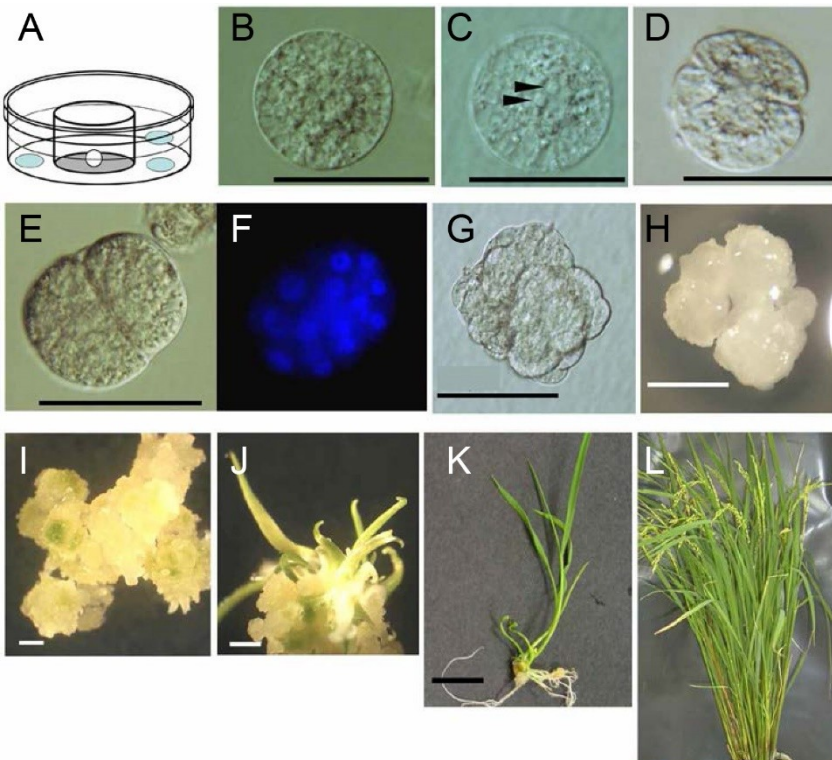
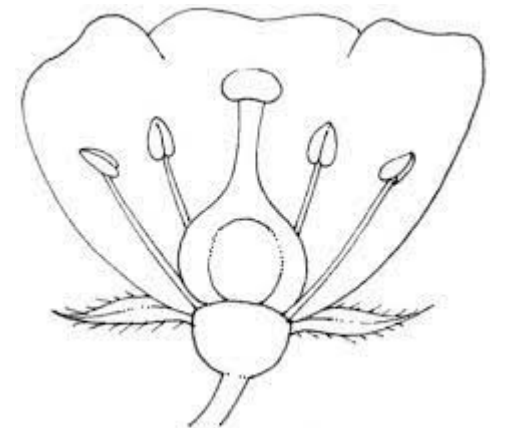


Opylování *in vitro*



Rostlinné explantáty
Mgr. Hana Cempírková, PhD.



Rozmnožování u rostlin

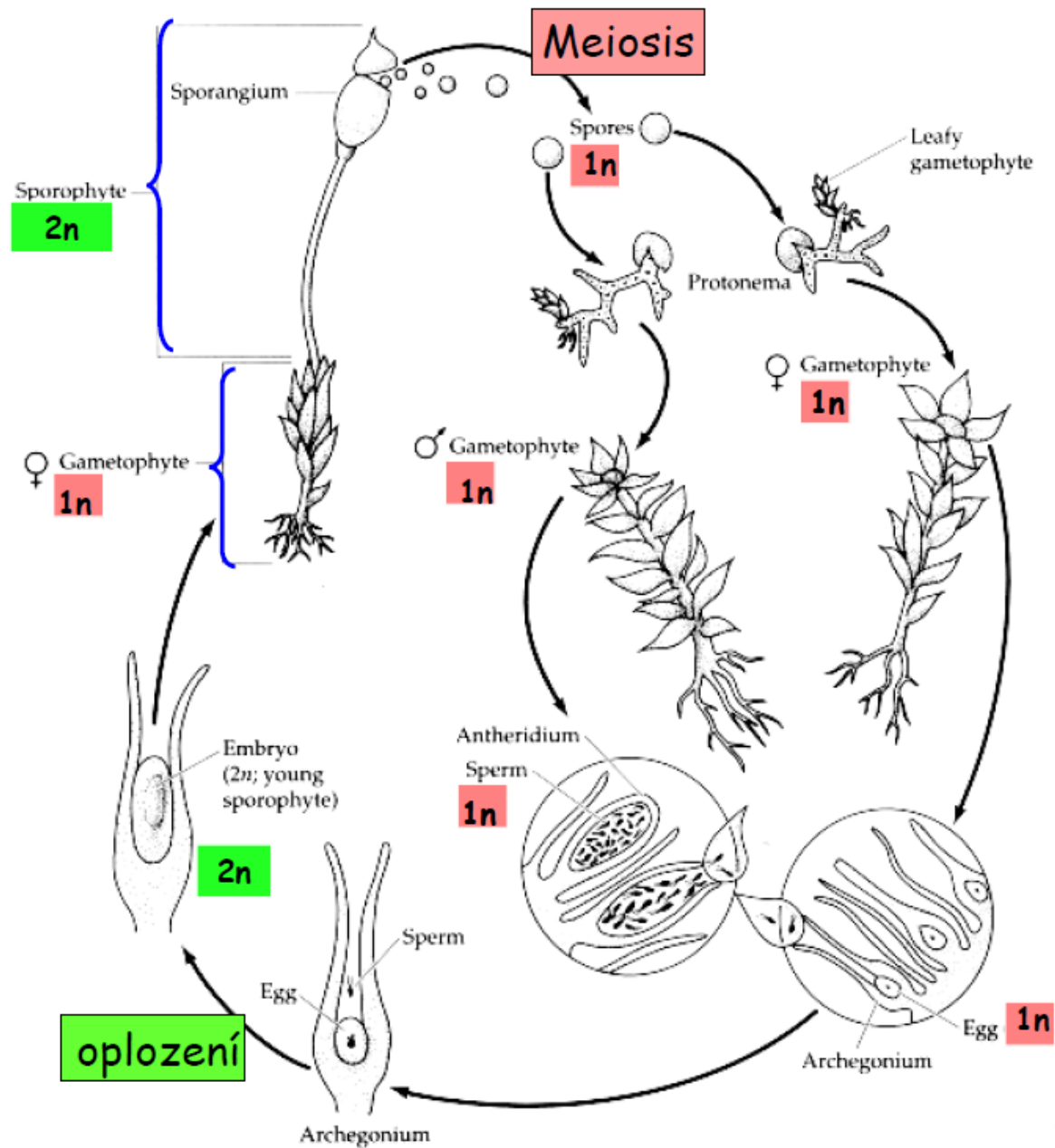
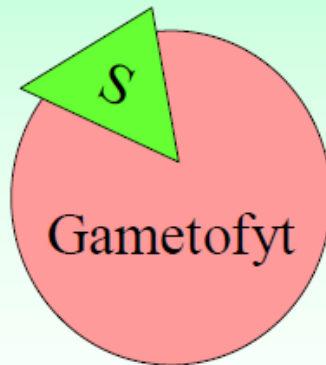
- **vegetativní rozmnožování (amixis)**
 - fragmentace
 - cibulky, hlízky
 - rhizomy
- **generativní rozmnožování (amfimixis)** - specializované struktury - vývoj pohlavních buněk + mechanismus zajišťující jejich fúzi
- **apomixis** - zvláštní varianty rozmnožování - „vegetativní množení z generativních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

