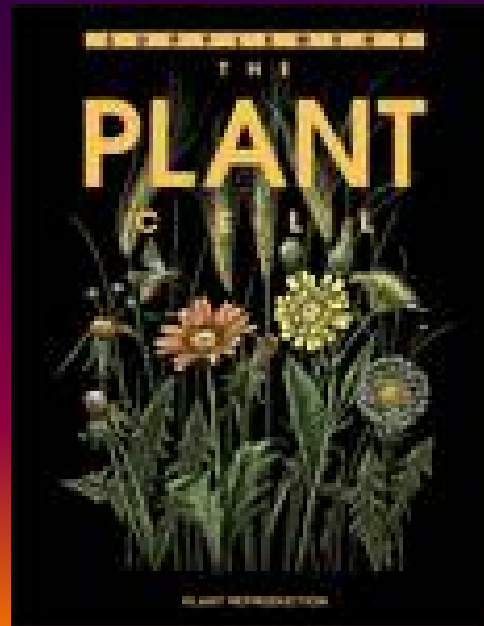


## 4) Reprodukce rostlin

- d) Vznik gamet
- e) Mutace ve vývoji gametofytu
- f) Opylení, oplodnění



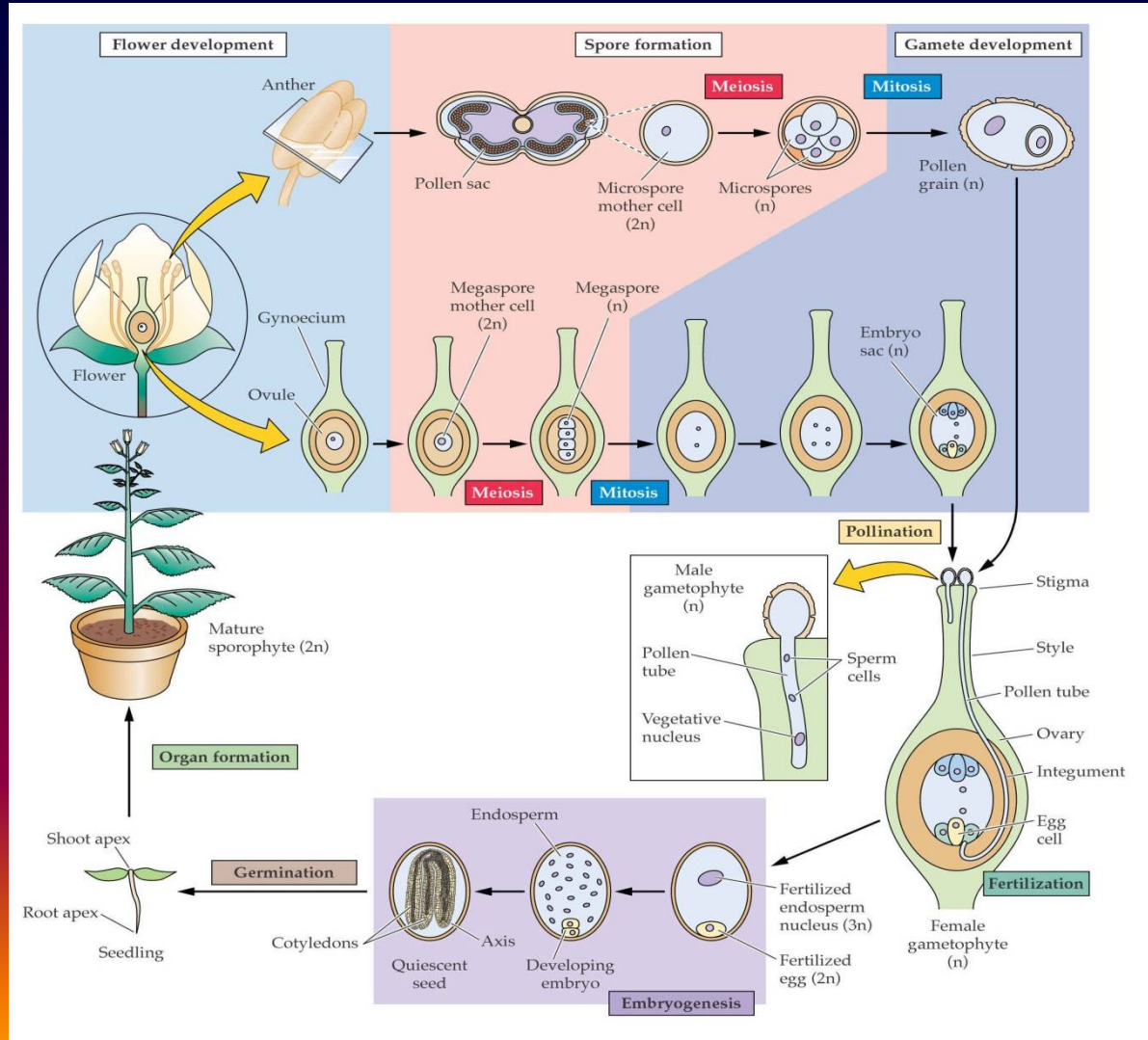
Martin Fellner  
Laboratoř růstových regulátorů  
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

