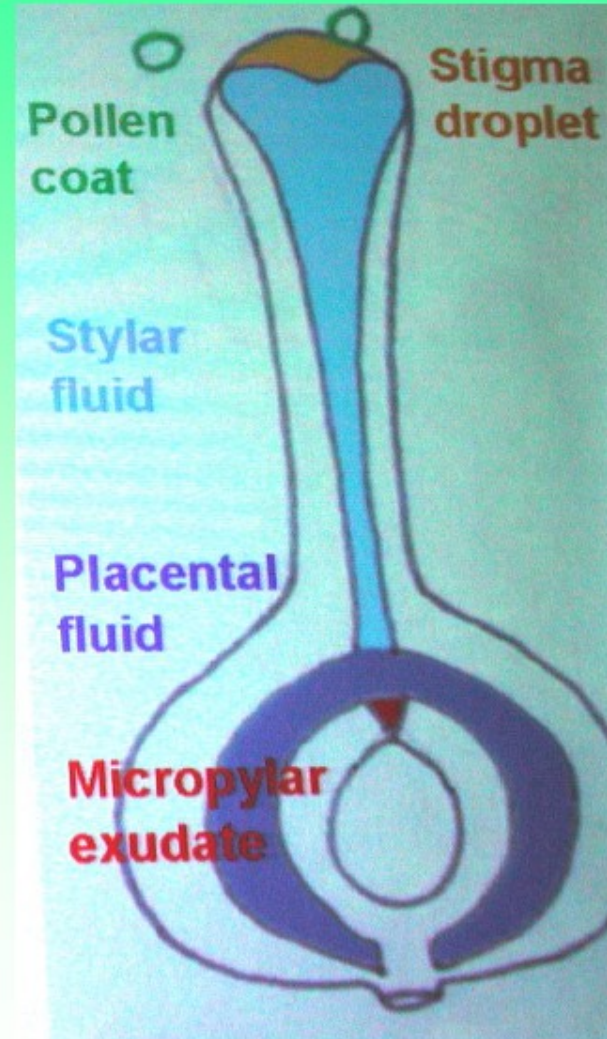
Bliznový exudát

Tekutina kanálu čnělky

Placentární tekutina

Exudát mikropyle

Willemssee (*Haworthia*)



# Bariéry oplození

- **vnější**
  - nepřiměřená teplota a vlhkost
  - nedostatečná výživa
  - působení fyzikálních nebo chemických vlivů
- **vnitřní**
  - inkompatibilita
  - inkongruita (nedostatek informace a koordinace)
  - samčí nebo samičí sterilita

# Inkompatibilita (neslučitelnost)

= neschopnost rostlin tvořit semena, přestože mají funkční gamety

- před 200 lety - **J.G.Kölreuter**  
*Verbascum*:  
po samoopylení netvořila semena  
po cizosprášení ano



