

Opylování *in vitro*

Test-tube pollination/fertilization



Pulsatilla grandis, Brno Stránská skála, 6.4.2003

Rozmnožování u rostlin

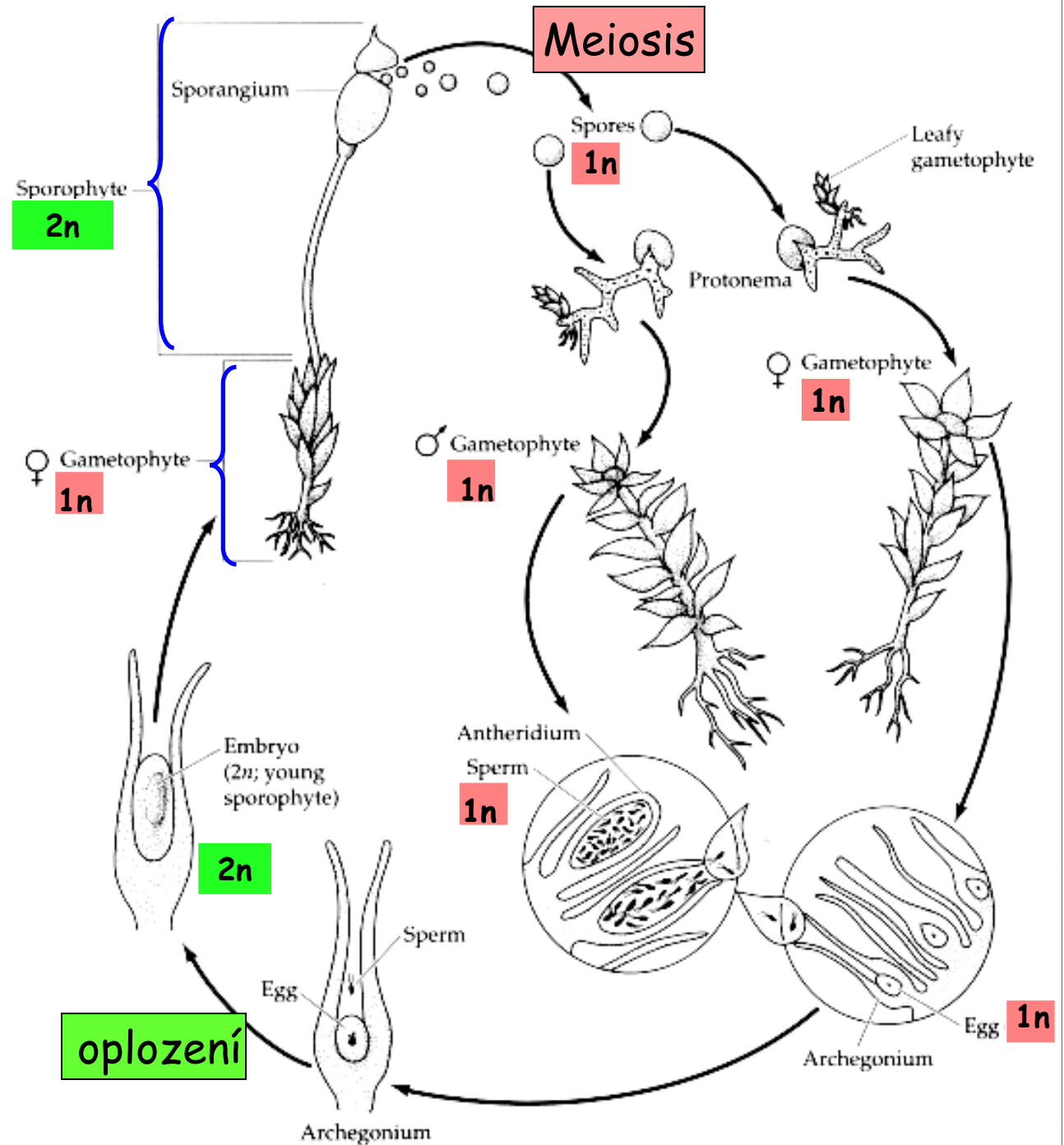
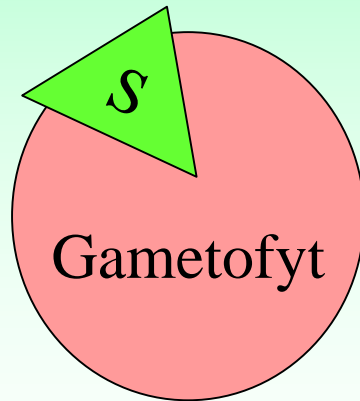
- **vegetativní rozmnožování (amixis)**
 - fragmentace
 - cibulky, hlízky
 - rhizomy
- **generativní rozmnožování (amfimixis)** - specializované struktury - vývoj pohlavních buněk + mechanismus zajišťující jejich fúzi
- **apomixis** - zvláštní varianty rozmnožování - „vegetativní množení z generativních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

