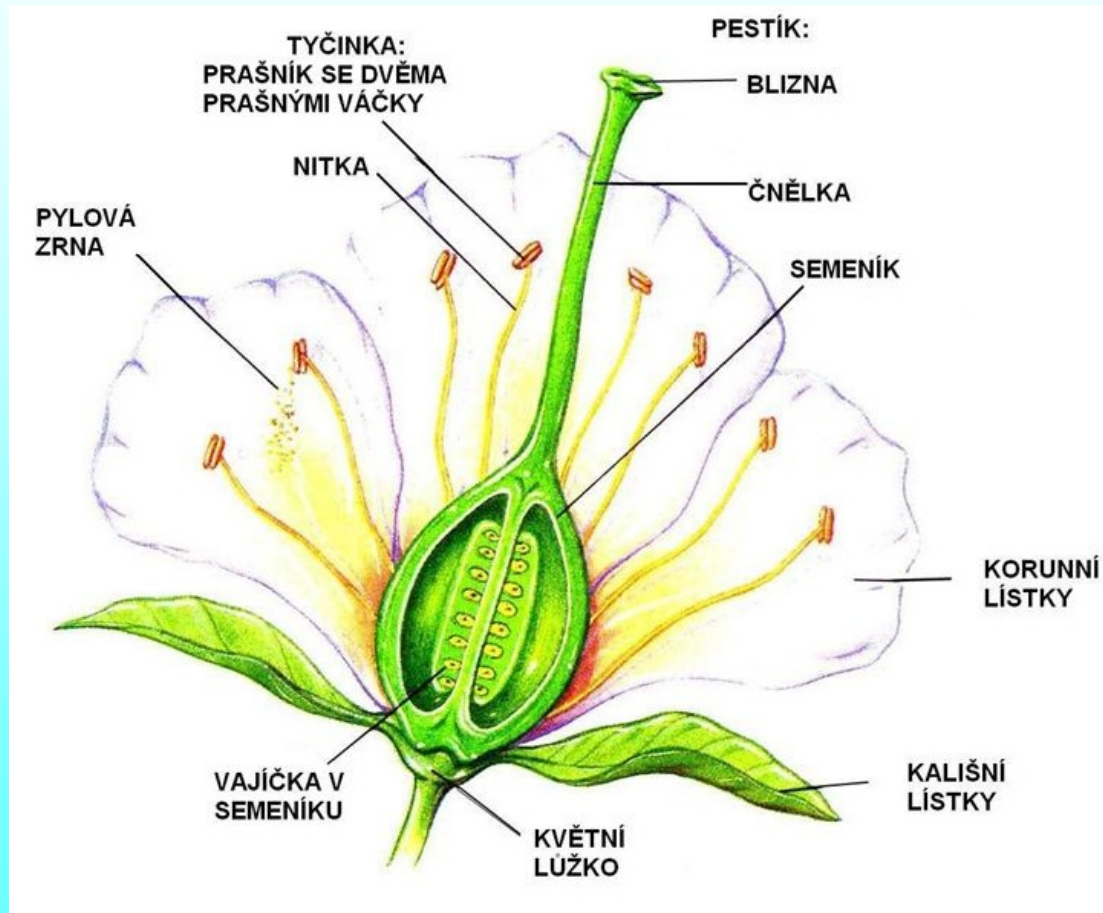


# Haploidní techniky 10.



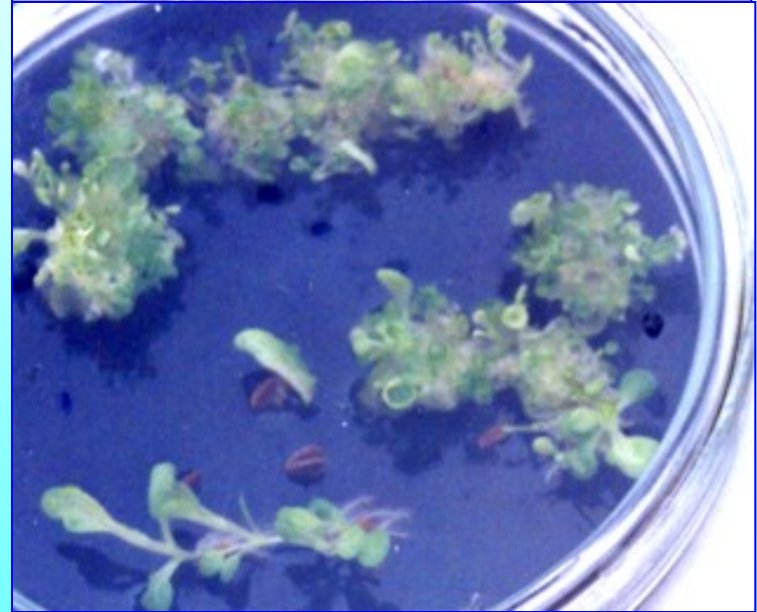
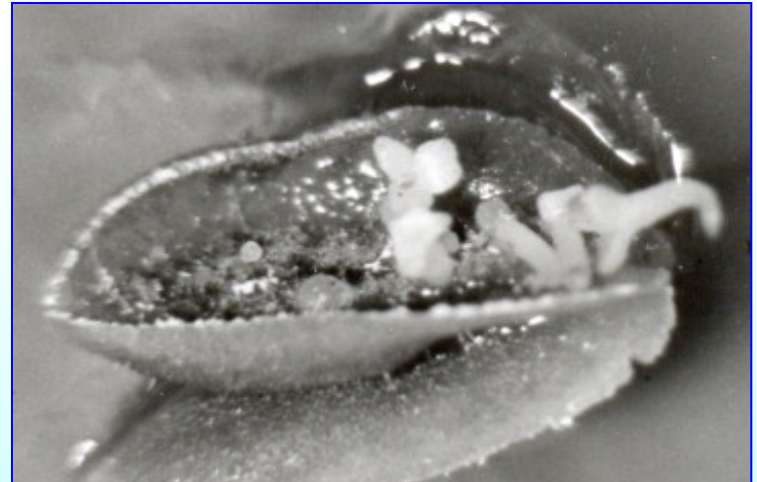
# Cíle této přednášky

- Co jsou to haploidní techniky?
- Jaké je jejich využití?
- Jak vytvořit fertillní rostliny z haploidů?

