

Samčí gametofyt

mikrosporogeneze
mikrogametogeneze



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

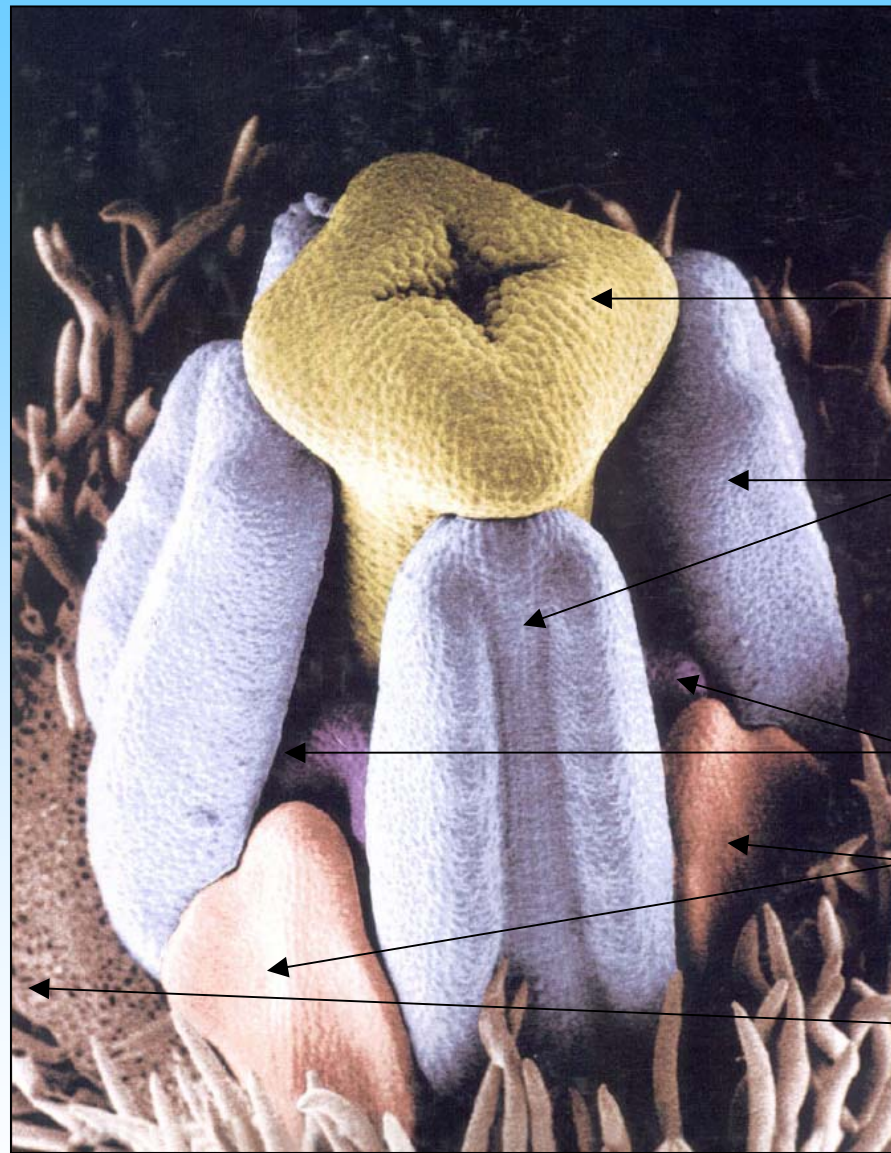
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Clarkia xantania (Onagraceae)

Am. J. Bot.

<http://www.botany.org/plantimages>

Photo:
C. J. Runions
Cornell University



blizna s čnělkou

větší prašníky

menší prašníky

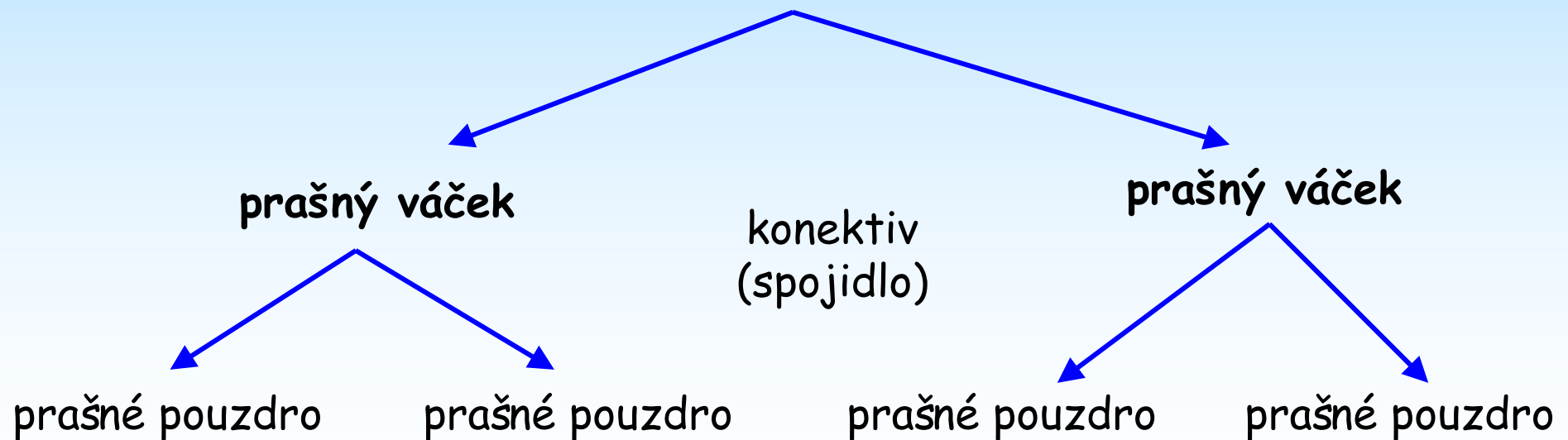
petaly

sepaly s trichomy

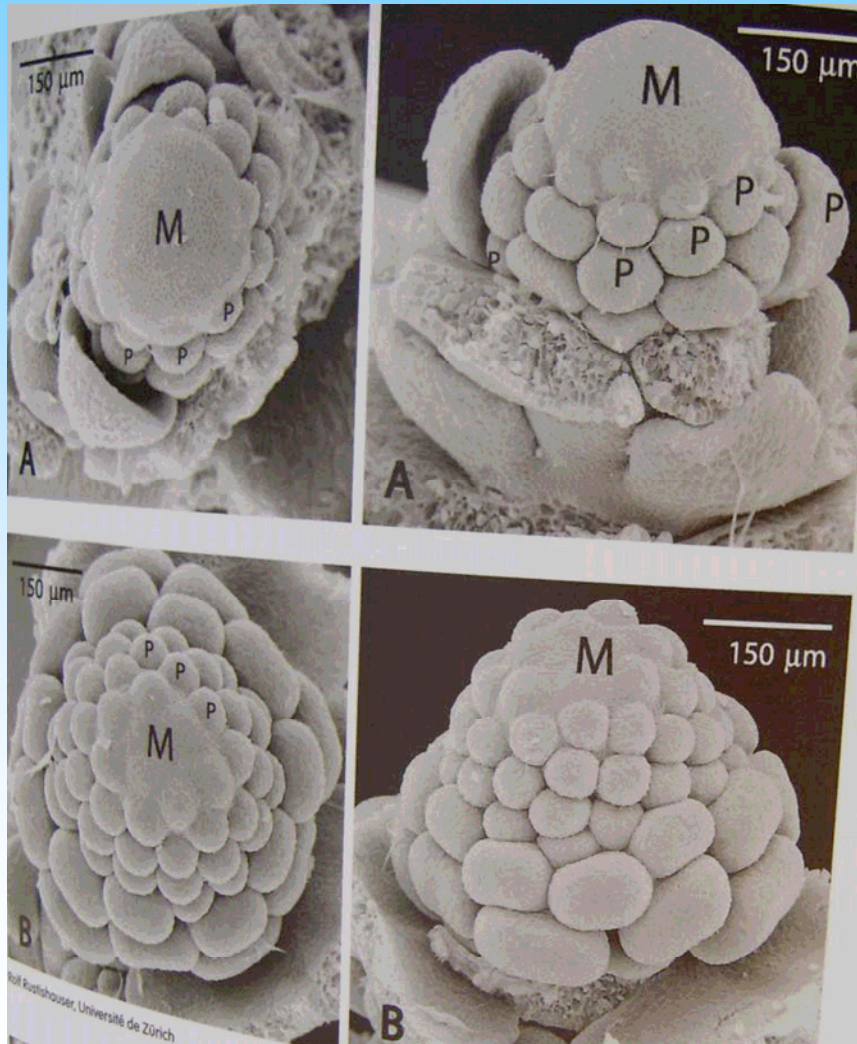
SE micrograph of an early floral developmental stage

Samčí rozmnožovací orgán = tyčinka soubor tyčinek = *androecium*

- tyčinka se zakládá jako meristematičtý hrbolek na vrcholu květního základu
- z baze  nitka (filamentum)
- z apexu  prašník (anthera)



Meristém květu pryskyřníku



spirálovitá fylotaxe
primordií tyčinek

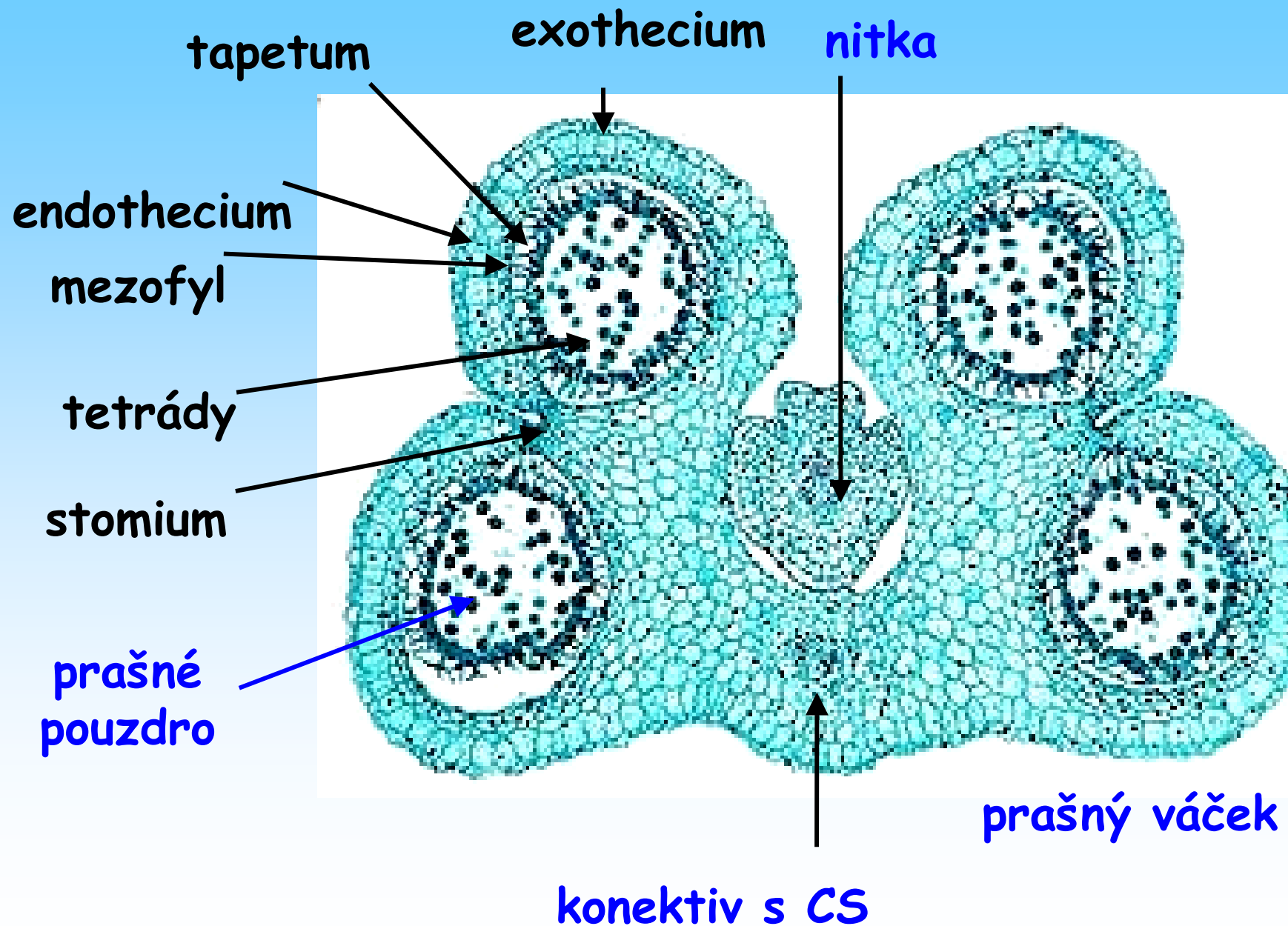
Ranunculus apiifolius
(J. Amerika)

R. Rutishauser, Zurych
Botanická zahrada Ženeva

Stavba stěny prašníku

- **exothecium** = pokožková vrstva s kutikulou
stomium, hypostomium
- **endothecium** = subepidermální, vláknitá vrstva
- střední vrstva = **mezofyl**, parenchymatické pletivo
- **tapetum** = výstelka prašného pouzdra
 - žlázaté (sekretorické)
 - ameboidní = periplazmodium

Řez prašníkem lilie - stadium tetrád



Řez prašníkem lilie - metafáze I.meiot. dělení

endothecium

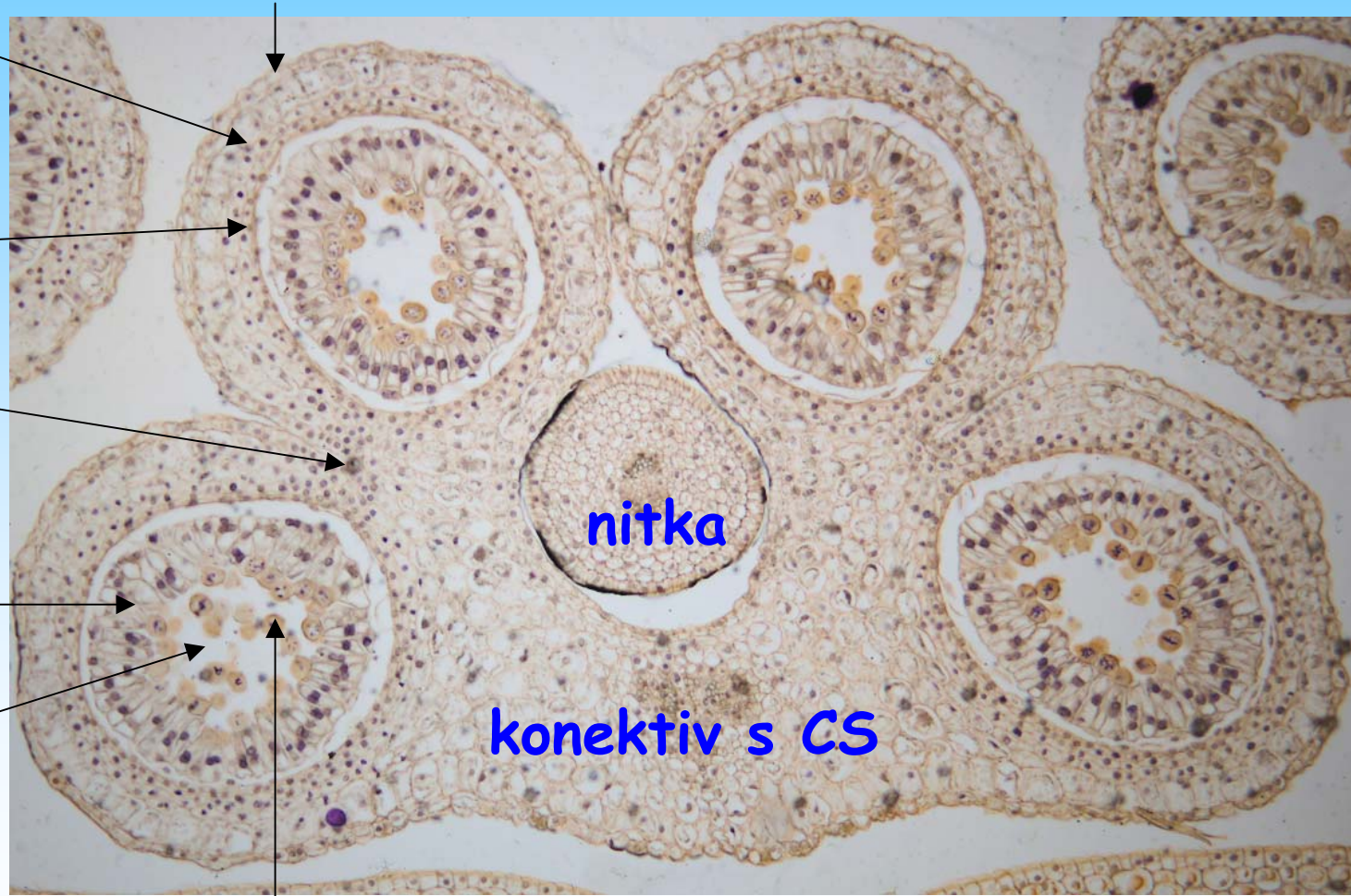
exothecium

mezofyl

stomium

tapetum

prašné
pouzdro



nitka

konektiv s CS

PMC

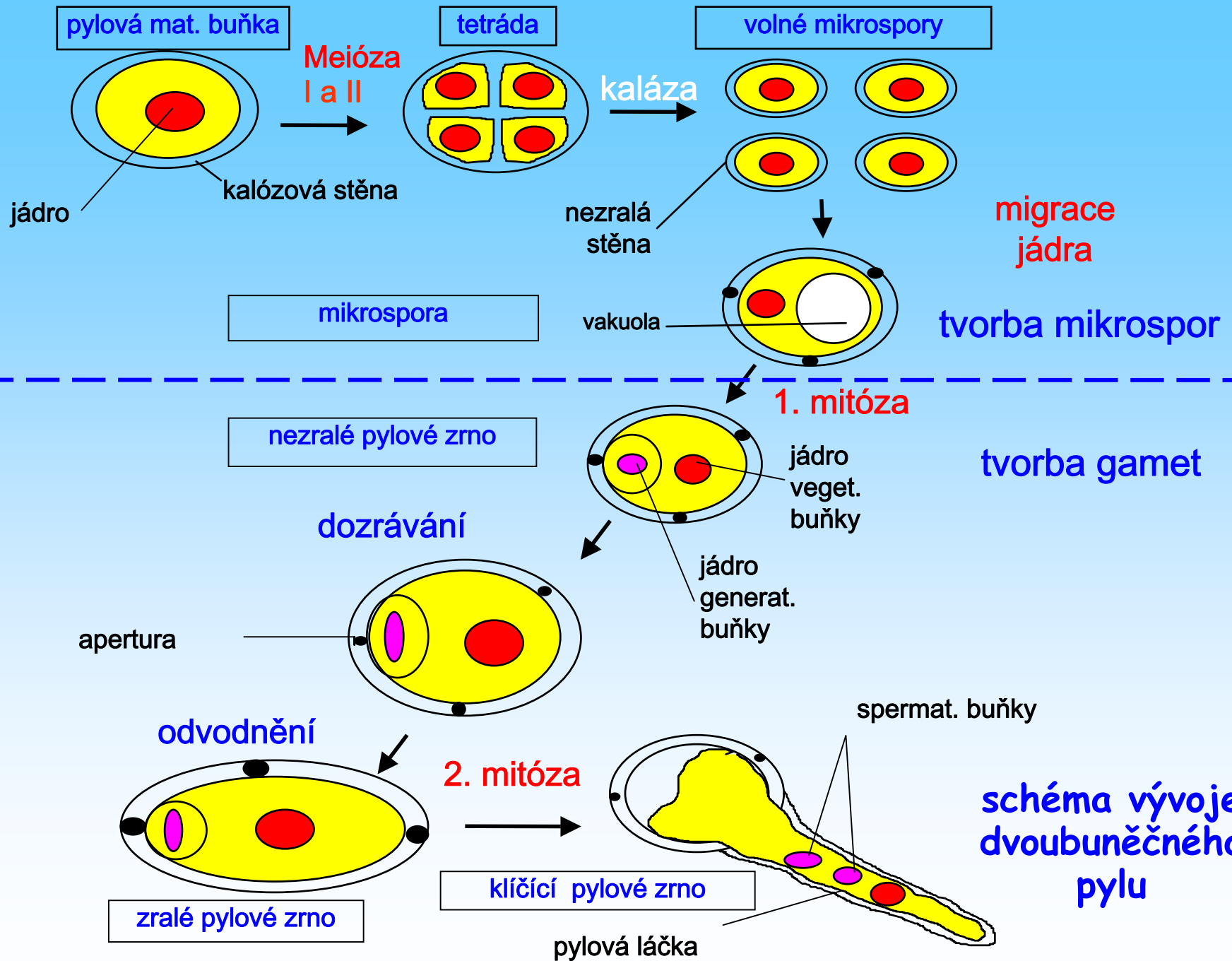
prašný váček

Funkce tapeta

- produkce enzymu **kalázy** (β 1,3-glukanáza) rozkládá kalózu a uvolňuje mikrospory z tetrád)
- syntéza prekurzorů exiny
- syntéza a vylučování **pylového tmelu** (depozice na povrchu pylových zrn)
- syntéza **proteinů** (depozice ve vnější vrstvě pylových zrn - exině)

Vývoj buněk tapeta

- **vnější a vnitřní tapetum** - má **dvojí původ**
- **předmitotická fáze** - buňky jednojaderné meristemické
- **mitotická fáze** - mitóza bez cytokineze + endomitóza = 2 polyploidní jádra, zvětšuje se i objem buněk
- **postmitotická fáze** - vesikulární útvary = vysoká syntetická a sekreční aktivita
- programovaná buněčná smrt buněk tapeta



Meióza = redukční dělení

I. heterotypické dělení segregace homologních chromozómů

- profáze
 - leptoten
 - zygoten - bivalenty
 - pachyten
 - diploten - chiasmata, CO
 - diakineze
- metafáze
- anafáze
- telofáze

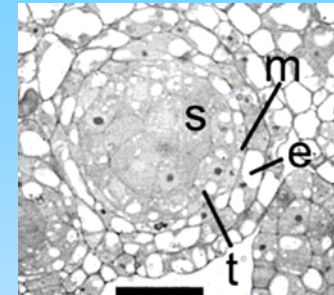
interfáze mezi I. A II.
dělením je krátká =
nedochází k syntéze DNA