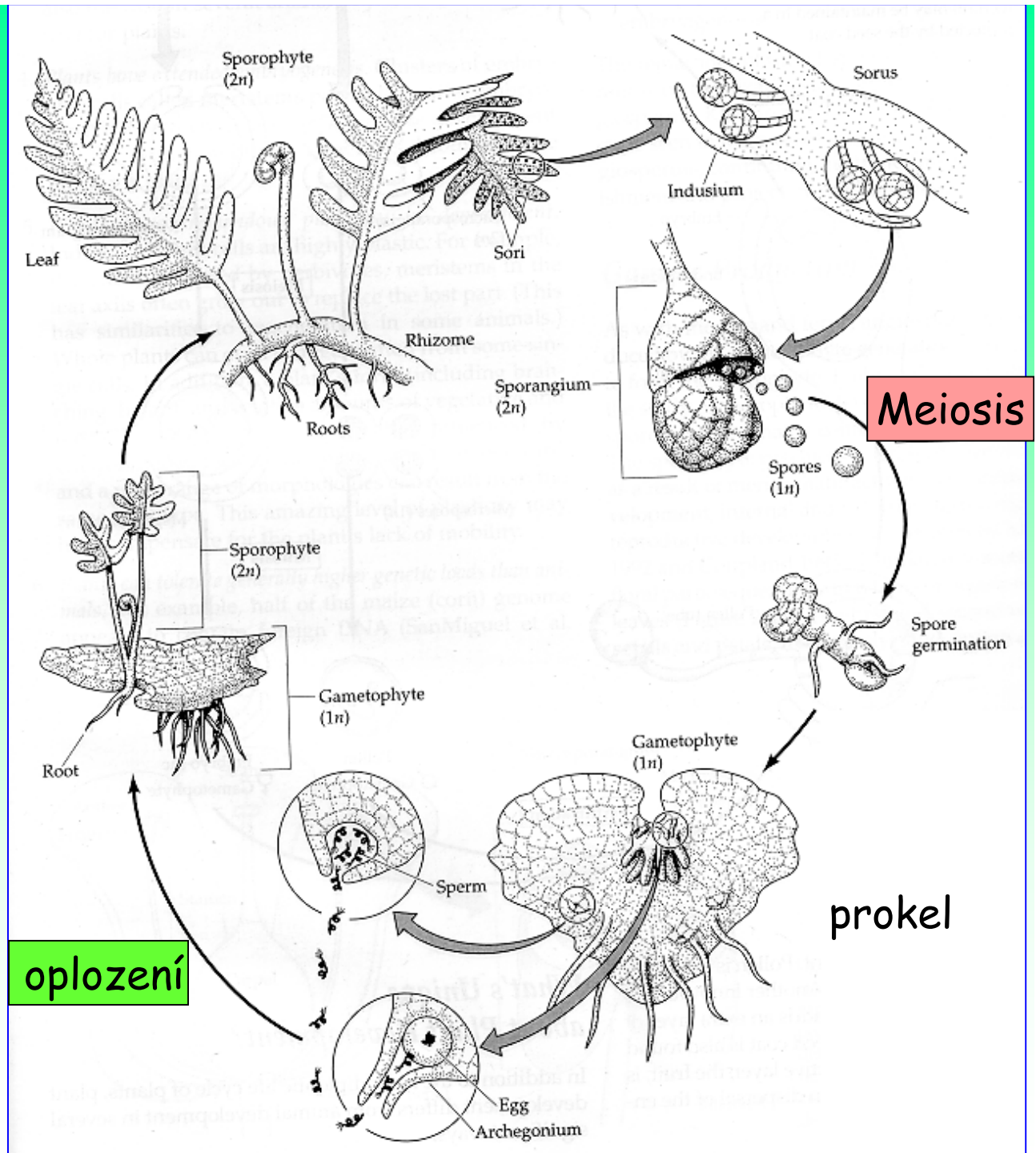
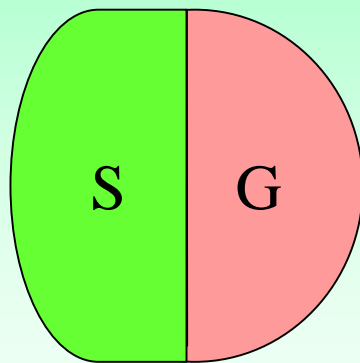
Rodozměna u mechorostů

embryo i zralý sporofyt jsou závislé na fotosyntéze gametofytu



Rodozměna u kapradin

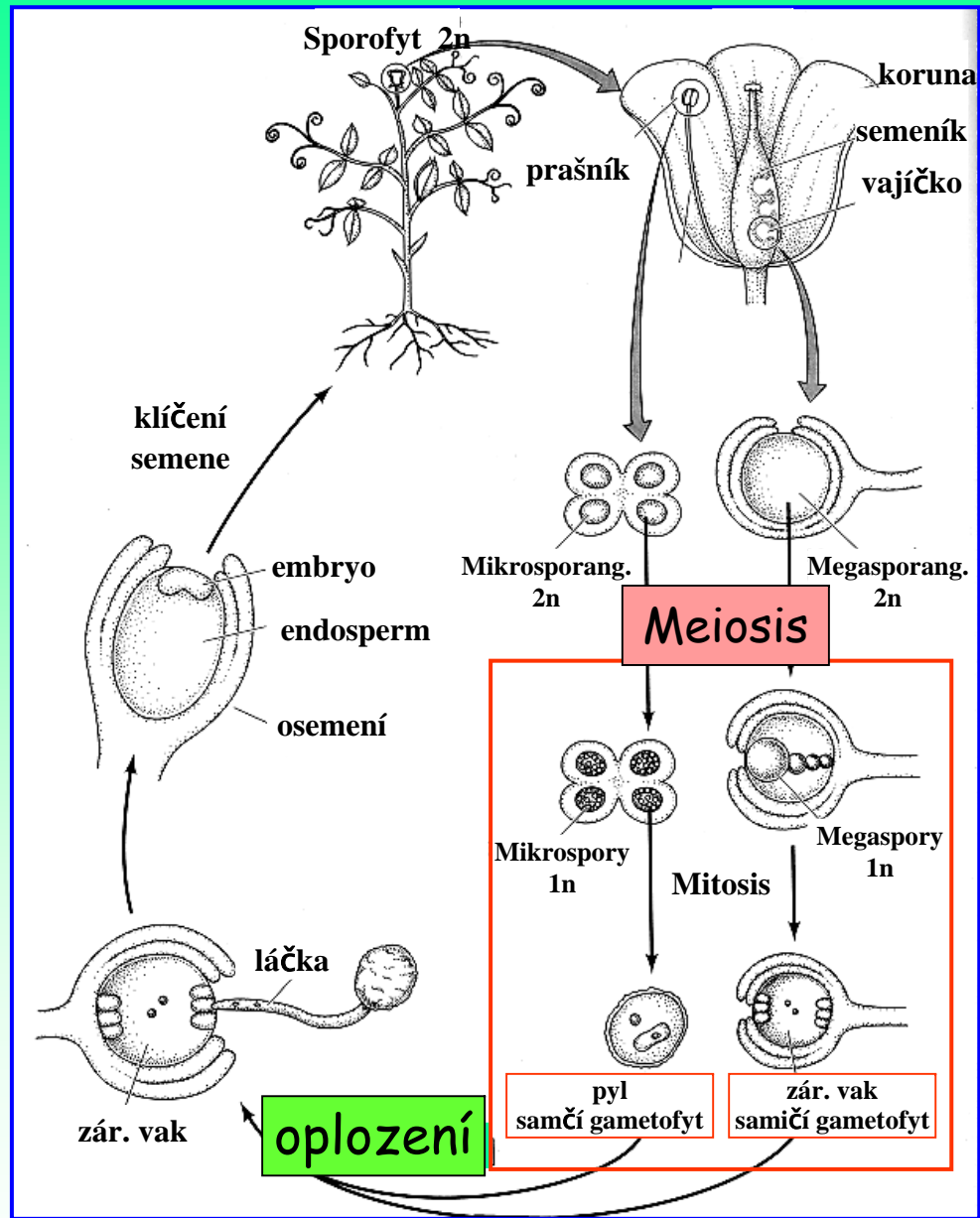
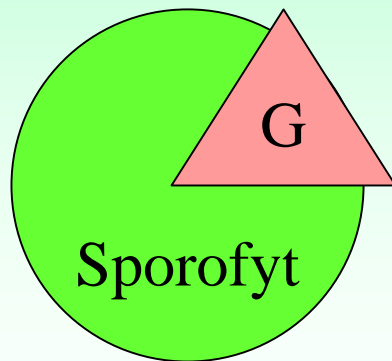
sporofyt i gametofyt je schopný fotosyntézy



Rodozměna u krytosemenných rostlin

gametofyty jsou závislé na fotosyntéze sporofytu

gametofyty jsou velmi redukované 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