# 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

# 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

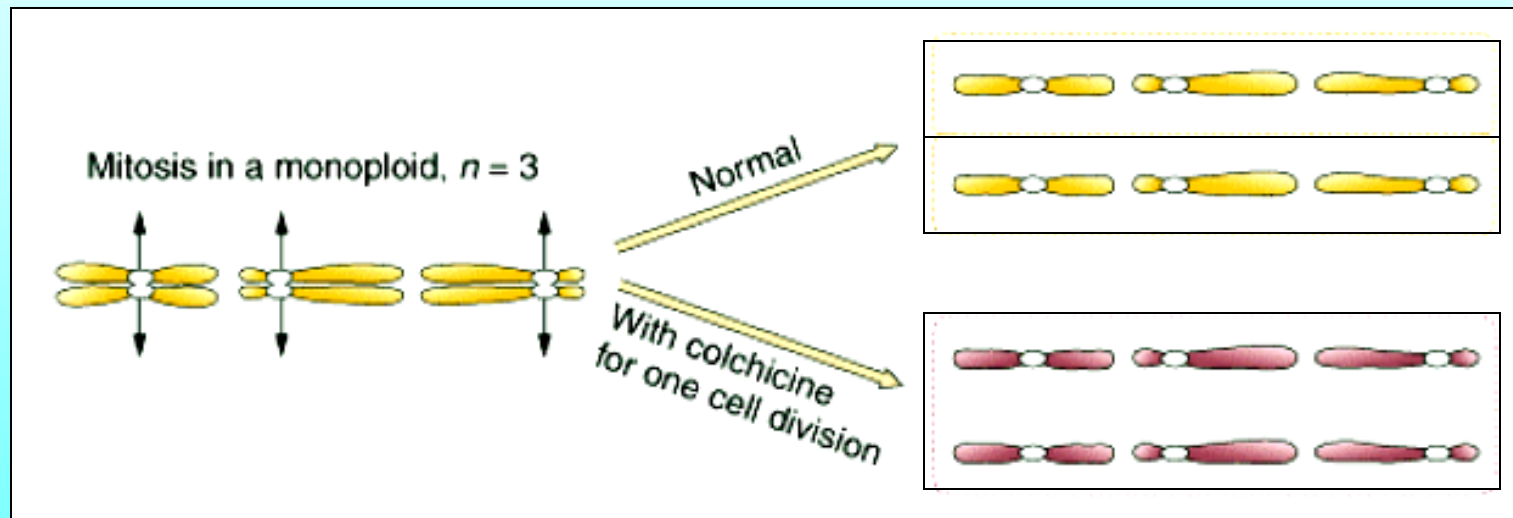
monohaploid  $n = x$

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

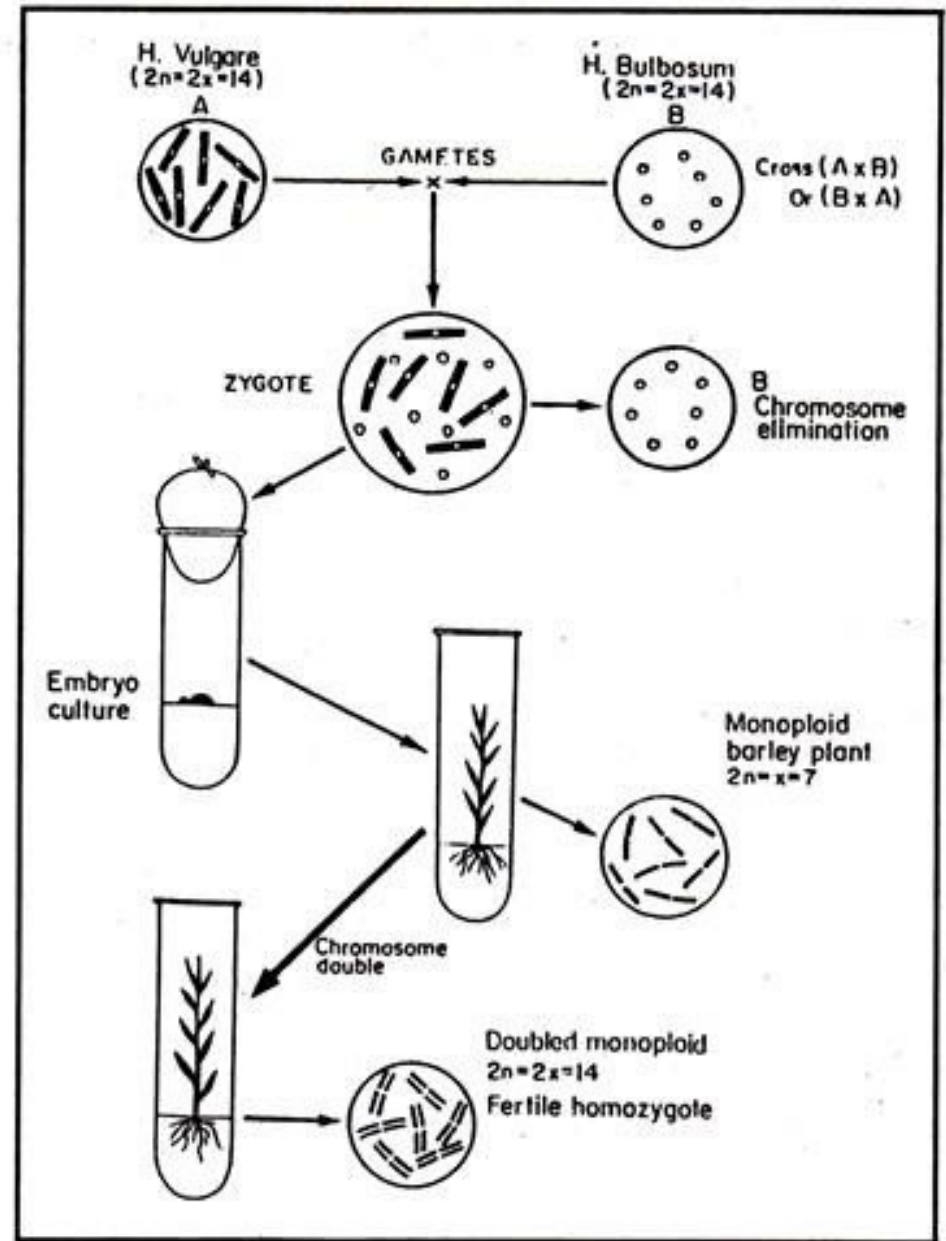


# Vznik haploidů u vyšších rostlin

## • Explantátové metody

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

Příklad haploidní  
techniky užívané  
ve šlechtitelství -  
Monoploidní  
ječmen



□ Fig 10.7

Scheme of monoploid barley production

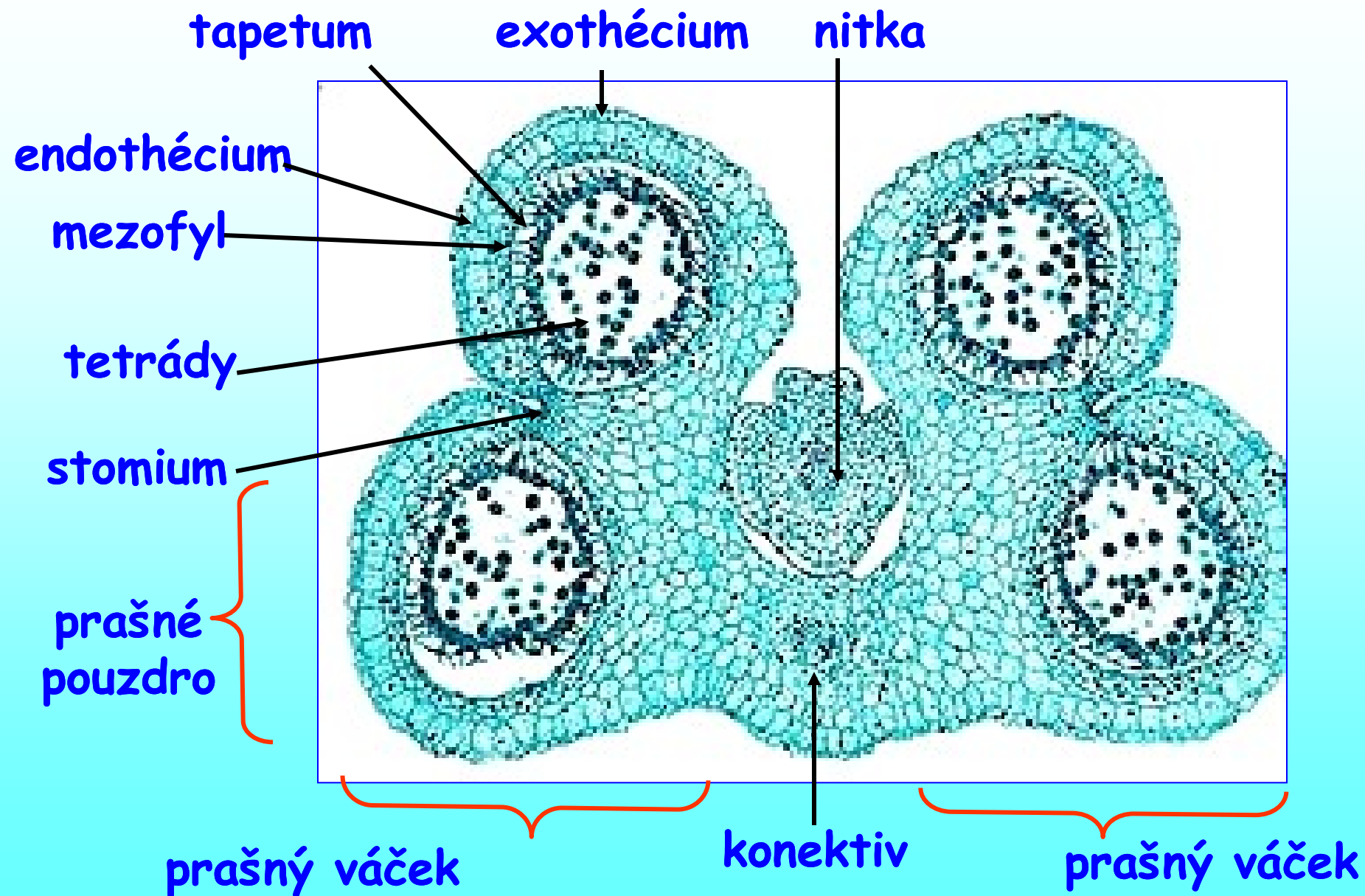
# Produkce haploidů a dihaploidů ječmene