II. homeotypické dělení = ekvační - dochází k segregaci alel

průběh je shodný s
mitózou

Mikrosporogeneze

vývoj mikrospor ze sporogenních buněk



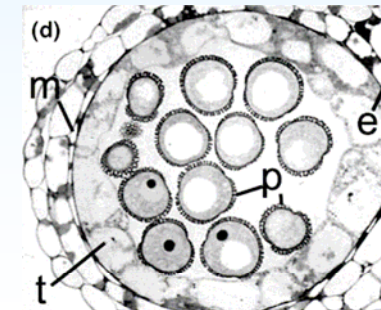
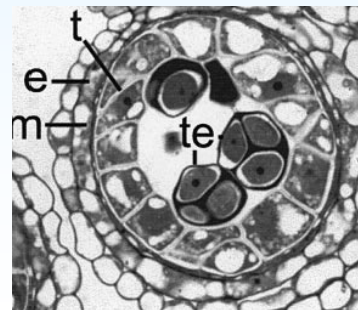
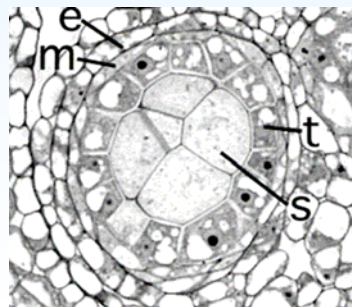
redukční
meiot.
dělení

mikrosporocyty
pylové mateřské
buňky (PMC)

tetrády
mikrospor

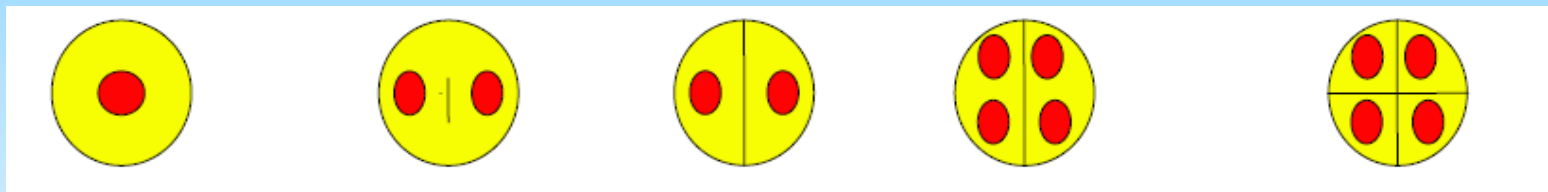
kaláza

mikrospory

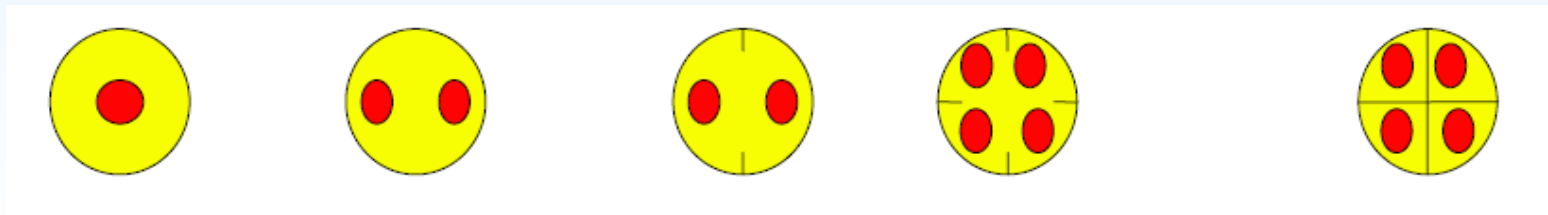


Typy tvorby tetrad

sukcesivní typ - ihned po I. meiotickém dělení vzniká centrifugálně přehrádka (diáda mikrospor) a po II. meiotickém dělení tetráda (častý u **jednoděložných rostlin**)

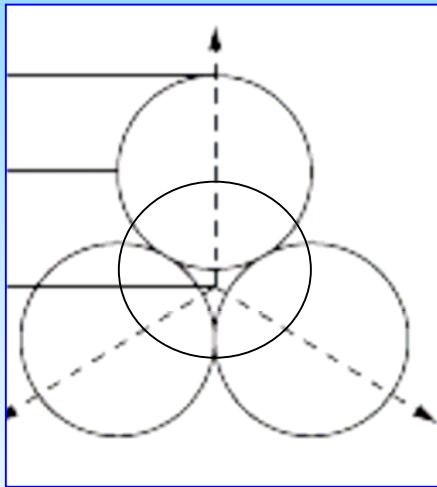


simultánní typ - po I. meiotickém dělení přehrádka nevzniká, teprve po skončení II. meiotického dělení začíná centripetálně (od periferie dovnitř) tvorba brázd a následně přepážek (typický u **dvouděložných rostlin**)

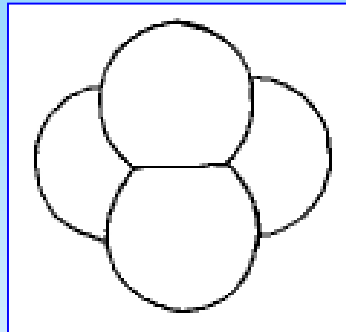


Typy tetrád

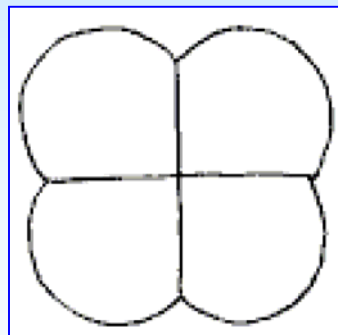
tetraedrická



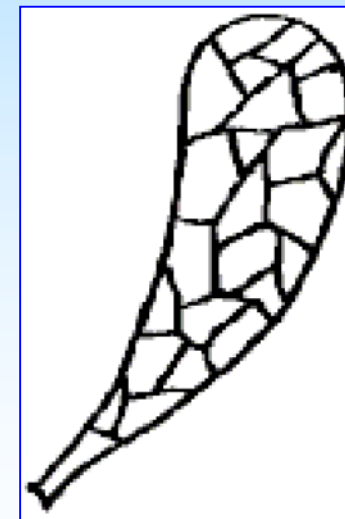
příčná



lineární



izobilaterální



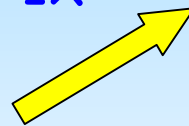
polinárium

Mikrogametogeneze = vývoj samčích gamet

mitóza v pylovém zrnu

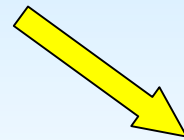
mikrospory

1x



pylová zrna dvoubuněčná
(*Liliaceae* - lilie, *Rosaceae*
Solanaceae - tabák,)

2x



pylová zrna tříbuněčná
(*Brassicaceae* - *Arabidopsis*
Asteraceae, *Poaceae*)

30% z 2000 analyzovaných druhů

Sporoderma - stěna pylového zrna

- **vnitřní vrstva = intina** - pektocelulózová
(spojení intiny s okolním prostředím =
apertury (póry) v exině, kanálky)
- **vnější vrstva = exina** - sporopolenin
 - endexina (nexina) = hladká lamelární vrstva
 - ektexina (sexina) = strukturovaná
základní vrstva
bakuly
tektum
- **pylový tmel** - lipidy, proteiny, flavonoidy,
aromatické látky

Stavba exiny pylového zrna pelyňku (*Artemisia*)

sporopolenin

ektexina

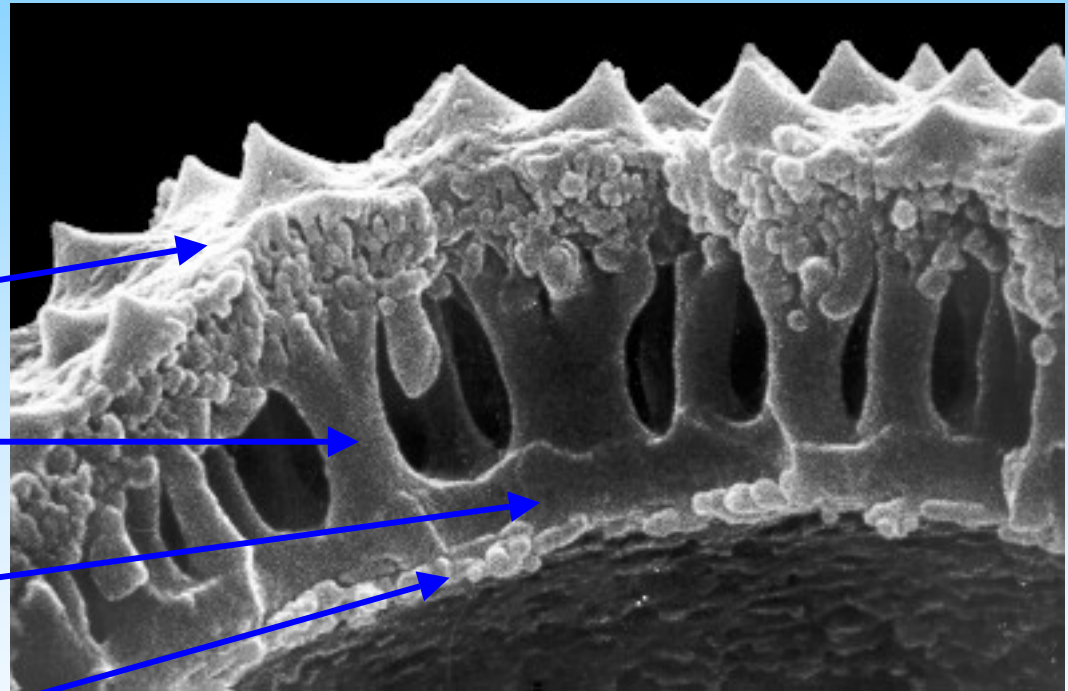
tektum

bakuly

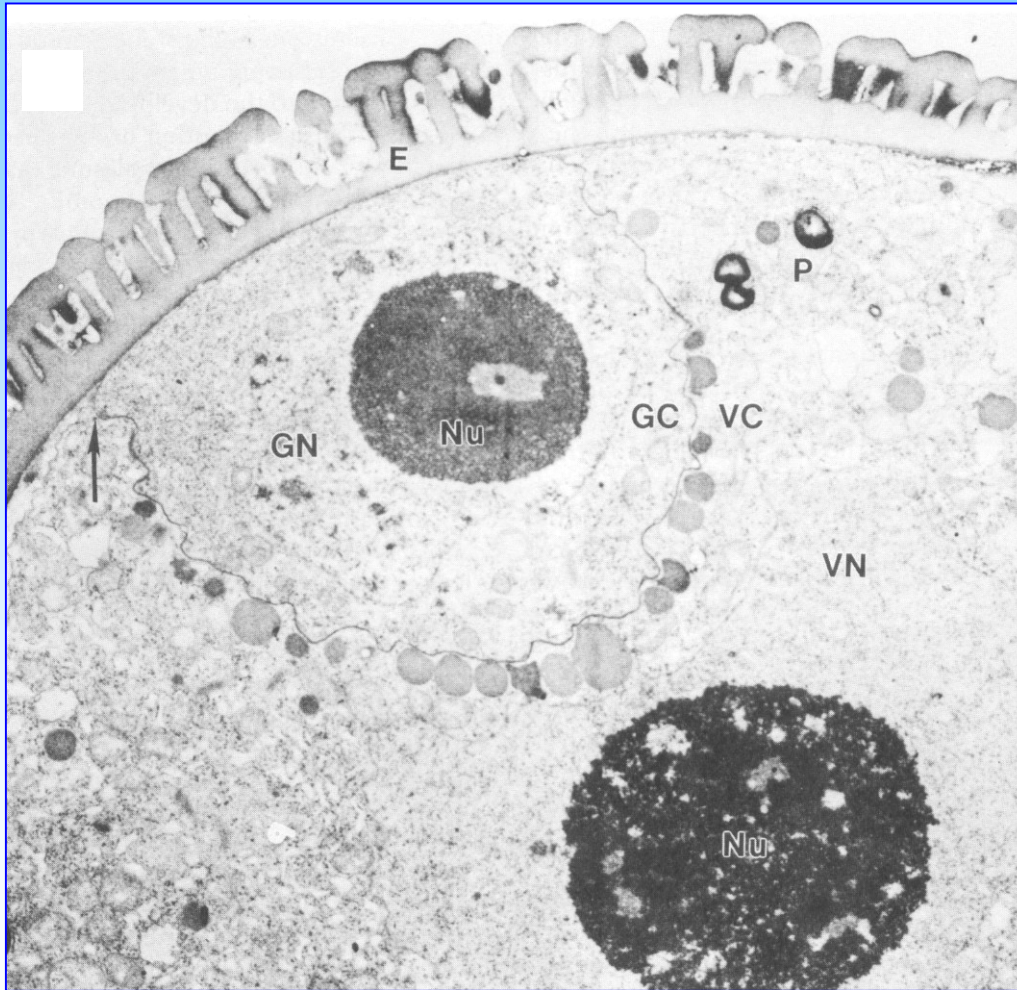
základní vrstva

endexina

lamelární vrstva



TEM pylového zrna pryšce (*Euphorbia*)



(Cresti *et al.* 1992)

dvoubuněčný pyl:
u 75% studovaných
kvetoucích rostlin

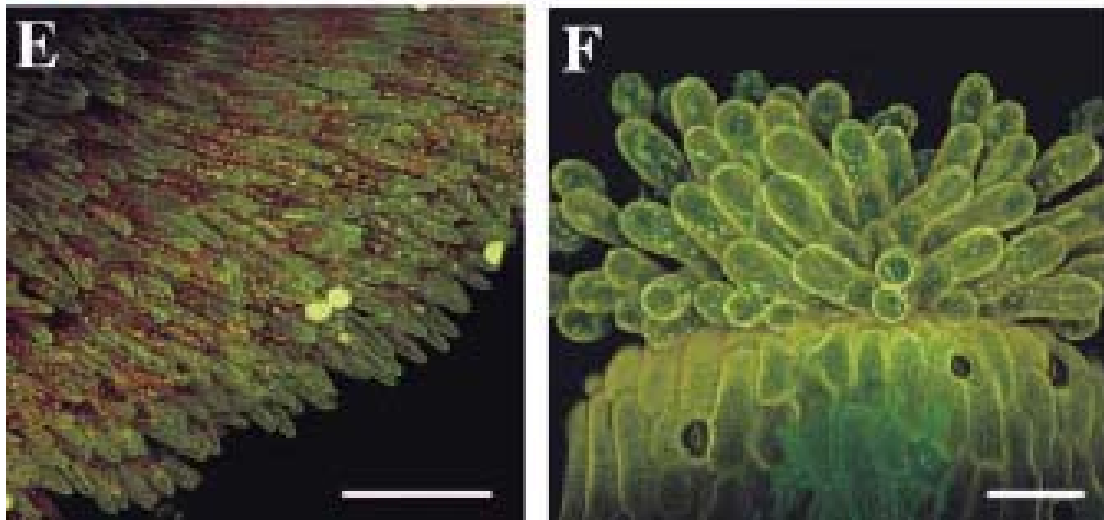
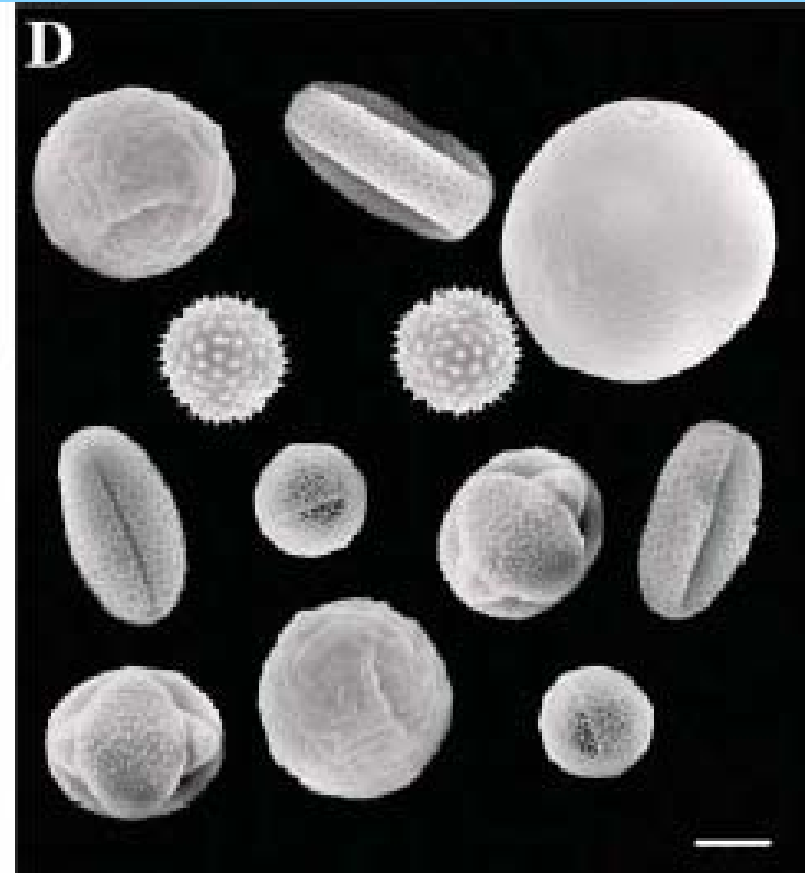
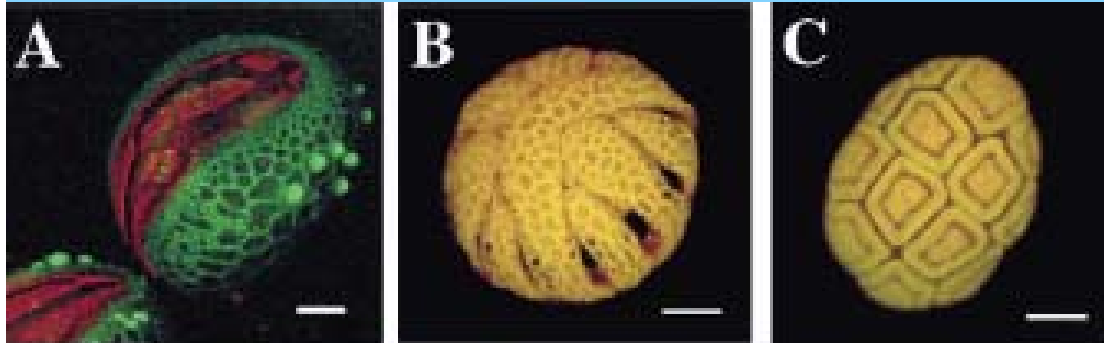
dělení generativní
buňky na 2 buňky
spermatické probíhá
v pylové láčce

Variabilita pylu

Lilium

Passiflora

Accacia - polyády (8,12,16 nebo 32)