# d) Vznik gamet

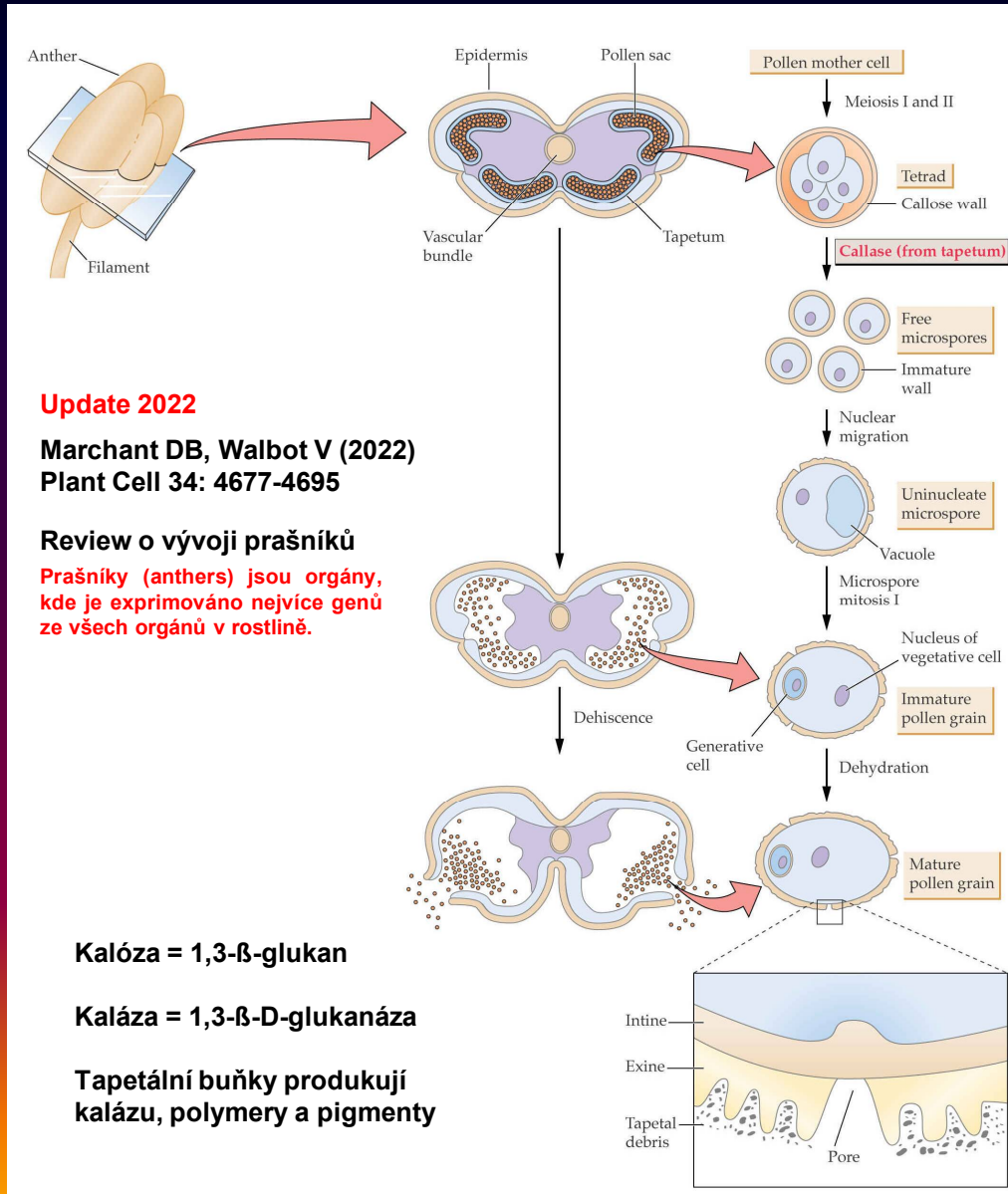
## Životní cyklus rostliny

Mikrosporogeneze

Megasporogeneze



# Vývoj samčího gametofytu - mikrosporogeneze

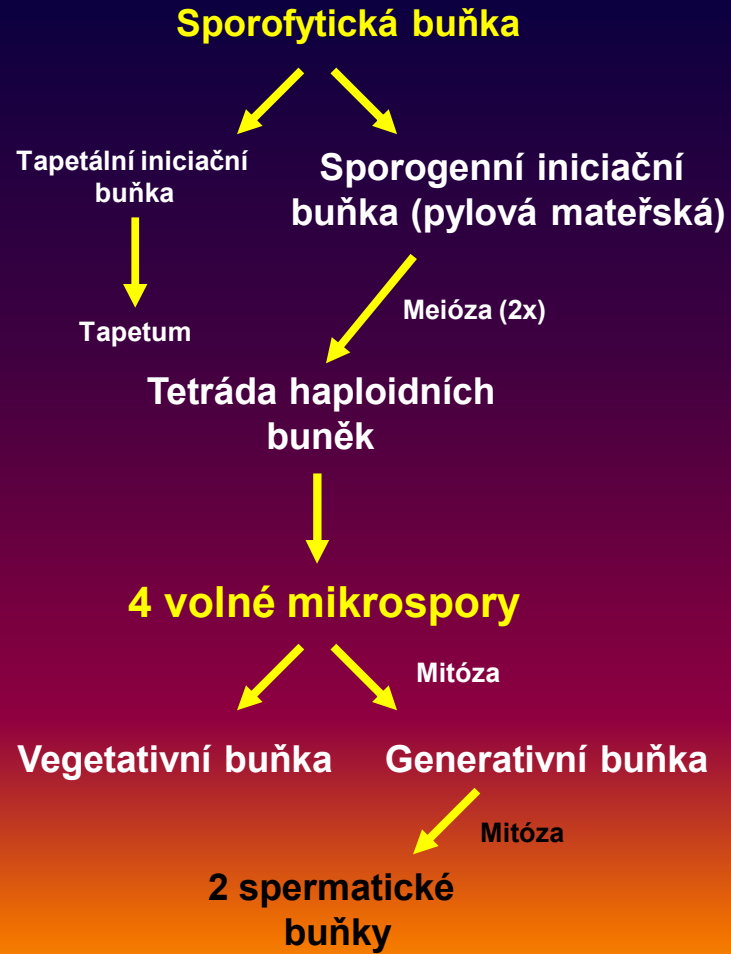


**Update 2022**  
 Marchant DB, Walbot V (2022)  
 Plant Cell 34: 4677-4695

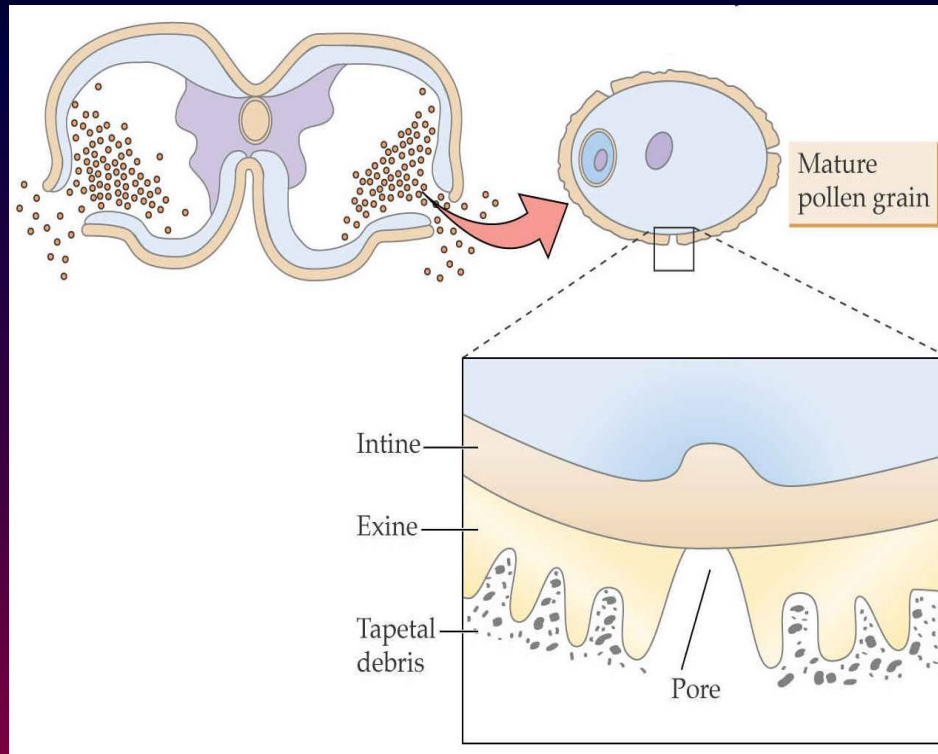
**Review o vývoji prašníků**  
 Prašníky (anthers) jsou orgány, kde je exprimováno nejvíce genů ze všech orgánů v rostlině.

Kalóza = 1,3-β-glukan  
 Kaláza = 1,3-β-D-glukanáza  