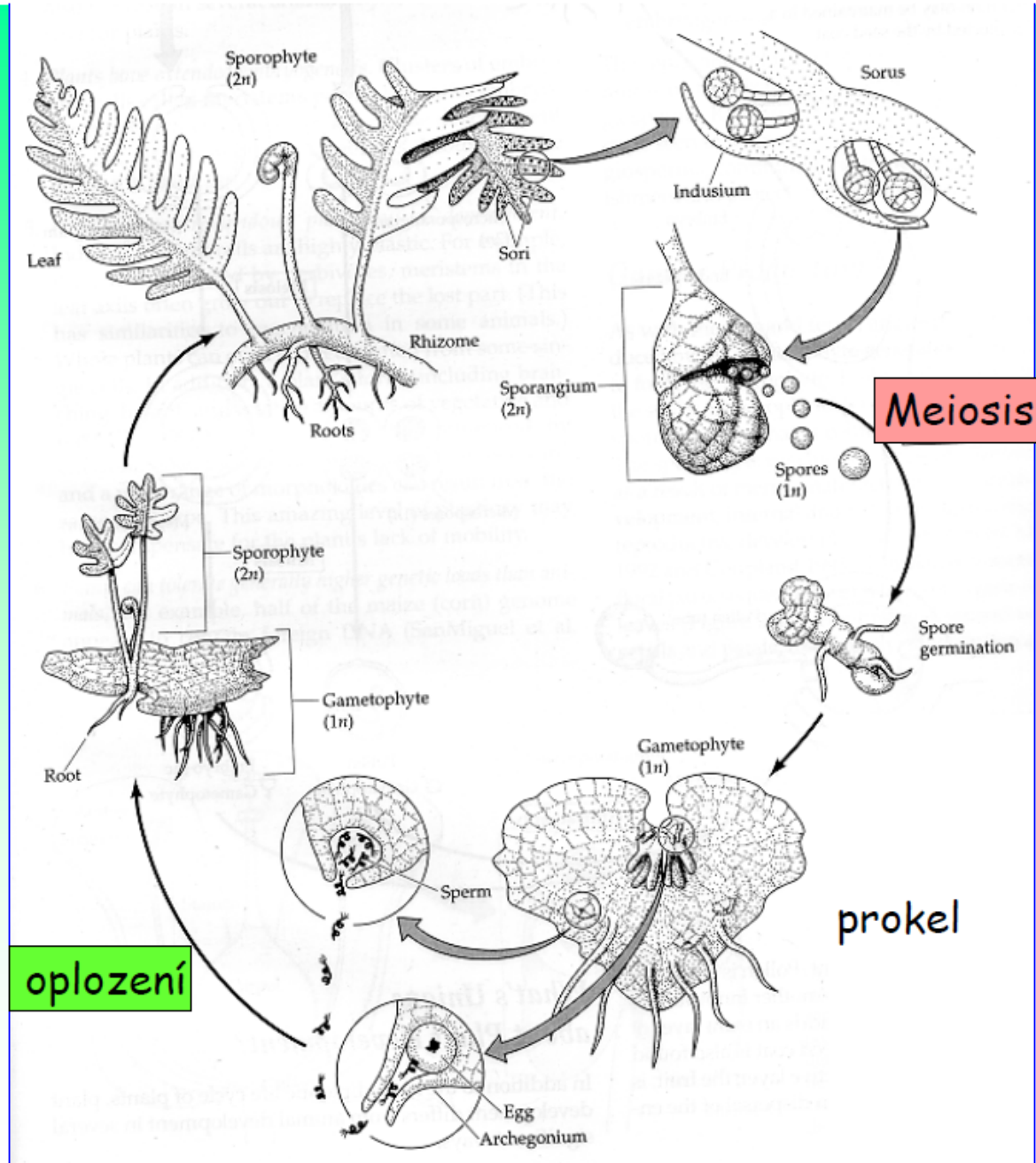
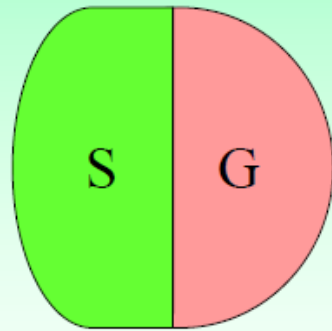
Rodozměna u mechorostů

embryo i zralý sporofyt jsou závislé na fotosyntéze gametofytu



Rodozměna u kapradin

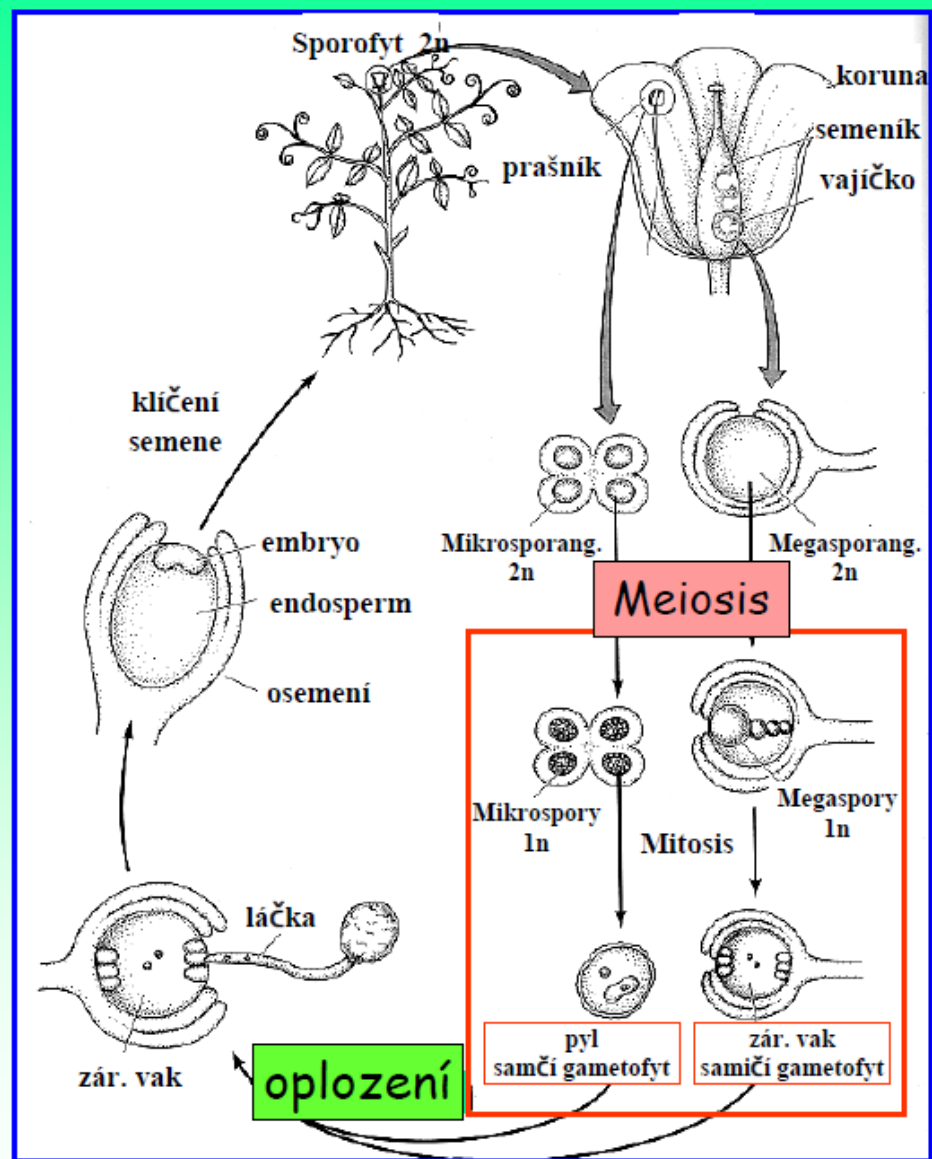
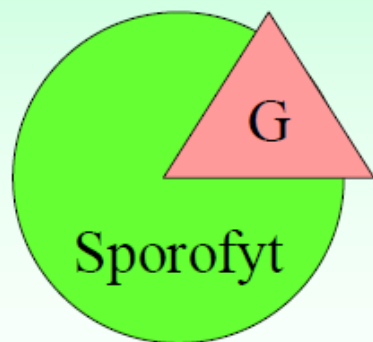
sporofyt i gametofyt je schopný fotosyntézy