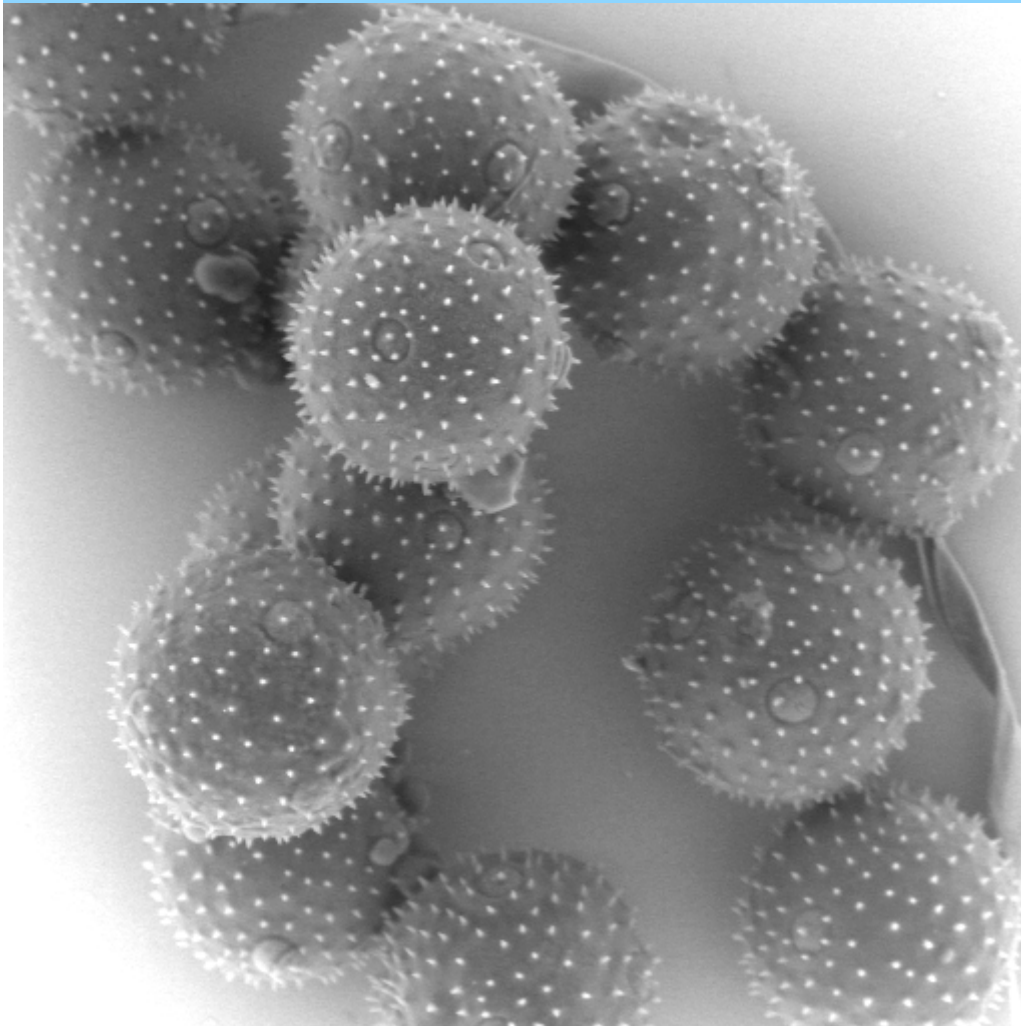


Torenia

Arabidopsis

Edlund *et al.* 2004

Cucurbita pepo L.
AQUASEM



mnoho apertur -
polysyfonické klíčení
pylu

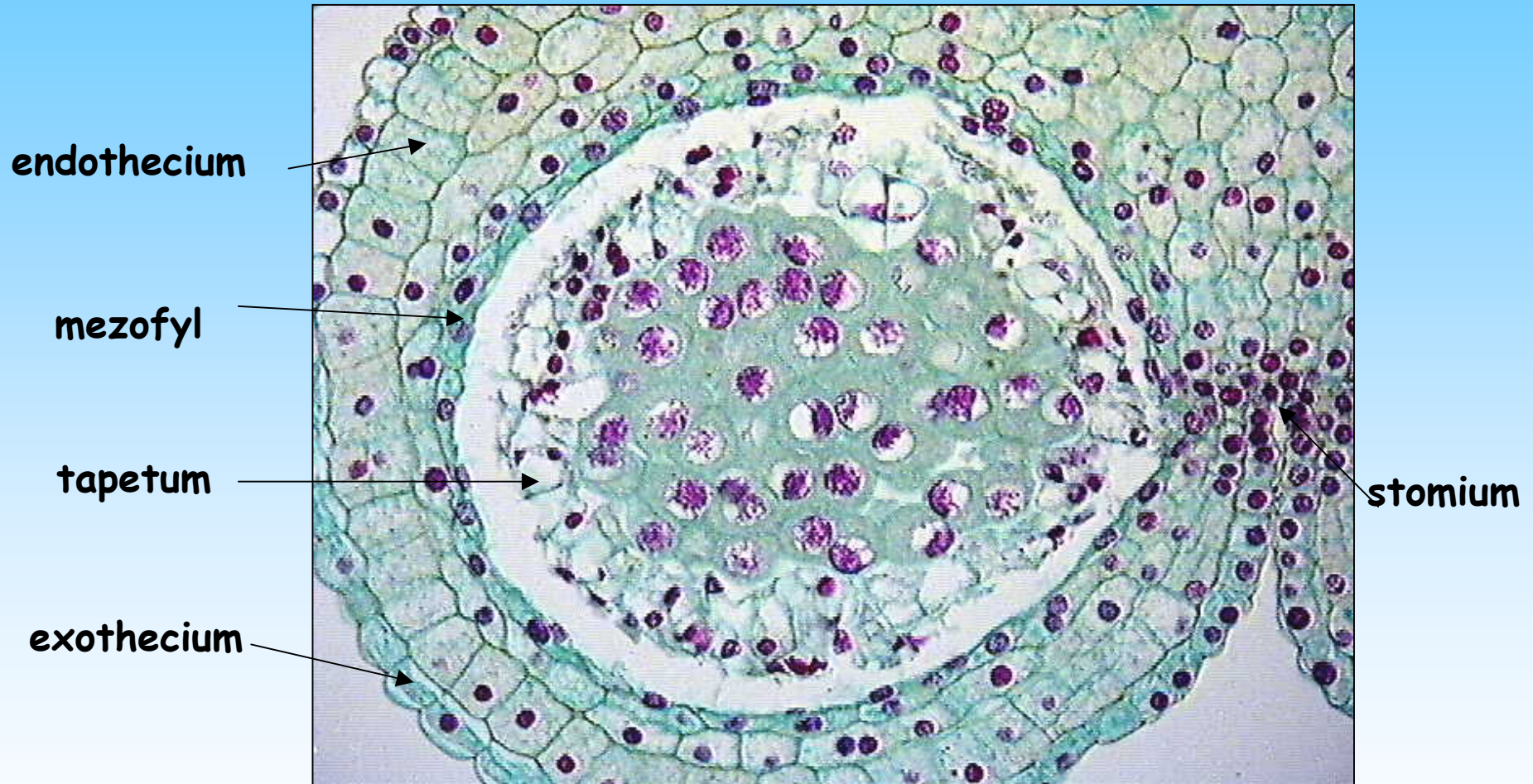
Mikrosporogeneze u *Lilium*

IASPR

International Society for Sexual Plant Reproduction Research

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

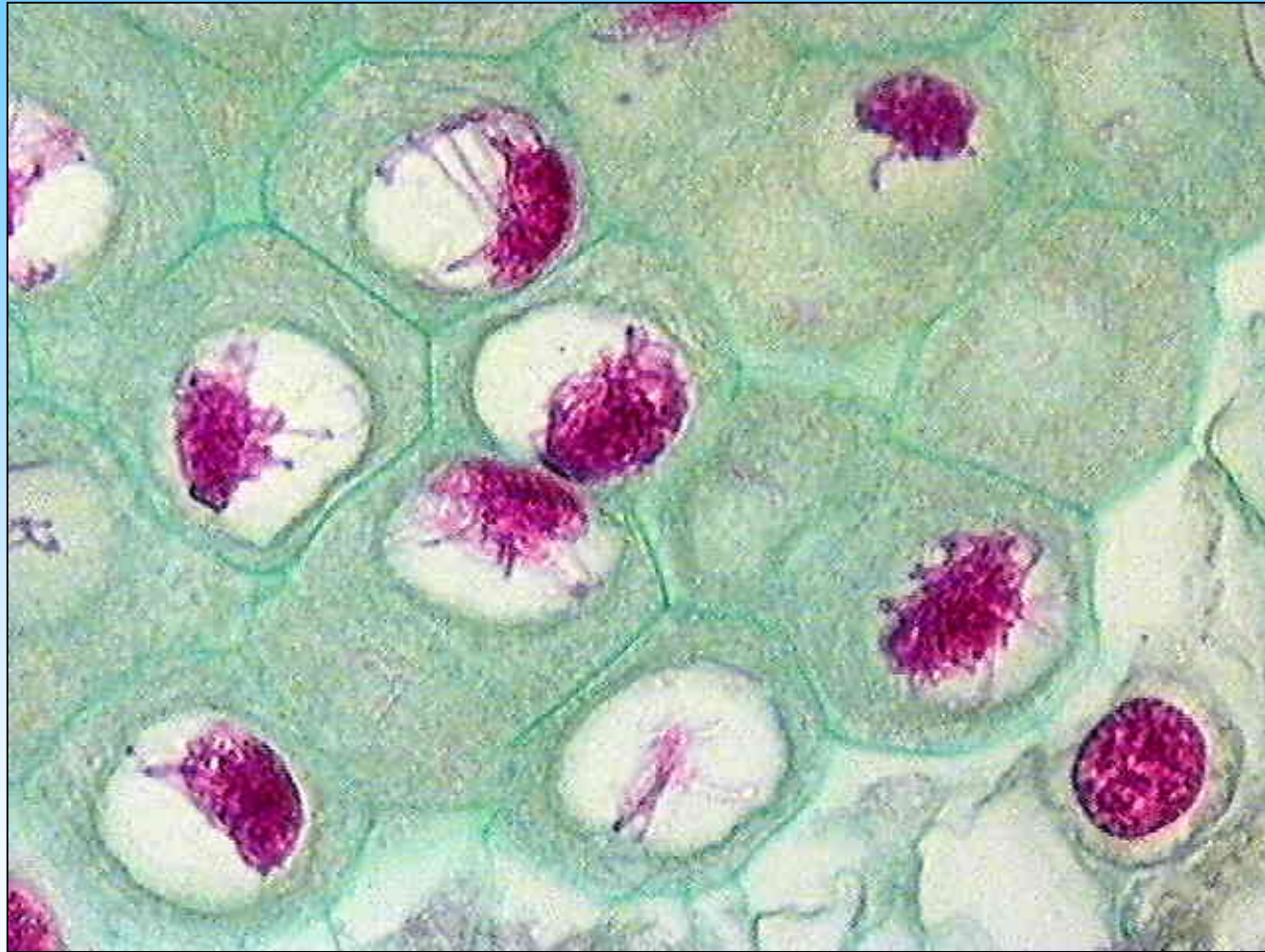
Mikrosporocyty v rané profázi I.



IASPRR

většinu profáze I představuje precizní párování homologních chromosomů

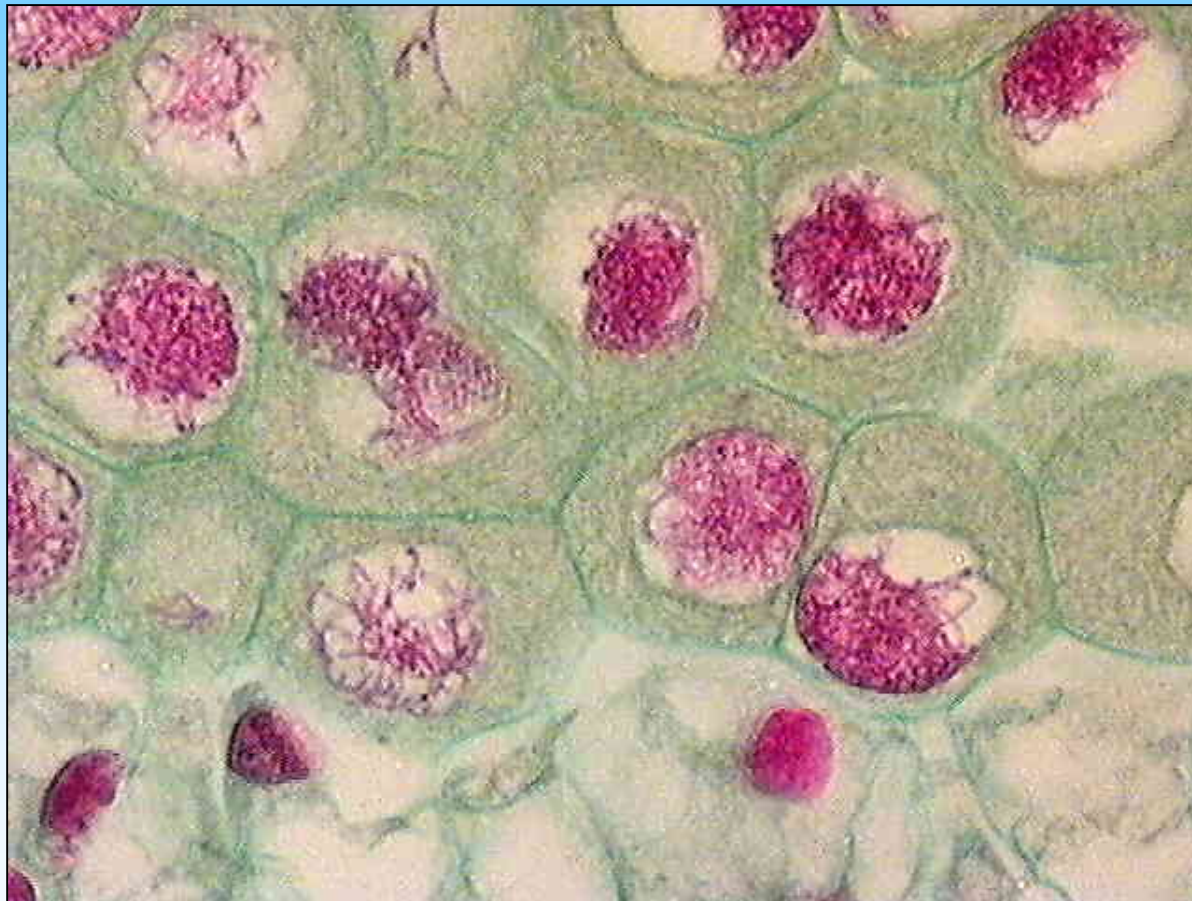
Mikrosporocyty v rané profázi I.



detail

IASPRR

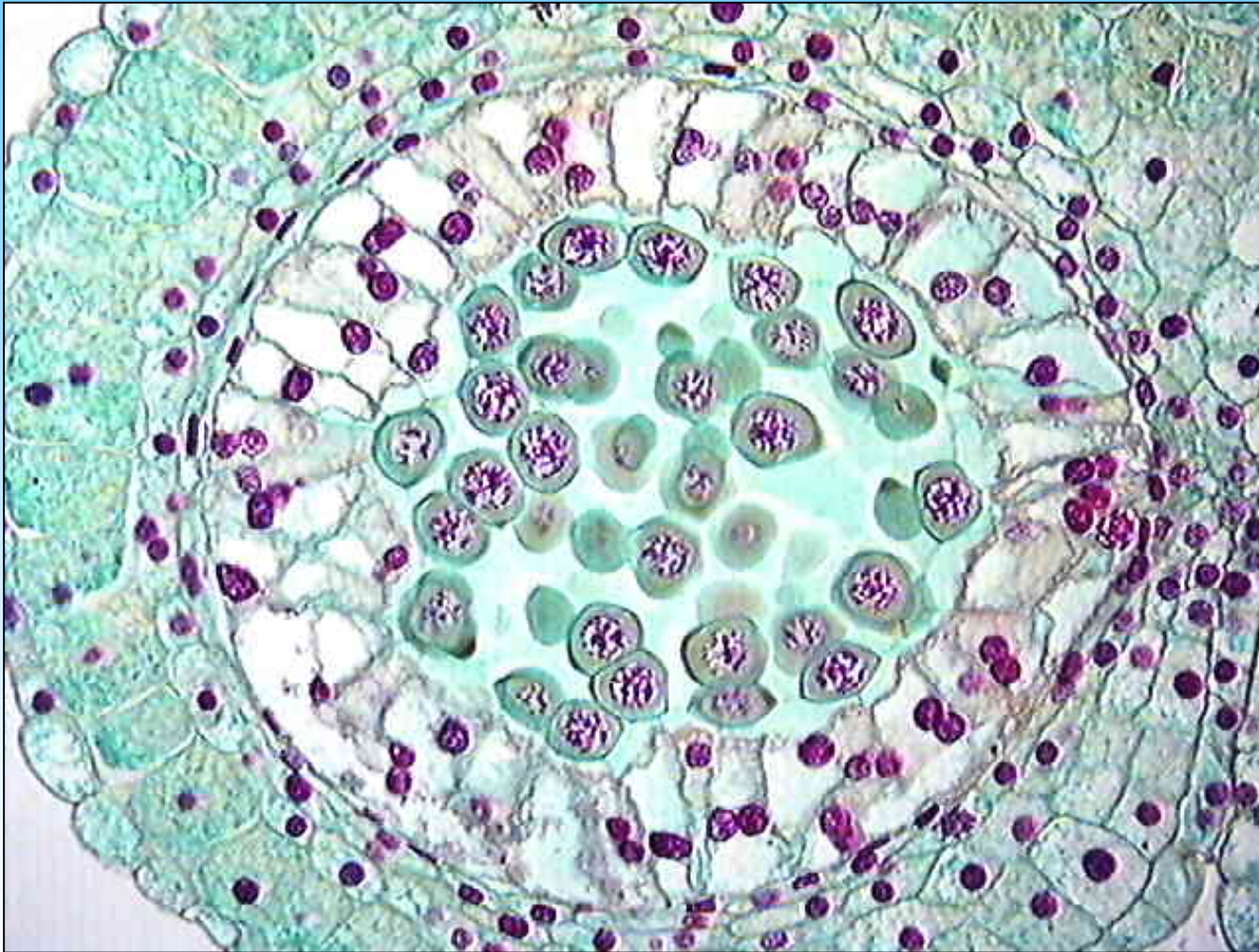
Střed profáze I.



IASPRR

pachytene - chromosomy jsou velmi prodloužené,
spárované homologní chromosomy vyměňují genetický materiál

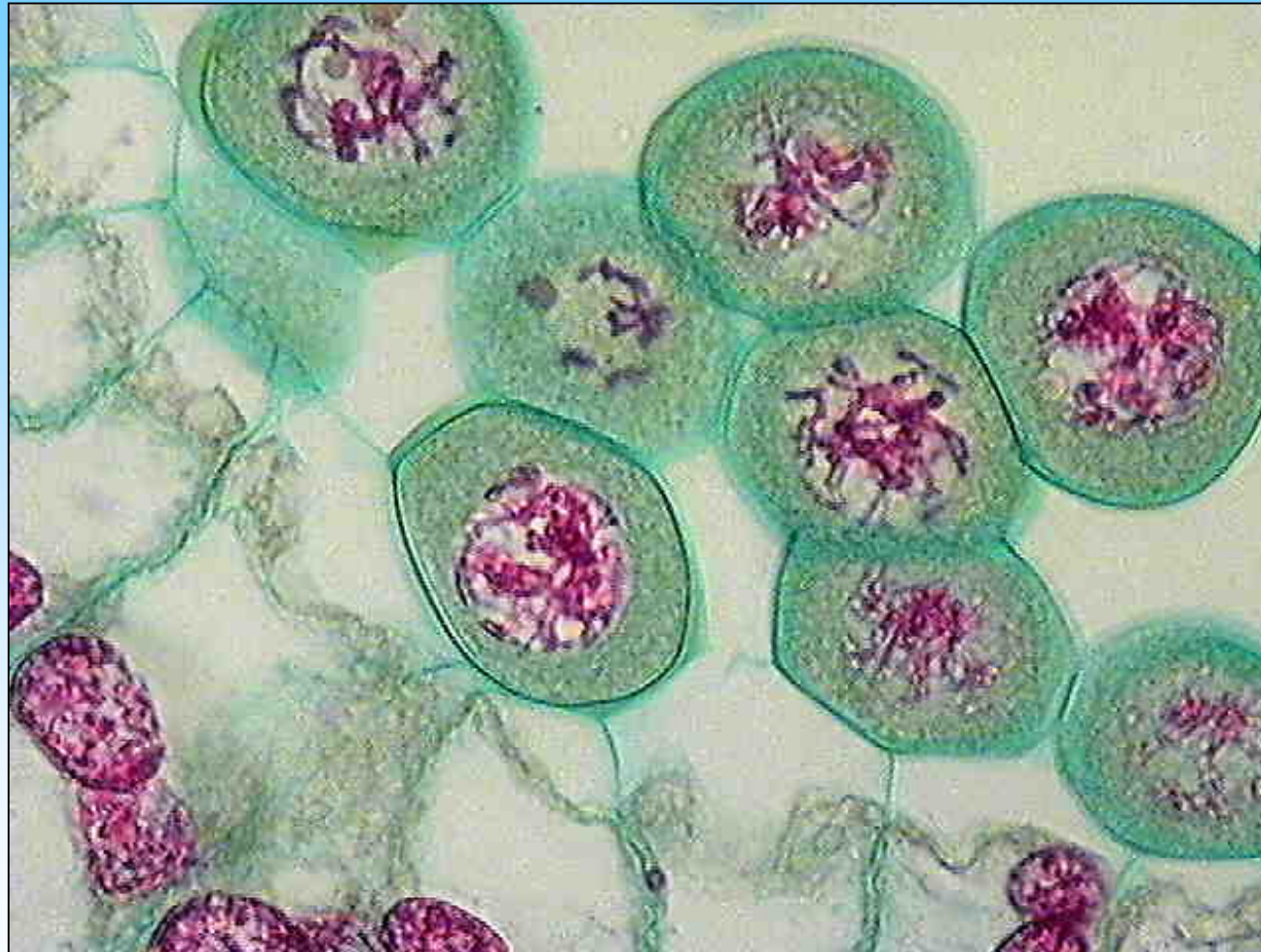
Pozdní profáze I.



IASPRR

pokračuje kondenzace homologních chromosomů - blíží se diakinese

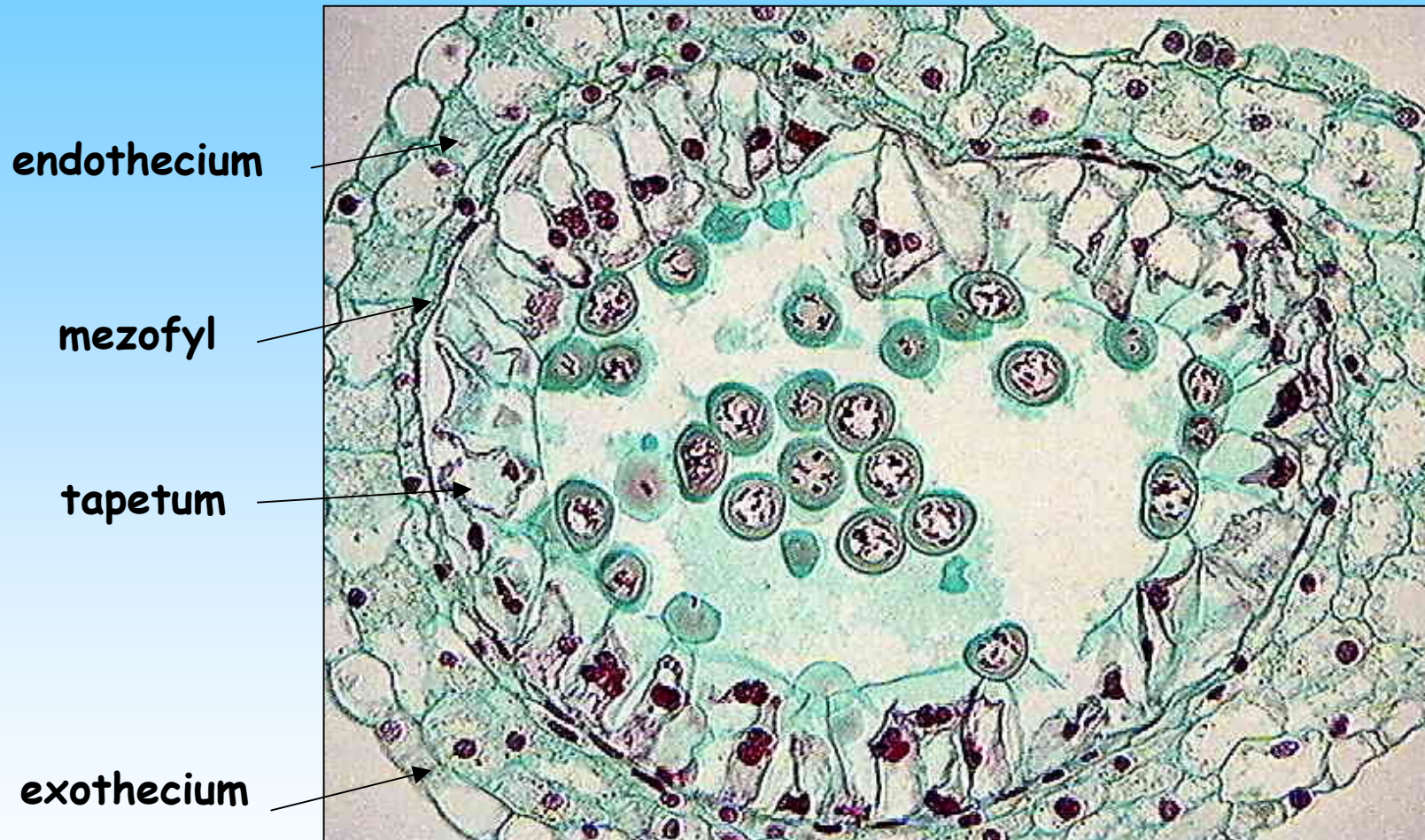
Pozdní profáze I.