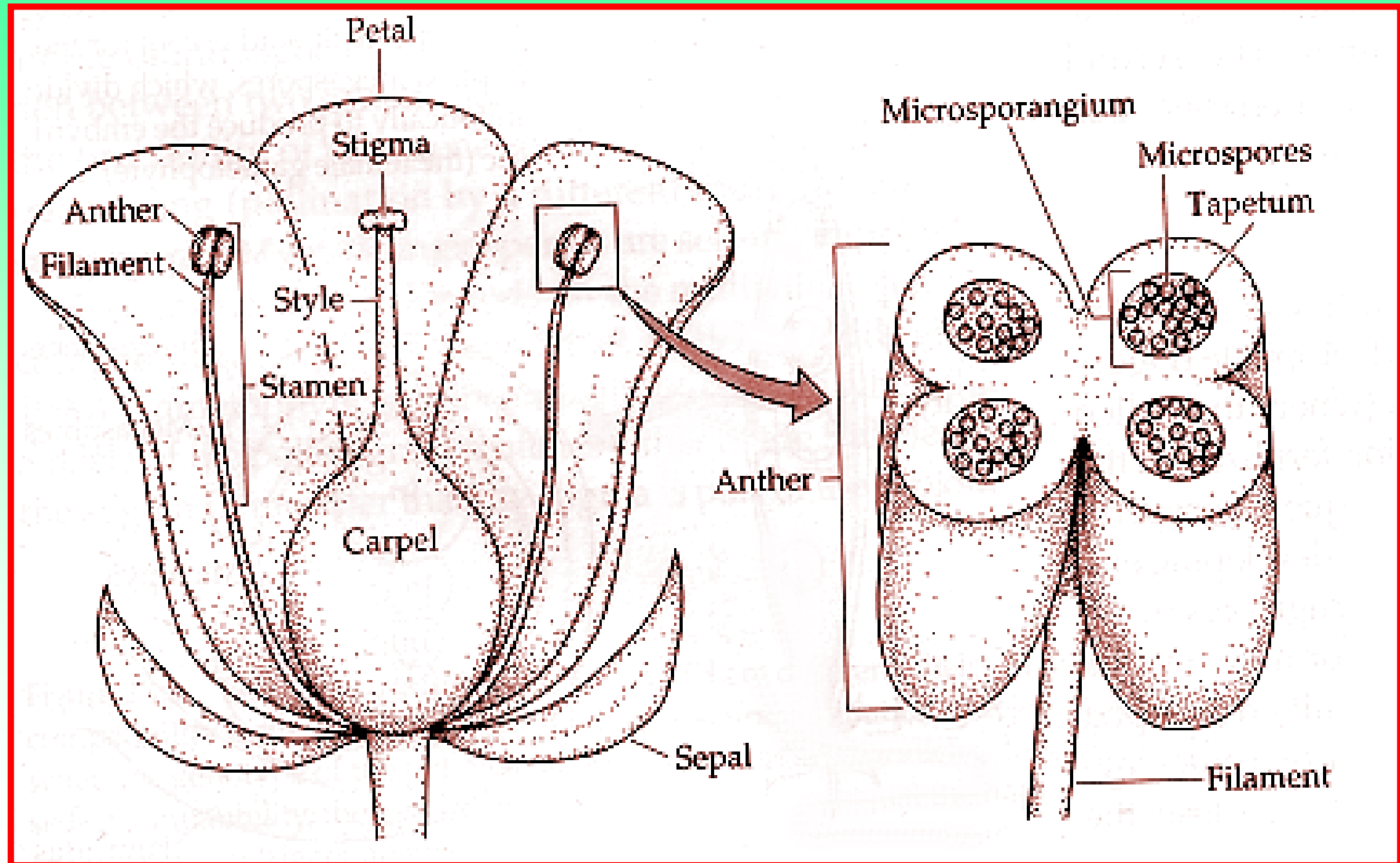
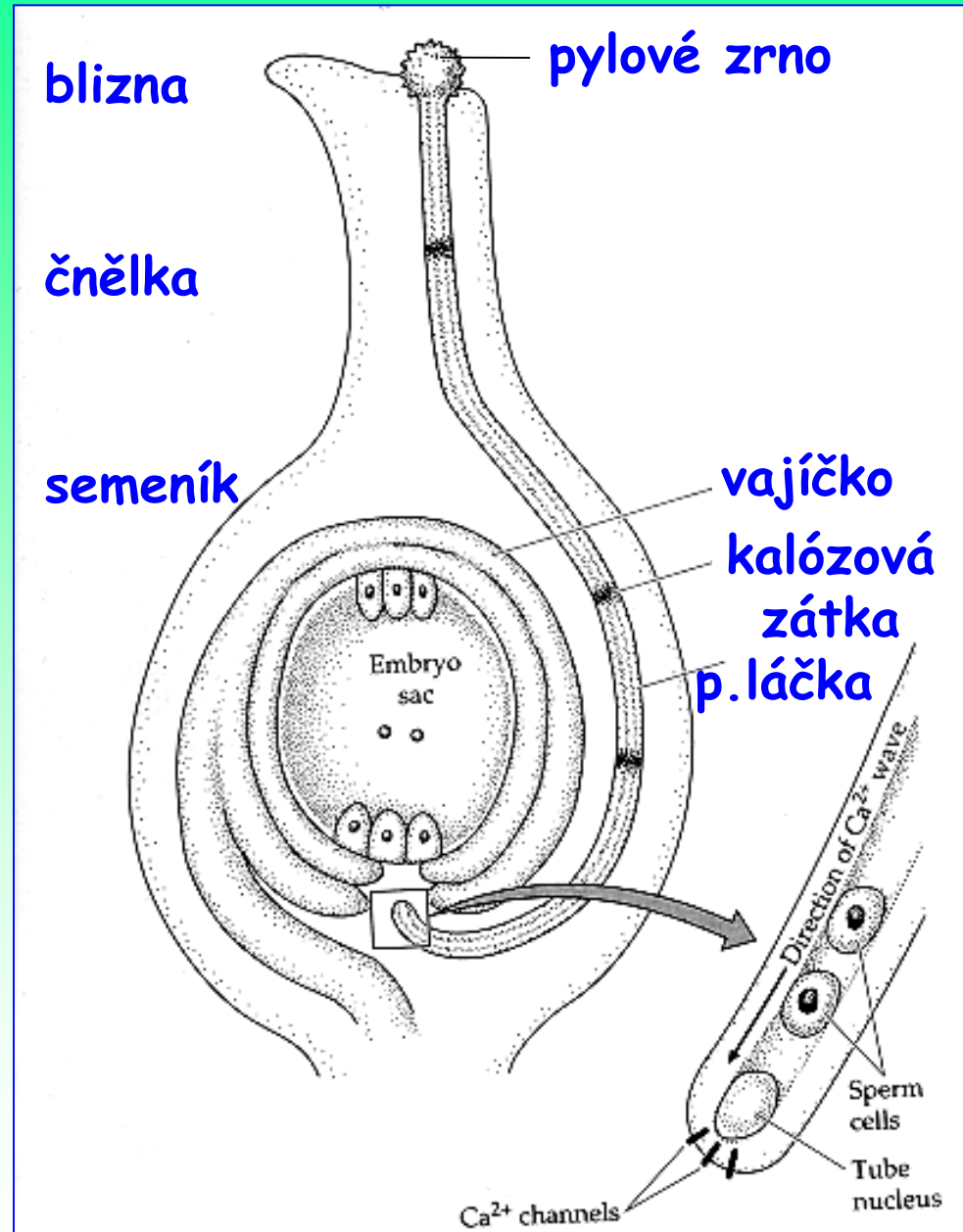