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

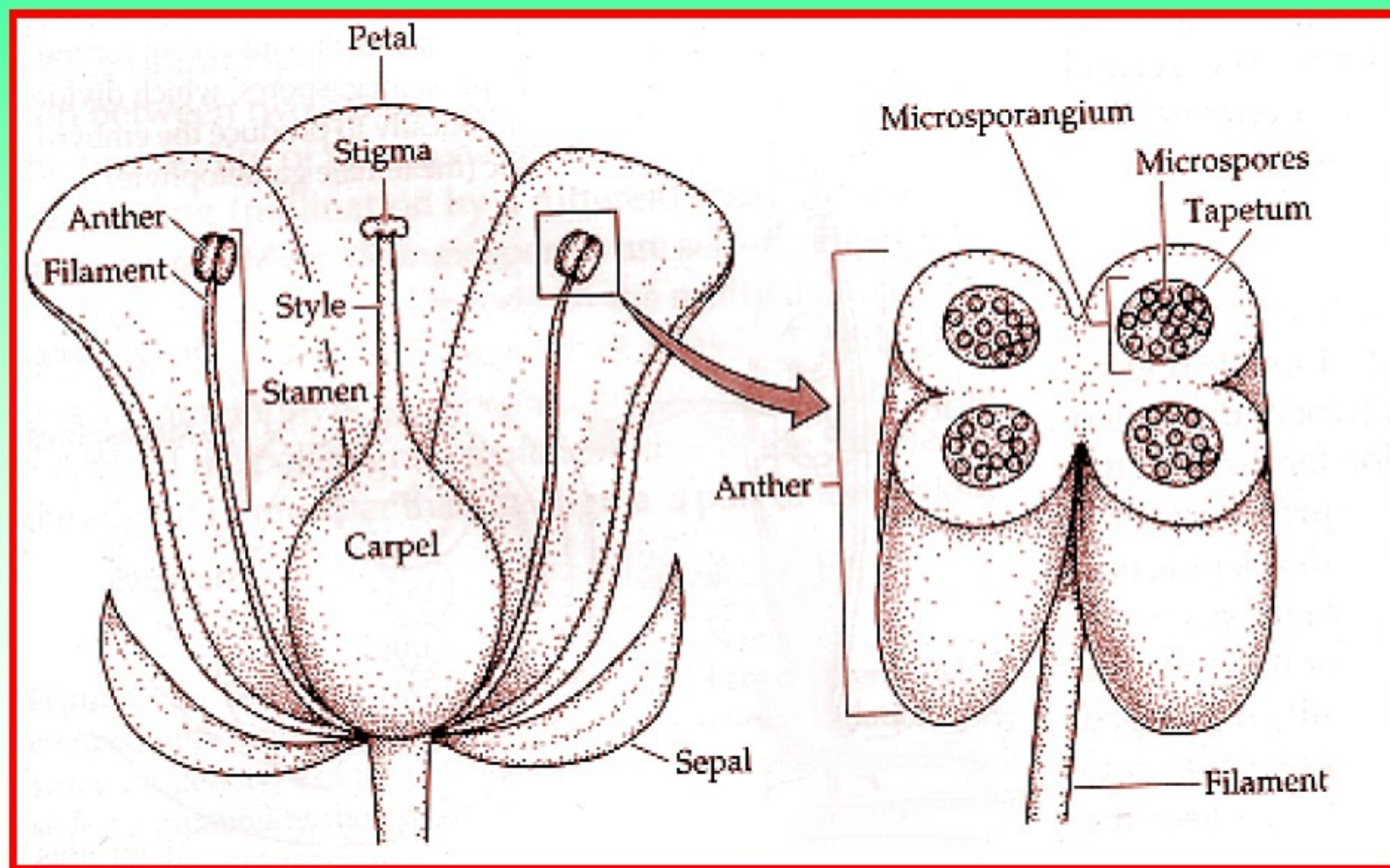
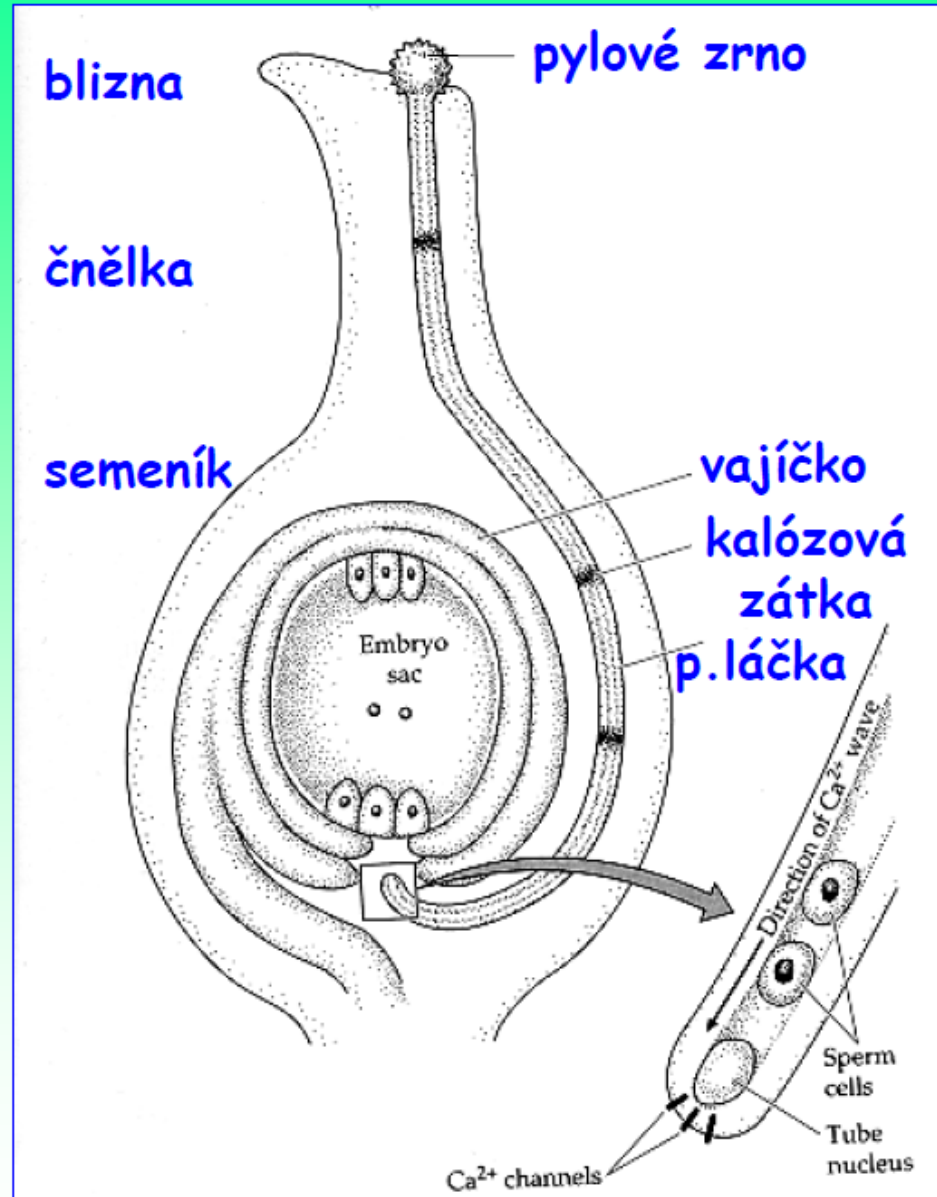