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

# 1. Androgeneze

Tvorba haploidních regenerantů  
ze samčího gametofytu

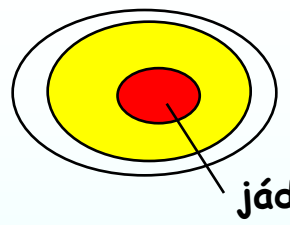
# Řez prašníkem lilie



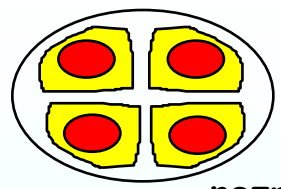
pylová mateřská buňka

tetráda mikrospor

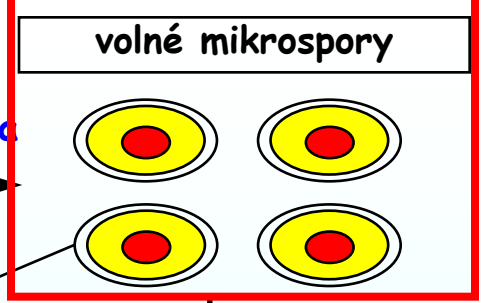
volné mikrospony



Meióza I a II



Kalóza

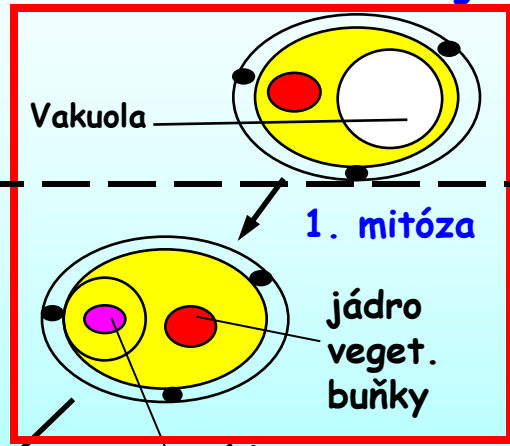


nezralá stěna

migrace jádra

tvorba mikrospor: mikrosporogeneze

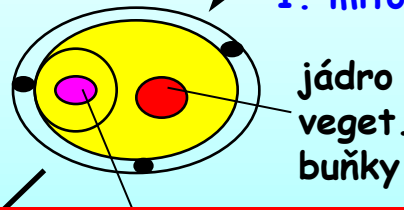
mikrospora



vývojová stadia vhodná pro iniciaci androgeneze

1. mitóza

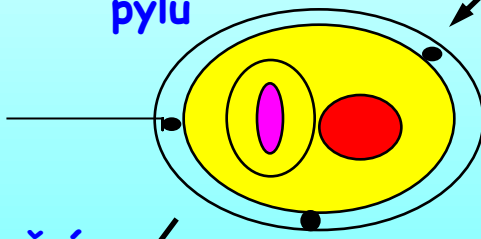
nezralé pylové zrno



tvorba gamet: mikrogametogeneze

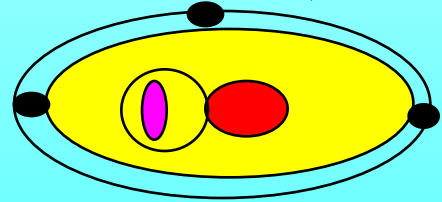
dozrívání pylu

apertura



jádro generat. buňky

odvodnění

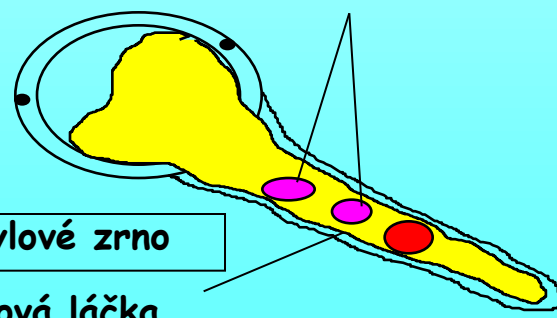


zralé pylové zrno (dvoubuněčný pyl)