Schéma gynecea s vajíčkem

pestík =
soubor plodolistů =
gynaecium



Místa interakcí v pestíku

Povrch pylového zrna:
pylový tmel
proteiny ve sporodermě

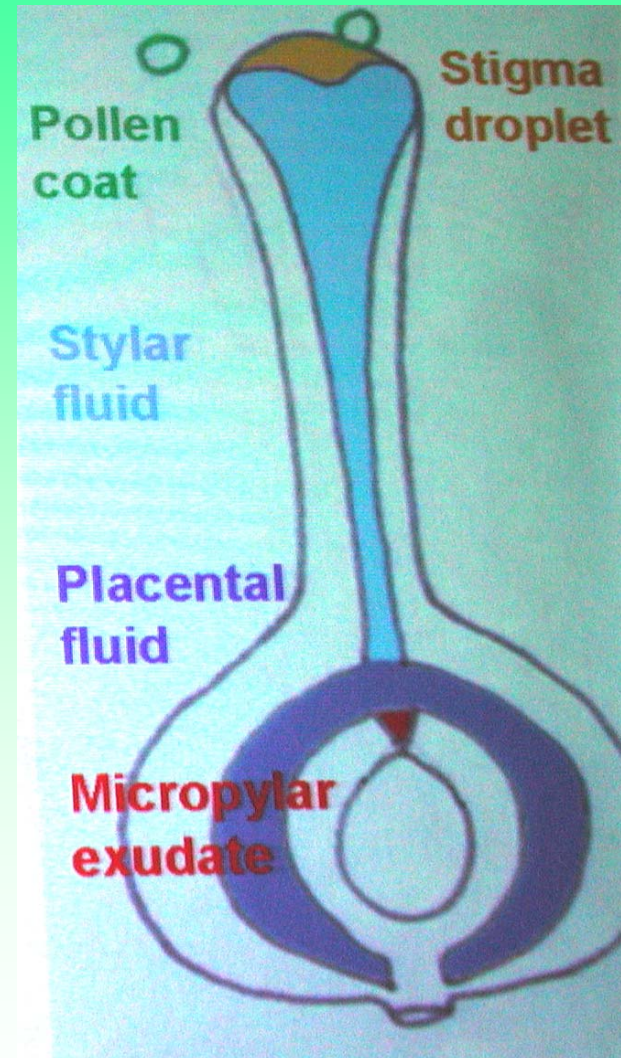
Bliznový exudát

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

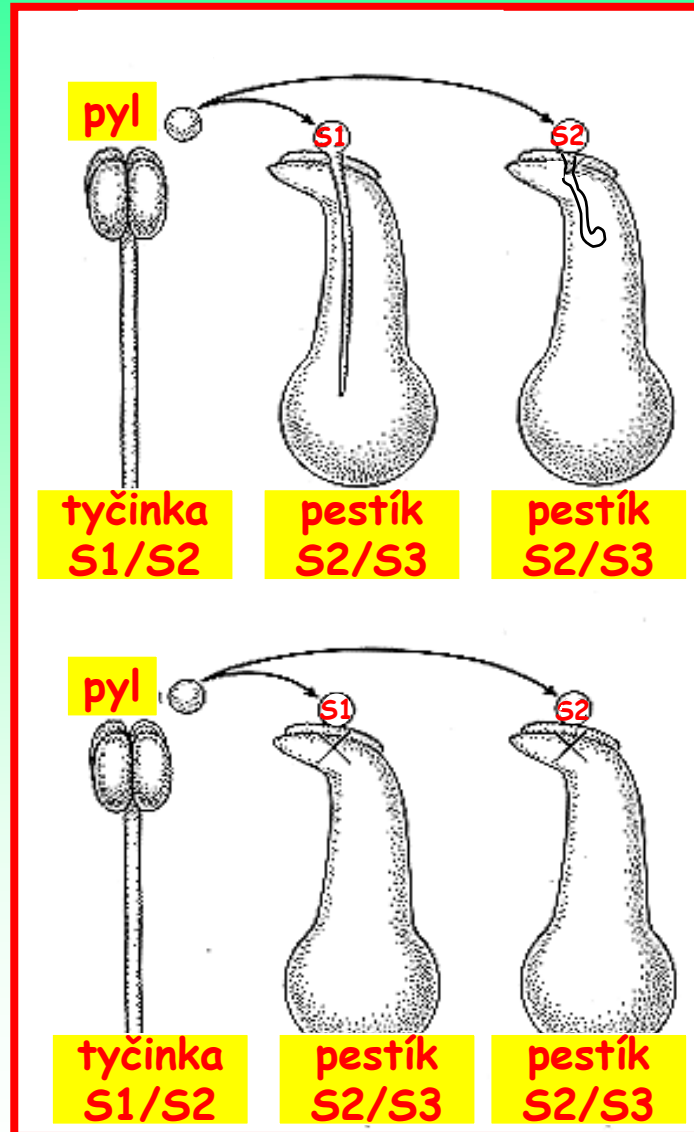
- je daná genotypem rostliny, která produkuje pyl (**sporofytem**), bez ohledu na genotyp si pyl ponechává fenotypovou reakci dominantní alely
- projevuje se **již na povrchu blizny** (proteiny z tapeta)
- suché blizny a 3 buněčný pyl