Schéma gynecea s vajíčkem

pestík =
soubor plodolistů =
gynaecium



Místa interakcí v pestíku

Povrch pylového zrna:
pylový tmel
proteiny ve sporodermě

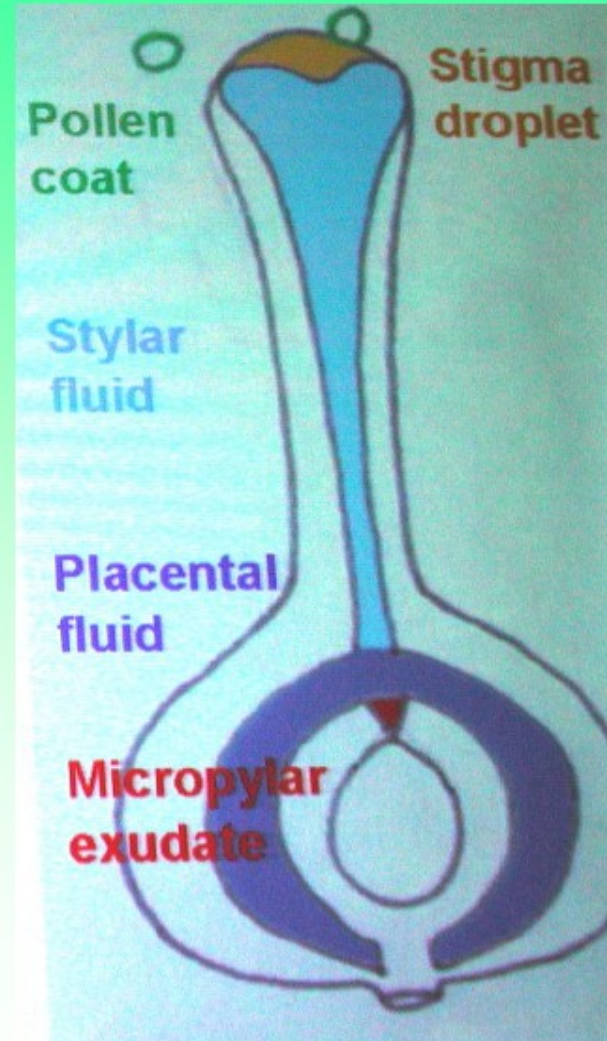
Bliznový exudát

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

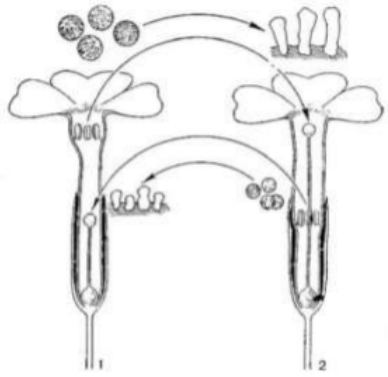
Inkompatibilita (neslučitelnost)

= neschopnost rostlin tvořit semena, přestože mají funkční gamety

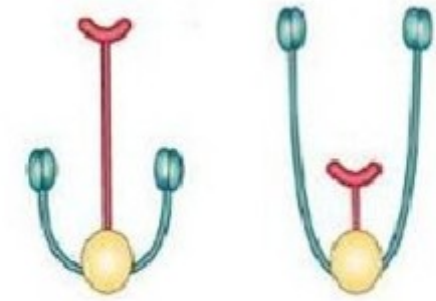
- před 200 lety - **J.G.Kölreuter**
Verbascum:
po samoopylení netvořila semena
po cizosprášení ano



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



Různočelečnost u prvosenek
(*Primula*): na nákrese je patrné, že
velký pyl vyklíčí jen na blizně
s velkými papilami (a naopak)