- **Stout (1917)** - studium fertility *Cichorium intybus*

# Typy inkompatibility

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

## Inkompatibilita sporofytického typu

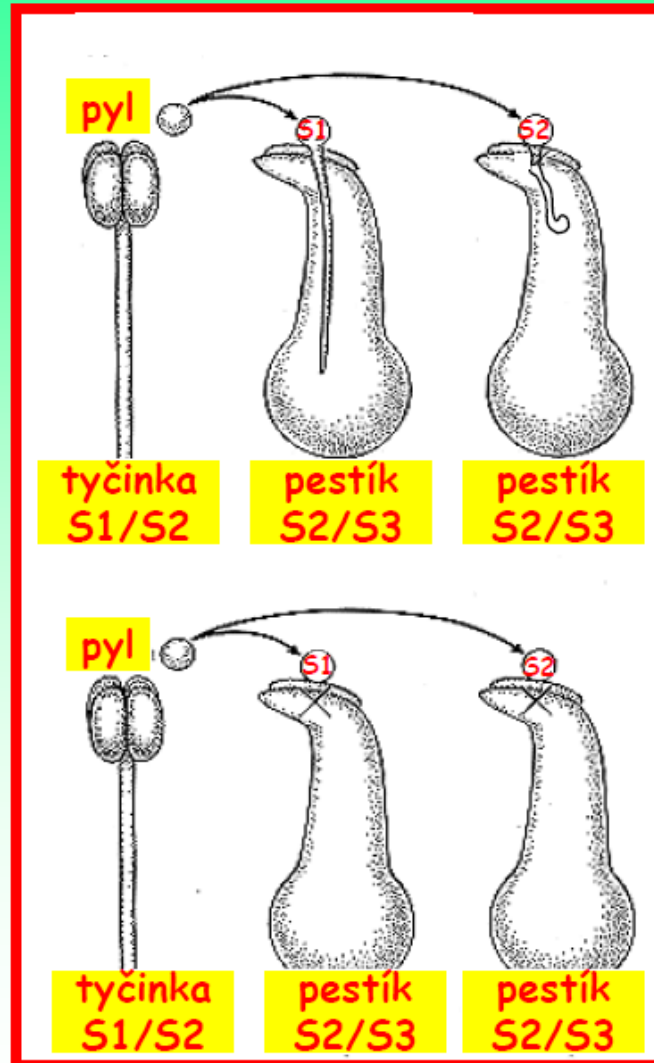
- je daná genotypem rostliny, která produkuje pyl (**sporofytem**), bez ohledu na genotyp si pyl ponechává fenotypovou reakci dominantní alely
- projevuje se **již na povrchu blizny** (proteiny z tapeta)
- suché blizny a 3 buněčný pyl

## 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, dvoubuněčný pyl
  - u čeledí *Viciaceae*, *Solanaceae*

# Inkompatibilita

gametofytického  
typu



sporofytického  
typu



# Funkce inkompatibility

- **zabránění samoopylení**
  - podporuje cirkulaci genů v populaci
  
- **zabránění mezidruhovému nebo vzdálenějšímu (mezirodovému) křížení**
  - podporuje stabilitu druhu