detail předchozího snímku

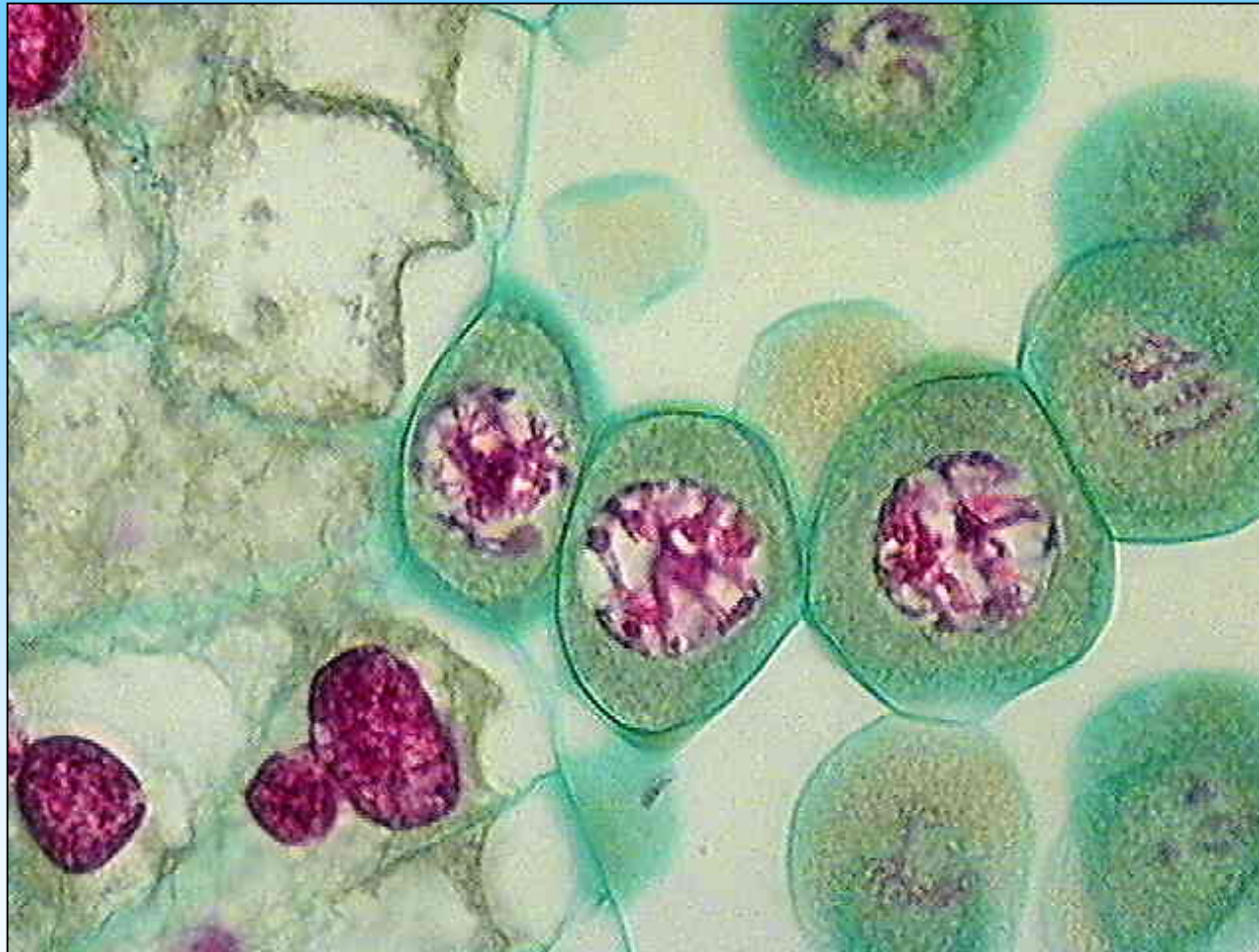
IASPRR

Diakinesis



diakineze = poslední stadium profáze I před metafází IASPRR

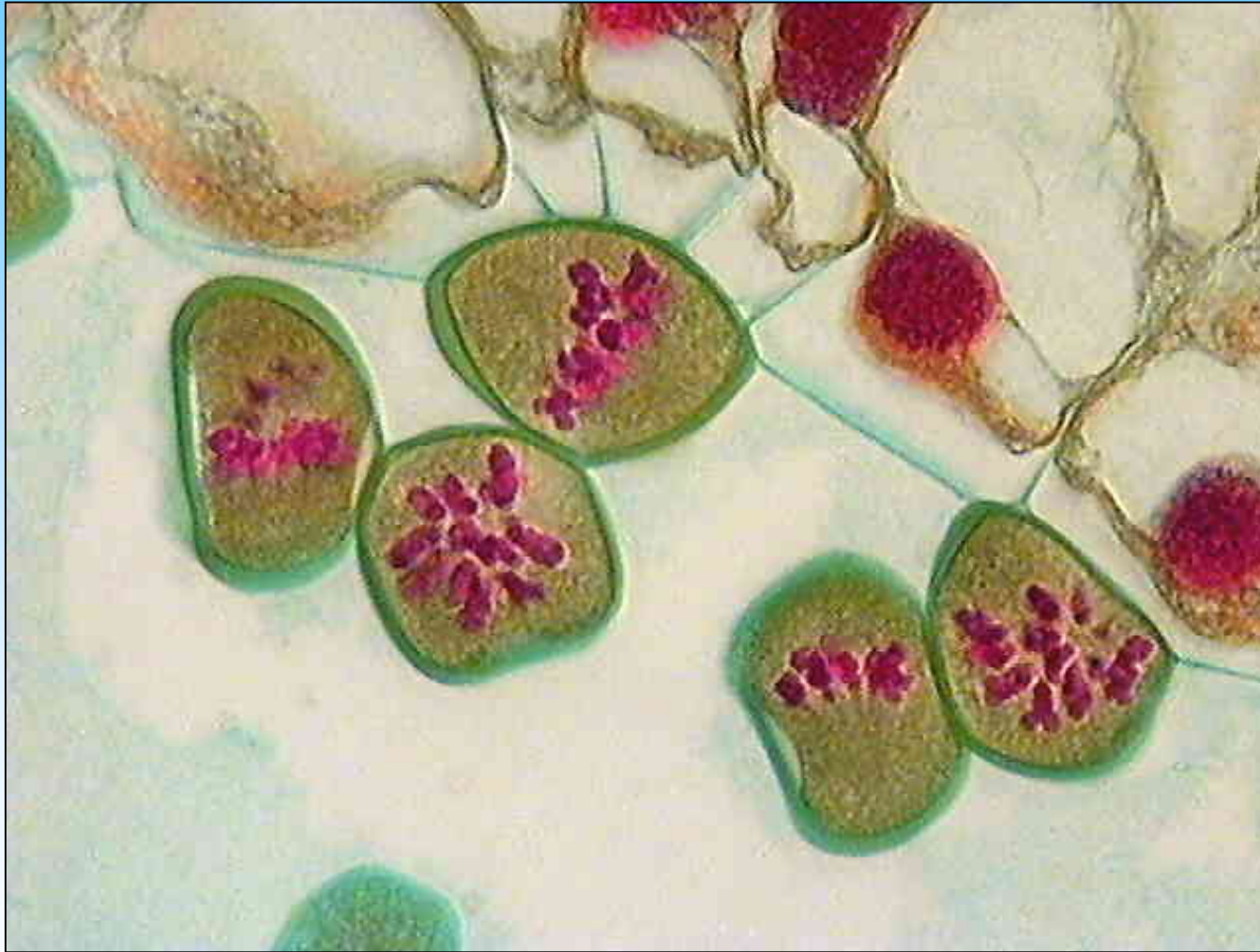
Diakinesis



detail předchozího snímku

IASPRR

Metafáze I.



metafázní chromosomy

IASPRR

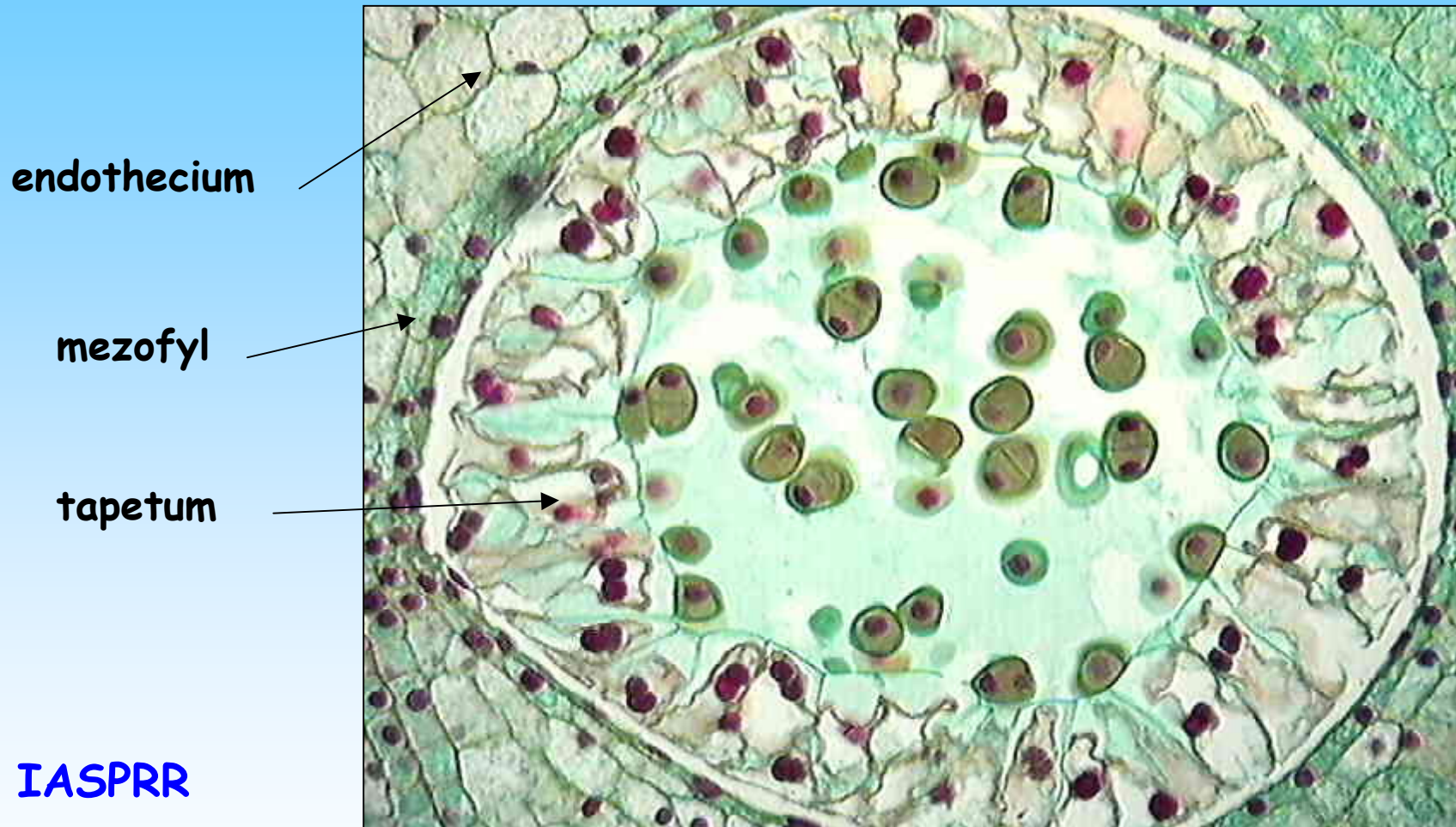
Anafáze I.



IASPRR

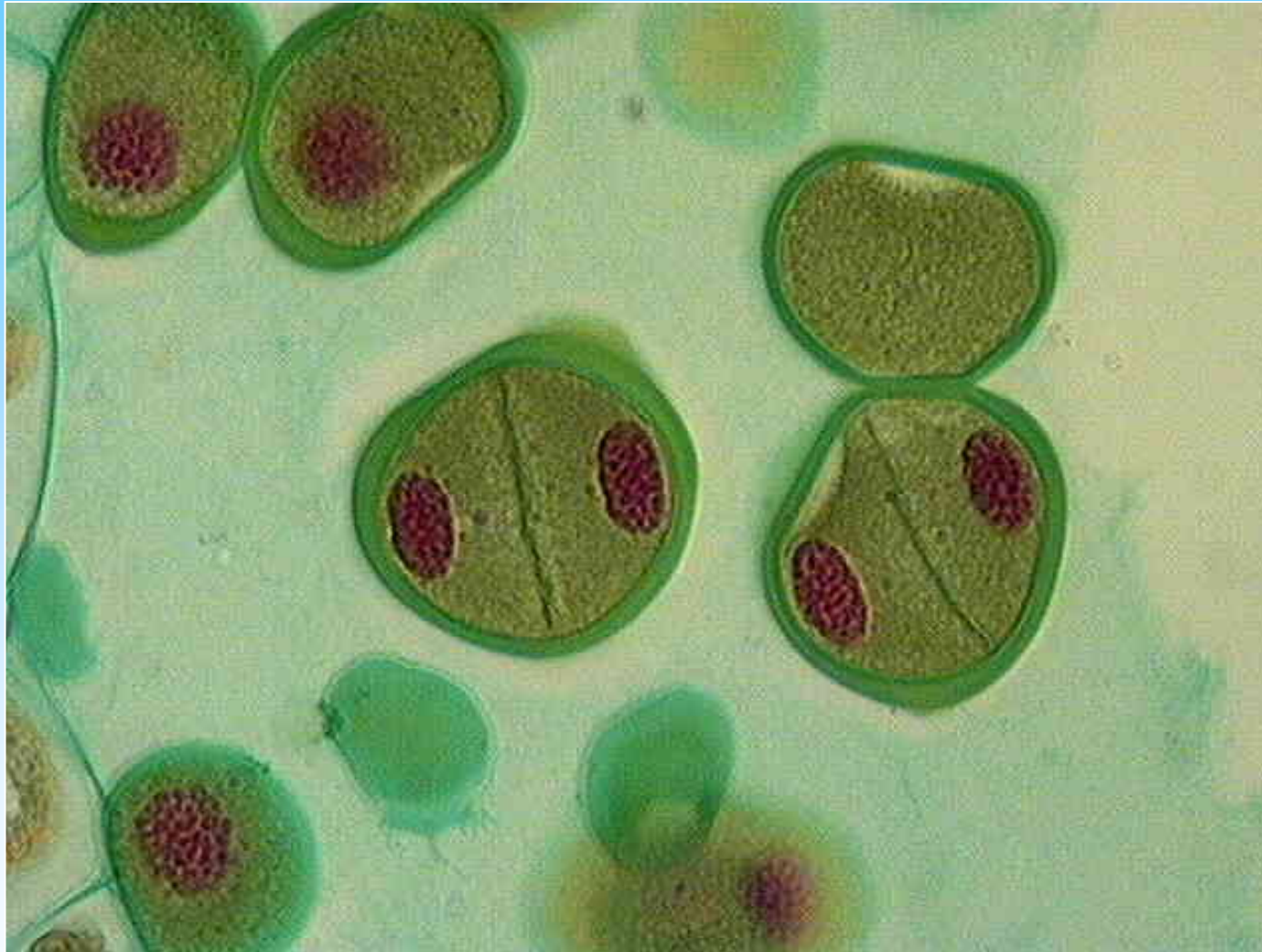
homologní chromosomy přemístěné na opačné buněčné póly,
přesné dělení genetického materiálu

Telofáze I.



výrazná buněčná přepážka se tvoří mezi jádry po I. meiotickém dělení u lilie (diády), druhé meiotické dělení probíhá rychle

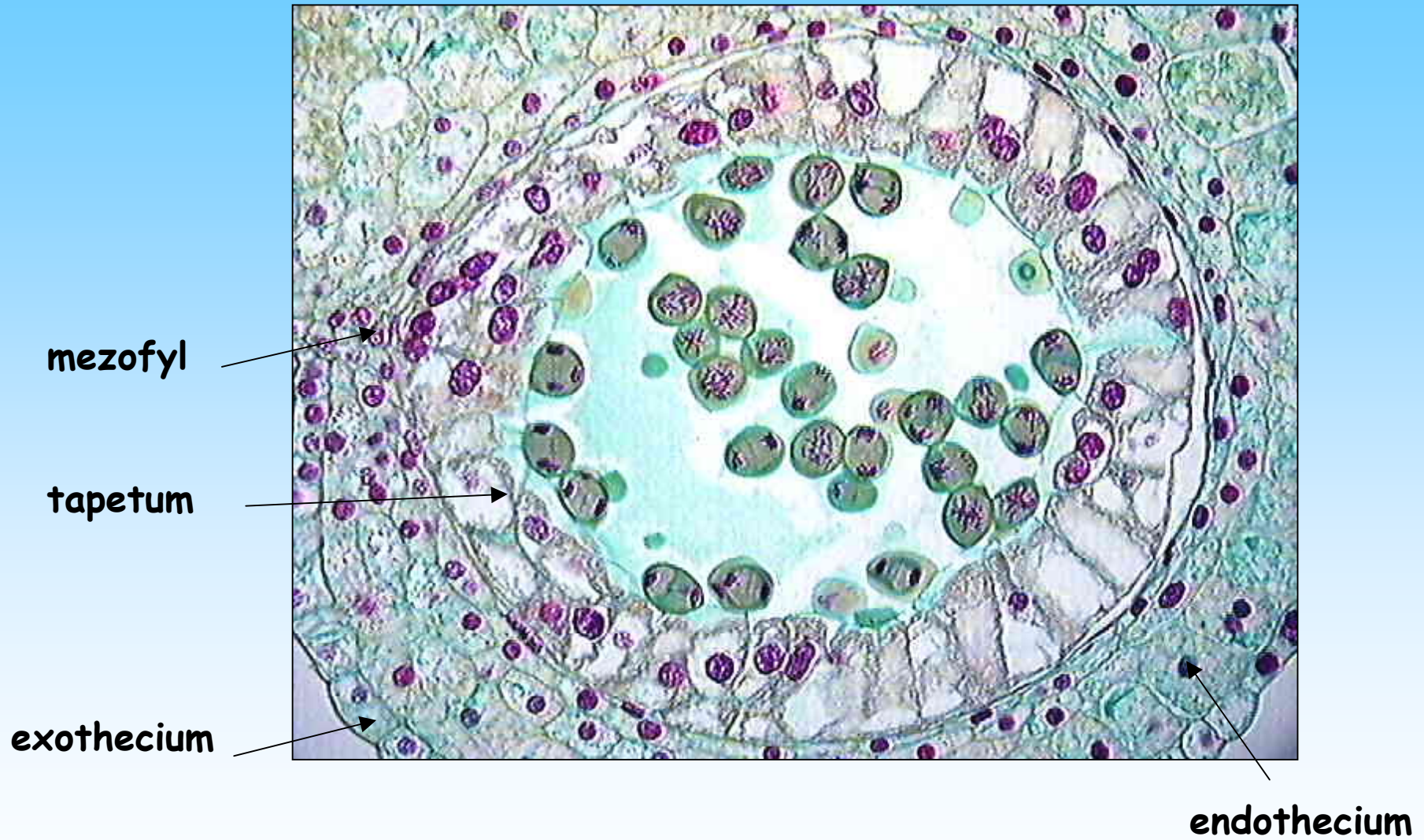
Telofáze I.



detail diád

IASPRR

Metafáze II.

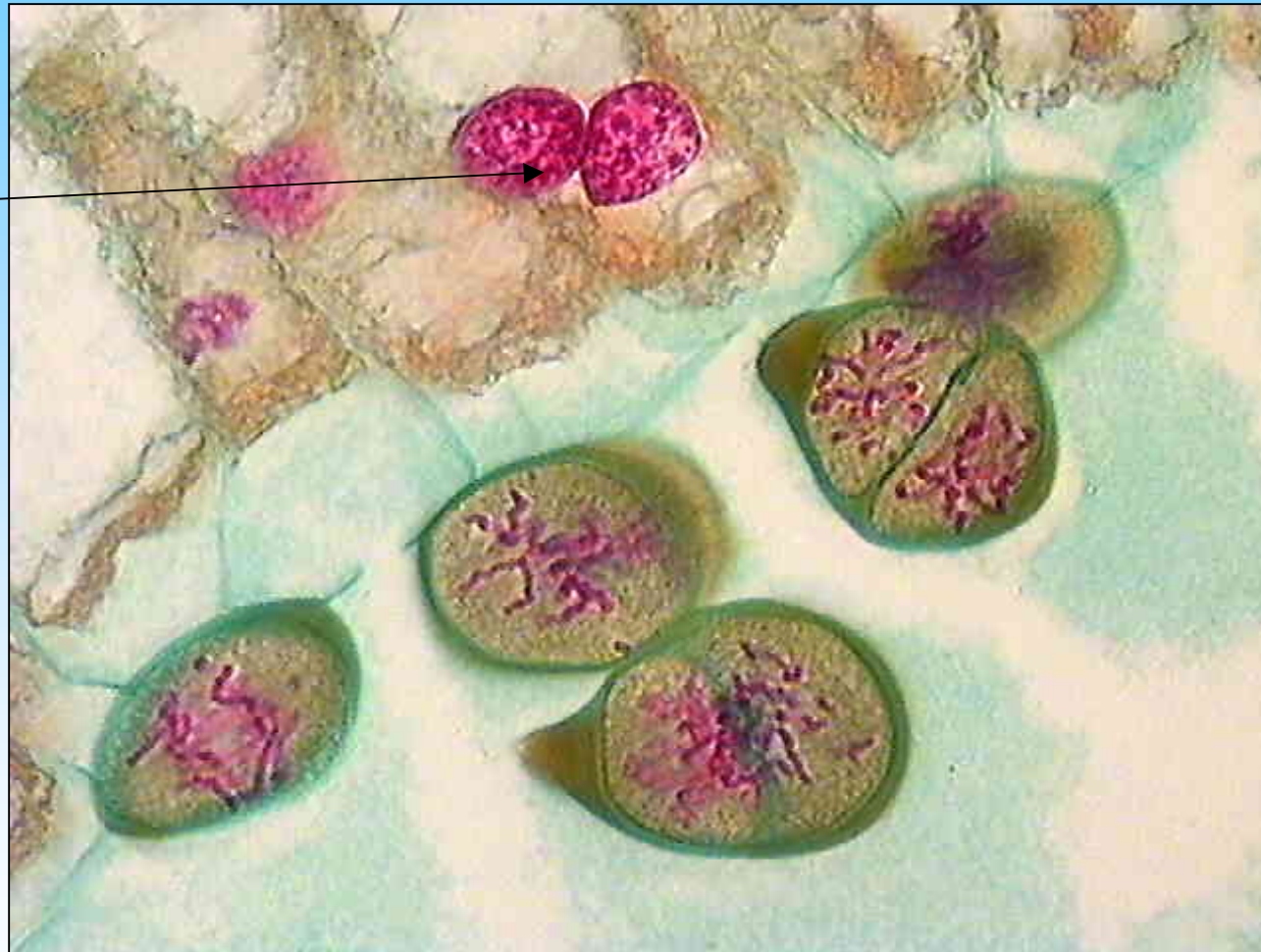


separace chromatid během II. meiotického dělení

IASPRR

Metafáze II.