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*

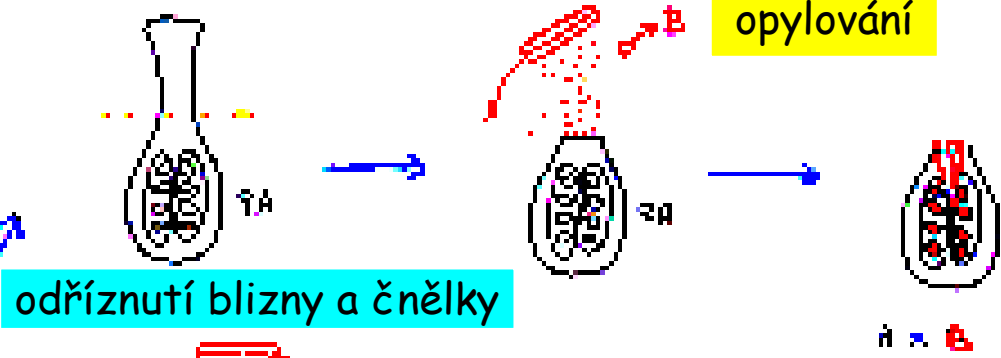
opylování *in vitro*

Umělé opylování *in situ*

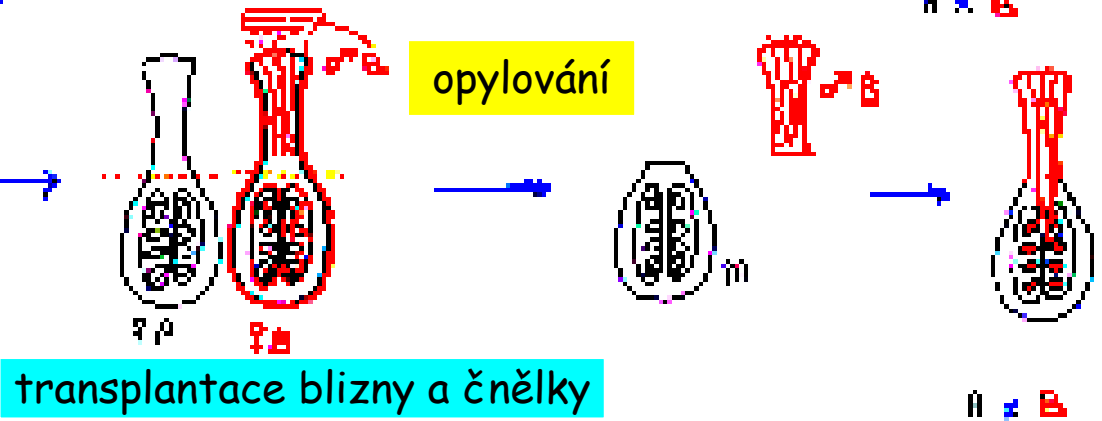
- opylení nezralých blizen
- teplotní šoky
- ovlivnění blizen (organická rozpouštědla, růstové regulátory, vitamíny, cukry, extrakty z kompatibilních blizen, „mentor pollen“)
- odříznutí blizny a čnělky
- intraovarijní opylení
- transplantace blizen

Umělé opylování *in situ*

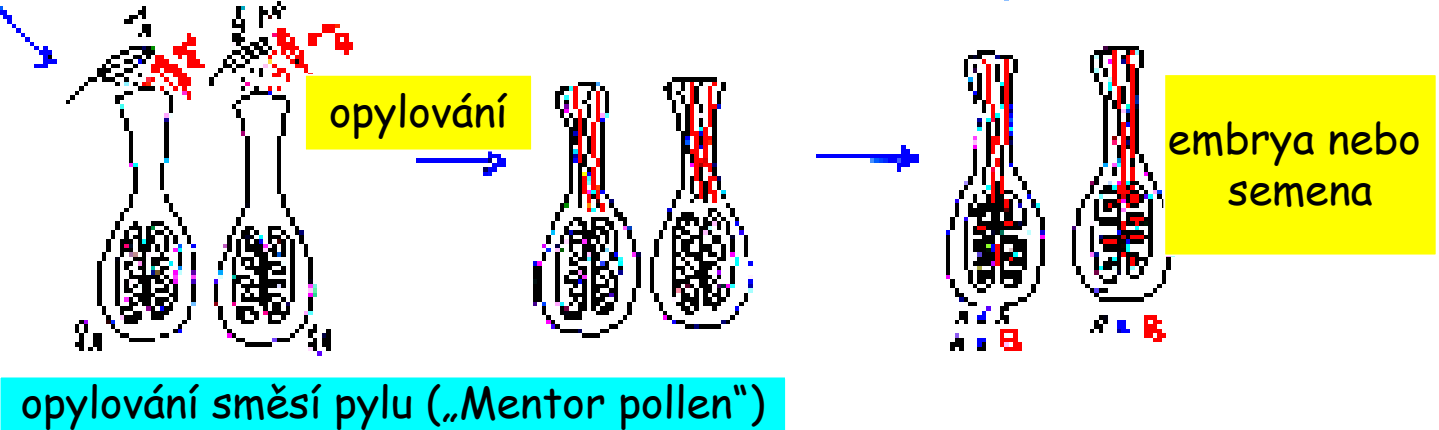
normální opylování



bez embryí nebo semen



transplantace blizny a čnělky



Opylování *in vitro*

1. intraovarijní - pyl v suspenzi
2. bliznové
3. placentární
4. izolovaná vajíčka
5. oplození izolovaných gamet

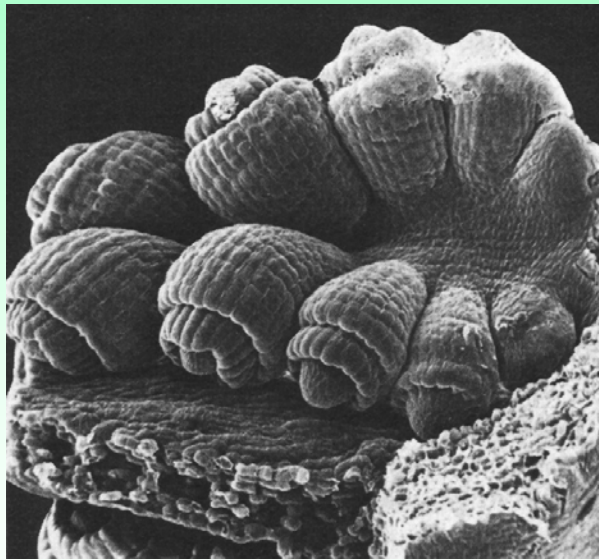
Předpoklady úspěchu

- znalost vhodného vývojového stadia
- zajištění média pro klíčení pylu i vývoj embrya

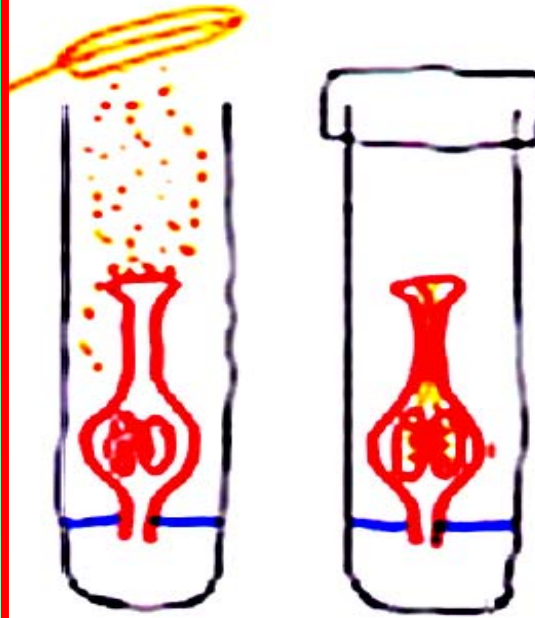
Intraovarijní opylování *in situ*

- 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*



Johri 1984



*bliznové
opylování*



*placentární
opylování*

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*

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*

Opylování izolovaných vajíček

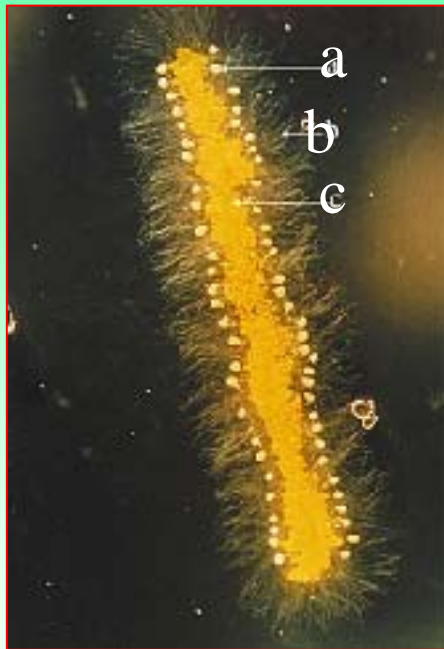
- Kameya (1966, 1970)
- Chi (2000)