Nettancourt *et* Devreux 1977

# Překonání inkompatibility

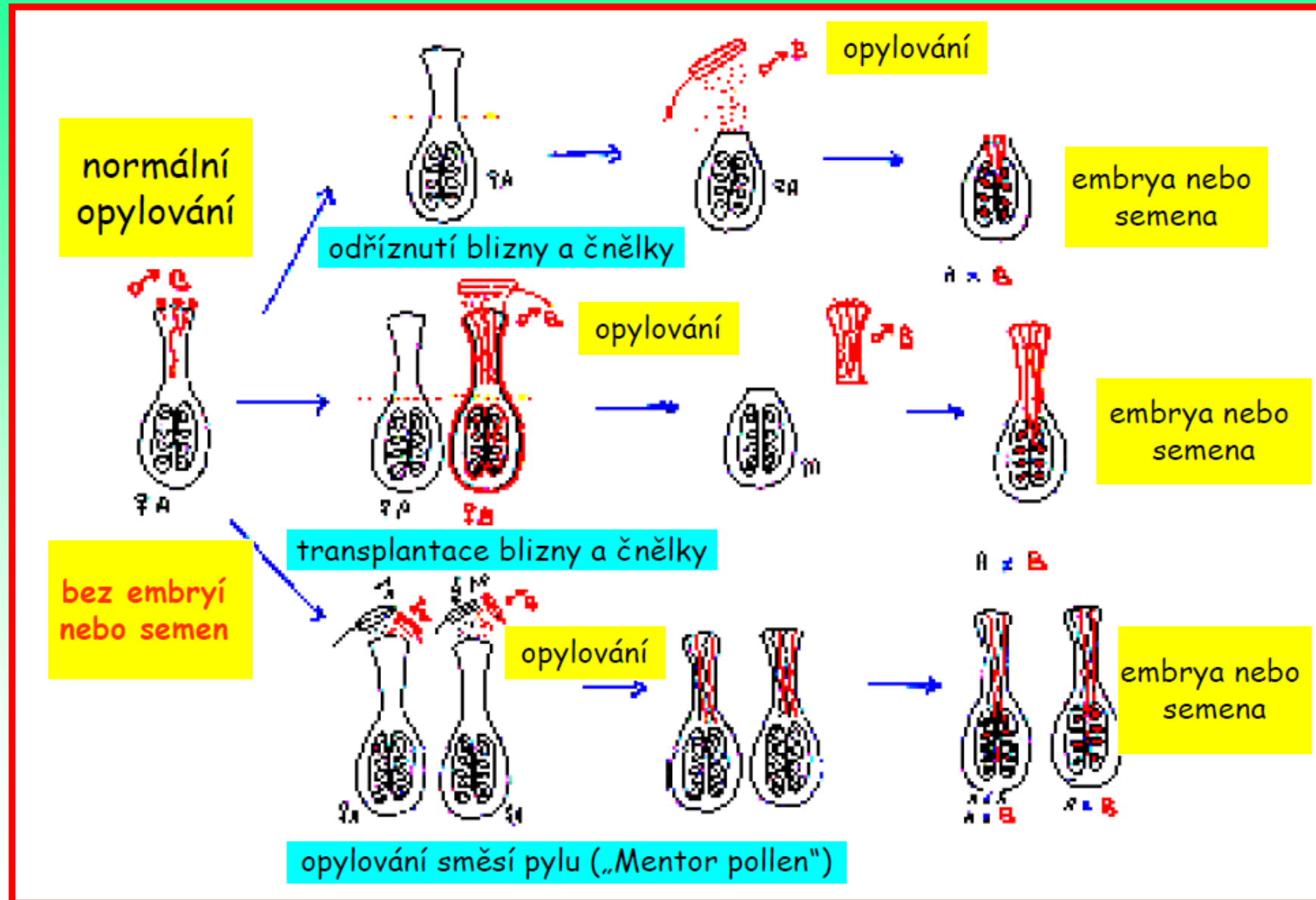
umělé opylování *in situ*

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*



## Intraovarijní opylování *in situ*

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

# 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

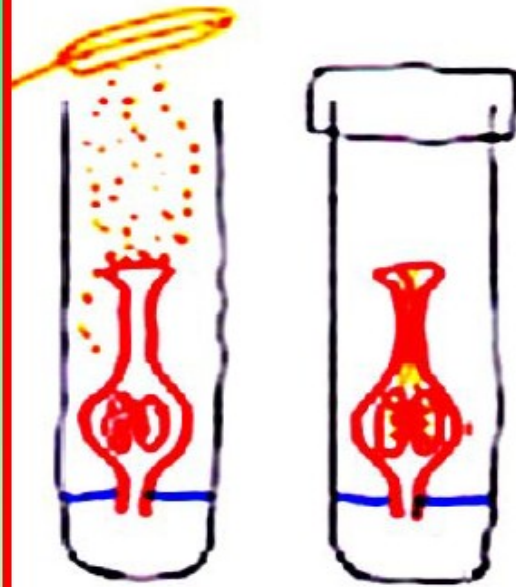
# Opylování *in vitro* (IVF)

- Výzkum buněčné a molekulární kontroly oplození u vyšších rostlin
- Aplikace v rostlinných biotechnologiích
- Nově vytvořené fúzní produkty jsou v médiu a přímo využitelné pro techniky molekulární buněčné biologie
- Potenciál pro tvorbu nových hybridů
- Transformace rostlin bez nutnosti využití genů pro antibiotika a herbicidy pro sledování transformovaných produktů

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*

# Opylování izolovaných vajíček

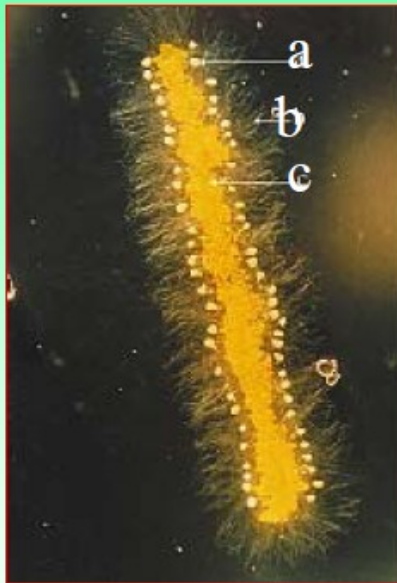
- Kameya (1966, 1970)
- Chi (2000)