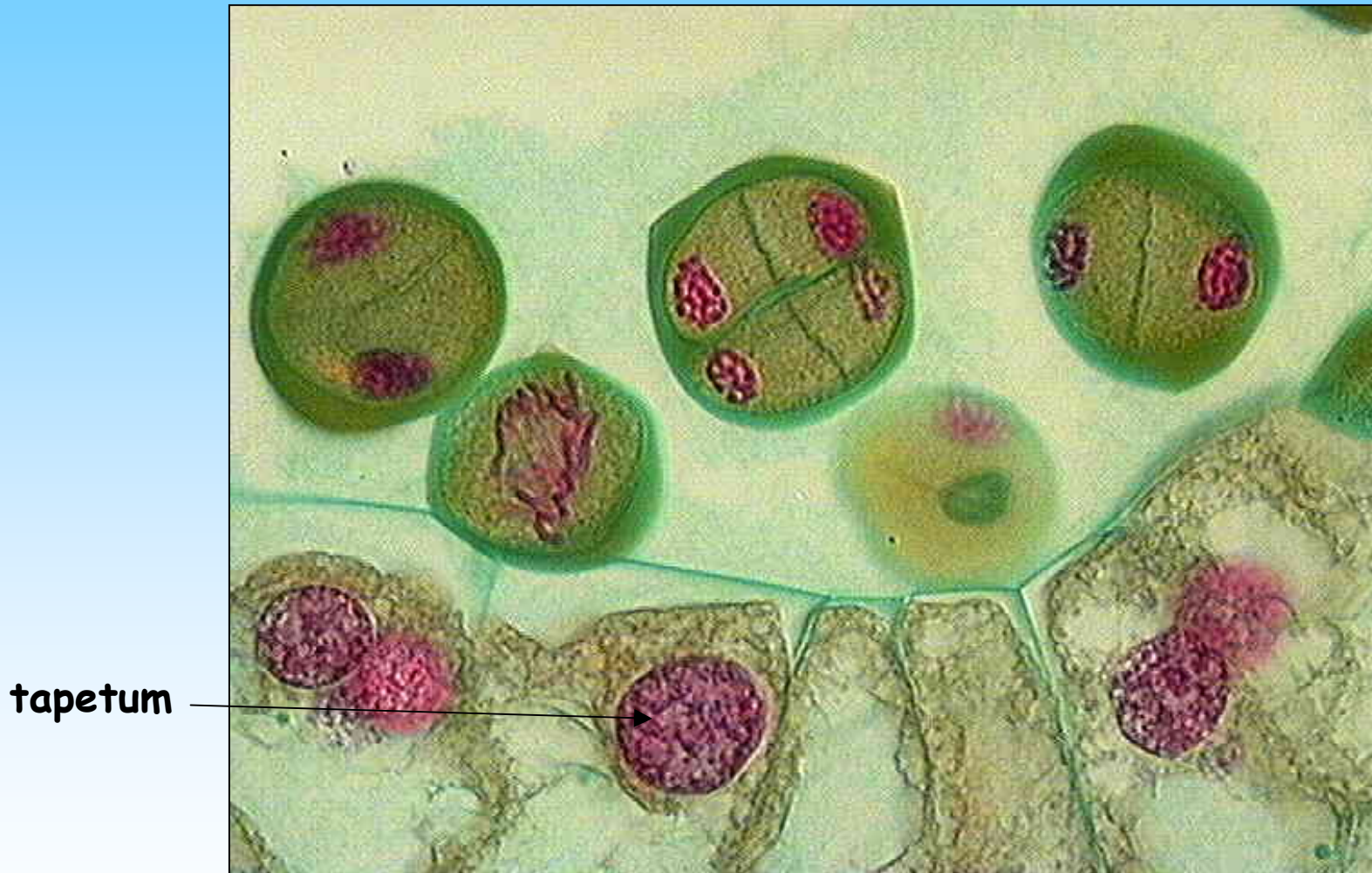
tapetum



detail

IASPRR

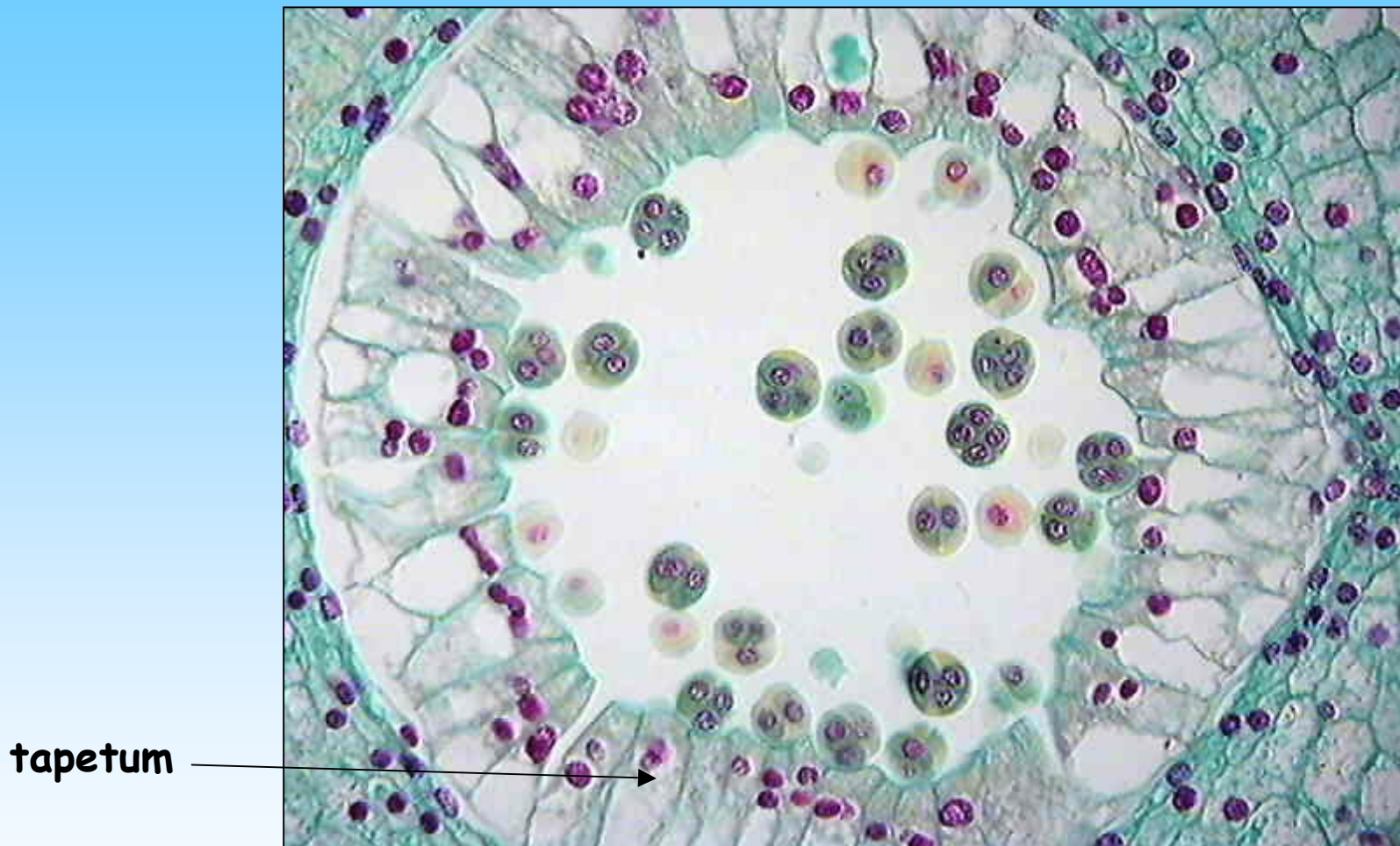
Telofáze II.



IASPRR

Cytokineze tetrad. Separace buněk začíná brzy od stěny microsporocytu.

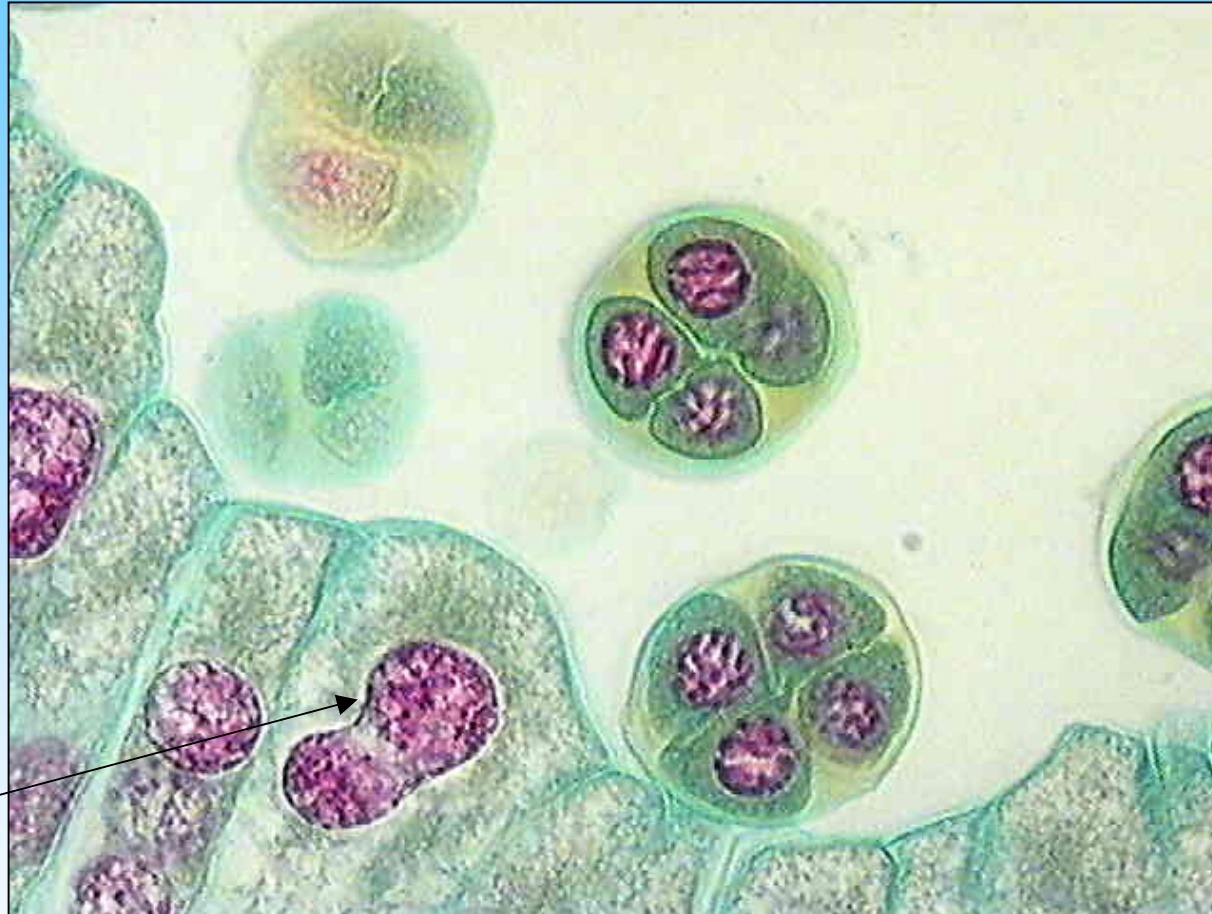
Tetrády v "callose special wall"



IASPRR

Kalóza tvoří obal **tetrád** uvnitř staré stěny mikrosporocytu. Mikrospory se oddělují od stěny mikrosporocytu, zakulacují se a tvoří **primexinu** = prekursor templátu pro pozdější ukládání **exiny**.

Tetrády v "callose special wall"

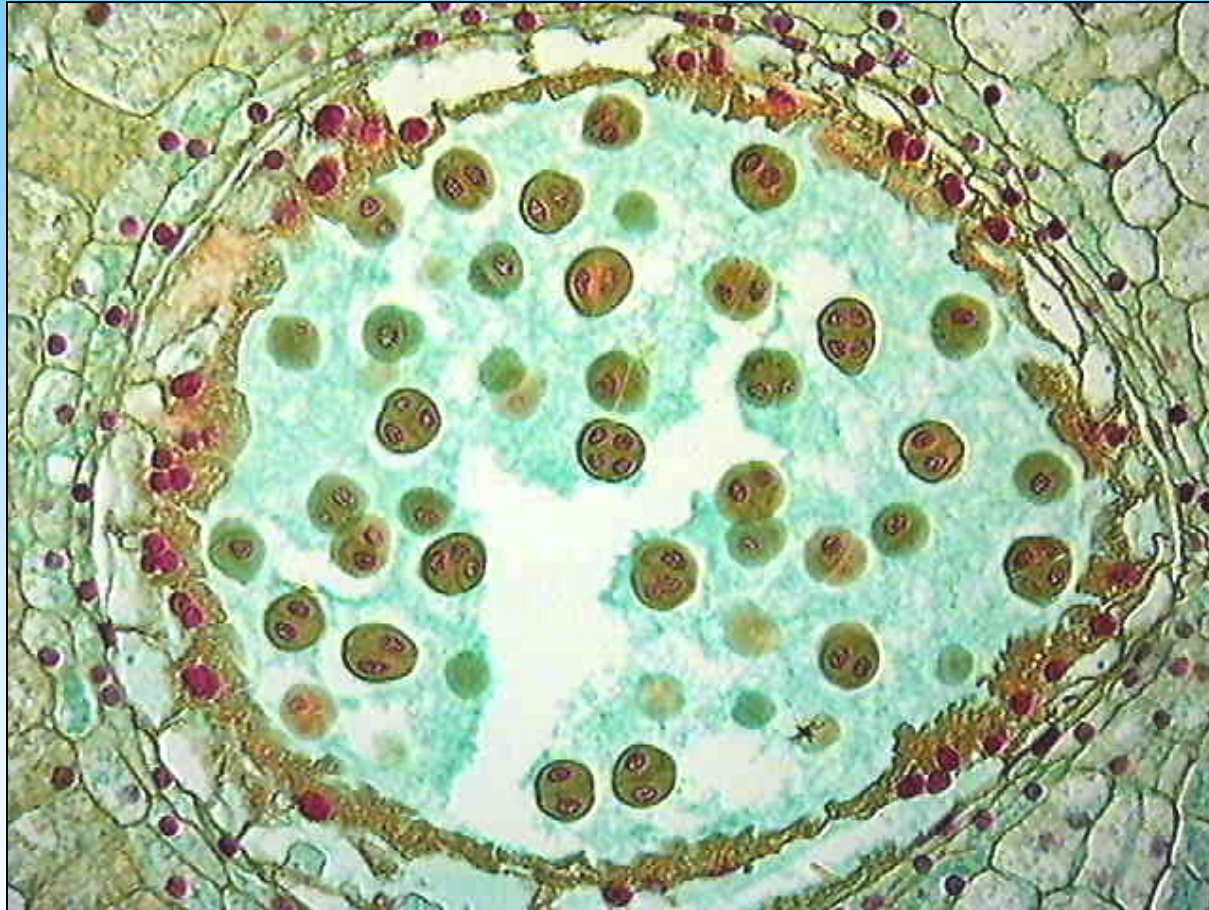


tapetum

IASPRR

Kalóza tvoří obal **tetrád** uvnitř staré stěny mikrosporocytu. Mikrospory se oddělují od stěny mikrosporocytu, zakulacují se a tvoří **primexinu** = prekursor templátu pro pozdější ukládání **exiny**.

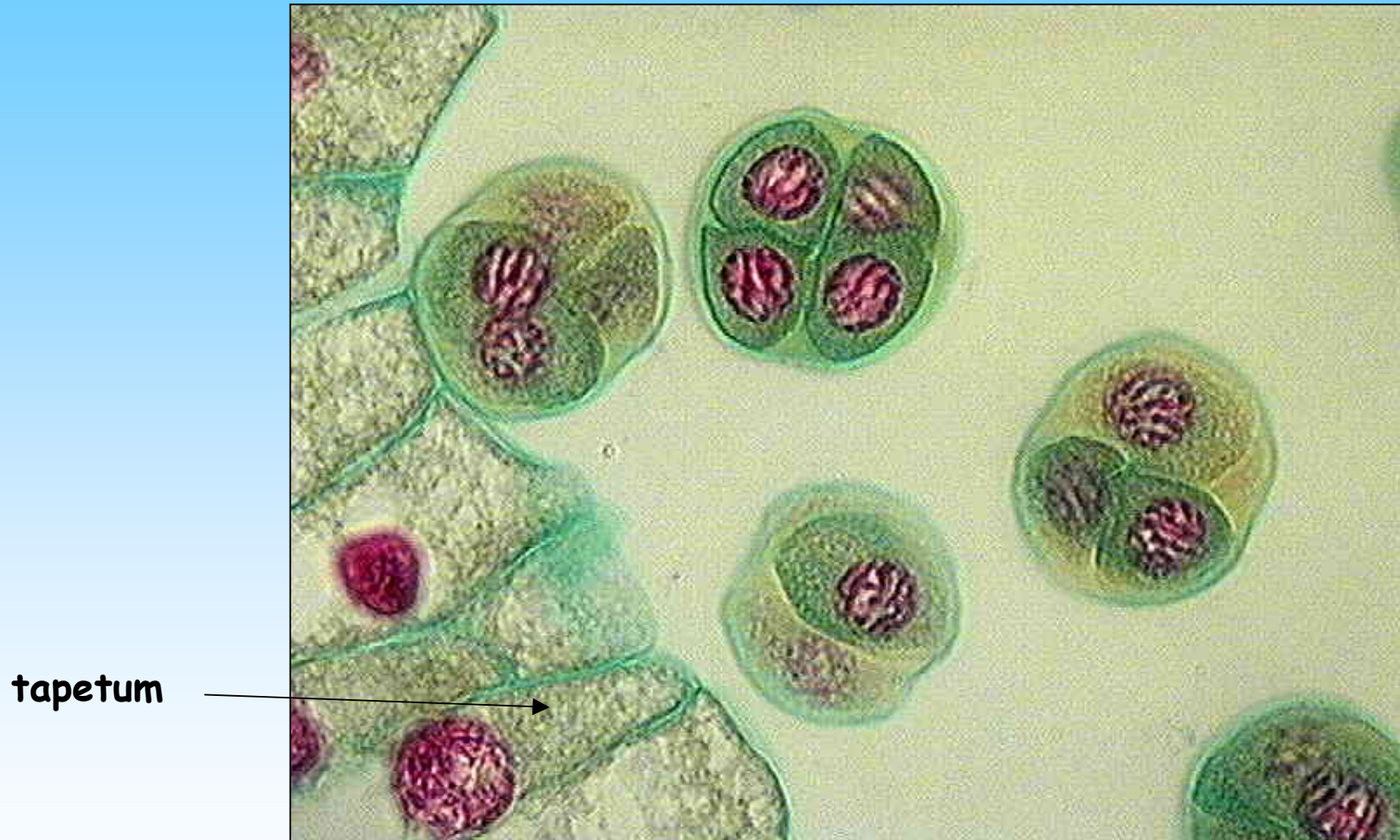
Tetrády mikrospor



IASPRR

dokončování tvorby tetrád - jejich prodlužování

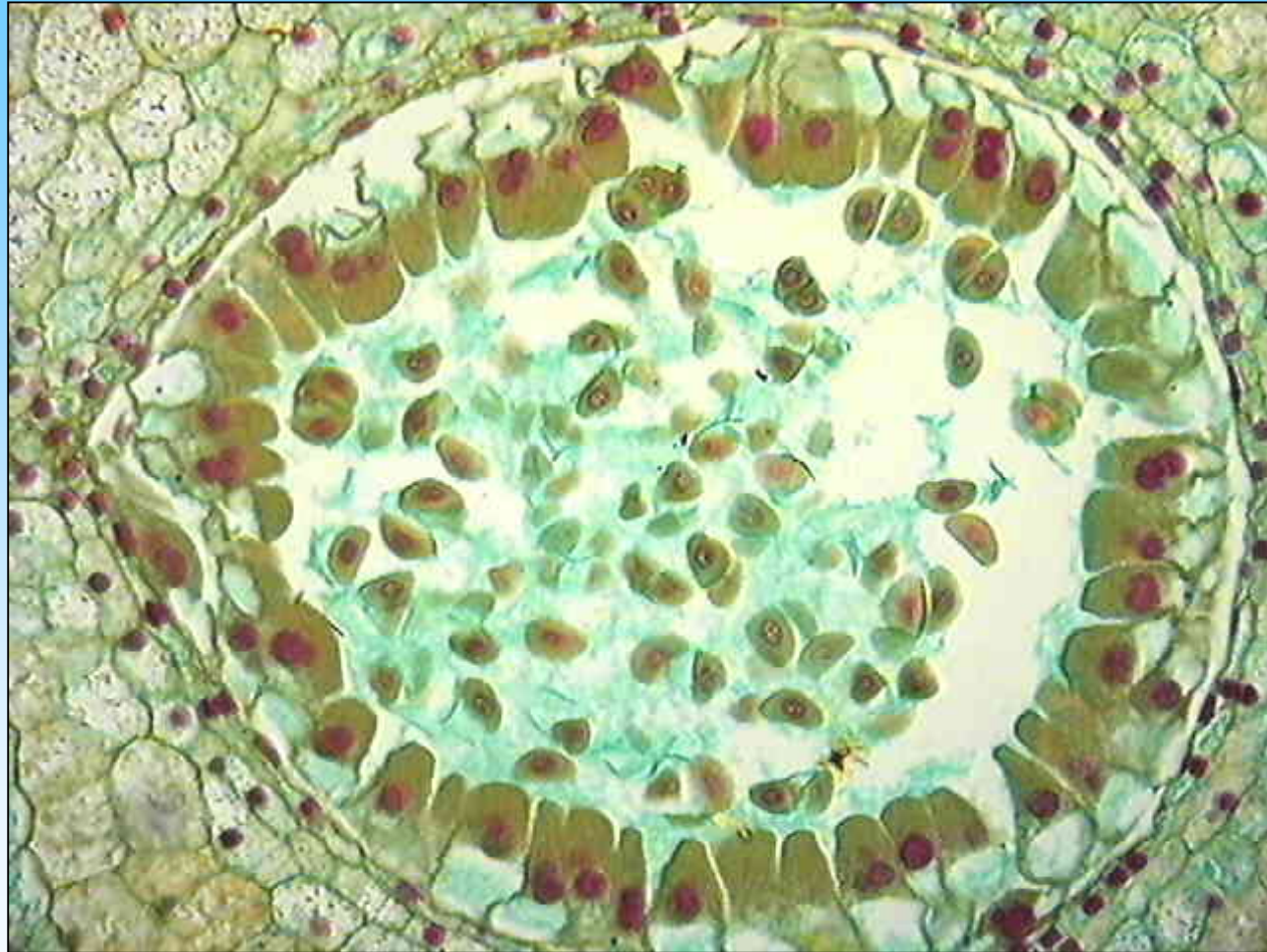
Tetrády mikrospor



dokončování tvorby tetrád - detail

IASPRR

Mikrospory uvolněné z tetrad



IASPRR

mikrospory mají již **exinu** (vnější stěna tvořená sporopoleninem), plní se zásobními materiály a zůstávají po krátké období pružné