pylová mitóza

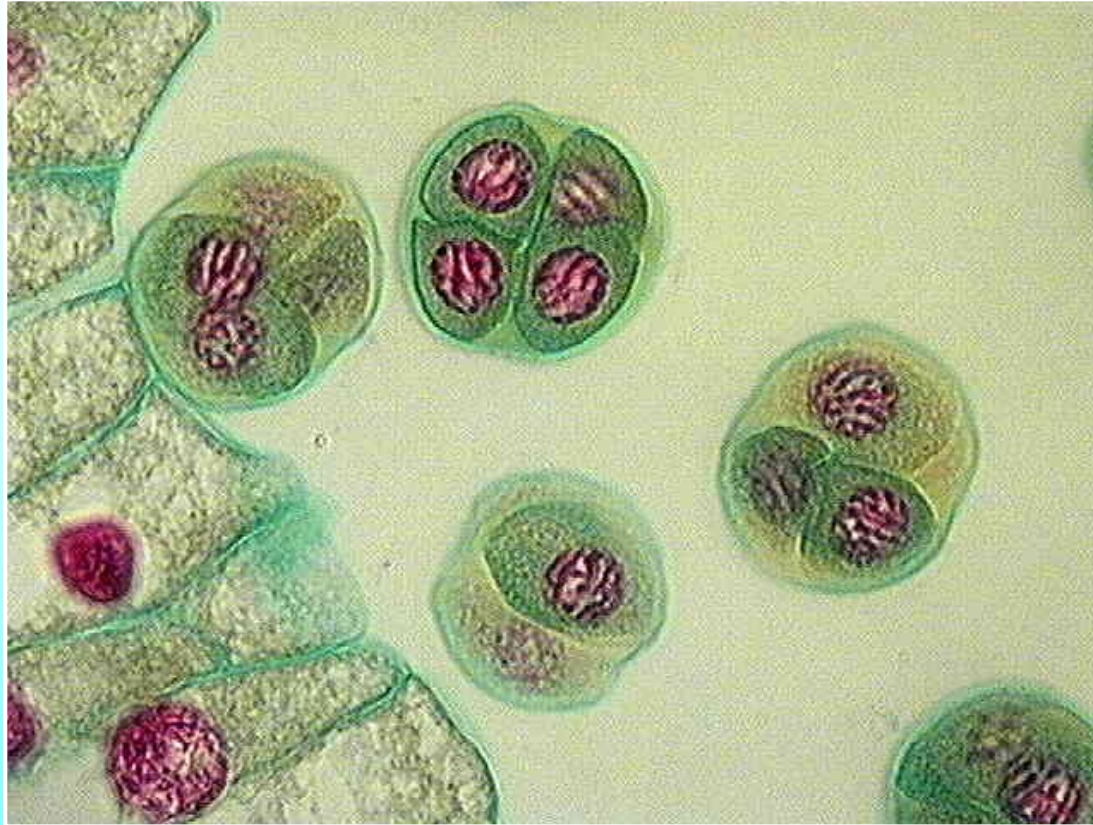
klíčící pylové zrno

pylová láčka



spermatické buňky

# Tetrády

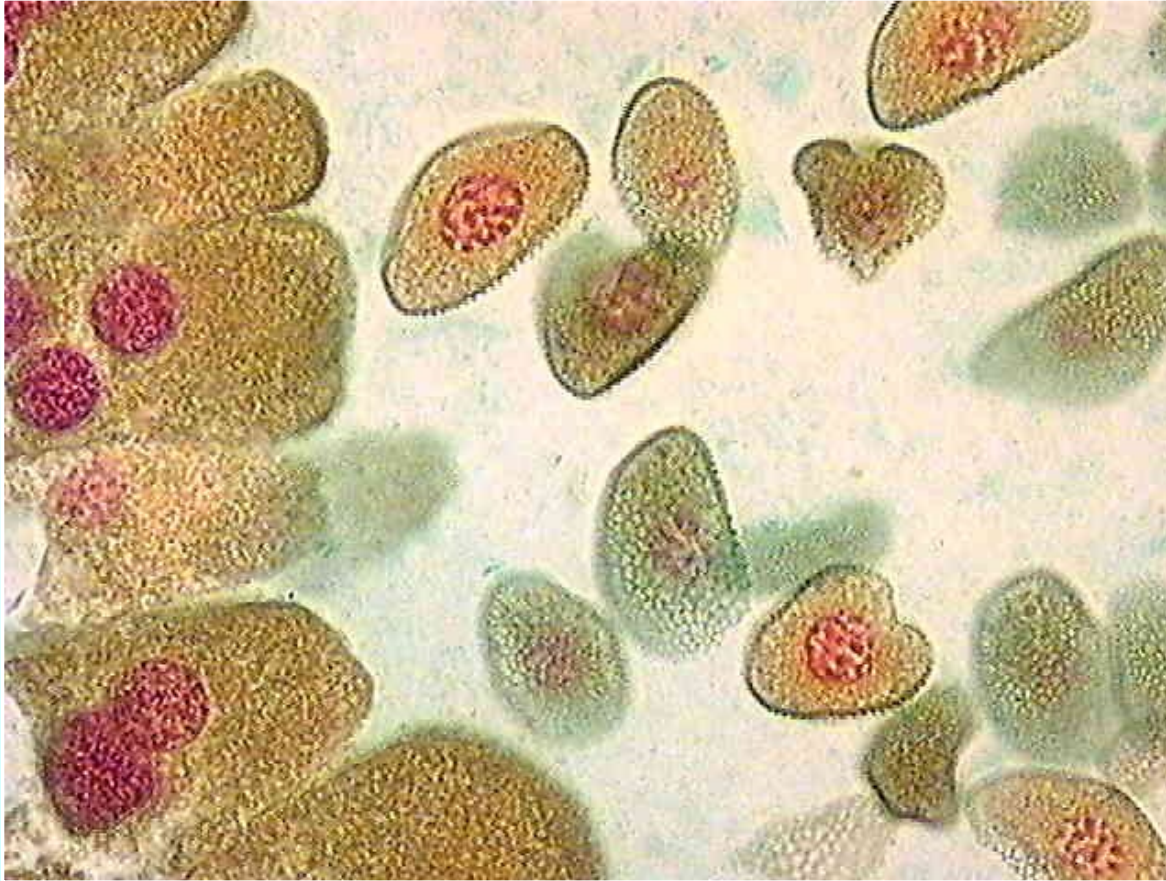


*Lilium*

IASPR

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

# Mikrospory uvolněné z tetrad



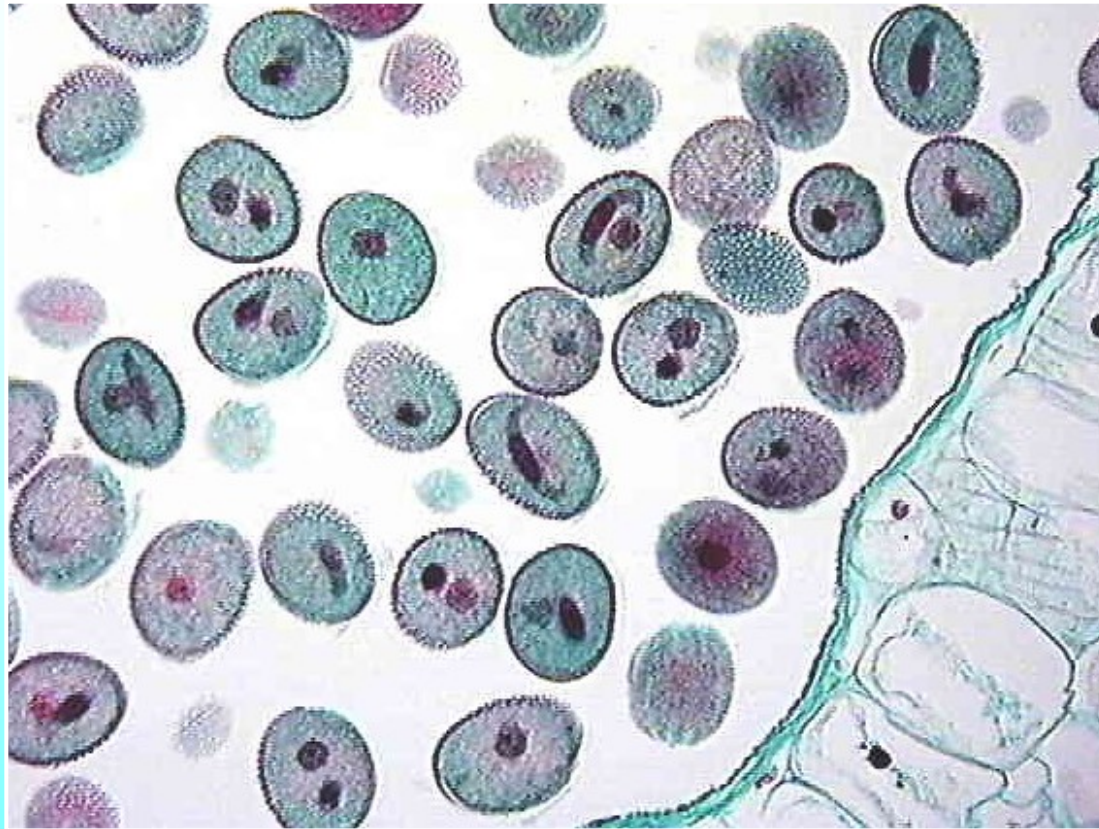
*Lilium*

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.