*Brassica*

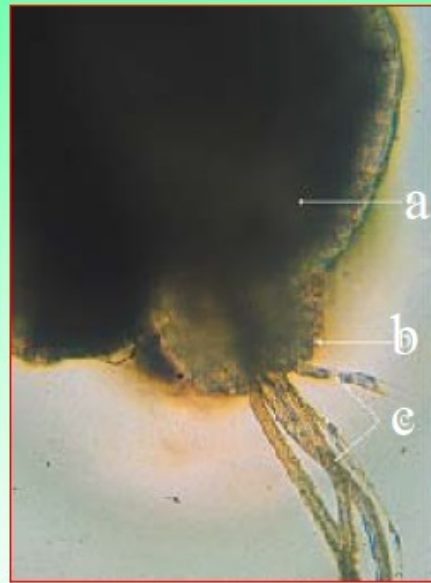
*Lilium*

# Opylování izolovaných vajíček

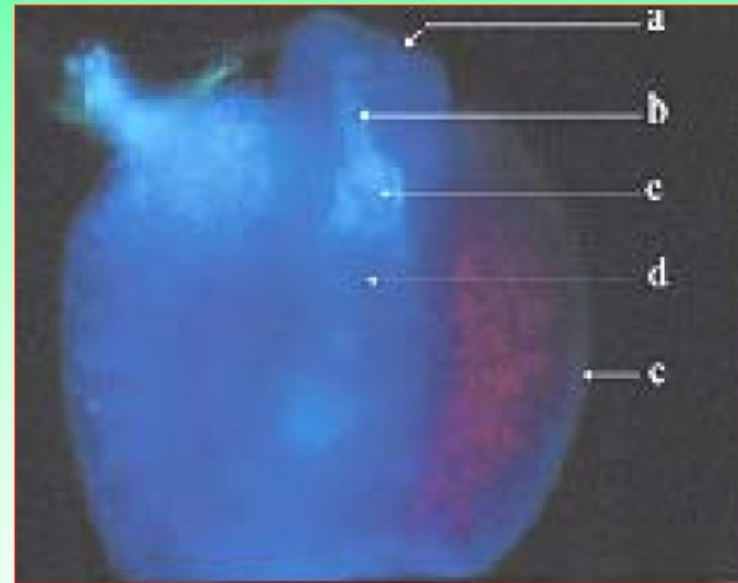
CHI (Bot. Bull. Acad. Sinn. (2000) 41: 143 - 149