 Tapetální buňky produkují kalázu, polymery a pigmenty

**Mikrosporogeneze = tvorba samčího gametofytu = pylových zrn**



## Samčí pohlavní buňka - pylové zrno



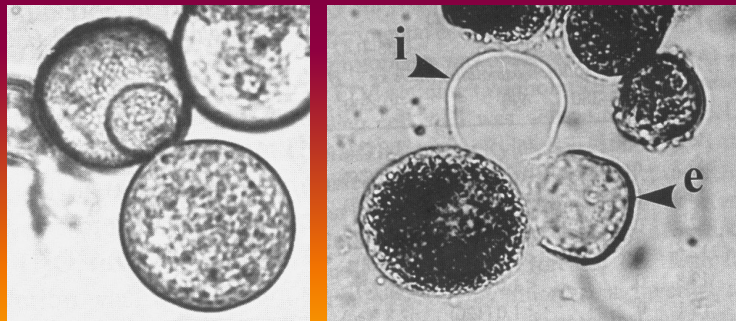
**Exina** = sporopolenin = polymer fenolů; extrémně rezistentní k chemickým látkám; geny, které utváření exiny kódují, jsou málo známy



Fosilní nálezy pylových zrn



Vývojová biologie



### Pylové protoplasty

Fellner M (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 157-162.