# Dvoubuněčný pyl



*Lilium*

IASPR

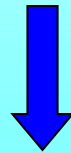
Generative cells are first formed in contact with the intine (inner pollen wall), but the cells then become immersed in the cytoplasm - truly becoming "a cell within a cell".

# 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 **prašниковé kultury**
2. zdvojení haploidního genomu = **dihaploidizace**



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

# 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

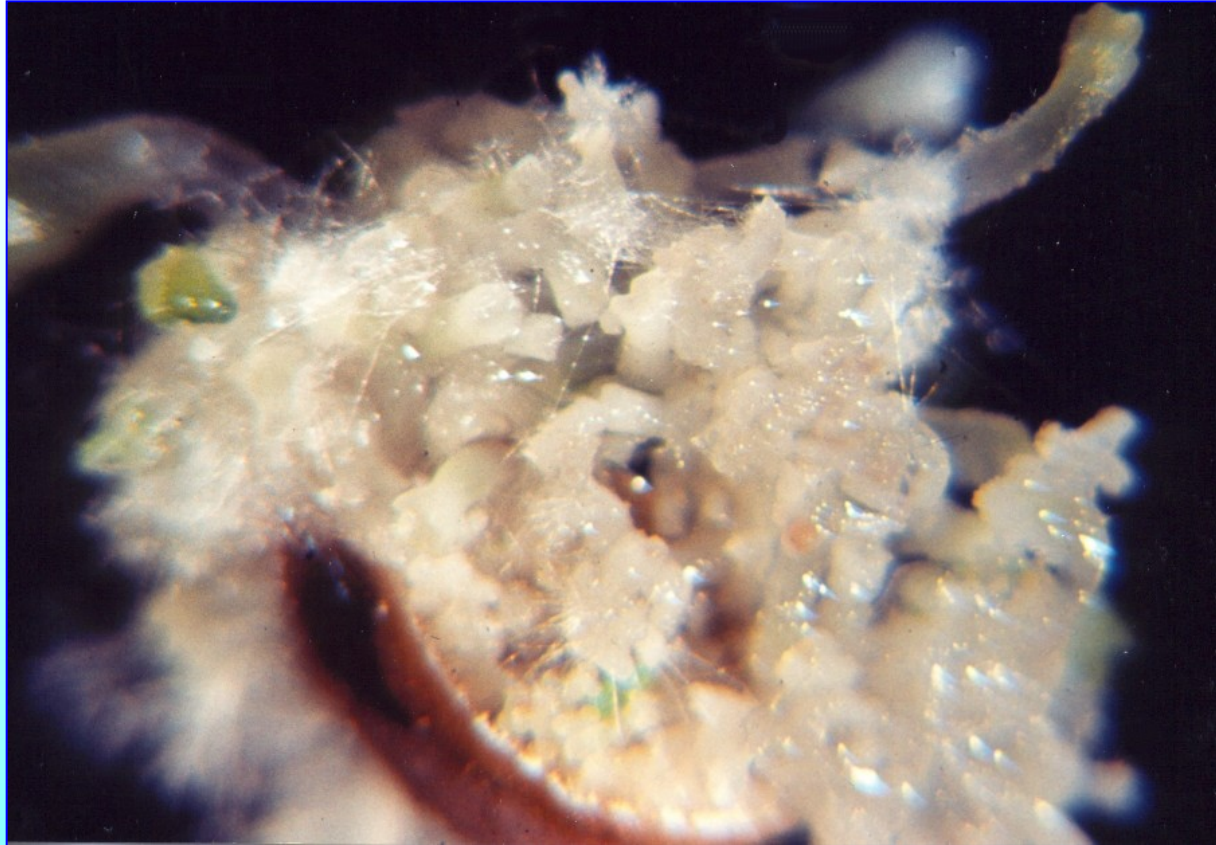
**ontogenetické stáří** - prašníky by se měly odebírat z poupat ze začátku období kvetení

**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

# Typy androgeneze



přímá androgeneze na prašníku tabáku  
*Nicotiana tabacum* L.

Foto: J. Dubová

# Typy regenerace v prašниковých a mikrosporových kulturách

## 1. přímá androgeneze

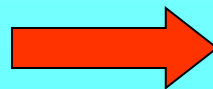
produkce haploidních rostlinek indukci embryogeneze opakovaným dělením mikrospory nebo mladého pylového zrna