Brassica

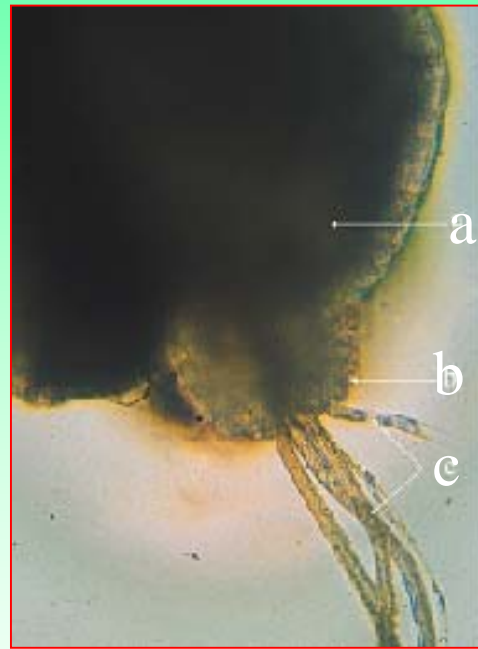
Lilium

Opylování izolovaných vajíček

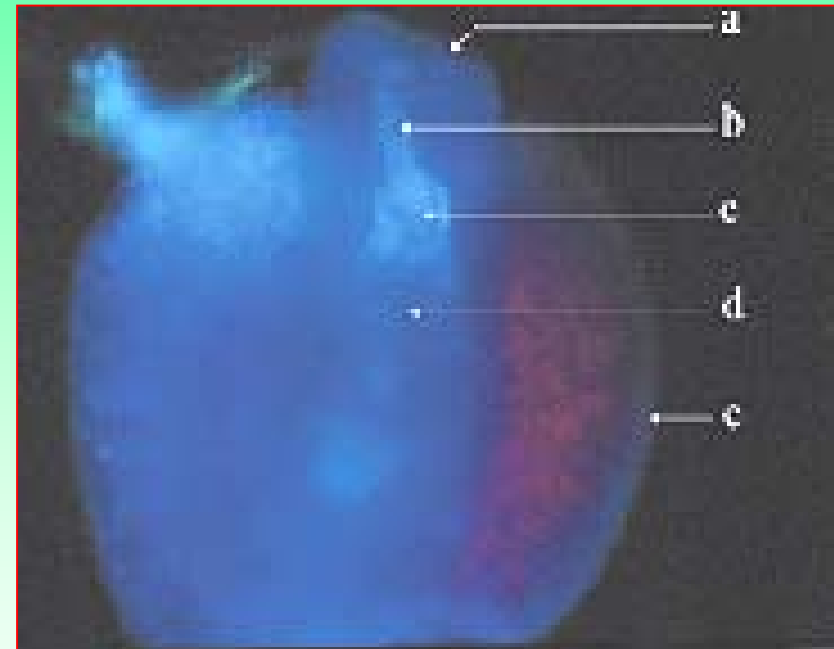
CHI (Bot. Bull. Acad. Sinn. (2000) 41: 143 - 149



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)

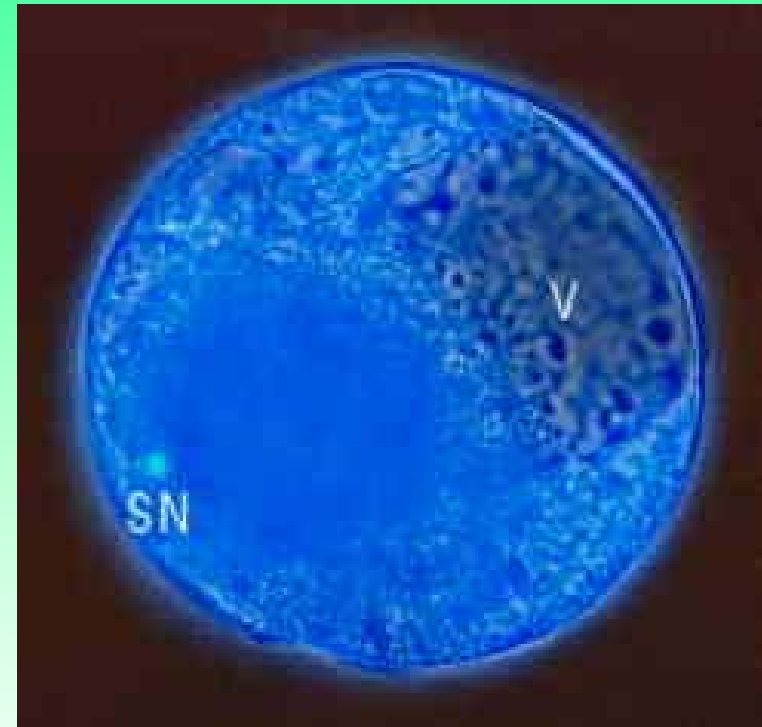
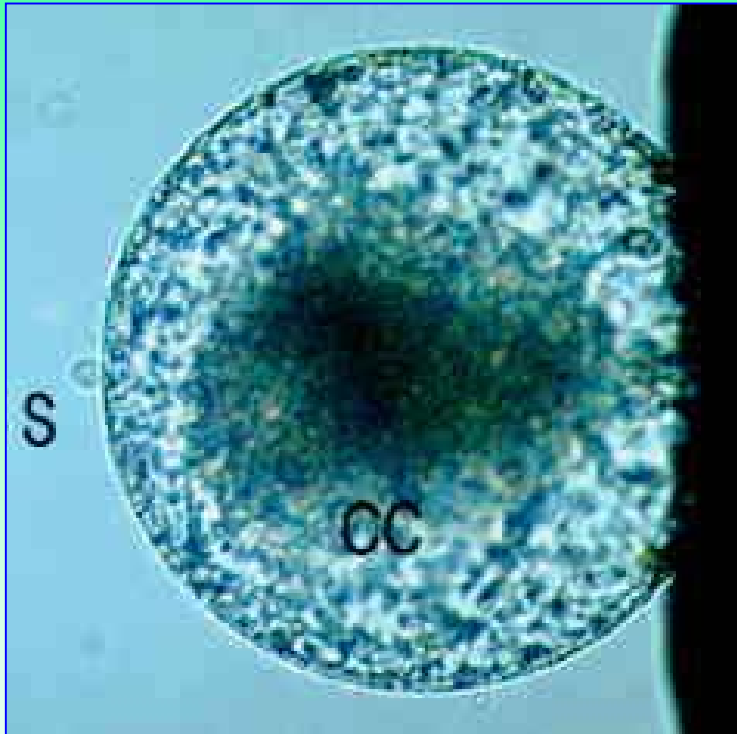


enzymatická izolace buněk
zárodečného vaku

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

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/kranz/1996.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)