a = vajíčka  
b = pyl. láčky  
c = pyl



Detail mikropyle  
s pyl. láčkami



Pylové láčky v mikropyle  
a synergidách

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

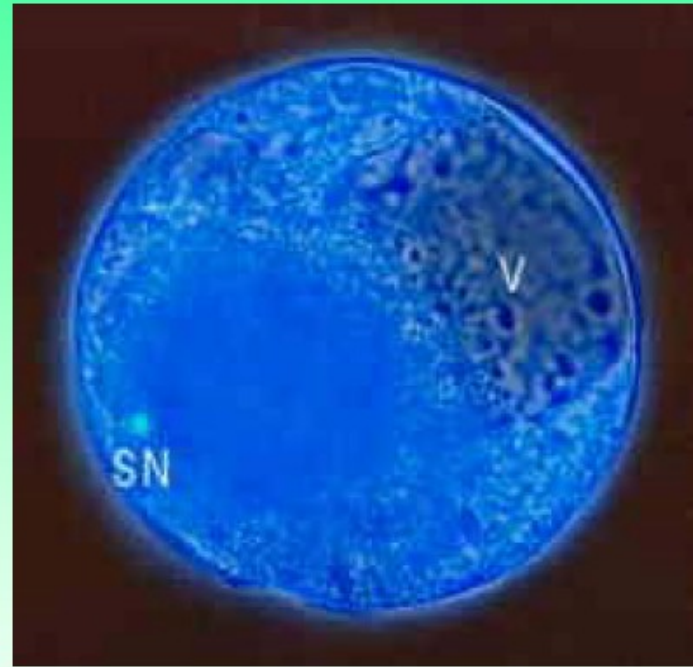
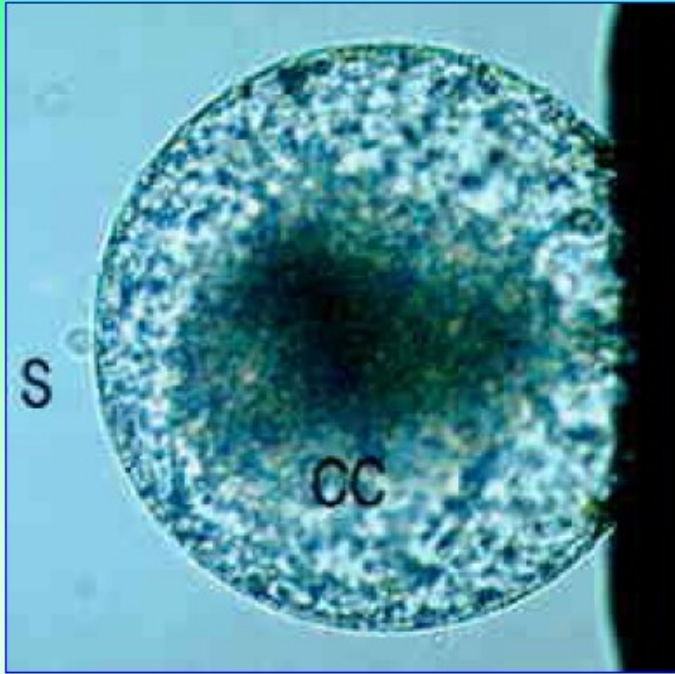


enzymatická izolace buněk  
zárodečného vaku

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

<http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/kranz/St-Louis.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, epifluorescence po DAPI barvení

(Kranz *et al.*, 1998)

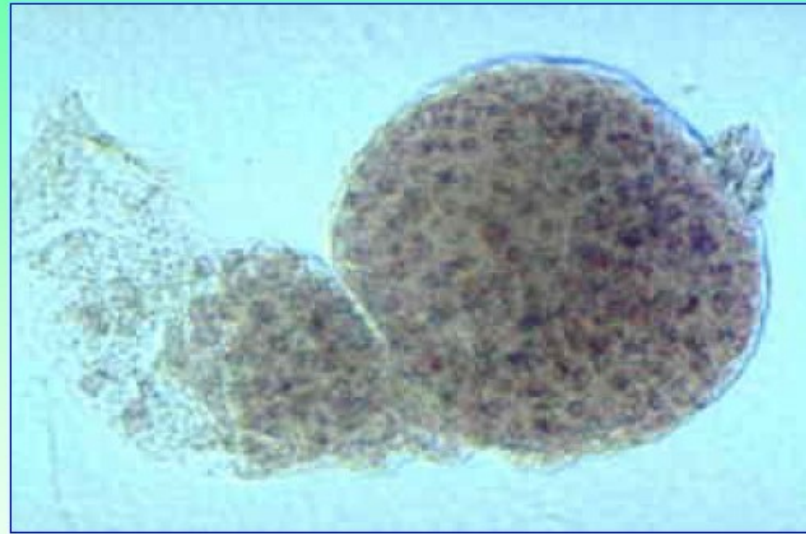
# Oplození izolovaných gamet primární endospermální buňka kukuřice (Univerzita Hamburg)