## 2. nepřímá androgeneze

získání haploidního kalusu a z něj regenerace haploidních rostlin

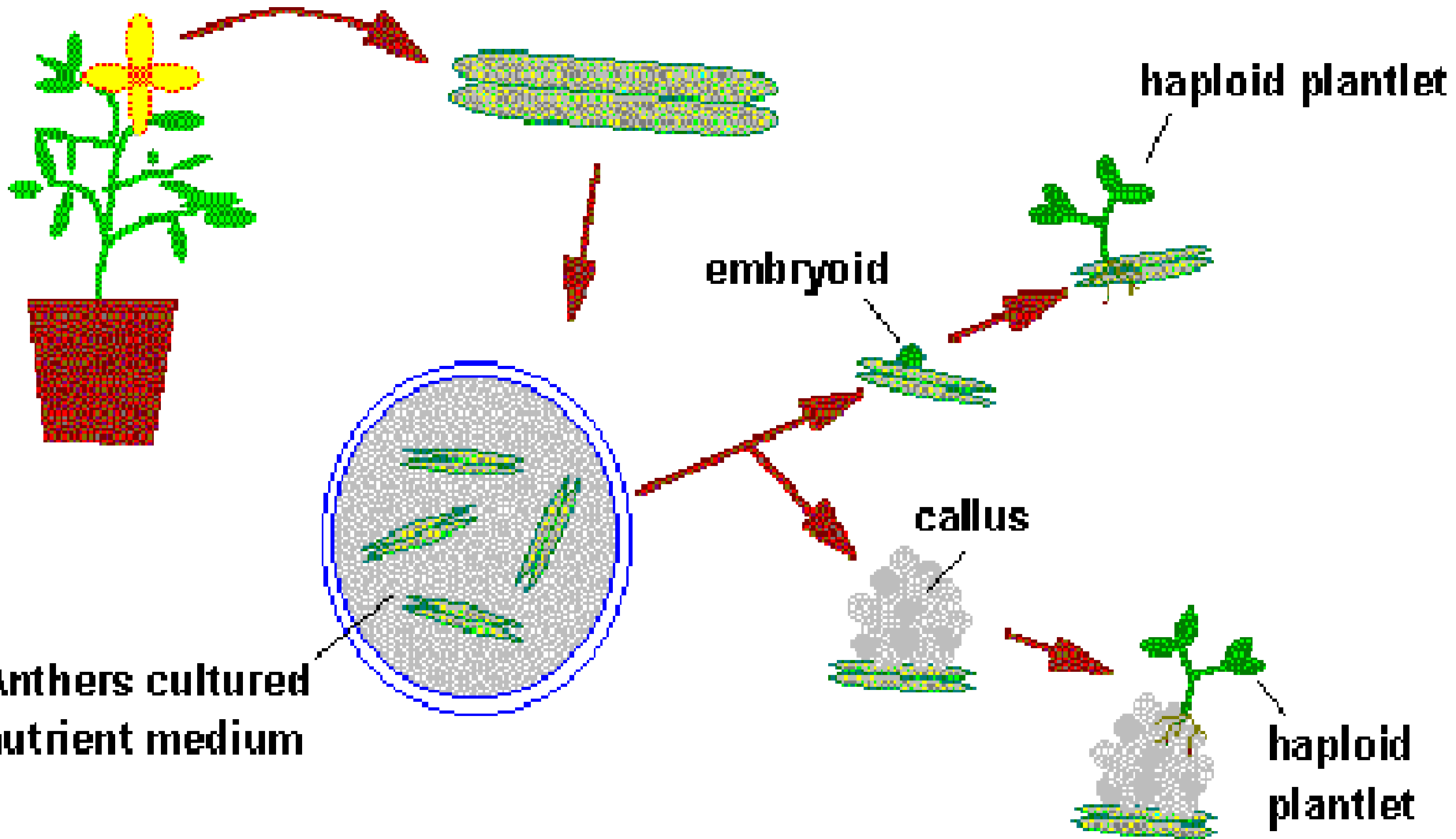
obnovení diploidního stavu

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**

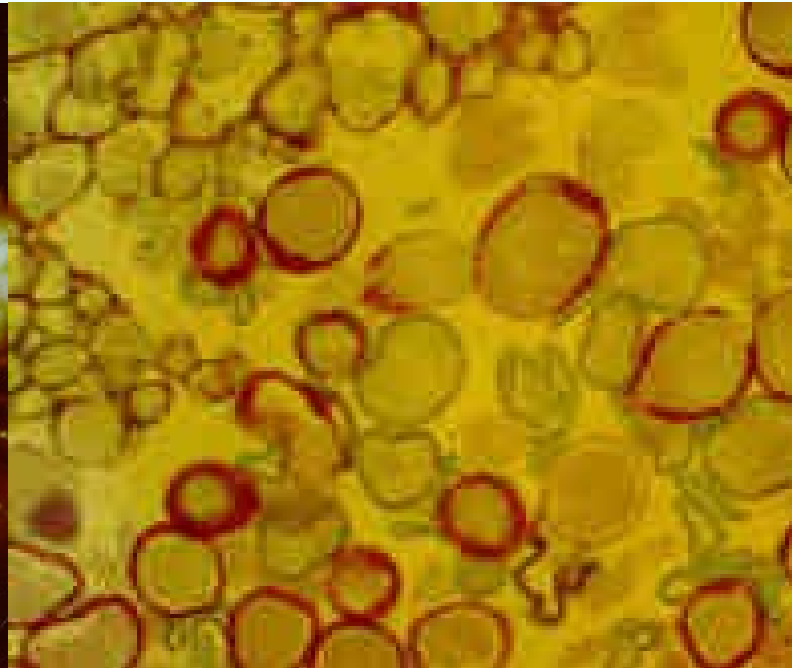
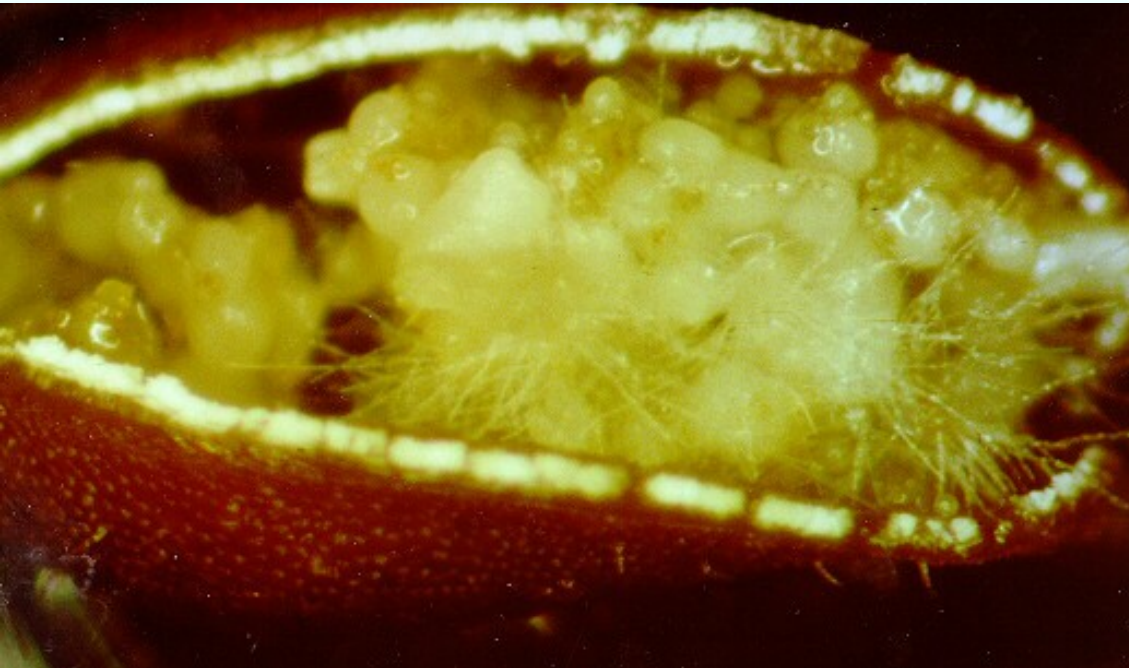
**hladovění**