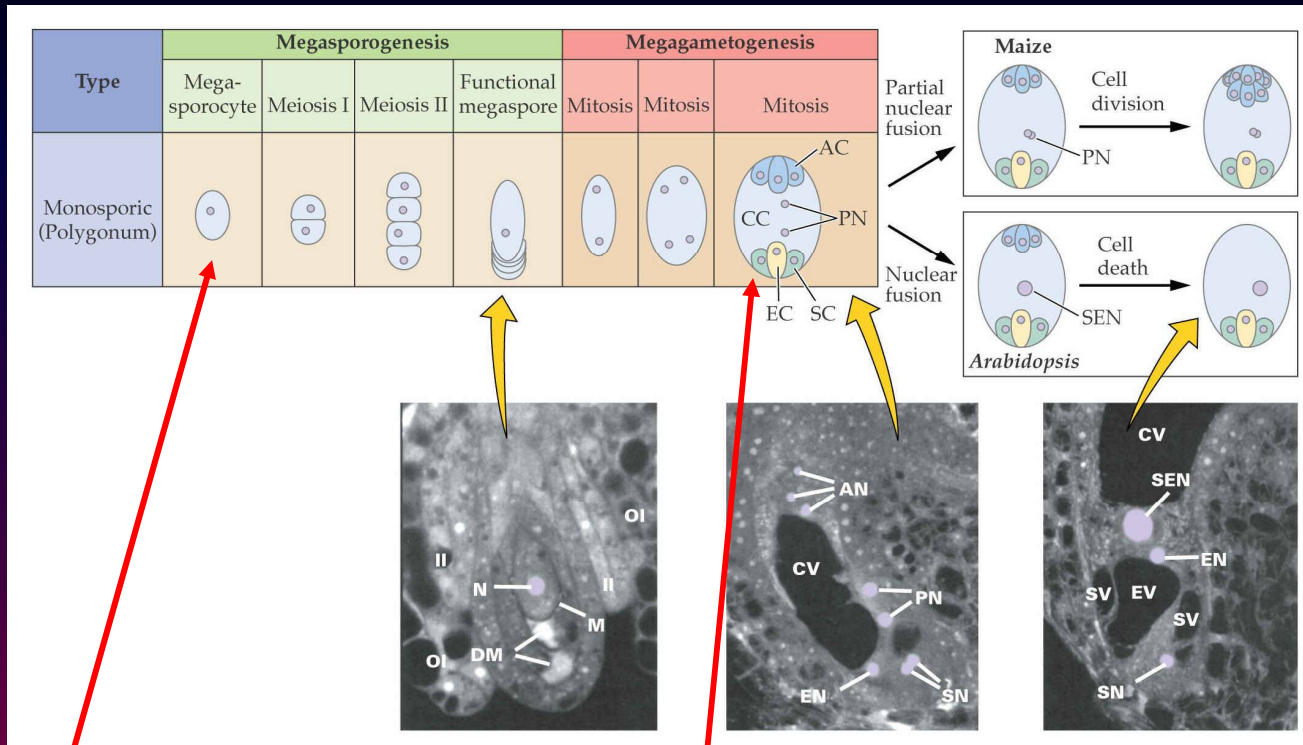


**Pestré uspořádání exiny  
pylových zrn**



**Praktické využití  
(např. kriminalistika)**

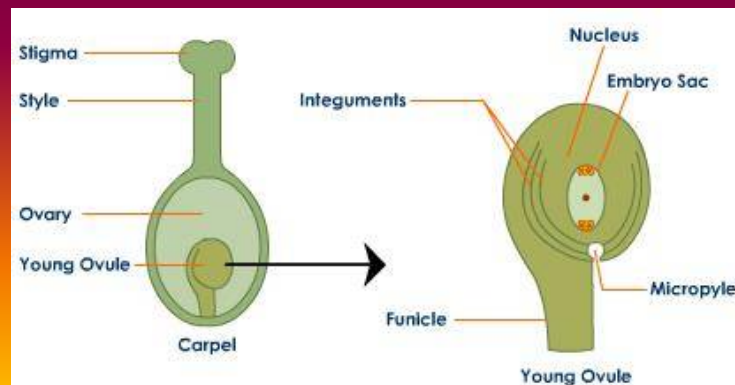
# Vývoj samičího gametofytu - megasporogeneze



Meióza (2x) → **Nezralé vajíčko** → Megaspora → Mitóza (3x) → **Embryonální vak: 7 buněk**

- 3 antipodální (AC)
- 2 synergické (SC)
- 1 centrální (CC)
- 1 vaječná (EC)

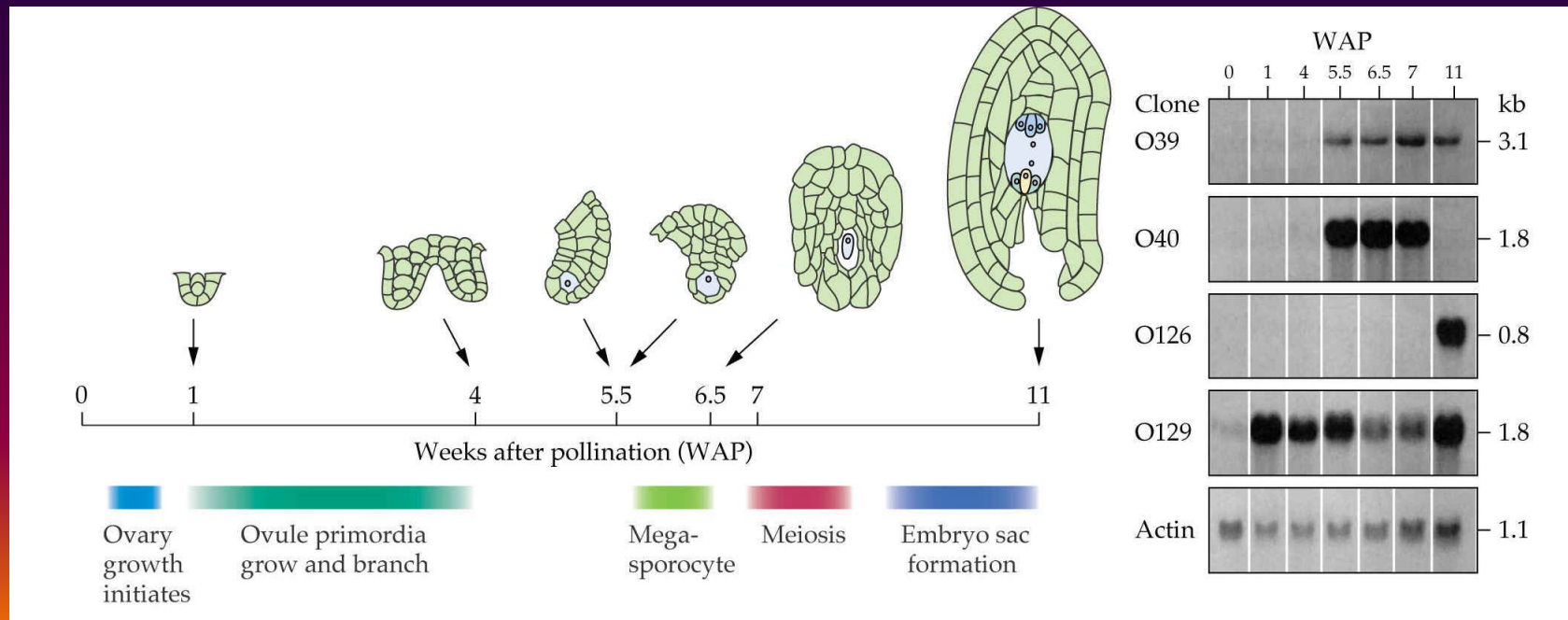
PN – 2 polární jádra  
 SEN – jádro sek. endospermu