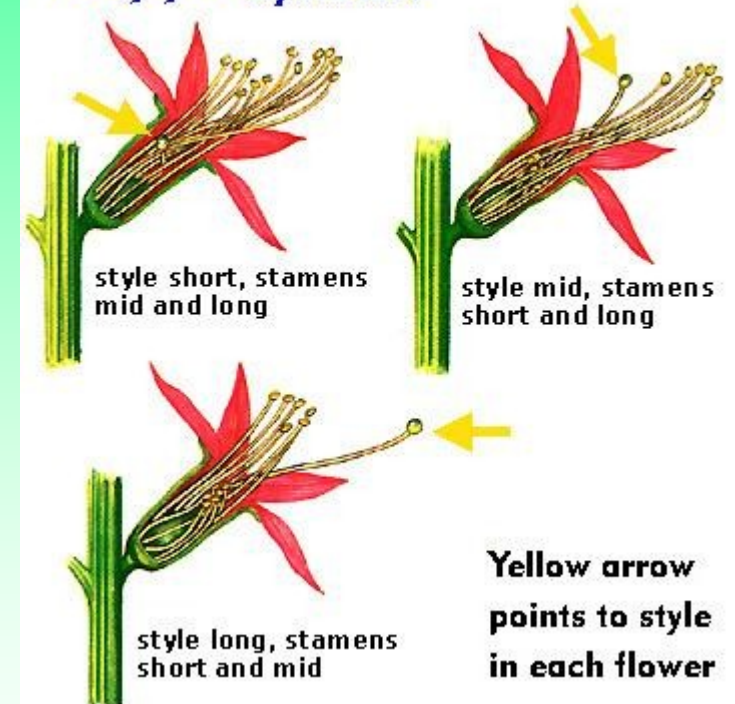


distylie

Typy inkompatibility

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

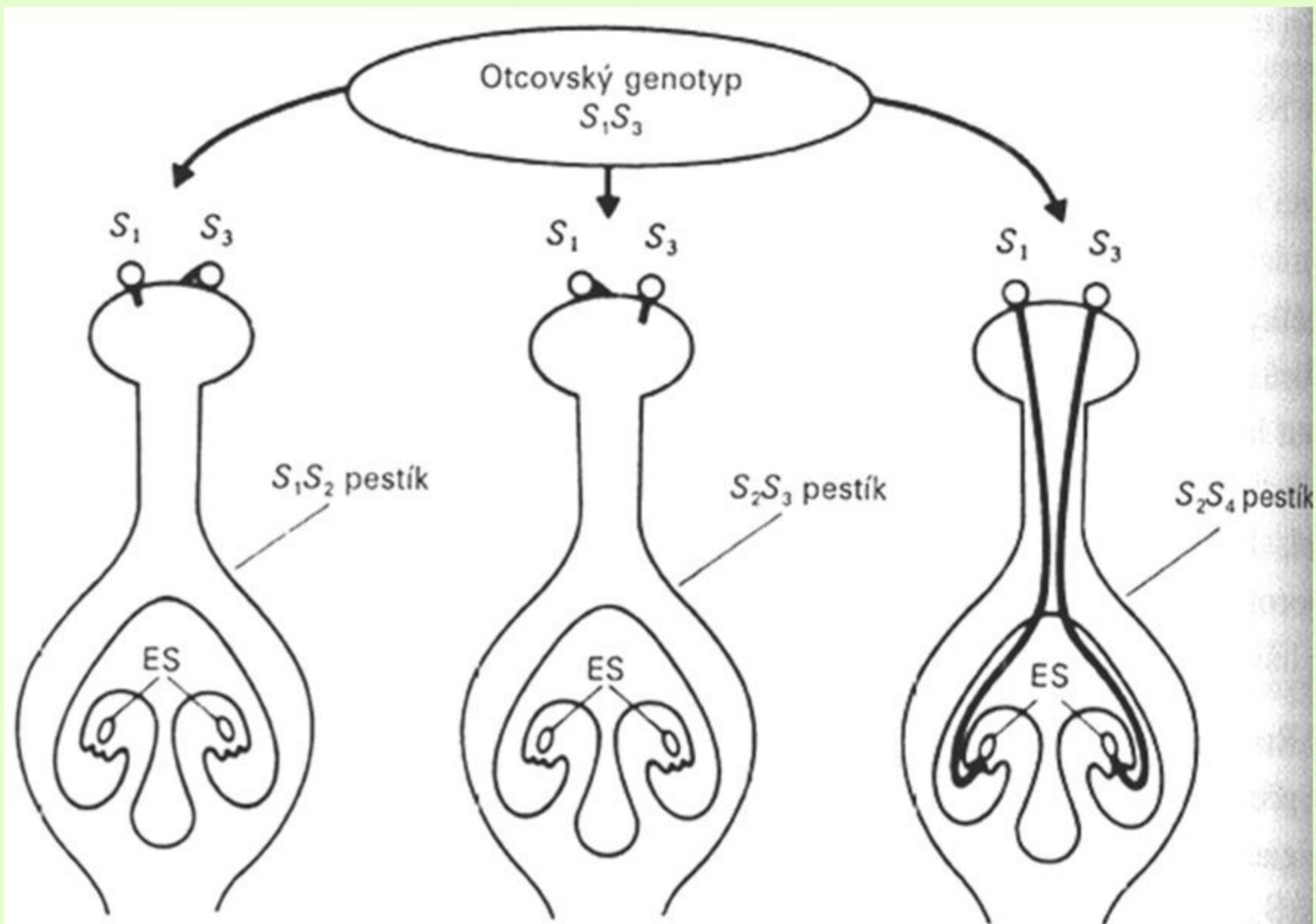
Tristyly in *Lythrum*



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

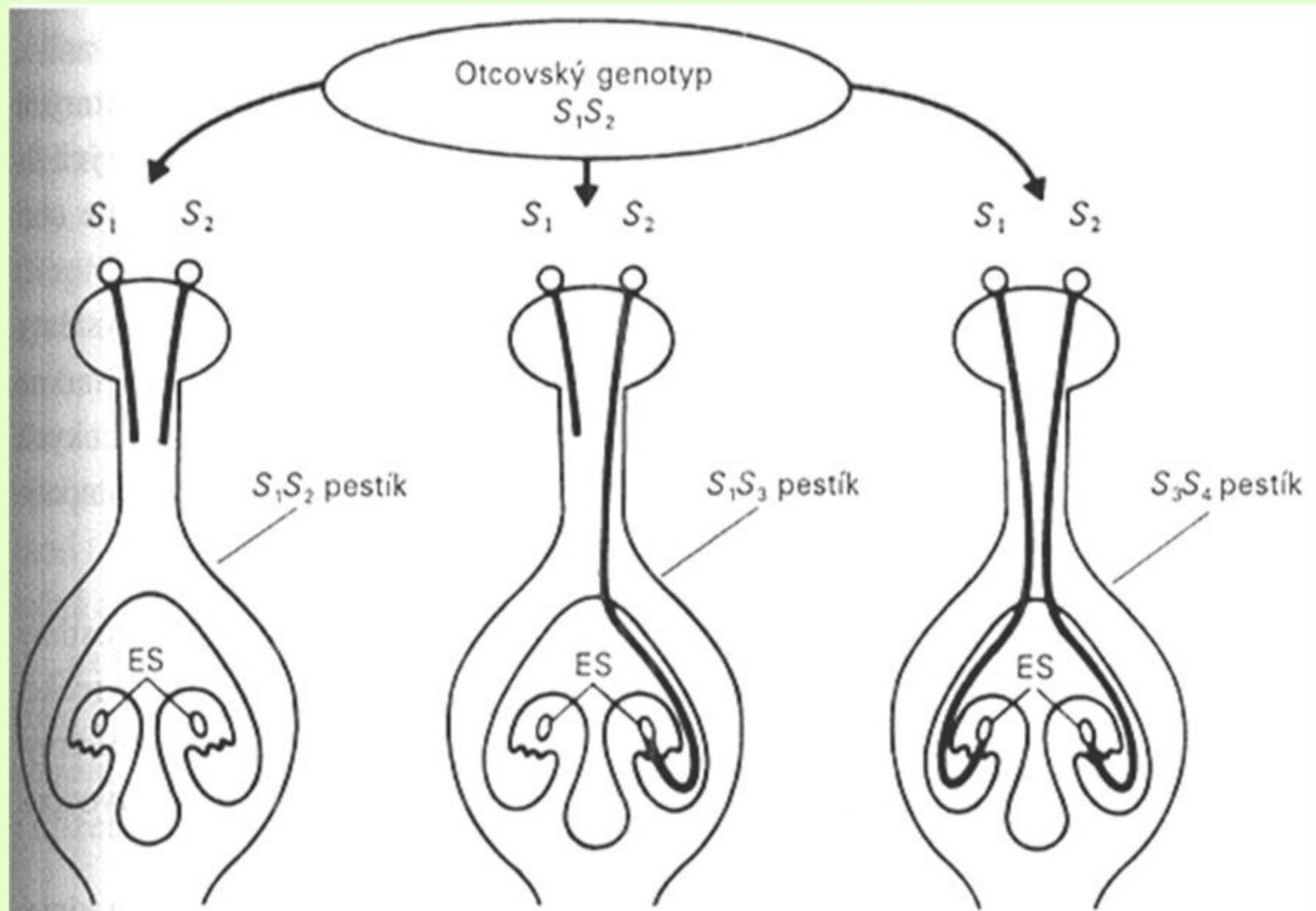
Sporofytická inkompatibilita



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*

Gametofytická inkompatibilita



Funkce inkompatibility

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

- **zabránění mezidruhovému nebo vzdálenějšímu (mezirodovému) křížení**
 - podporuje stabilitu druhu

Nettancourt *et* Devreux 1977

Překonání inkompatibility

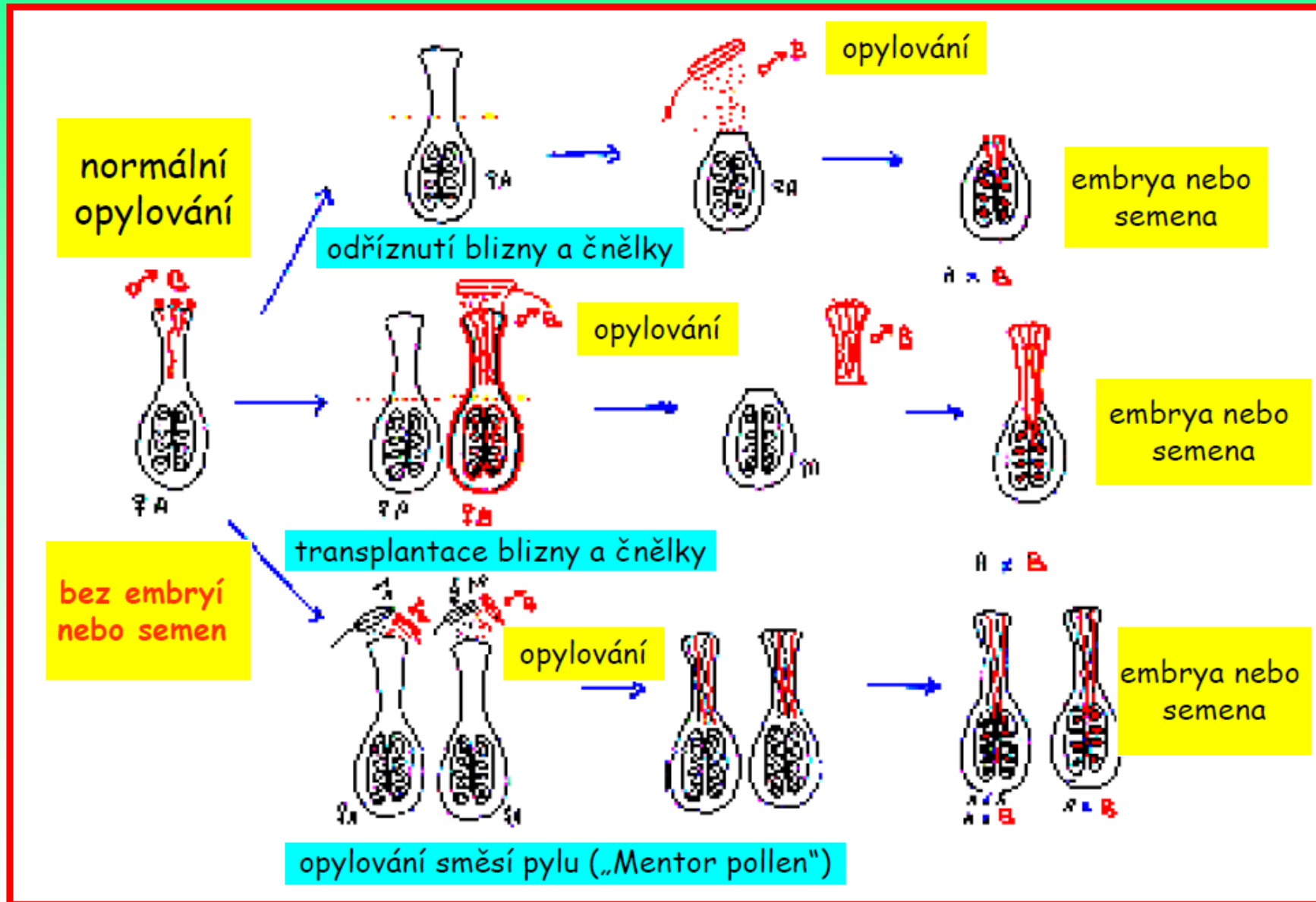
umělé opylování *in situ*

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-Szczytt *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