**změna polohy jádra**



# Androgeneze u tabáku

7 dní

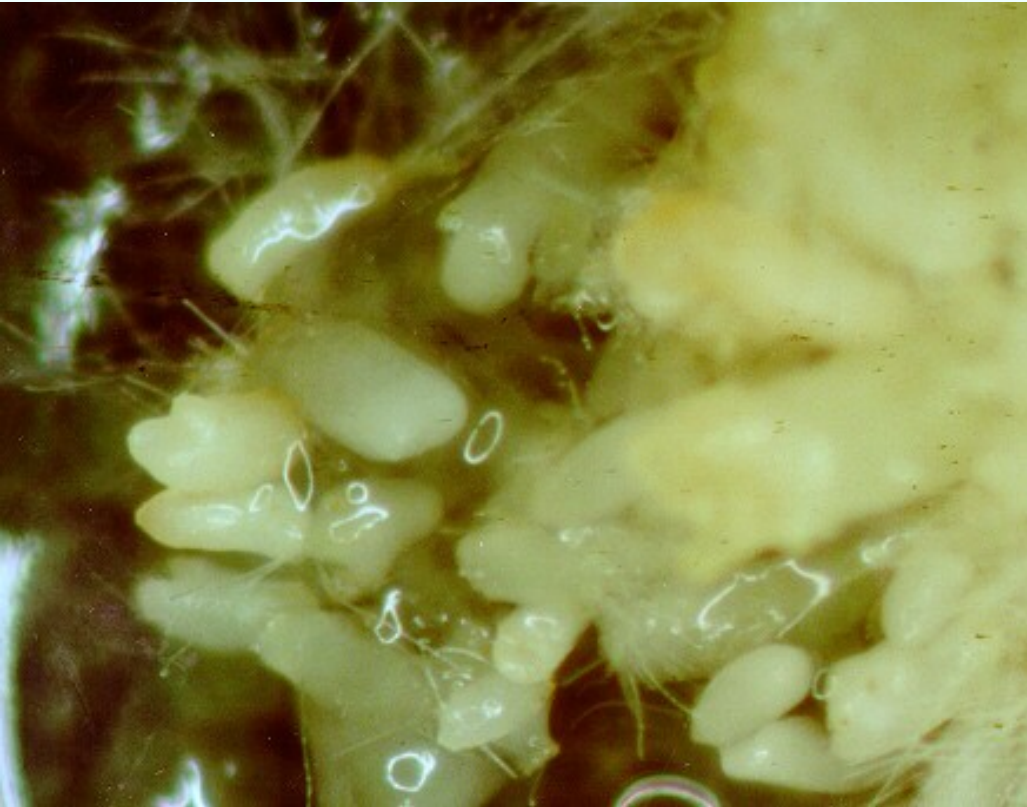


**prašník s embryoidy**

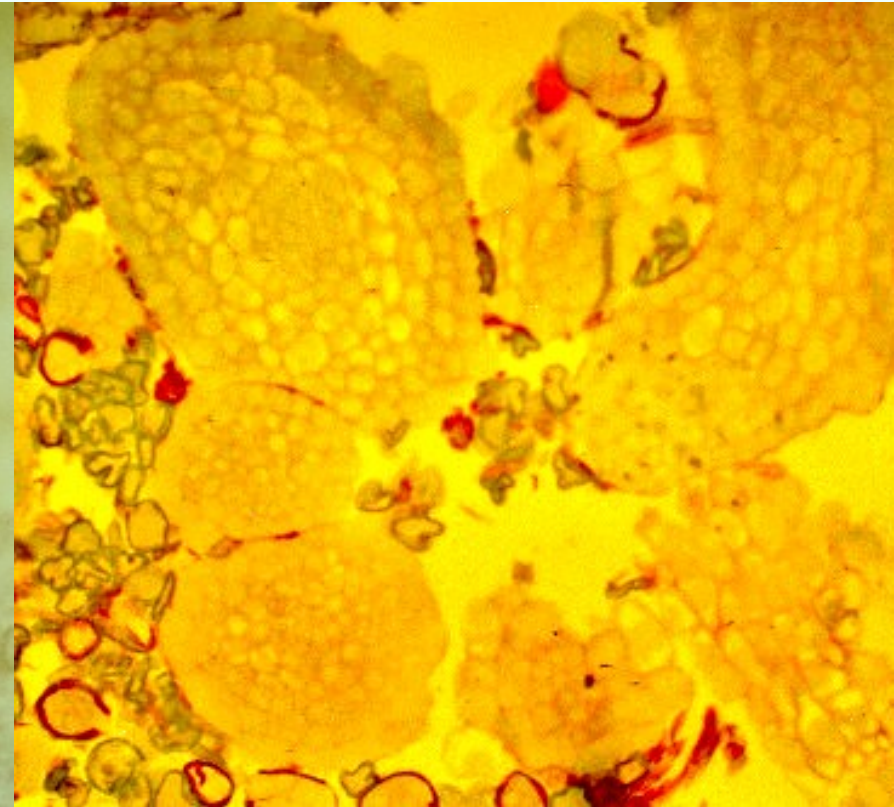
**řez embryoidy**

# Androgeneze u tabáku

21 dní

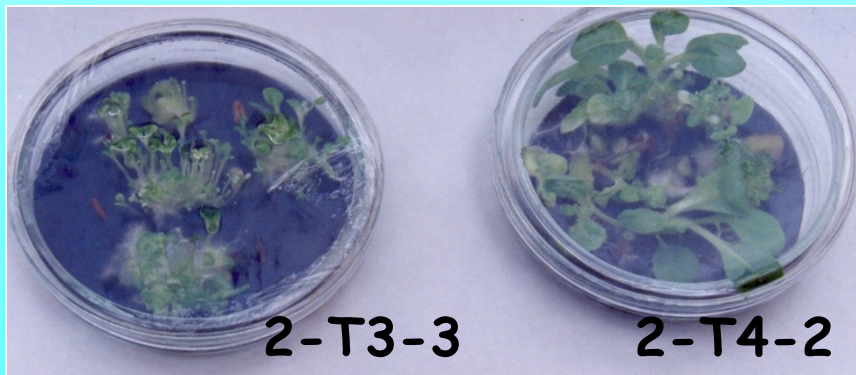
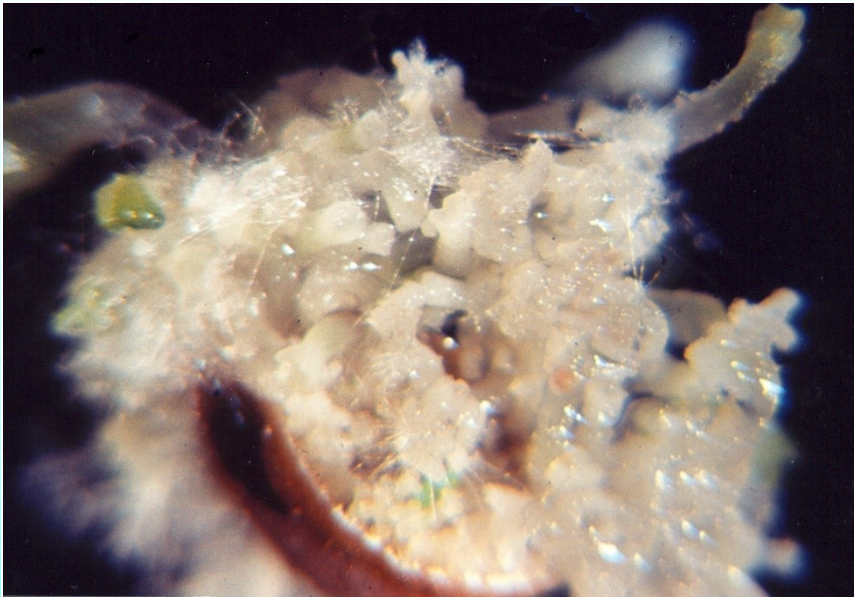


**prašník s embryoidy**



**řez embryoidy**

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



kvetoucí, ale sterilní  
haploidní rostlina

# Výhody mikrosporových kultur oproti kulturám prašниковým

- v **prašnikových kulturách** často nedochází k indukci dělení mikrospor vlivem inhibičních látek z prašníku nebo nedostatečným kontaktem s živinami
- u **prašnikových 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.





# Centre of Plant Structural and Functional Genomics

of the Institute of Experimental Botany AS CR

Home > RESEARCH

- Research Topics
  - BANANAS
  - CEREALS
  - GRASSES
- Flow cytometry
- Research Projects
- Publications
- Facilities
- Useful Links

## Androgenesis in vitro

We used androgenesis *in vitro* to reduce ploidy level in tetraploid hybrids (*L. multiflorum* × *F. pratensis* and *L. perenne* × *F. pratensis*) and tetraploid *L. multiflorum*. Obtained diploids have higher potential to be used as turf breeding material.