Mikrospory uvolněné z tetrad



IASPRR

mikrospory mají již vytvořenou mladou **exinu**
= (vnější stěna tvořená sporopoleninem)

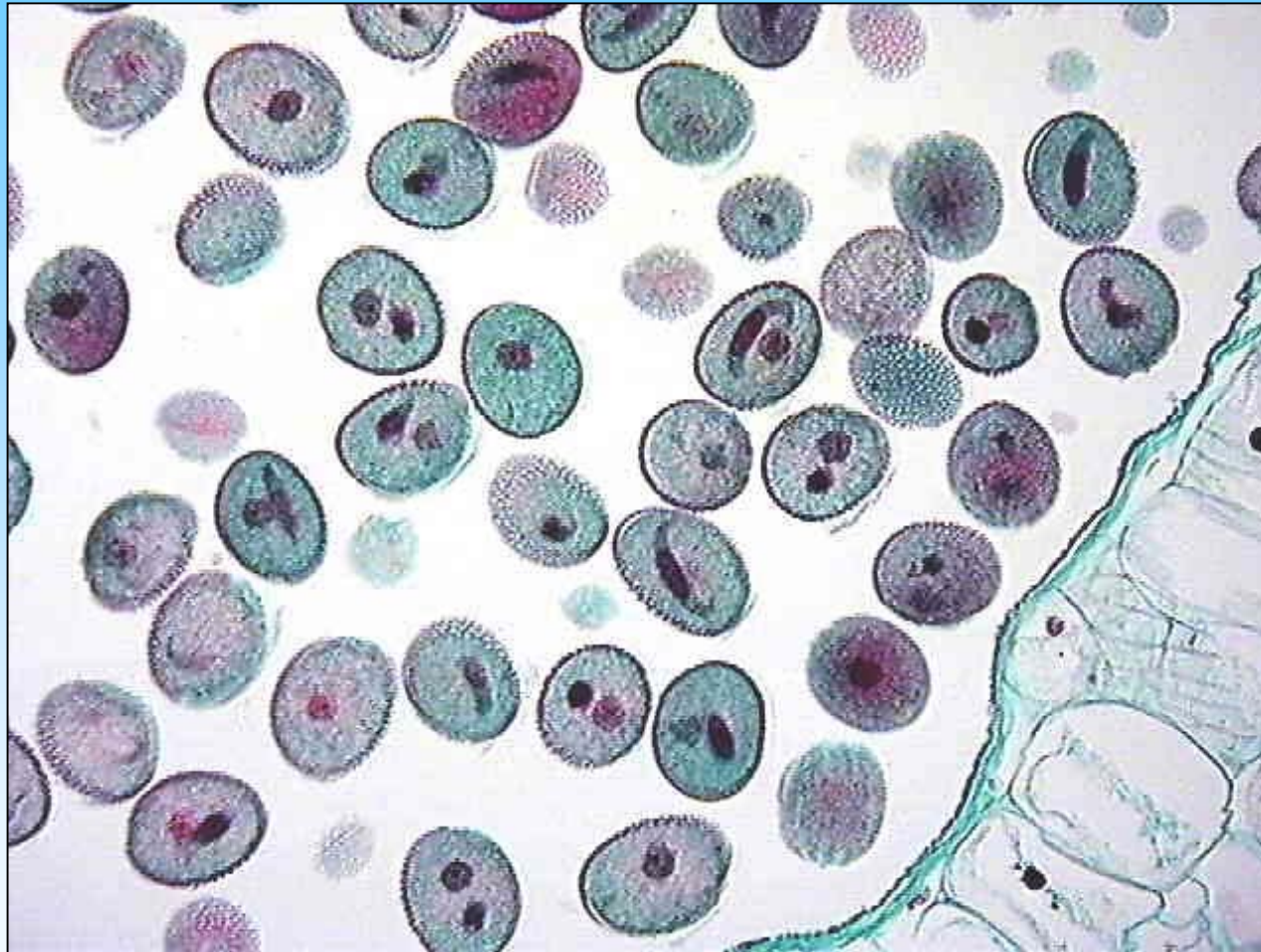
Mikrogametogeneze u *Lilium*

IASPRR

International Society for Sexual Plant Reproduction Research

<http://images.iasprrr.org/lily/>

Dvoubuněčný pyl



IASPRR

Generativní buňky se tvoří zpočátku v kontaktu s **intinou** (vnitřní vrstva stěny pylu), později se vnoří do cytoplasmy = "a cell within a cell".

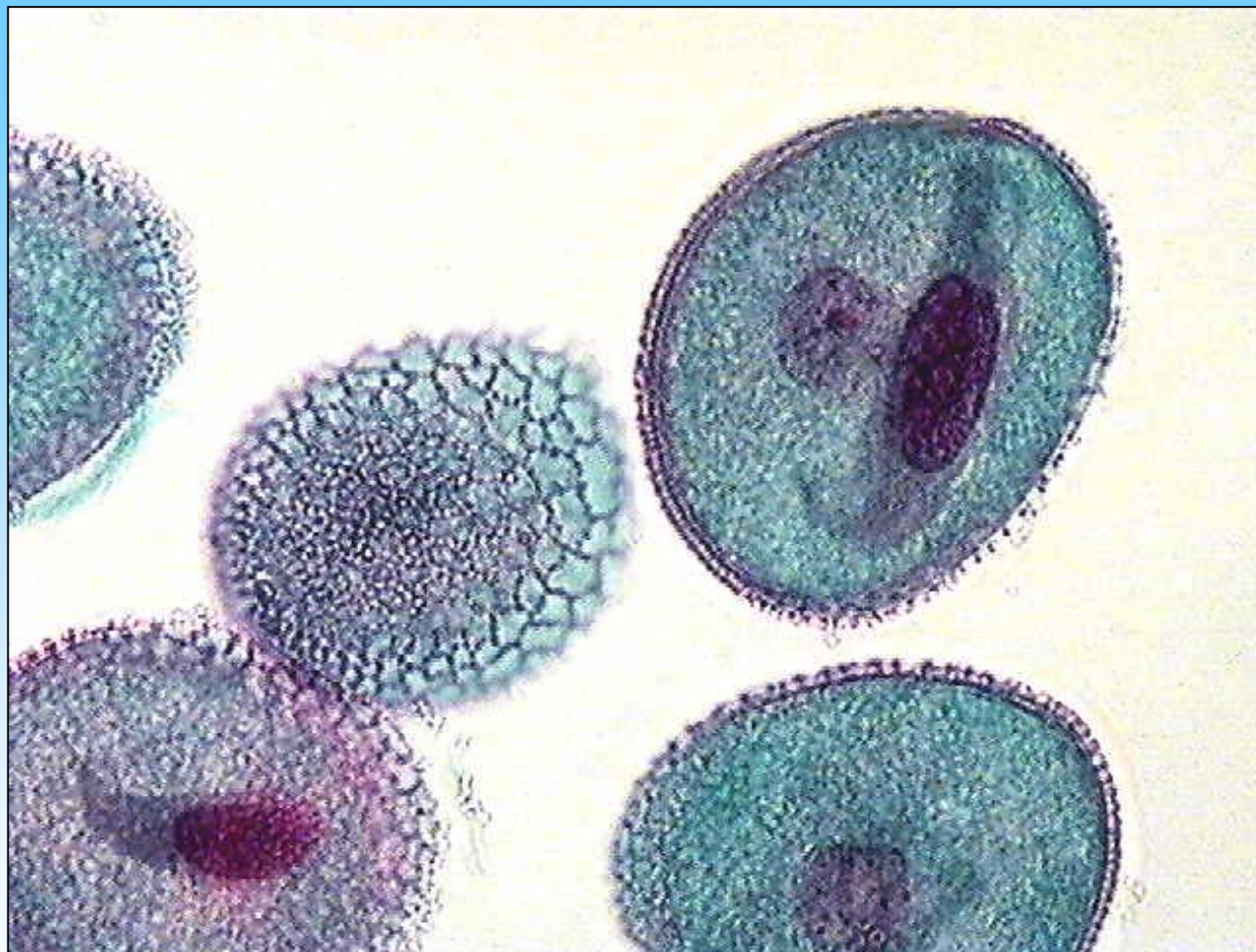
Dvoubuněčný pyl



detail generativní buňky v buňce vegetativní

IASPRR

Dvoubuněčný pyl



IASPRR

Tvar generativní buňky často vřetenovitý, buňka je v kontaktu s vegetativním jádrem = "male germ unit."
Cytoplazma generativní buňky je hustá = méně vakuol a organel.

Hydratovaná pylová zrna lilie

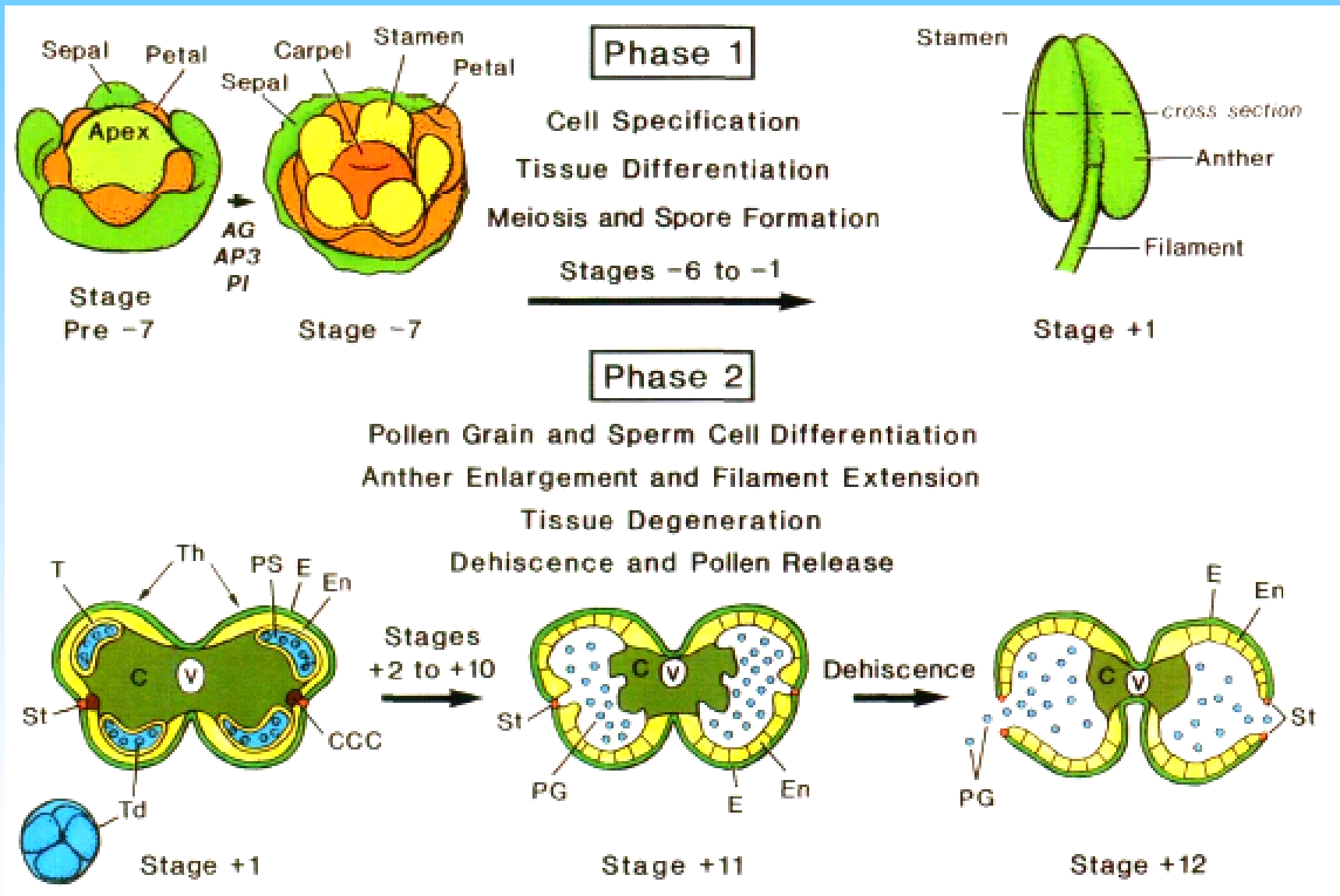


Foto: G. Obermeyer

Mikrosporogeneze a mikrogametogeneze u tabáku

dvoubuněčný pyl

Schéma vývoje prašníků a pylu tabáku

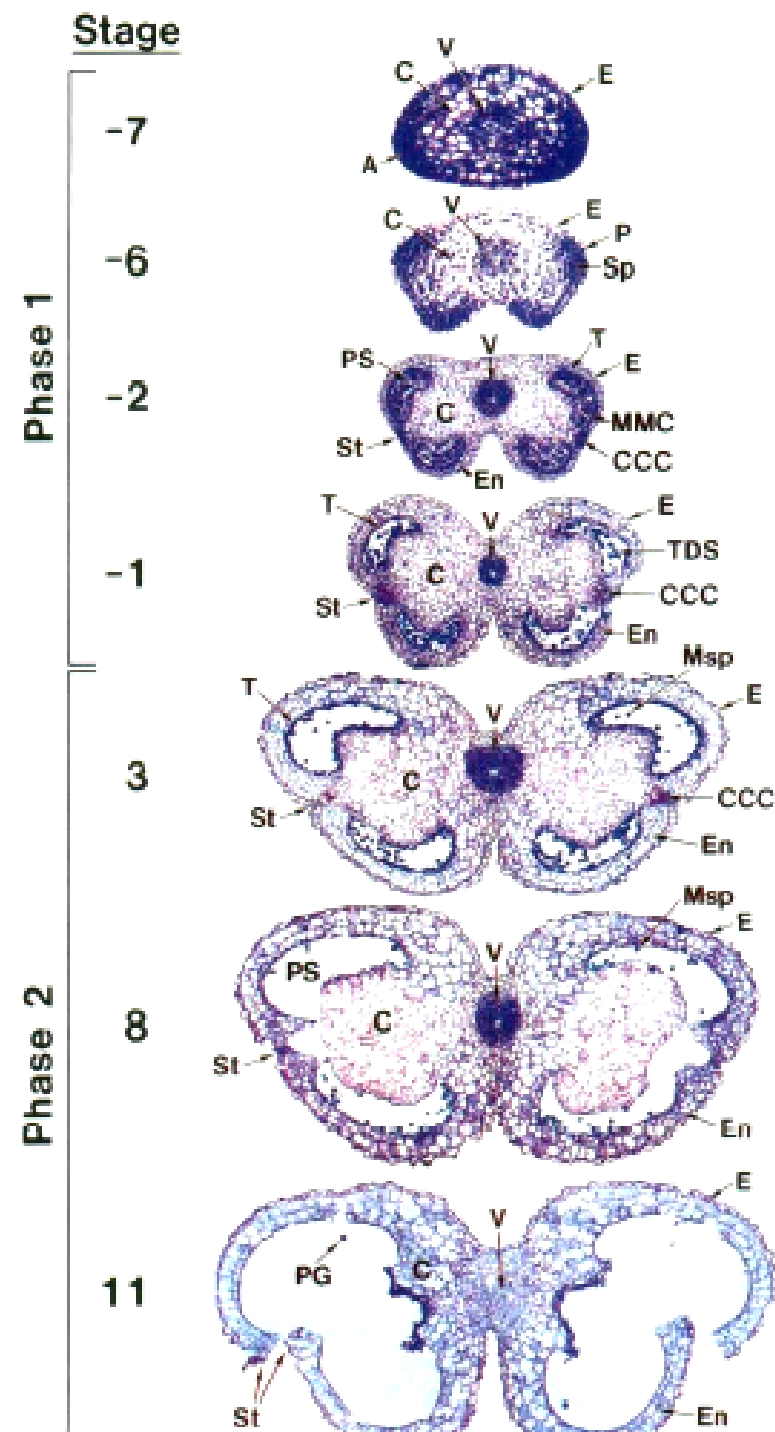


Goldberg *et al.* 1993

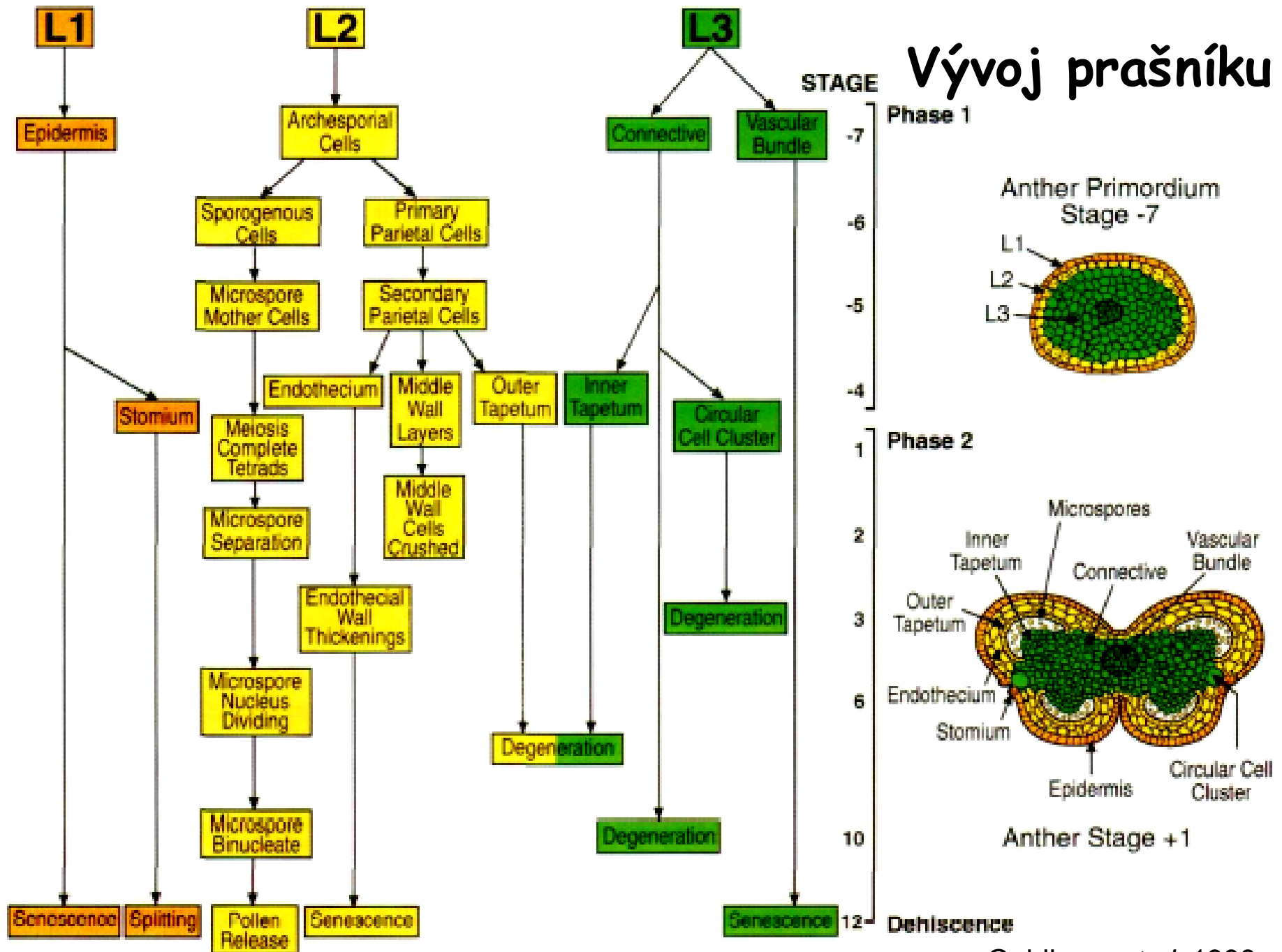
Stadia vývoje prašníku tabáku

Koltunov et al.1990

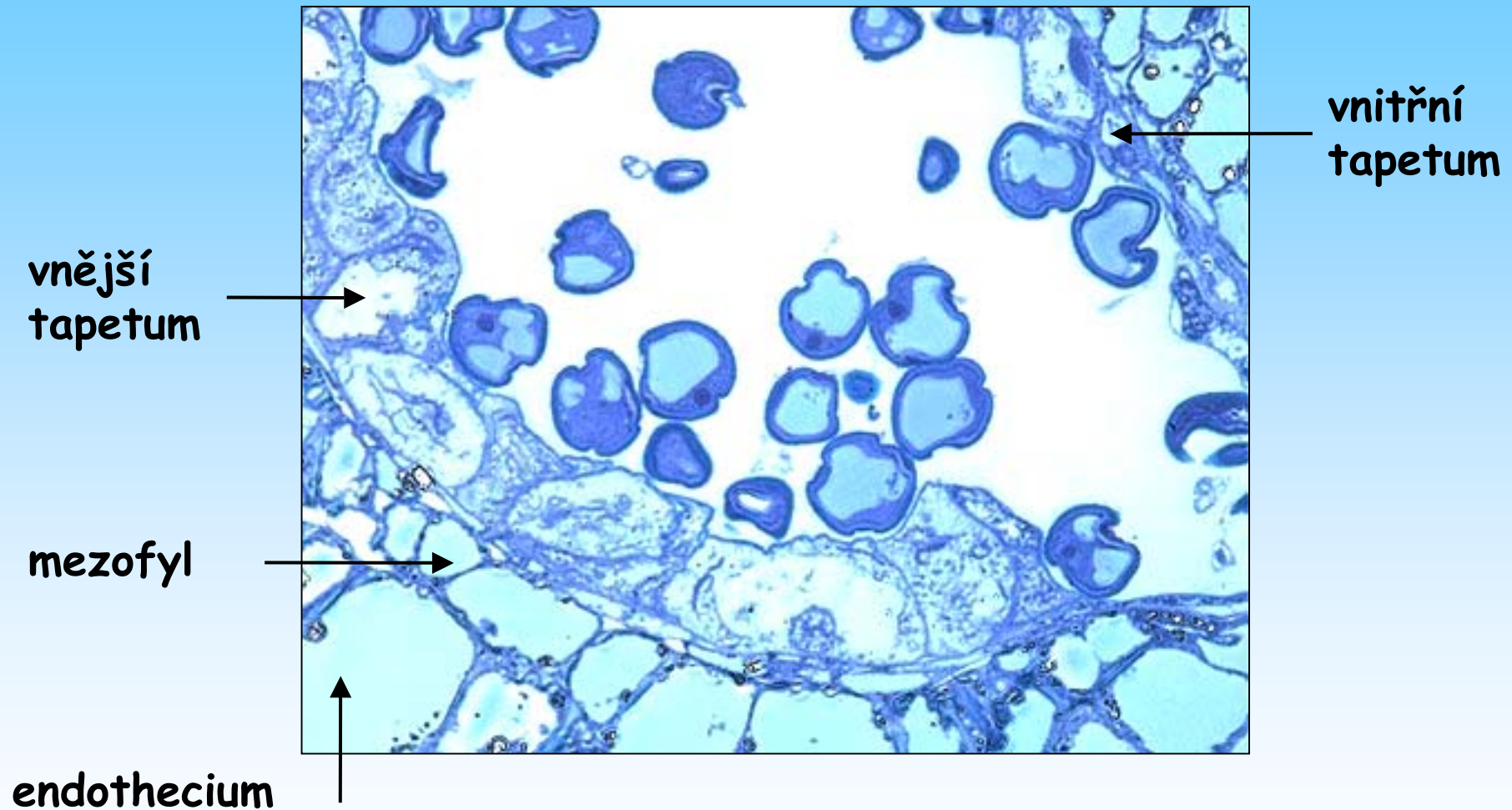
-7	primordia tyčinek	začátek diferenciacce
-6		intenzivní dělení
-2	prašníky pod bliznou	meioza
-1	petaly na úrovni sepalů	tetrády
3	koruna přes kalich	mizí tapetum
8		spojení prašných pouzder
11	koruna zpola otevřená	zralá pyl. zrna
12	otevření květu	otevírání prašníků