**Je problematické najít geny specificky exprimované v samičím gametofytu:  
problematické izolovat vajíčko od sporofytického pletiva => obtížné izolovat  
mRNA a vytvořit cDNA knihovny**

Orchidej - experimentální rostlina pro studium genů specificky exprimovaných  
ve vajíčku

- synchronizovaný vývoj vajíček
- vajíčko se vyvíjí dlouhou dobu (11 týdnů) => možnost izolovat vajíčka v různých stádiích  
vývoje => mRNA v různých etapách vývoje => možnost determinovat expresi během vývoje



## e) Mutace ve vývoji gametofytu

Analýza sterilních mutantů → Identifikace genů

**Pylově sterilní mutanti s defektem ve vývoji pylu - většinou recesivní, homozygotní**

- defekt v meióze, netvoří pyl
- defekt ve vývoji tapetálních buněk
- deformace prašníků – pyl se neuvolňuje, nebo pozdě
- defekt v pylovém otvoru – pyl nemůže klíčit
- defekt ve vývoji sporofytu – pyl nemůže klíčit

**Sterilní mutanti s defektem ve vývoji vajíčka**

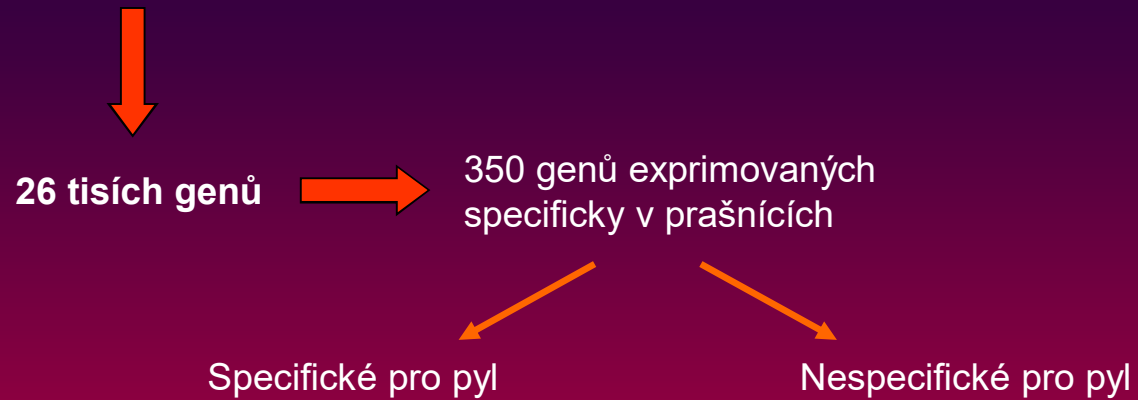
- defekt ve vývoji sporofytu
  - defekt ve vývoji megaspory
- } - ovlivněn vývoj vajíčka a ovlivněno oplodnění
- defekt ve vývoji embryonálního vaku a vajíčka – ovlivněno oplodnění

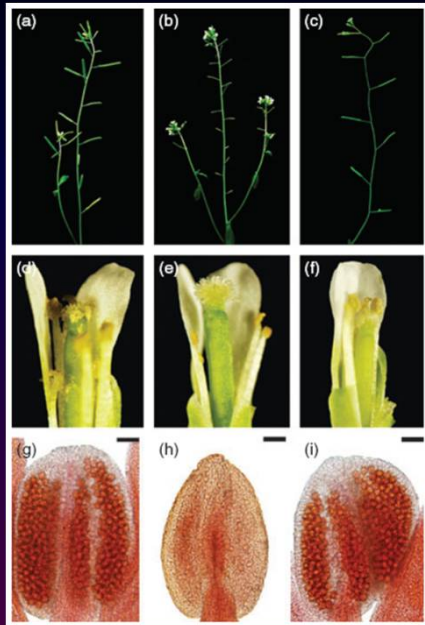


## Mutace ve vývoji samčího gametofytu

60 –90% genů exprimovaných v gametofytu je exprimováno i ve sporofytu

Sekvenování *Arabidopsis* genomu (2000)





WT *tdf1* Trangen *TDF1*

***TDF1***  
 (DEFECTIVE IN TAPETAL DEVELOPMENT AND FUNCTION 1)  
 – transkripční faktor MYB; klíčový v regulaci vývoje tapeta

***DYT1***  
 (DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1) – protein DYT1 se váže  
 přímo na promotorovou oblast genu *TDF1*



- DYT1 je lokalizován v cytoplazmě i jádře
- C-terminální doména BIF je nezbytná pro dimerizaci, nukleární lokalizaci a schopnost aktivovat transkripci
- Prostorově časová subcelulární lokalizace DYT1 je důležitá pro samotnou funkci DYT1