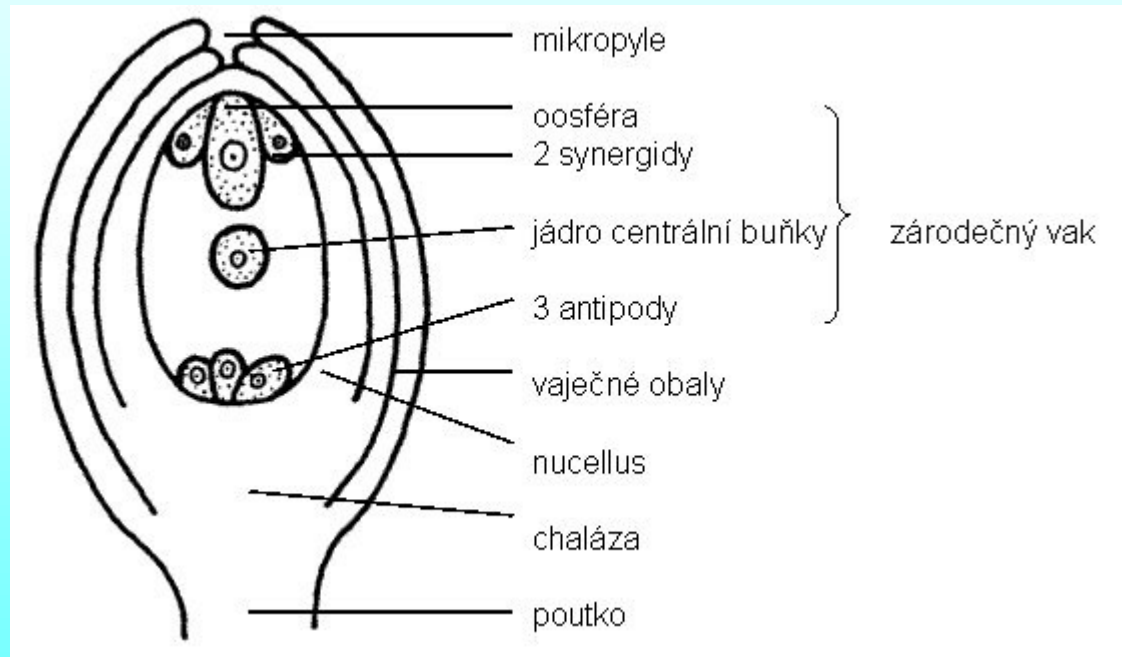
**Kopecky, D.**, Lukaszewski, A.J. and Gibeault, V. (2005). Reduction of ploidy level by androgenesis in intergeneric *Lolium-Festuca* hybrids for turf grass breeding. *Crop Science* 45: 274-281.



GRASSES

## 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
- většinou náročnější než androgenese
- tvorba haploidů tam, kde nejde androgenese (např. samčí sterilita)

[Plant Cell Rep.](#) 1985 Dec;4(6):300-3. doi: 10.1007/BF00269883.

## **Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: From in vitro culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil.**

[Bossoutrot D](#)<sup>1</sup>, [Hosemans D](#).

### **+ Author information**

#### **Abstract**

Our study concerns the different stages involved in the production of doubled haploid beet plants by in vitro gynogenesis. A histological study shows that the embryos obtained could come from the oosphere or the antipodals. Gynogenesis using male fertile plants gives nearly two haploid plants for 1000 ovules cultured: in this case, the problem is to avoid plating fertilized ovules. The gynogenetic plants obtained display an endopolyploidy phenomenon at the root meristem level while their shoot meristem remains haploid. Colchicine doubling during in vitro vegetative propagation of buds has been carried out successfully.

PMID: 84251227, DOI: 10.1007/BF00269883

[Theor Appl Genet.](#) 1987 Apr;73(6):920-5. doi: 10.1007/BF00289399.

## **In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.).**

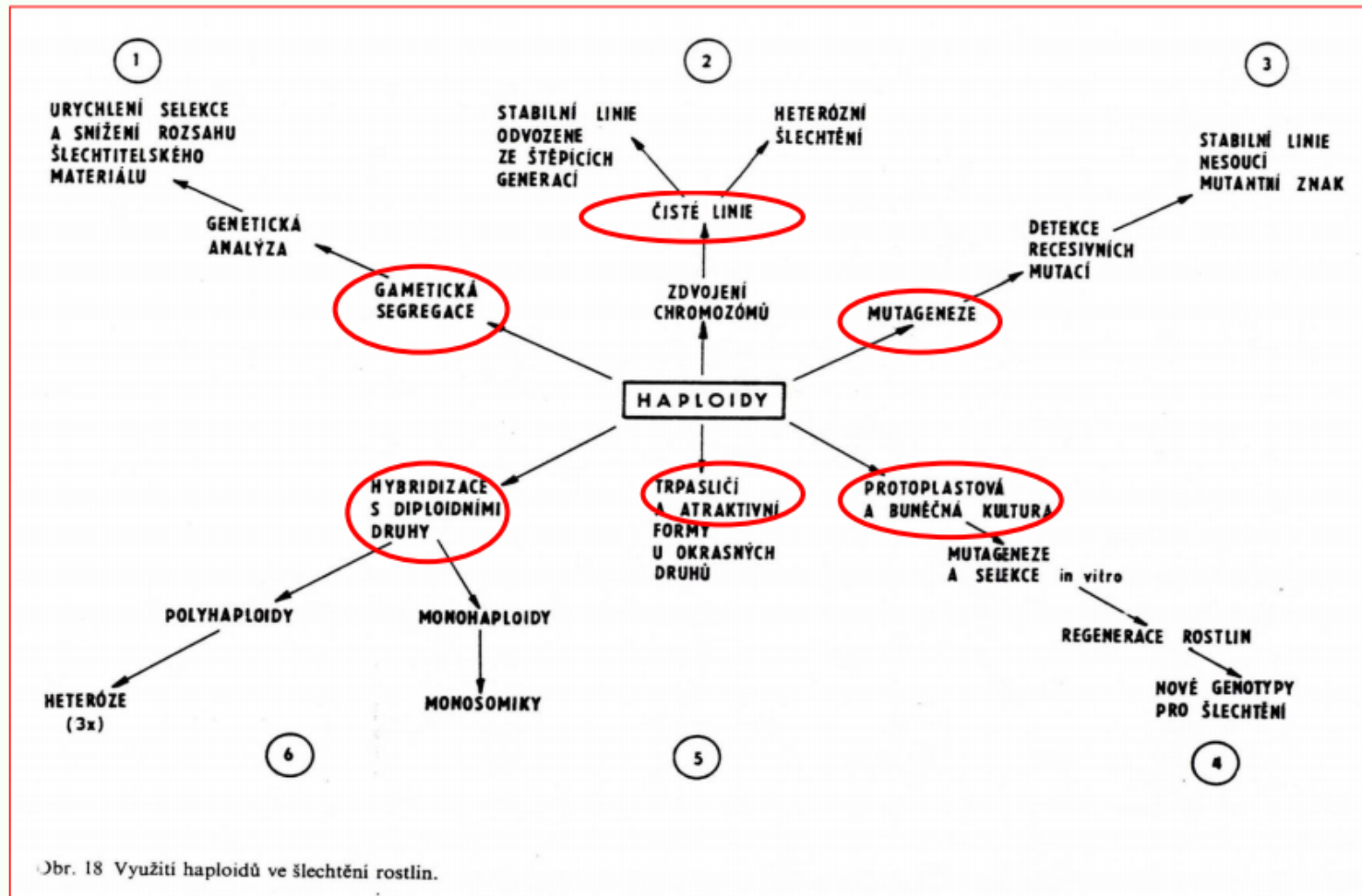
[Van Geyt J](#)<sup>1</sup>, [Speckmann GJ Jr](#), [D'Halluin K](#), [Jacobs M](#).

### **+ Author information**

#### **Abstract**

Haploid plantlets from male fertile and male sterile sugarbeet plants could be induced at frequencies up to 2.2% using ovule culture. Ovary culture on media without charcoal resulted in a similar induction frequency. Plant development was inhibited by callus development originating from the mother tissue. When the callus parts were removed and the ovule transferred to a new medium without 2,4 D, callus formation could be inhibited by adding 0.5% charcoal to the medium. Up to 6.1% haploids were induced. Chromosome counts in leaf tips, chloroplast counts and isozyme patterns revealed that all plants were haploid and originated from the haploid cells of the embryo sac. Root tips showed spontaneous polyploidisation.

# Využití haploidů v praxi



Obr. 18 Využití haploidů ve šlechtění rostlin.

Gynogeneze – *Beta vulgaris*, *Gerbera jamesonii*, *Allium cepa*

## 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.

# Přehled haploidních technik