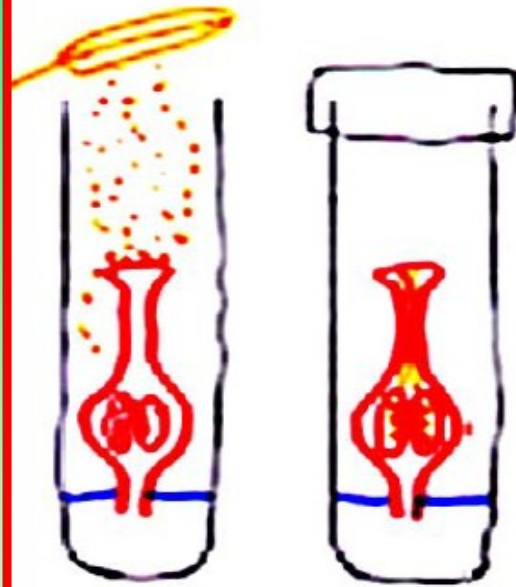
Opylování *in vitro* (IVF)

- 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

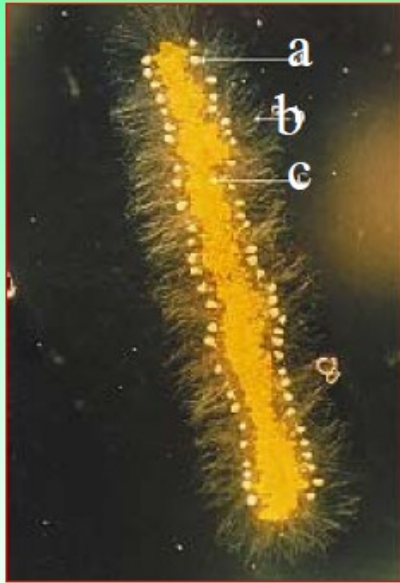
- Kameya (1966, 1970)
- Chi (2000)

Brassica

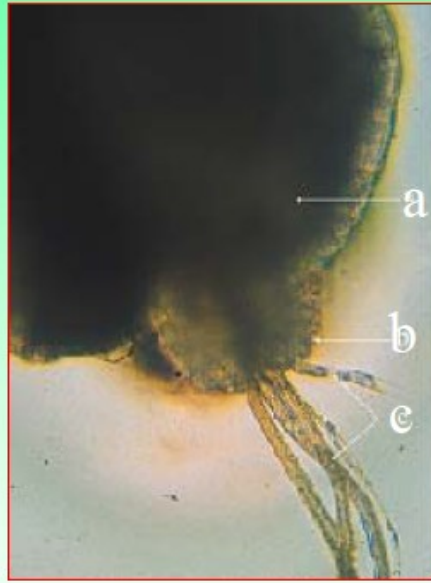
Lilium

Opylování izolovaných vajíček

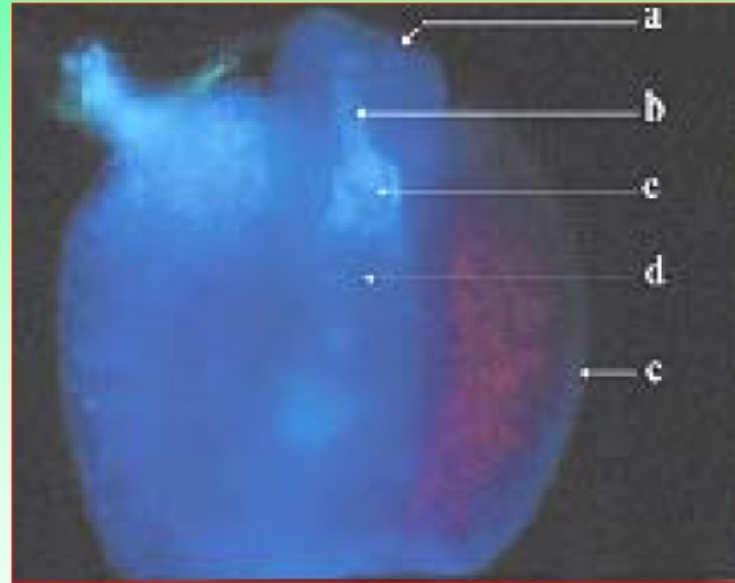
CHI (Bot. Bull. Acad. Sinn. (2000) 41: 143 - 149