Vývoj prašníku

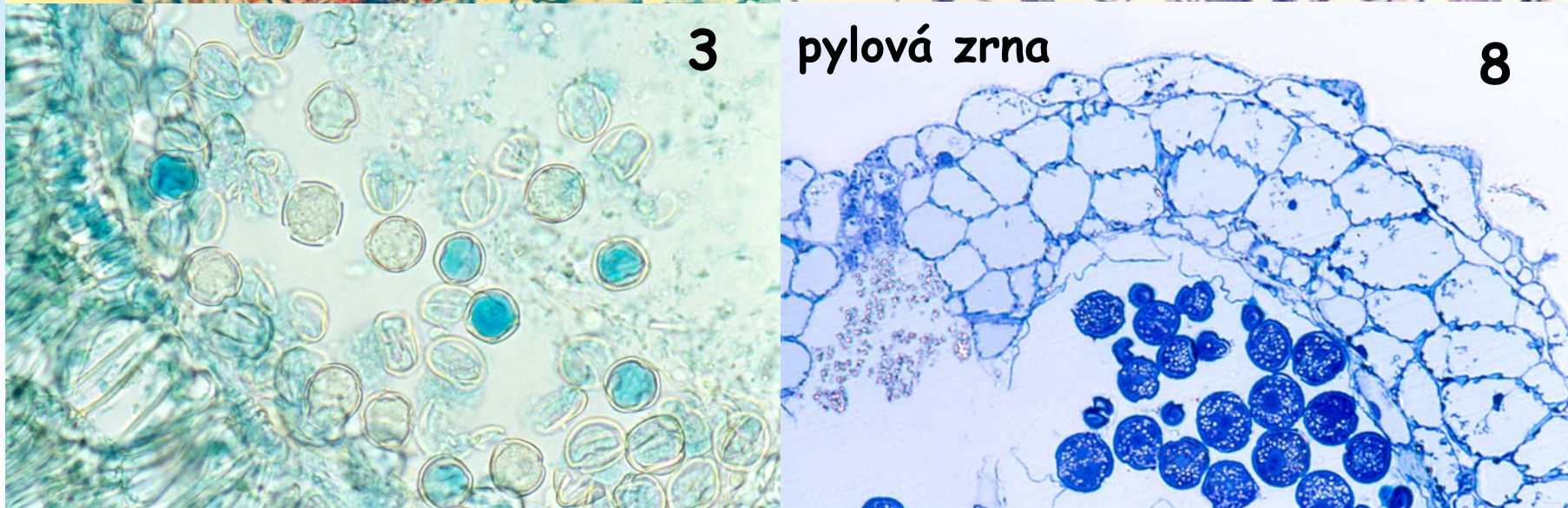
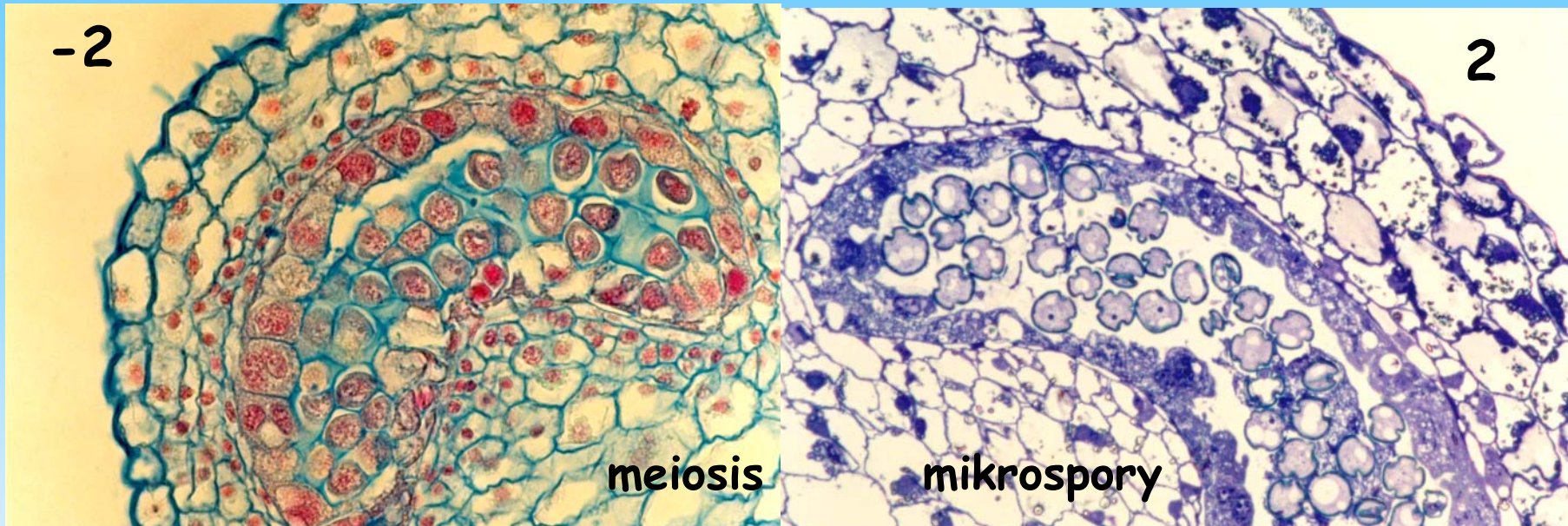


Nicotiana tabacum L. SR1



vakuolizované mikrospory
stadium 2

Vývoj prašníku tabáku



-2



metafáze I.dělení

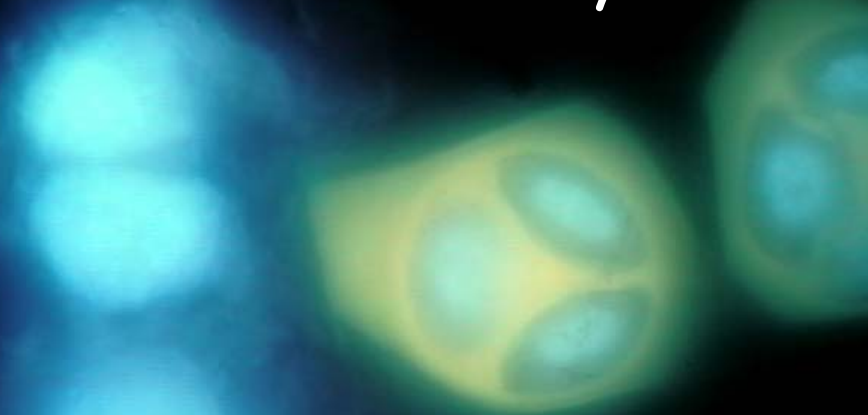


počátek tvorby tetrád

mikrosporogeneze *Nicotiana tabacum* L.

-1

tetrády



1

mikrospora se zbytky kalózy



Nicotiana tabacum L.

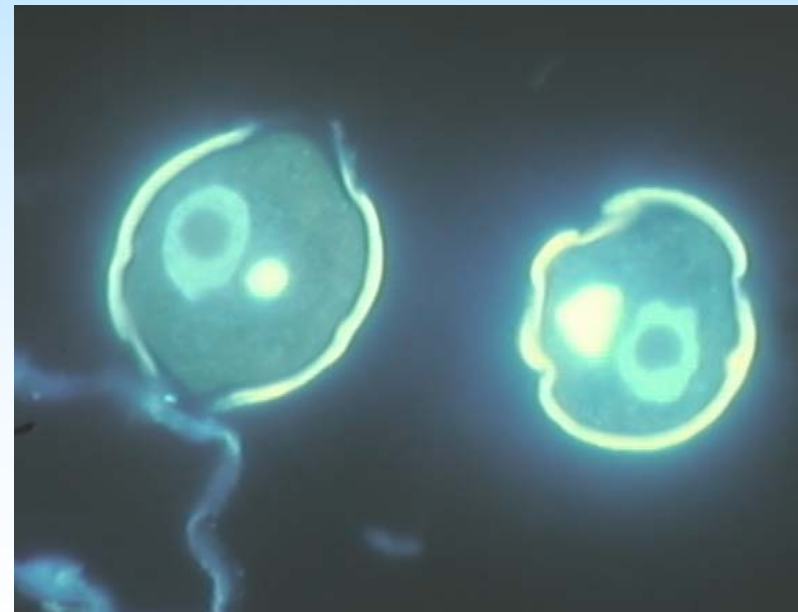
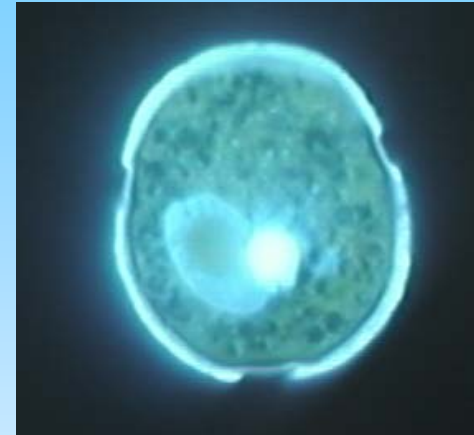
kryostatový řez - asi 40 um



zbytky
mezofylu a
tapeta

endothecium

exothecium



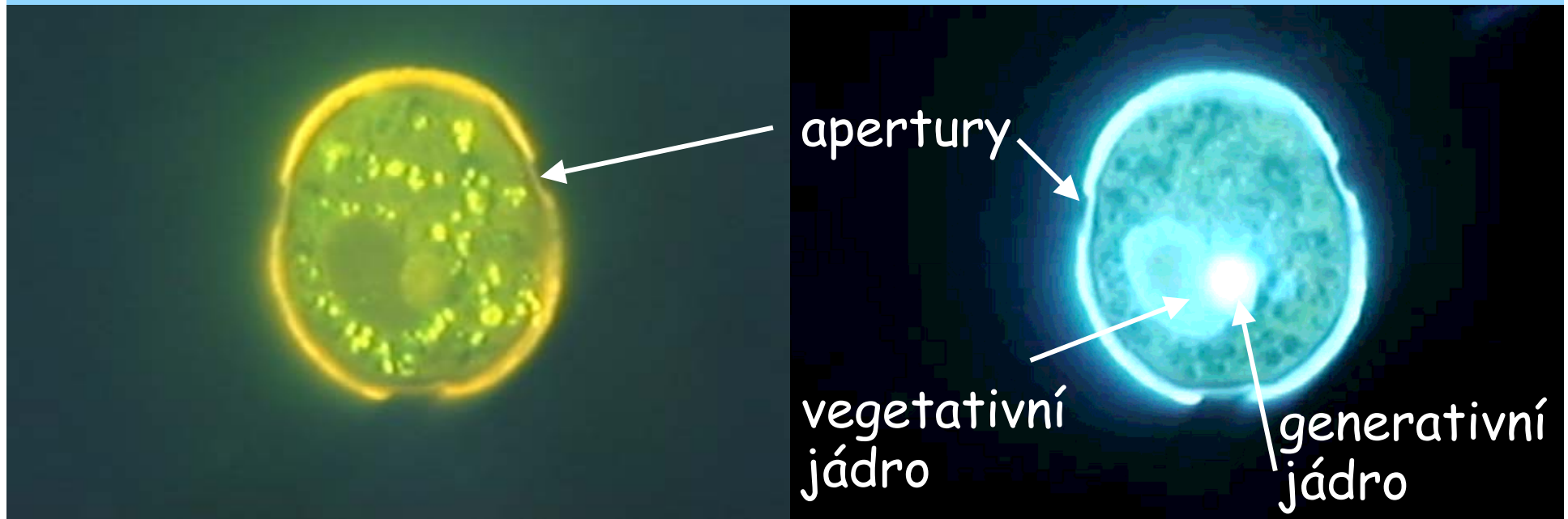
Nicotiana tabacum L.



desikovaný pyl
3 (-4) apertury

SEM, vysušeno metódou
„critical point dry“, pozlaceno

Pylová zrna *Nicotiana tabacum* L.



autofluorescence exiny a plastidů

PEG sections

DAPI, UV

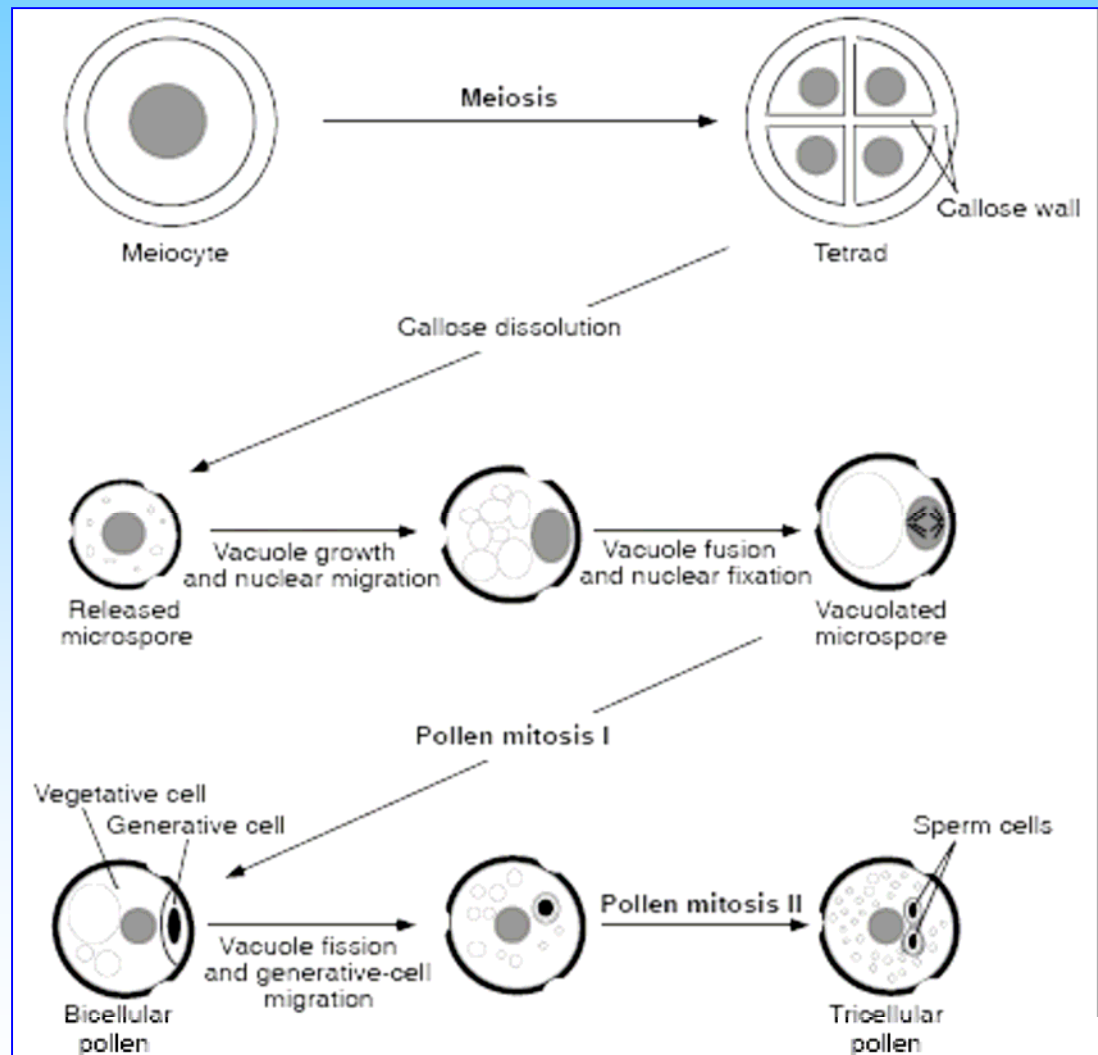
fluorescence DNA,
autofluorescence exiny

Mikrosporogeneze a mikrogametogeneze *Arabidopsis*

tříbuněčný pyl

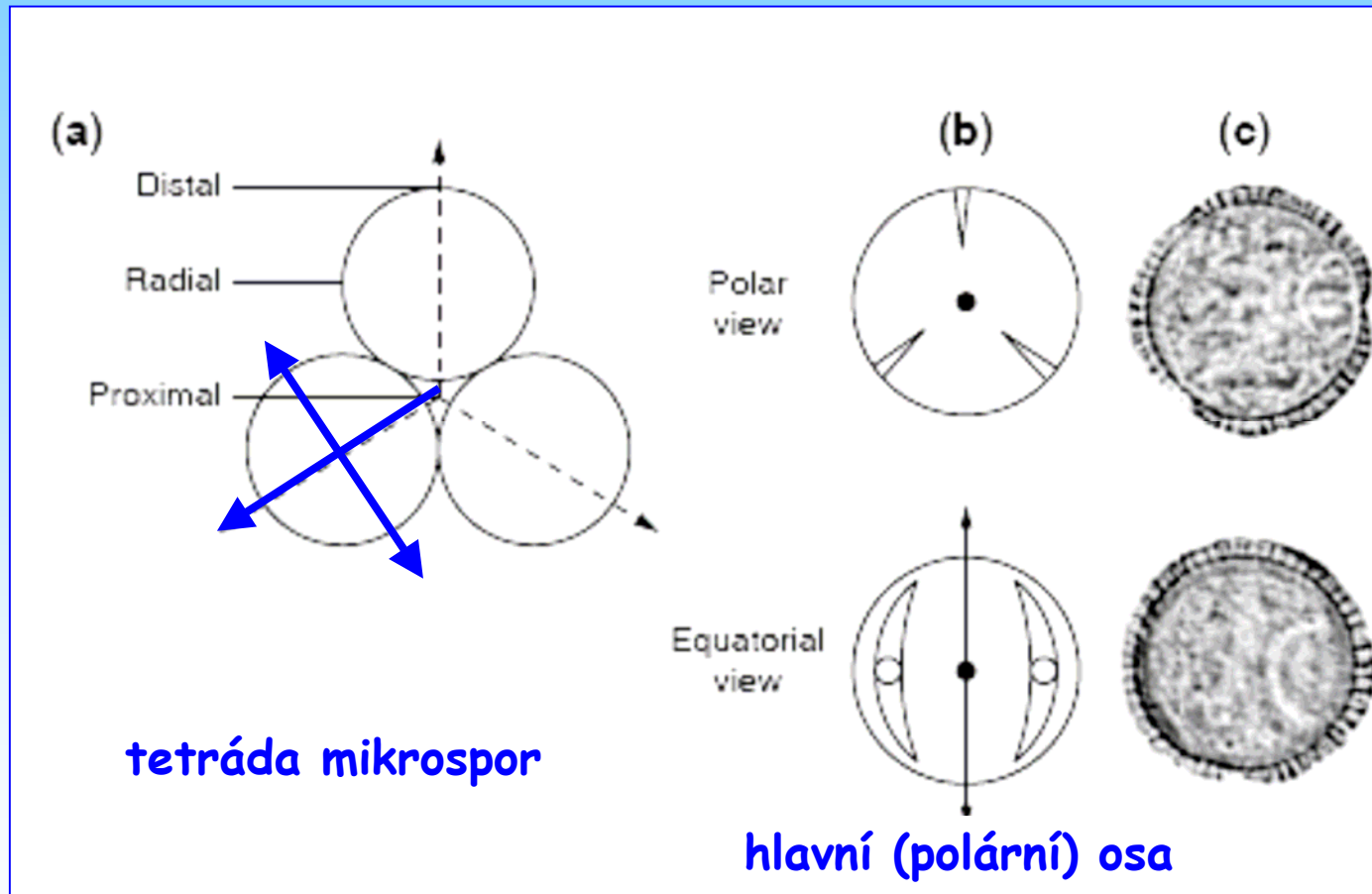
Arabidopsis thaliana

tříbuněčný pyl



Twell *et al.* TIPS, 1998

Arabidopsis thaliana

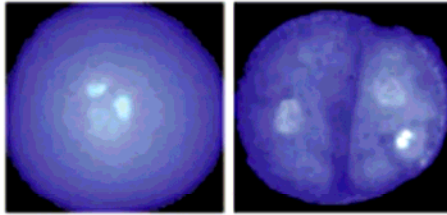


Twell *et al.* TIPS, 1998

(a)