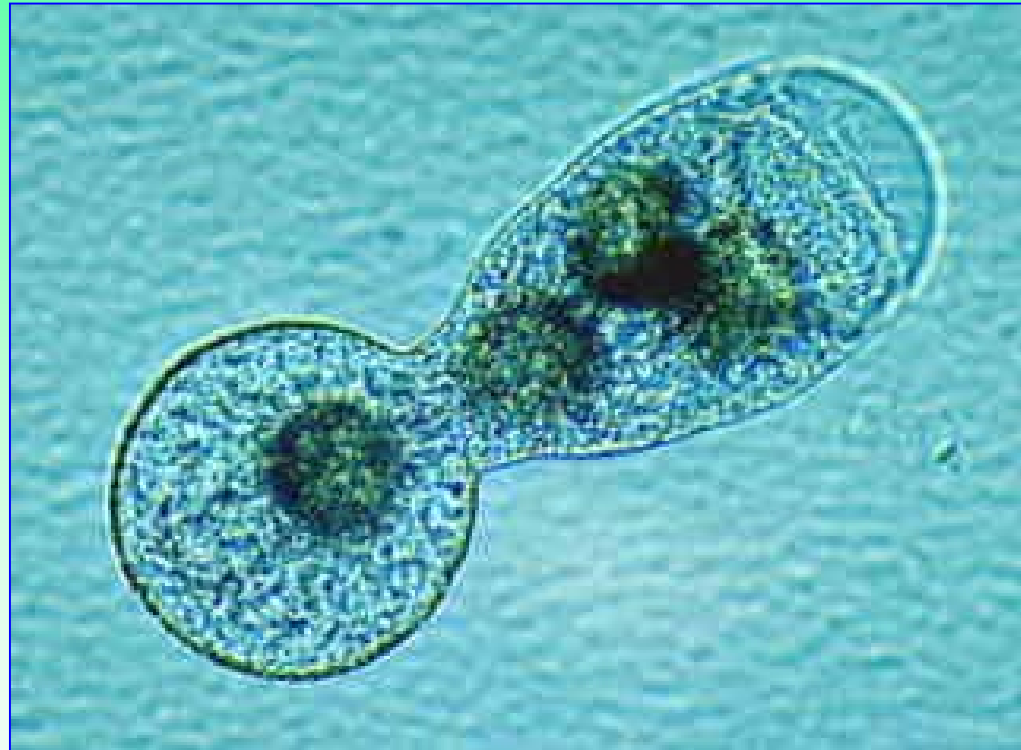


Izolované jádro centrální buňky kukuřice s integrovaným jádrem spermatické buňky (SN). Karyogamie po 150 min po *in vitro* fúzi spermatické a centrální buňky.

(N) velké jádro, epifluorescence po DAPI barvení

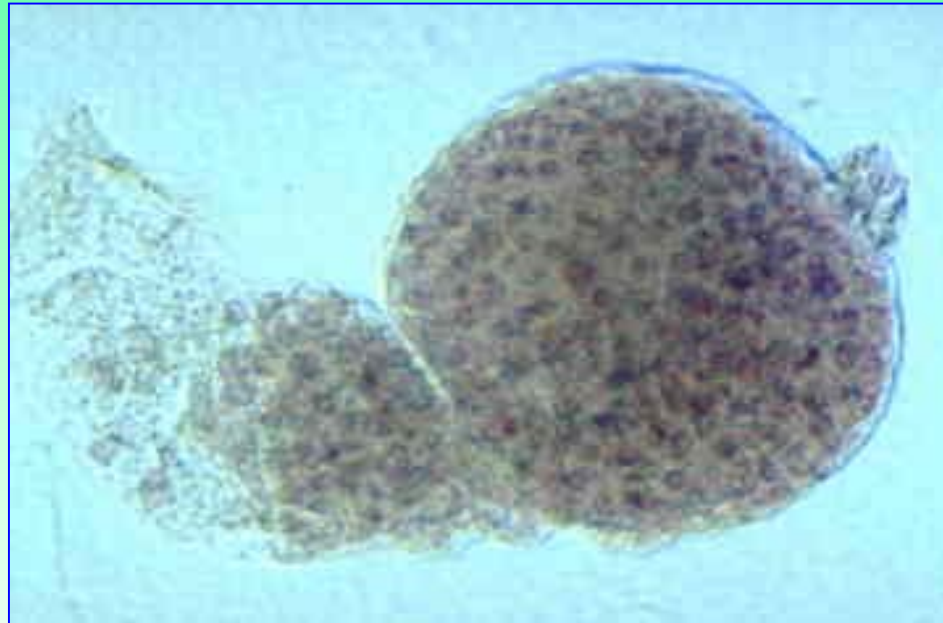
(Kranz *et al.*, 1998)

Oplození izolovaných gamet primární endospermální buňka kukuřice (Univerzita Hamburg)



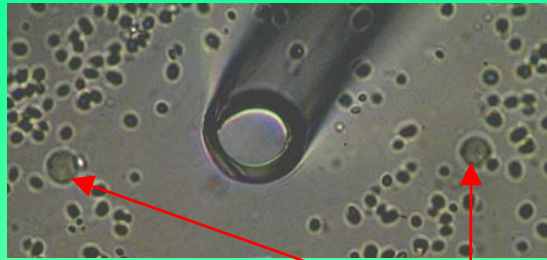
primární endospermální buňka kukuřice vytvořená *in vitro*
po 1 dnu kultury (Kranz et al., 1998)

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)