a = vajíčka
b = pyl. láčky
c = pyl

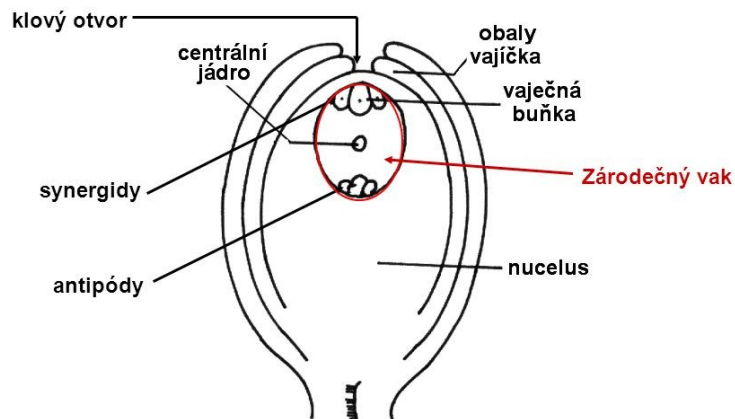


Detail mikropyle
s pyl. láčkami



Pylové láčky v mikropyle
a synergidách

Stavba vajíčka



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

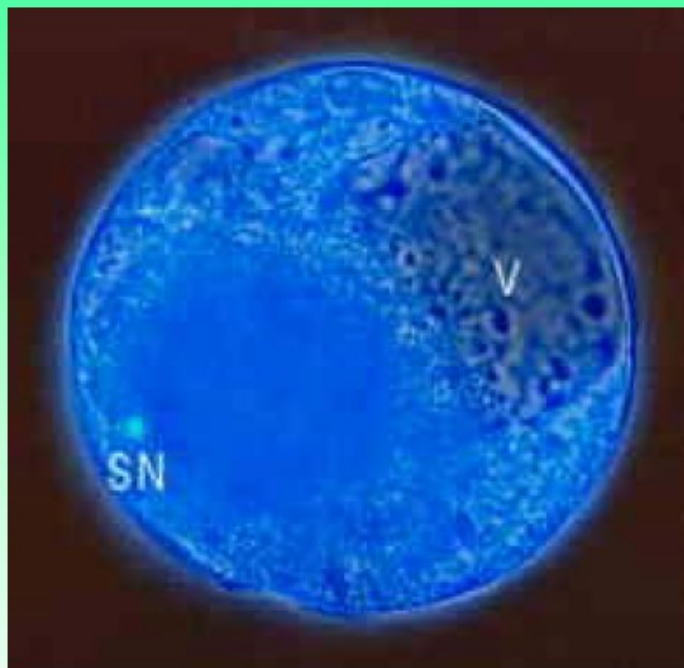
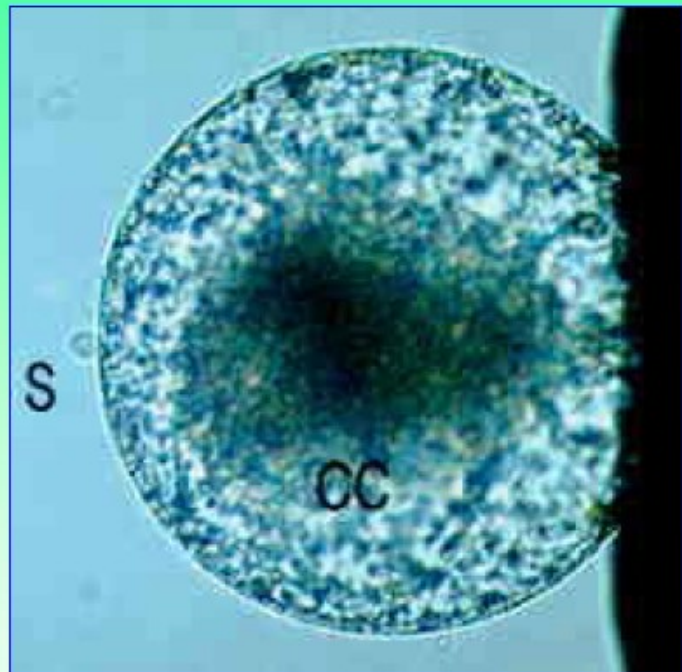


enzymatická izolace buněk
zárodečného vaku

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

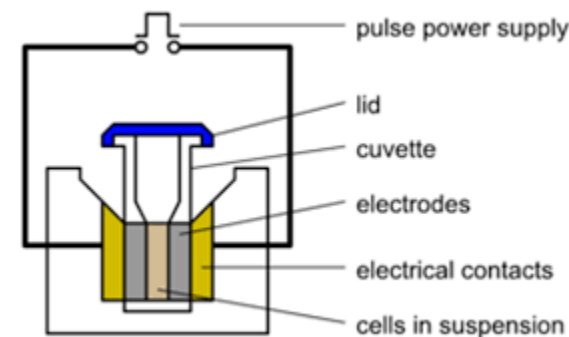
<http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/kranz/St-Louis.htm>

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)

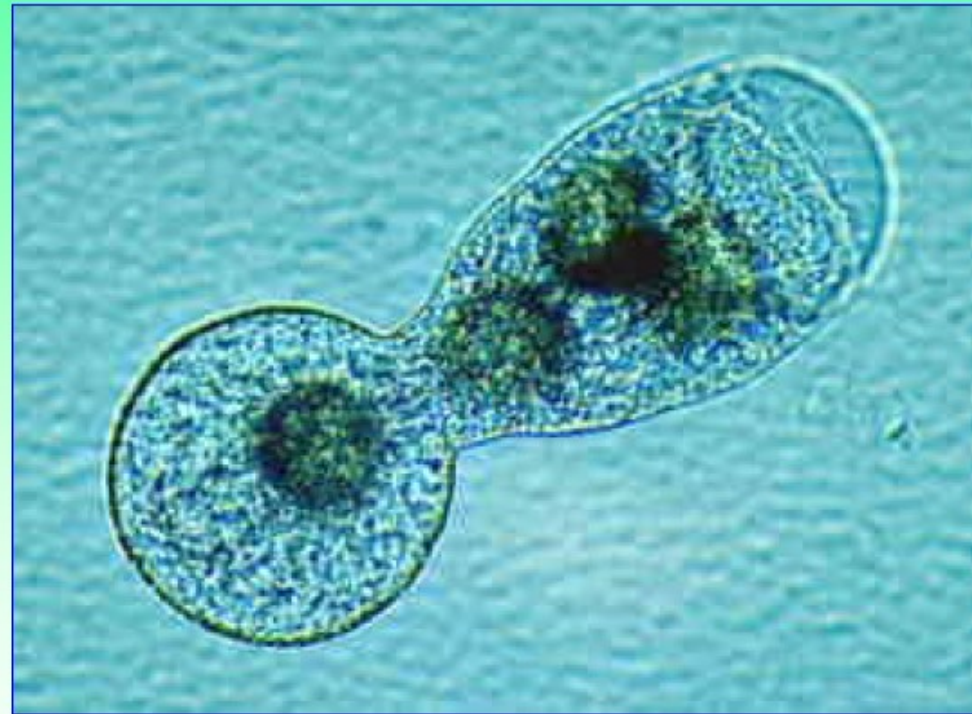


Izolované jádro centrální buňky kukuřice s integrovaným jádrem spermatické buňky (SN). Karyogamie po 150 min po *in vitro* fúzi spermatické a centrální buňky.

(N) velké jádérko, epifluorescence po DAPI barvení

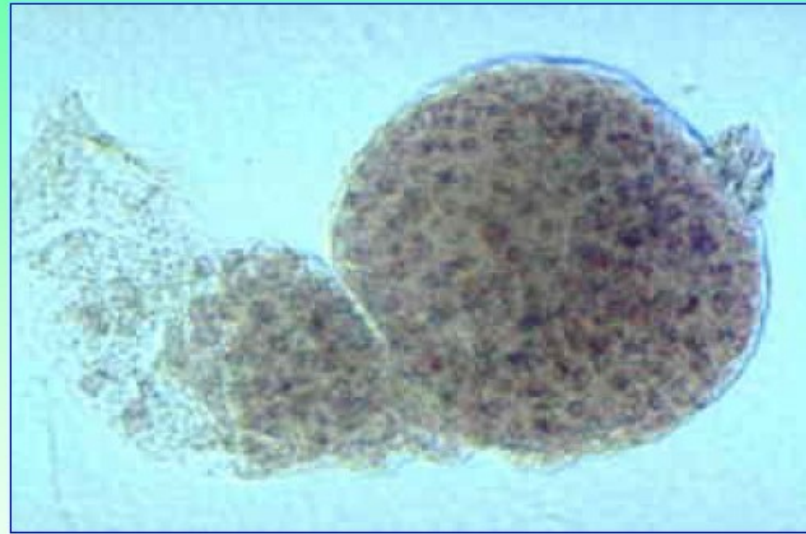
(Kranz *et al.*, 1998)

Oplození izolovaných gamet primární endospermální buňka kukuřice (Univerzita Hamburg)



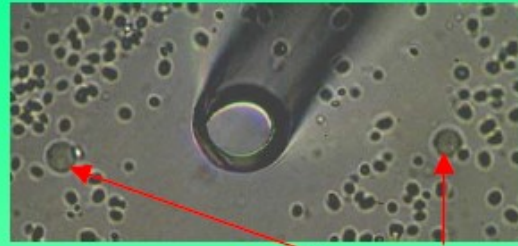
primární endospermální buňka kukuřice vytvořená *in vitro*
po 1 dnu kultury (Kranz et al., 1998)

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

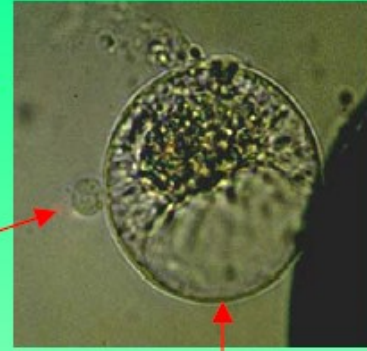


Feulgenovou reakcí barvené buňky endospermu kukuřice vytvořené *in vitro* -
po 5 dnech kultury. (Kranz *et al.*, 1998)