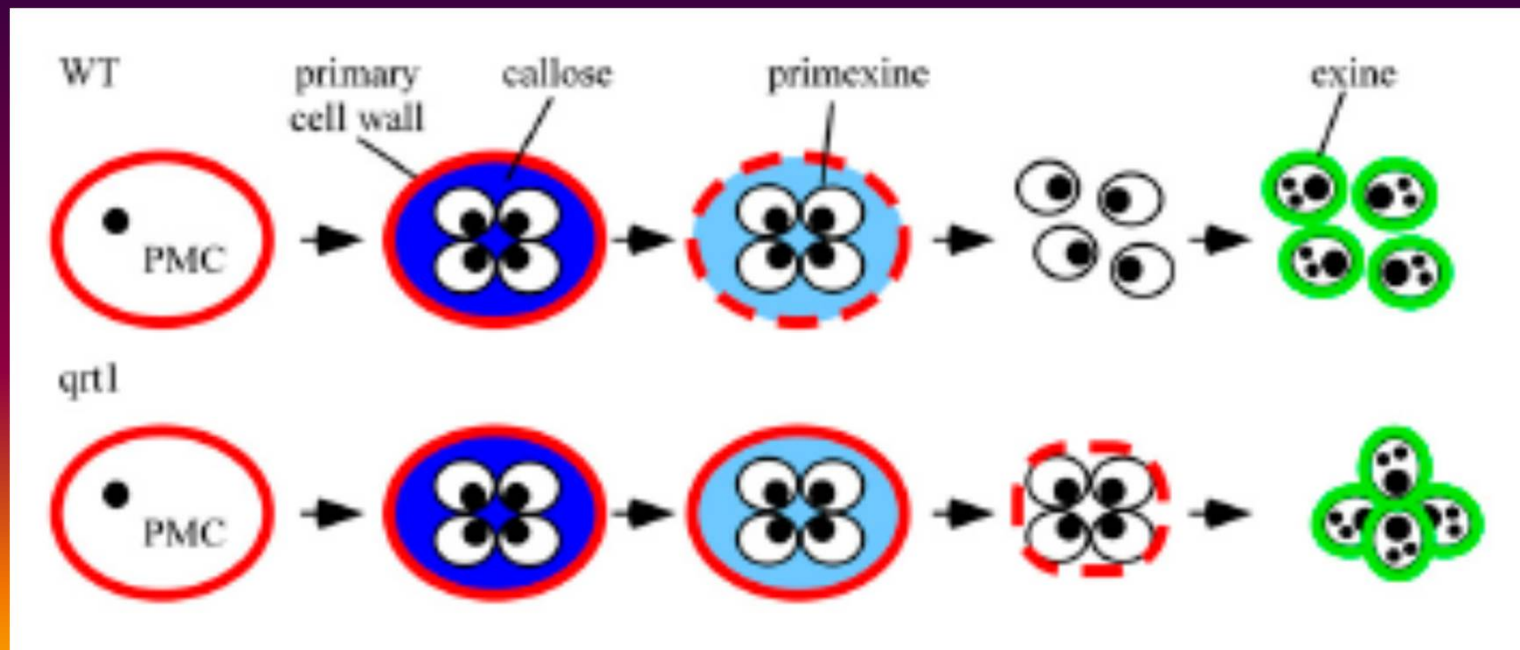
***fkp1*** – pylová zrna bez povrchové vrstvy

***FKP1* (FLAKY POLLEN 1)** – kóduje 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A syntázu = enzym mevalonátové (MVA) dráhy zapojený v biosyntéze sterolů

MVA důležitý pro vývoj organel tapetálních buněk => pylová zrna ***fkp1*** nemají povrchovou vrstvu, která vzniká z rozpadlých tapetálních buněk

***quartet* (*qrt*)** – tetrády se nerozdělují a uvolňují se celé z prašníku

***QRT*** – kóduje enzym s pektin metylesterázovou aktivitou (PME); exprimován v prašниковých pletivech před koncem meiózy



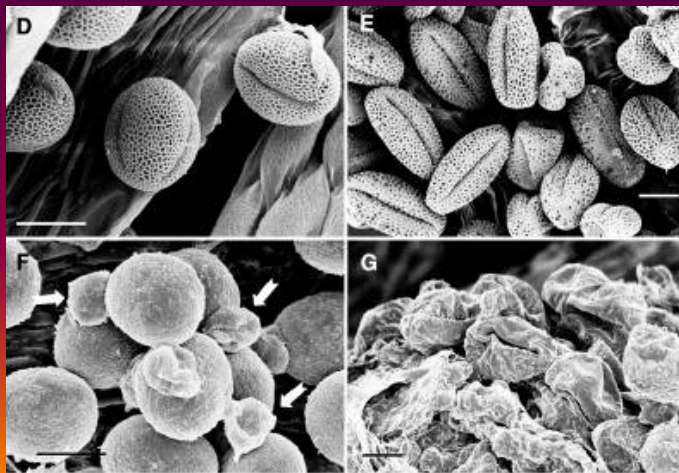
T-DNA mutant *cals5* – narušená fertilita, degenerované mikrospory

*CALS5* kóduje kalóza-syntázu → syntéza kalózy → exina

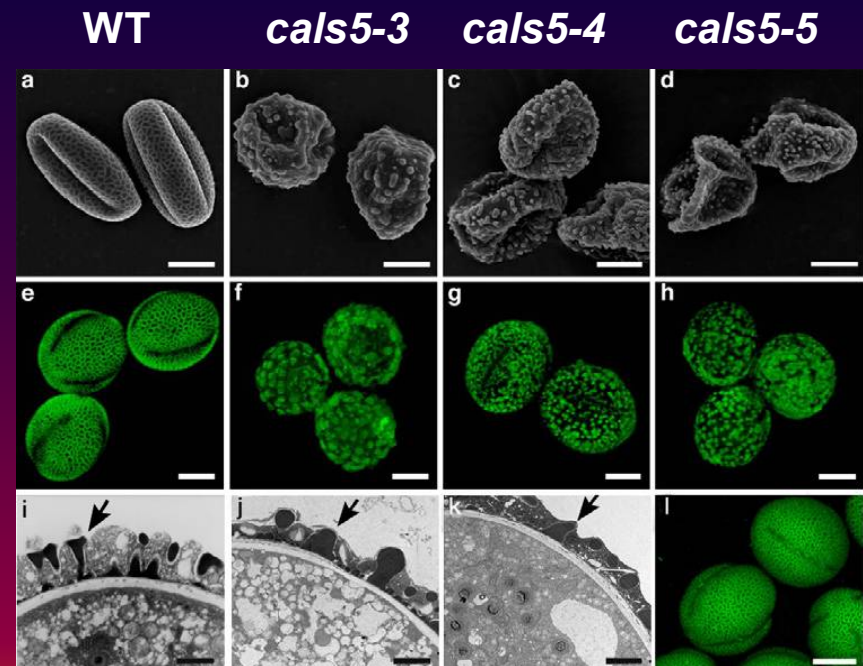
Knockout mutant *CYP703A2* (cytochrom P450)  
*CYP703A2* – katalyzuje hydroxylaci kys. laurové