Wild type

scp



kontrola

mutant
sidecar
pollen

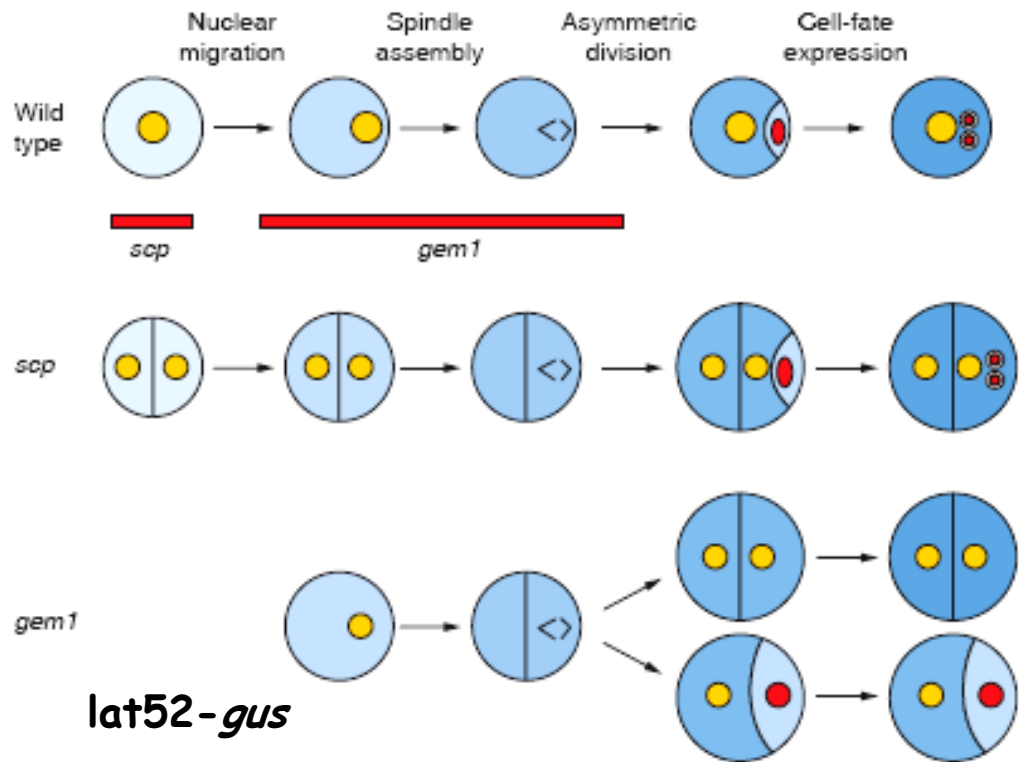
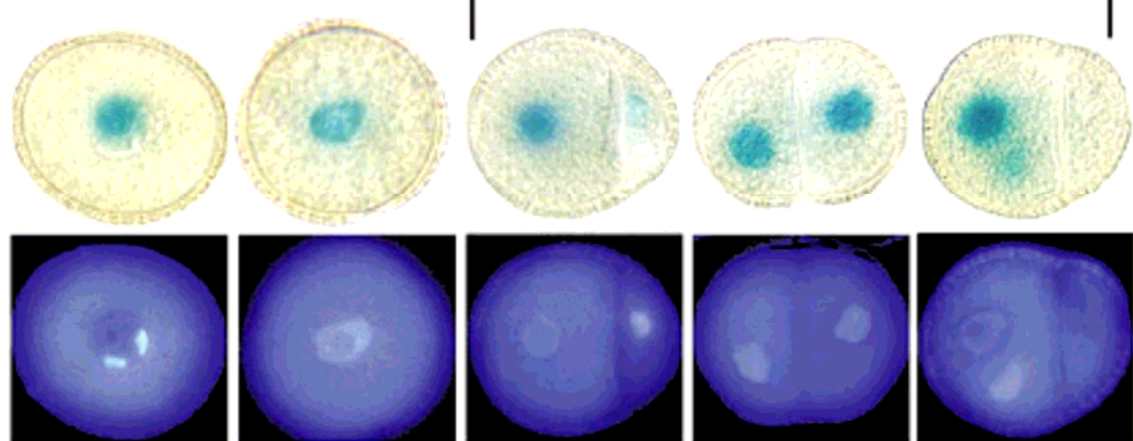
(b)

Wild type

solo

mutant *gemini*

gem1



Arabidopsis thaliana

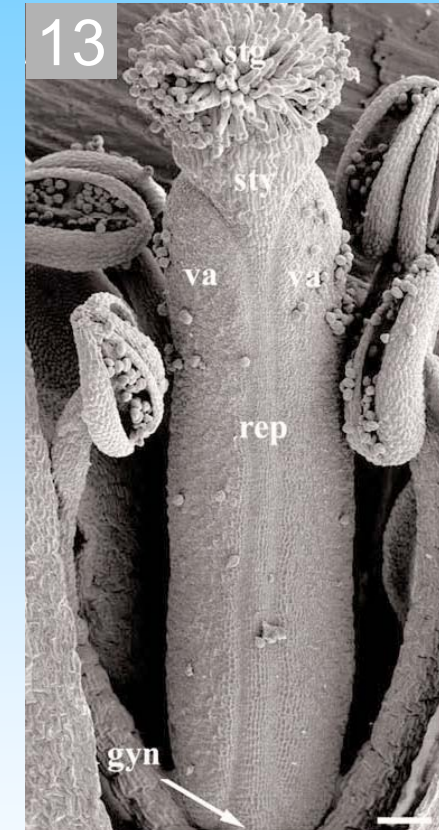
předčasné dělení a polarizace
jedné buňky

změna polarizace

Twell *et al.* TIPS, 1998

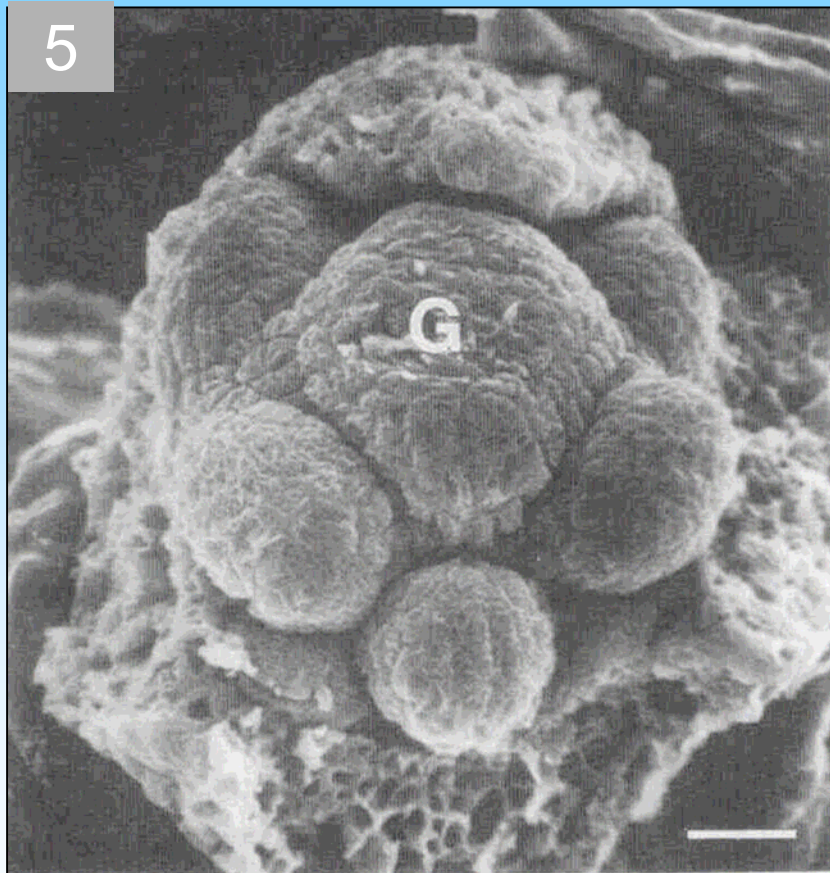
Přehled stadií vývoje květu *A. thaliana* Smyth *et al.* 1990

Stadium	Charakteristický znak
1	Vznik květního základu
2	Tvorba květního primordia
3	Formace primordií sepalů
4	Sepaly překrývají meristem
5	Vznik primordií petalů a tyčinek
6	Sepaly uzavírají pupen
7	Zakládání nitky u primordií dlouhých tyčinek
8	Diferenciace prašných pouzder
9	Primordia petalů na bázi užší, rychlý růst nahoře
10	Petaly na úrovni krátkých tyčinek
11	Diferenciace bliznových papil
12	Petaly na úrovni dlouhých tyčinek

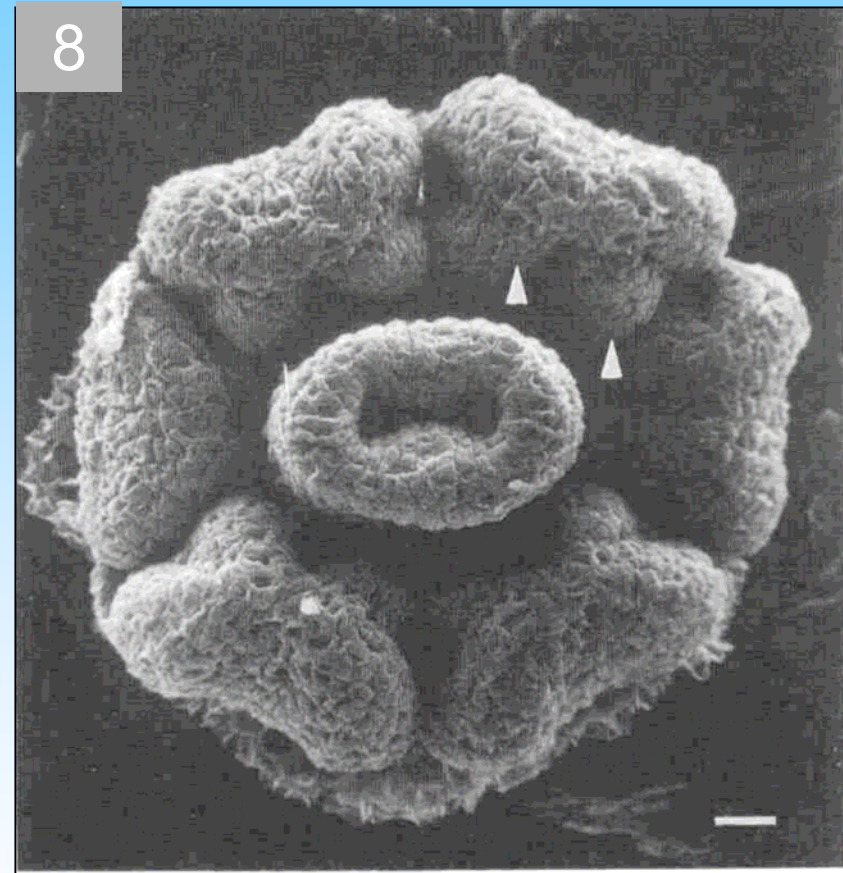


13 - antheze

Vývoj květu u *A. thaliana* (Smyth *et al.* 1990)



5. Vznik primordií petalů a tyčinek



8. Diferenciace prašných pouzder u dlouhých tyčinek

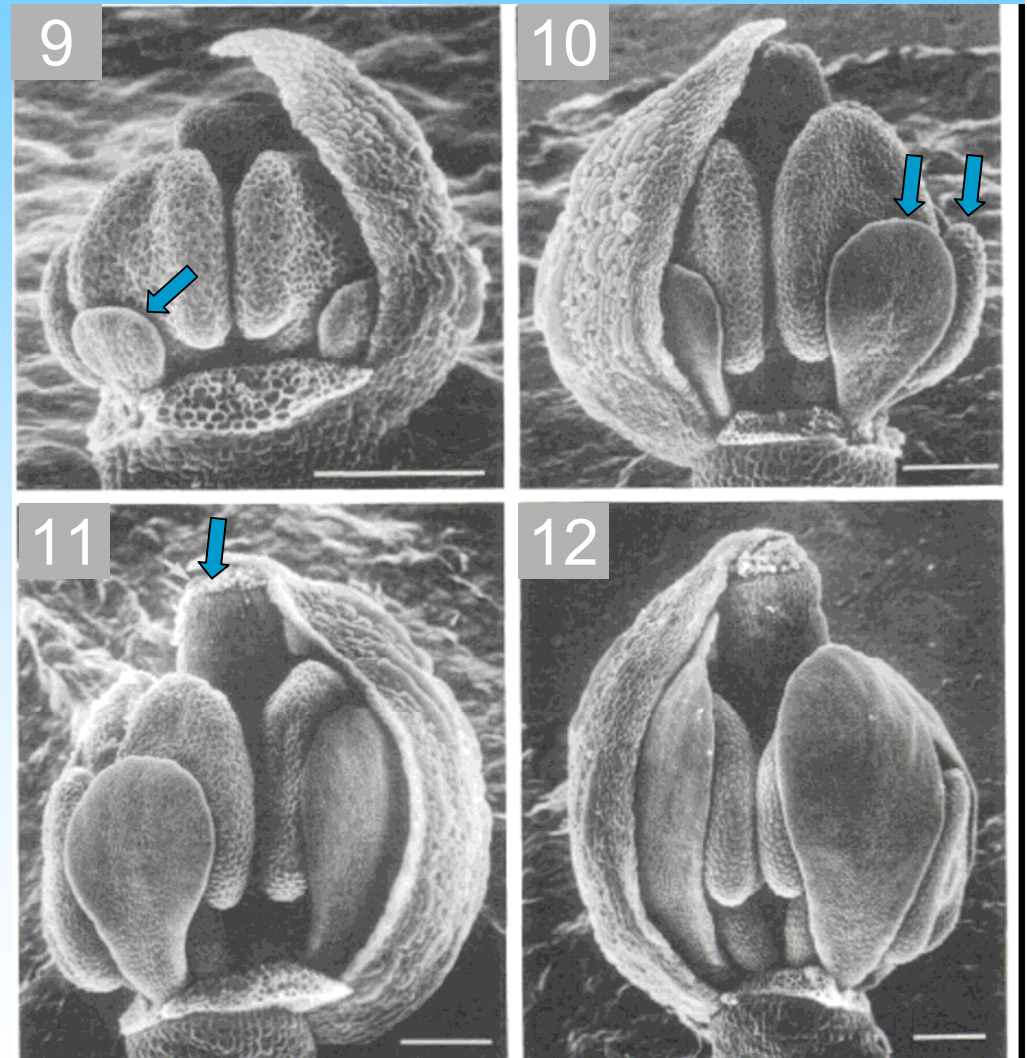
Stadia vývoje květu *Arabidopsis*

9 - petaly nahoře širší

10 - velikost květu 2x větší,
petaly na úrovni kratších
tyčinek

11 - diferenciaci
bliznových papil

12 - petaly na úrovni
delších tyčinek



Smyth et al. 1990

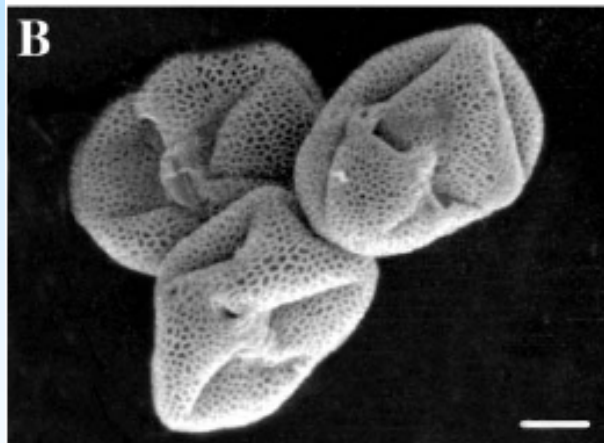
Tetrády pylu

Arabidopsis

mutant

quartet

narušení
degradace
pektinových
složek stěny,
tetrády
zralých
životaschopných
pylových
zrn

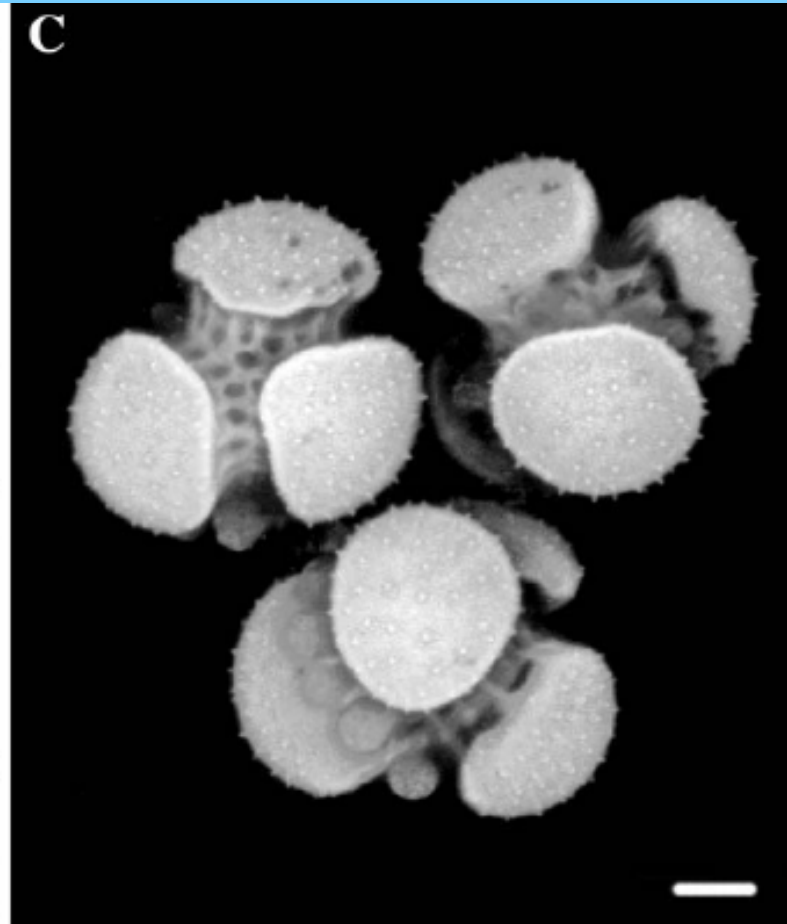


Arabidopsis

mutant

tes/stud

abnormální
tvar
apertur



přirozené tetrády pylu
Drosera binata

Edlund *et al.* 2004

i Ericaceae nebo Juncaceae

Celkový tvar pylového zrna

podle poměru poledníkové (m) a příčné osy (a)

velmi protáhlá

protáhlá

slabě protáhlá

kulovitá

slabě zploštělá

zploštělá

$m:a =$ větší než 8:4

$m:a =$ 8:4 až 8:6

$m:a =$ 8:6 až 8:7

$m:a =$ 8:8

$m:a =$ 6:8 až 7:8

$m:a =$ 4:8 až 6:8

Velikost pylových zrn

vzdálenost pólů (polární rozměr) a ekvatoriální rozměr

velmi malá	menší než 10 um	<i>Myosotis</i>	
malá	10 - 25 um		<i>Salix</i>
střední	25 - 50 um		<i>Cyanus</i>
velká	50 - 100 um		<i>Pinus</i>
velmi velká	100 - 200 um	<i>Abies</i>	
obrovská	nad 200 um		<i>Cucurbit</i>

Variabilita velikosti pylových zrn

Taxon	velikost / μm /
<i>Myosotis</i>	2 - 5
anemofilní druhy	asi 60
<i>Malva</i>	150 až 250
<i>Cucurbita</i>	až 250
<i>Zostera marina</i>	2000

variabilita i v rámci jedné rostliny, častá polymorfie

Stanley *et* Linskens 1974, Unar 1992

Morfologická charakteristika pylových zrn - podle apertur (Erdtman 1969)

NPC systém

N - počet (numerus)

P - poloha (positio)

C - tvar (character)

typy apertury

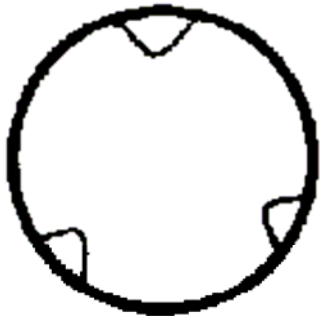
- **porus** (okrouhlé až mírně oválná apertura)

- **kolpus** (oválná až úzce štěrbinovitá apertura)

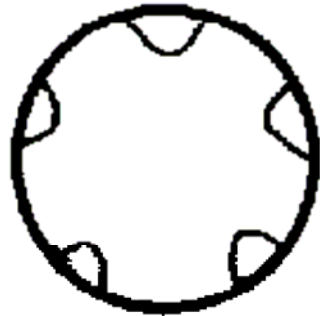
viz skripta Lux *et* Erdelská (2001)

Příklady různých typů pylových zrn

1



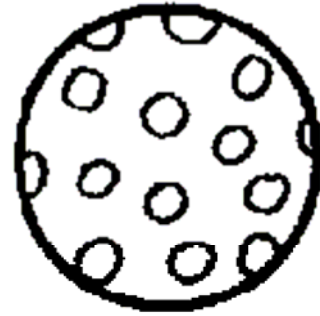
2



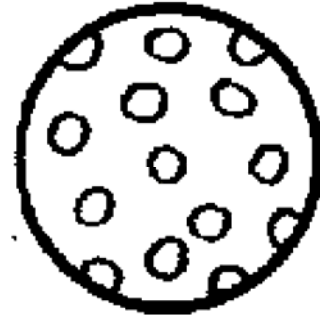
3



4



5



- 1 - trizonoporátní (bříza)
- 2 - pentazonoporátní (olše)
- 3 - trizonokolpátní (javor, tabák)
- 4 - polyantoporátní (merlík, tykev)
- 5 - hexapantokolpátní (kuřinka)

Diferenciální barvení pylu

Alexander 1969

- 95% ethanol 10 ml
- malachitová zeleň 10 mg (1 ml 1% rozt. v 95% eth.)
- destilovaná voda 50 ml
- glycerol 25 ml
- fenol 5g
- chloralhydrát 5g
- kyselý fuchsin 50 mg (5 ml 1% vodný roztok)
- oranž G 5 mg (0,5 ml 1% vodný roztok)
- ledová kys. octová 1 - 4 ml

Hodnocení viability pylu

- **barvení** - často nadhodnocuje životaschopnost pylu
- **fluorescenční mikroskopie** - aktivita enzymů: esterázy (substrát FDA), peroxidázy (substrát TTC)
- **klíčivost pylu *in vitro***
- **médium pro klíčení pylu *in vitro***

Brewbaker - Kwack (1964)	100 ml
H ₃ BO ₃	10mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	30mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20mg
KNO ₃	10mg
+ 10% sacharóza	

nebo s přidavkem 1% agaru - nanesení filmu média na podložní sklo