Okamoto
Brno 2003

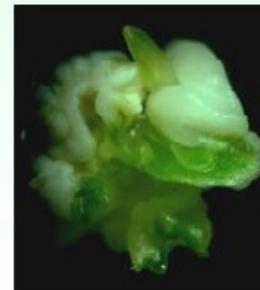
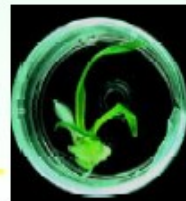
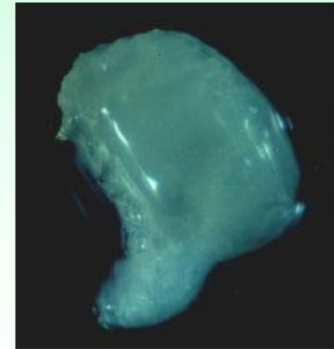
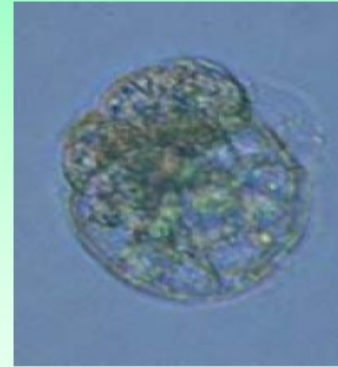
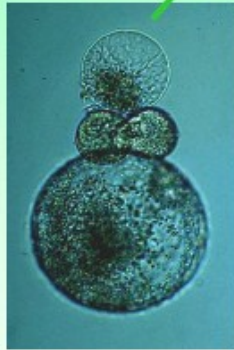
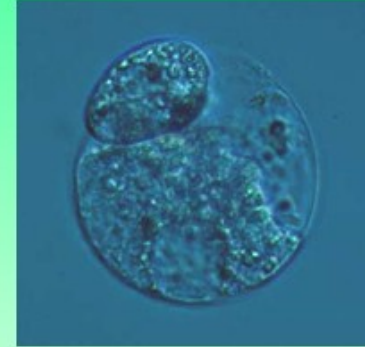
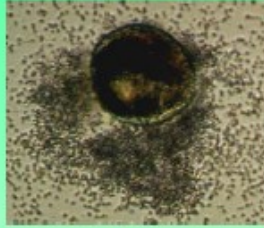


Sperm cell



Egg cell

In Vitro Fertilization in *Zea*



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



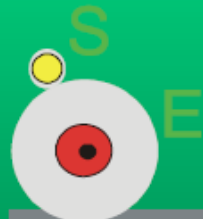
Karyogamy 35-90 min



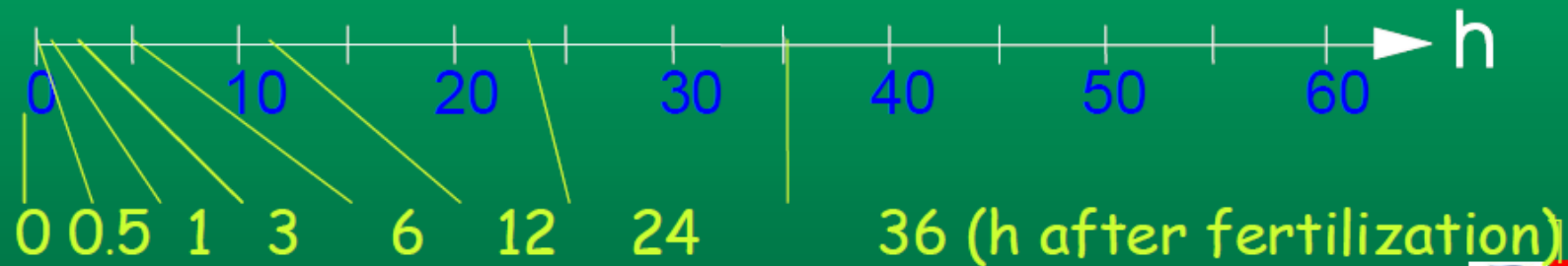
First Cell Division
40 - 50 h



Cell Wall Formation 30 sec



Syngamy 1 sec



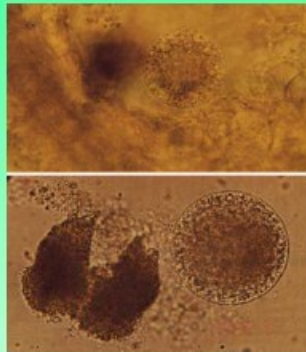
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21207258>

- [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 T¹.](#)
- 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)

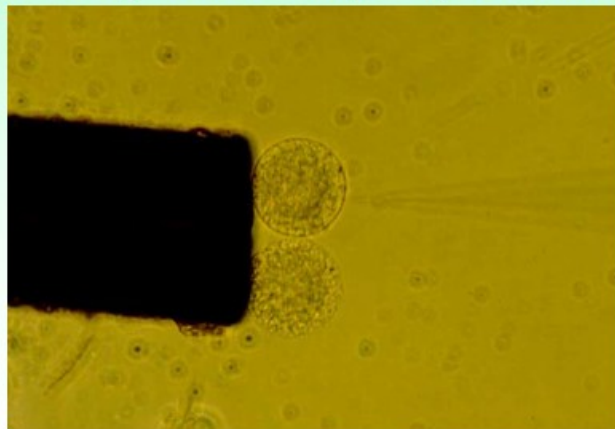
mikrochirurgická izolace buněk

synergida



vaječná buňka

imobilizace vaječné buňky s použitím elektrického proudu

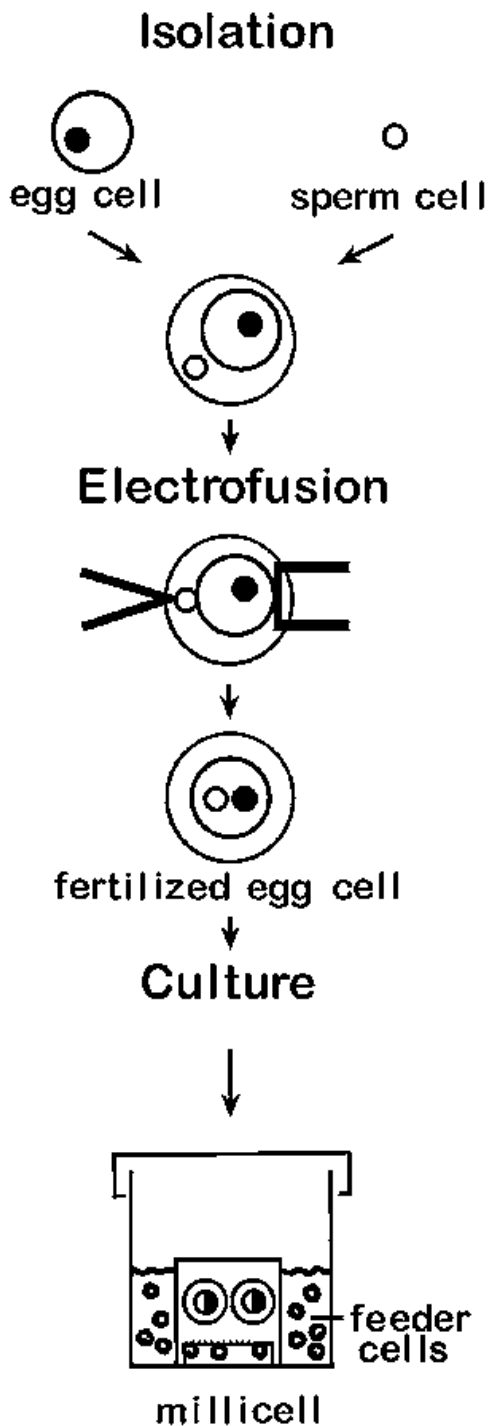


mikroinjekce DNA
do imobilizované
vaječné buňky

<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)
- Electro-fusion system with isolated gametes has been utilized to dissect fertilization-induced events in angiosperms, such as egg activation, zygote development and early embryogenesis, since the female gametophytes of plants are deeply embedded within ovaries. In this protocol, procedures for isolation of rice gametes, electro-fusion of gametes, and culture of the produced zygotes are described.