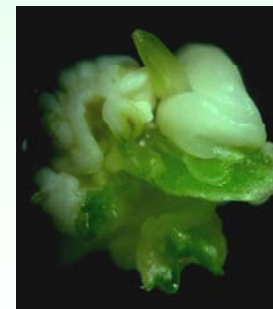
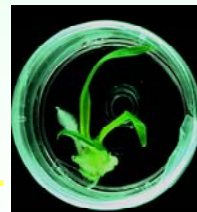
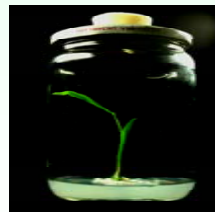
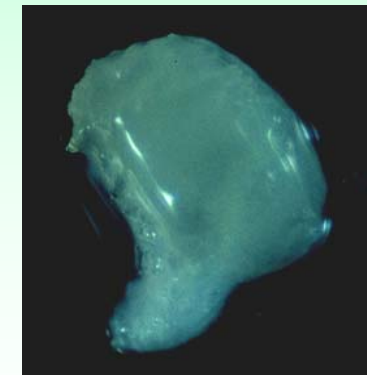
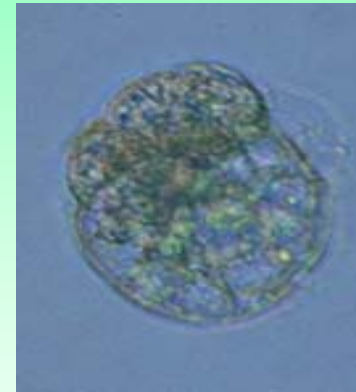
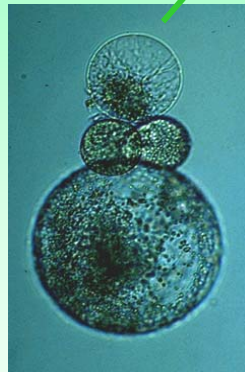
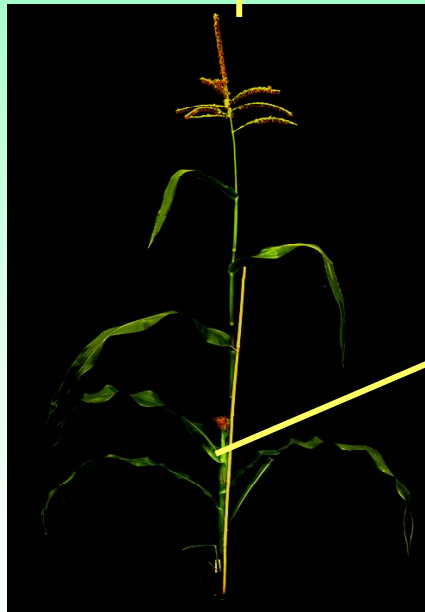
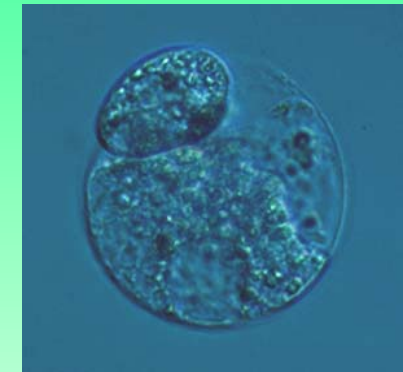
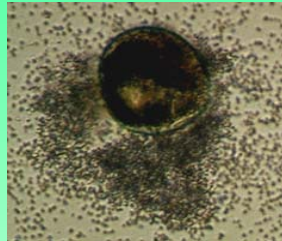
Okamoto
Brno 2003



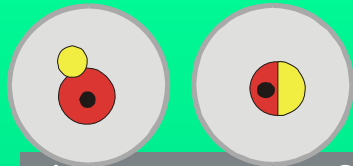
Sperm cell

Egg cell

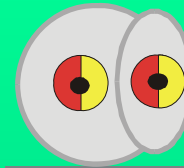
In Vitro Fertilization in *Zea*



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



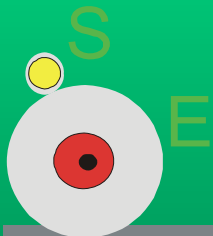
Karyogamy 35-90 min



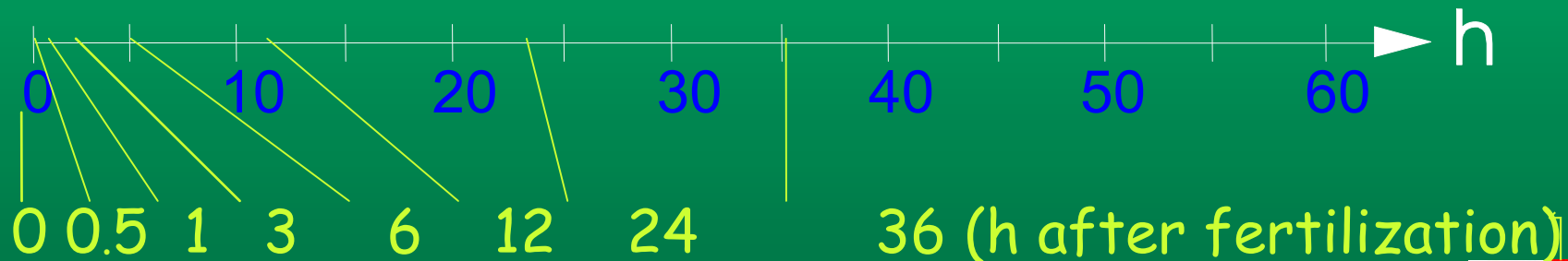
First Cell
Division
40 - 50 h



Cell Wall Formation 30 sec



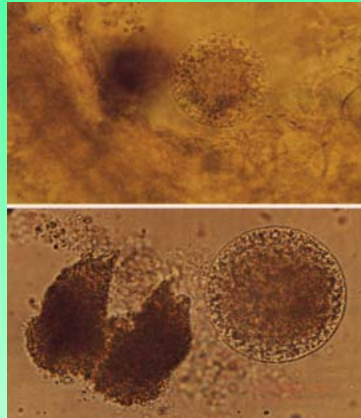
Syngamy 1 sec



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

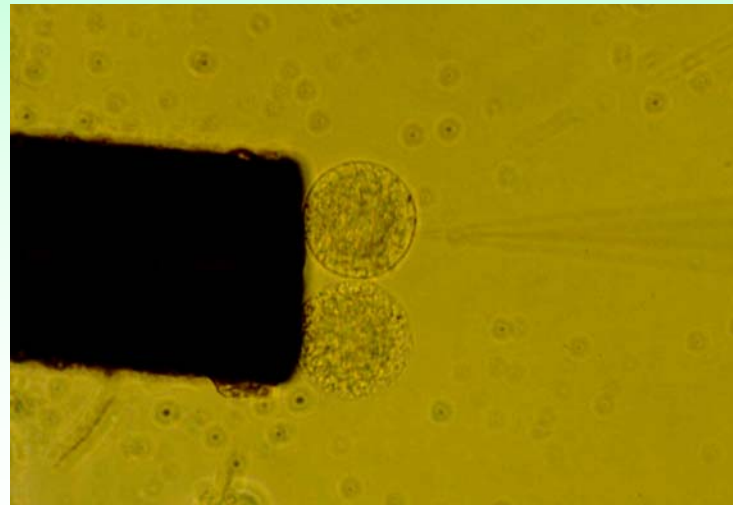
mikrochirurgická izolace buněk

synergida



vaječná buňka

imobilizace vaječné buňky s použitím elektrického proudu



mikroinjekce DNA
do imobilizované
vaječné buňky