Sporopolenin – bloky hydroxylované  
 kyseliny laurové

WT

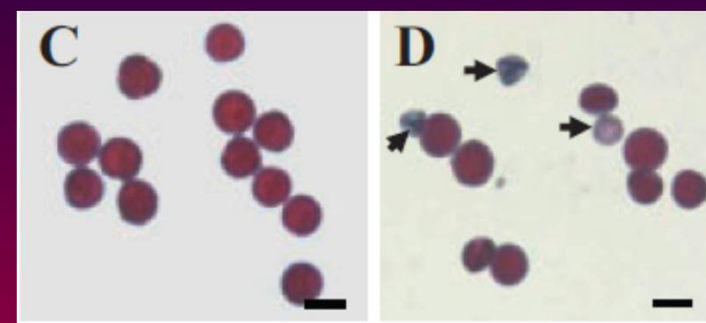
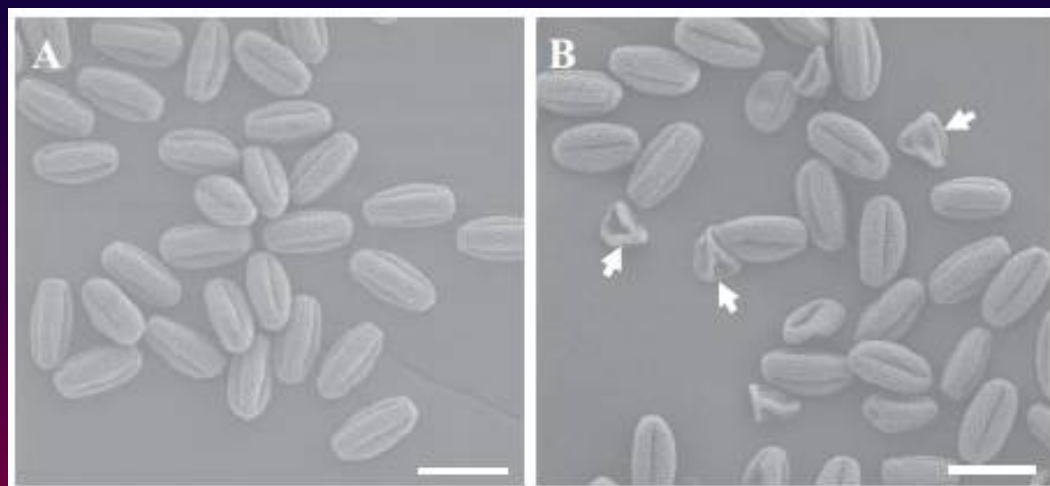


*CYP703A2*



**MGP1 (MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1)** – kóduje  $F_a$ d podjednotku mitochondriální  $F_1F_0$ -ATP syntázy u *Arabidopsis*.

**mgp1** mutant – destrukce mitochondrií v pylových zrnech a k zániku pylových zrn



**MS1 (MALE STERILITY1)** – transkripční faktor regulující tvorbu exiny, pyl. cytosolu a tapeta

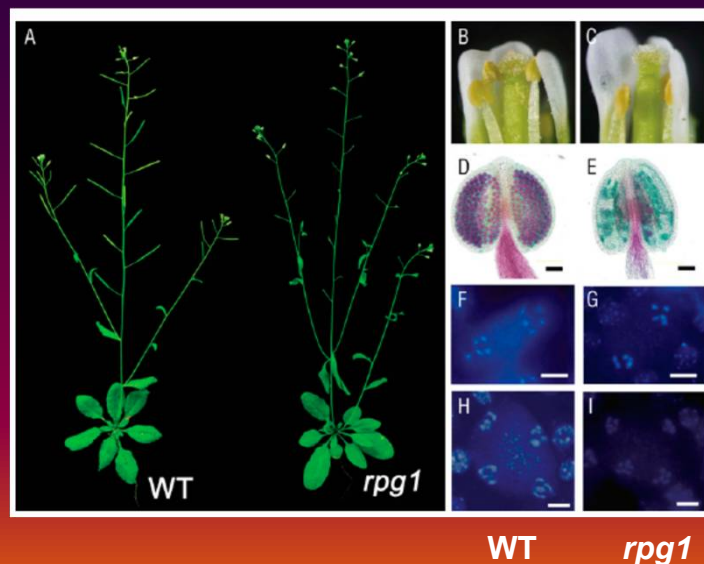
**MS2 (MALE STERILE2)** – kóduje reduktázu mastných kyselin nutnou pro tvorbu exiny



**MGT4, MGT5, MGT9 (MAGNESIUM TRANSPORTER 4, 5, 9)** – nezbytné pro vývoj pylu *Arabidopsis*; **mgt4-1** – nevyvinutá pylová zrna, rostliny sterilní