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

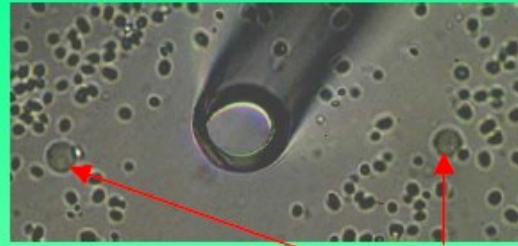


# Oplození izolovaných gamet endosperm kukuřice po 5 DK (Univ. Hamburg)

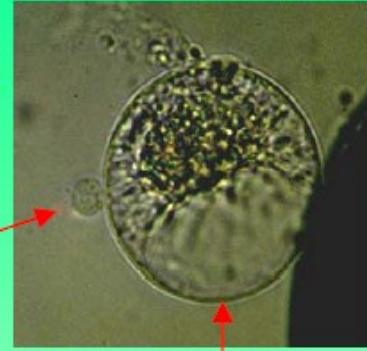


Feulgenovou reakcí barvené buňky endospermu kukuřice vytvořené *in vitro* -  
po 5 dnech kultury. (Kranz *et al.*, 1998)

Okamoto  
Brno 2003

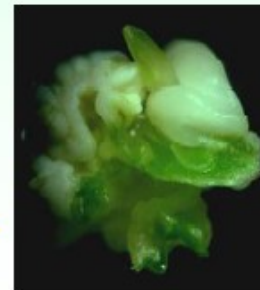
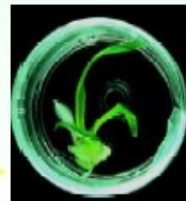
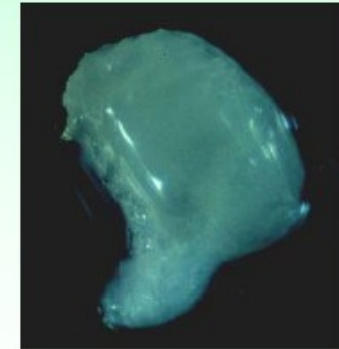
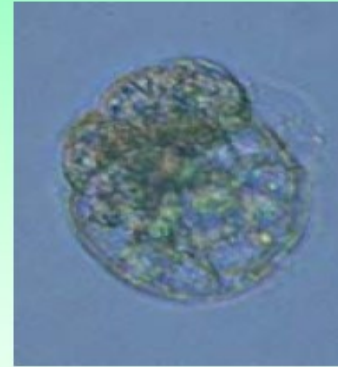
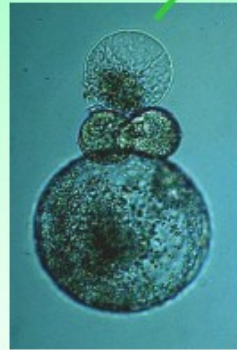
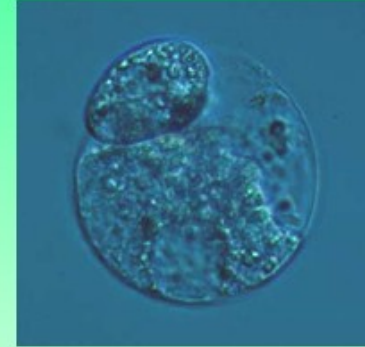
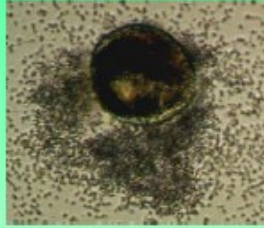


Sperm cell



Egg cell

# In Vitro Fertilization in *Zea*



# Time course of the early events of *in vitro* zygote development in maize, Okamoto, Hamburg (Brno 2003)



Karyogamy 35-90 min



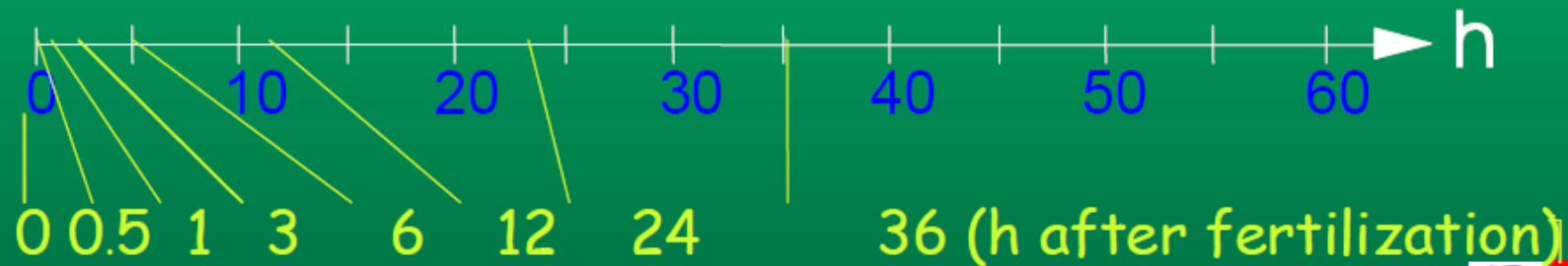
First Cell  
Division  
40 - 50 h



Cell Wall Formation 30 sec



Syngamy 1 sec



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21207258>

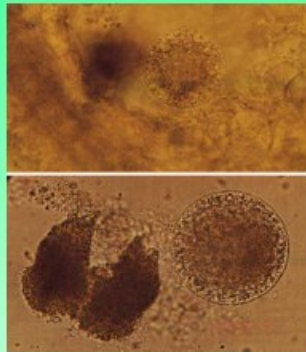
- [Methods Mol Biol.](#) 2011;710:17-27. doi: 10.1007/978-1-61737-988-8\_2.
- **In vitro fertilization with rice gametes: production of zygotes and zygote and embryo culture.**
- [Okamoto T<sup>1</sup>.](#)
- Fúze gamet rýže pomocí elektrofúze: zygota se rozdělila na asymetrické dvou-buněčné embryo a pak rané globulární embryo. Další vývoj embrya v nepravidelně tvarované masy buněk, ze kterých lze regenerovat fertilní rostliny



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

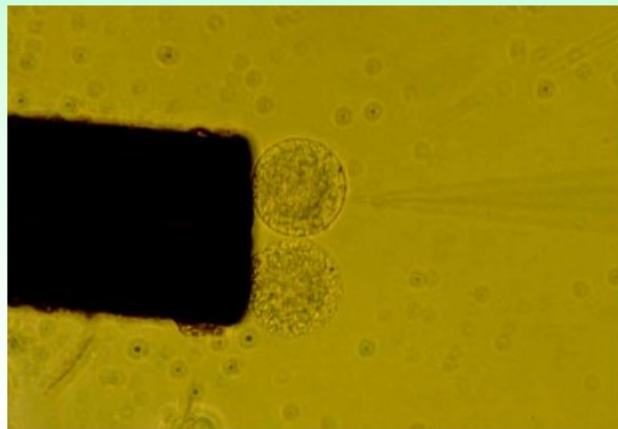
mikrochirurgická izolace buněk

synergida



vaječná buňka

imobilizace vaječné buňky s použitím elektrického proudu



mikroinjekce DNA  
do imobilizované  
vaječné buňky

<http://www.nature.com/cr/journal/v15/n9/full/7290343a.html>

- *Cell Research* (2005) **15**, 734–738. doi:10.1038/sj.cr.7290343
- A novel *in vitro* system for gamete fusion in maize
- Xiong Bo PENG, Meng Xiang SUN and Hong Yuan YANG
  
- **Fúze rostlinných gamet pomocí elektrického pulzu, vápníku, polyetylenglykolu**
- **V této práci nová metoda: BSA-zprostředkovaná fúze gamet kukuřice (bovine sérum albumin)**
- **Oplodněné vajíčko vykazovalo normální regeneraci buněčné stěny a dělení jádra**
- **Při optimální koncentraci BSA a vhodném pH byla úspěšnost fúze gamet 96,7%**

- **Electro-fusion of Gametes and Subsequent Culture of Zygotes in Rice** (<https://bio-protocol.org/e2074>) (2016)