**MGT4** – lokalizován v ER, exprimován v pylových zrnech ve dvoubuněčném stádiu až do zralého pylového zrna

**RPG1 (RUPTURE POLLEN GRAIN1)** – membránový protein nezbytný pro tvorbu exiny

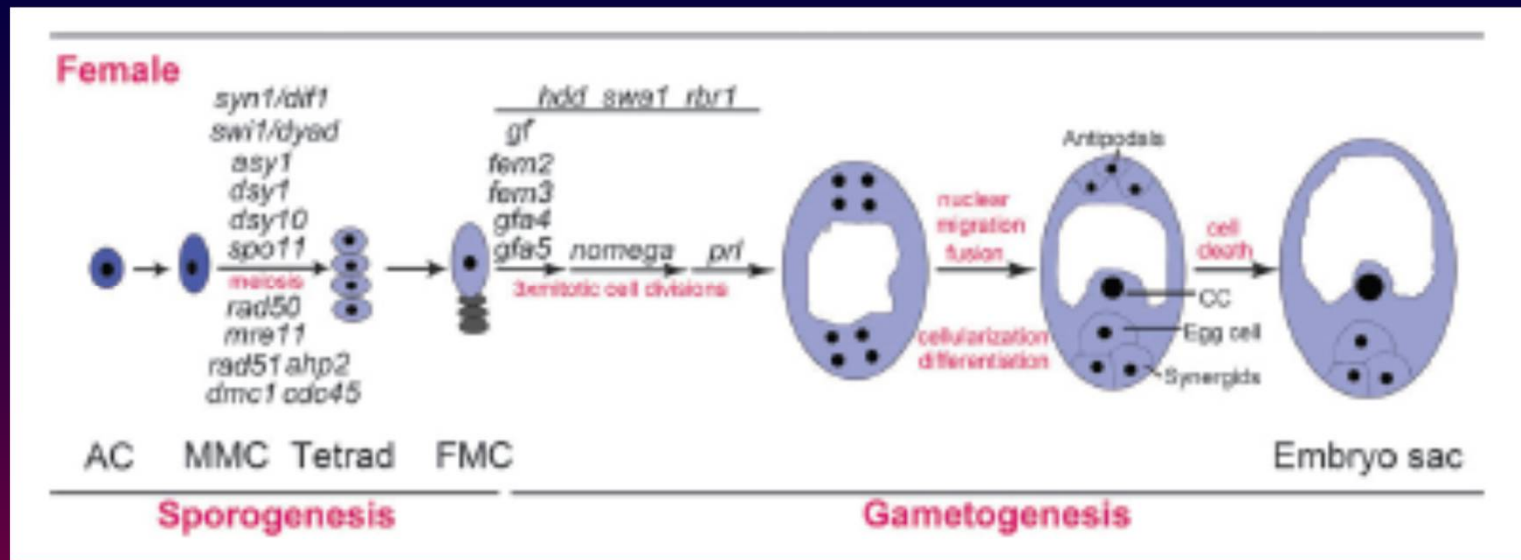


Guan Z-F et al. (2008) Plant Physiol 147: 852 - 863

**TIR1, AFB1 – AFB3** – auxinové receptory; mutanti vytváří krátké tyčinky prašníku a předčasné zrání pylu

# Mutace ve vývoji samičího gametofytu

Mutace zapojené v meiotickém a mitotickém buněčném cyklu

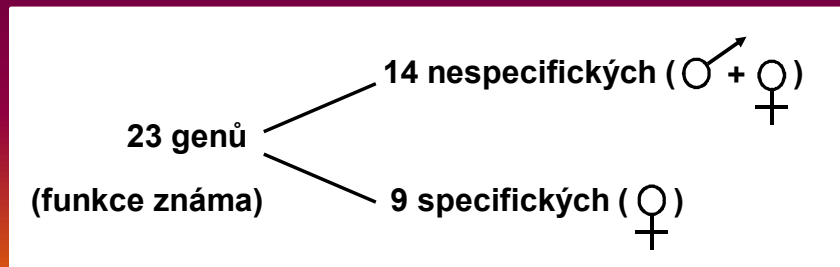


## Update 2020

Zhao H et al. (2020) Plant Physiology 182: 2006-2024

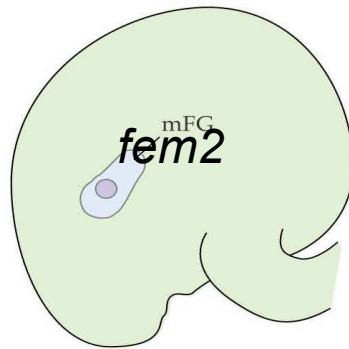
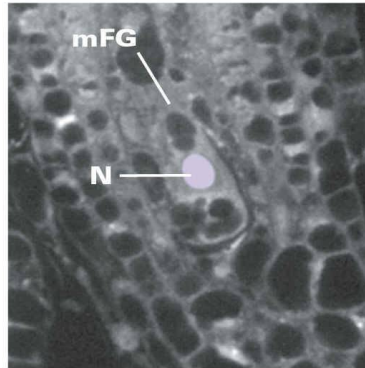
Transkriptomová analýza ve 3 stádiích vývoje vajíčka rýže (AC, MMC a FMC): 5,274 genů

AC a MMC: 958 genů

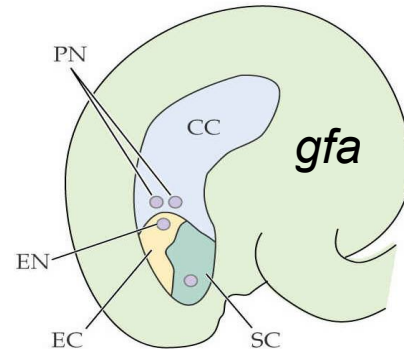
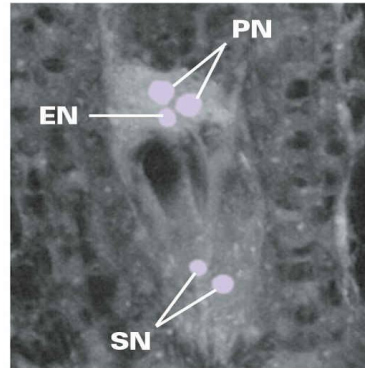


## Specifické geny

*fem2*: Never progresses beyond megasporogenesis



*gfa2*: Polar nuclei fail to fuse



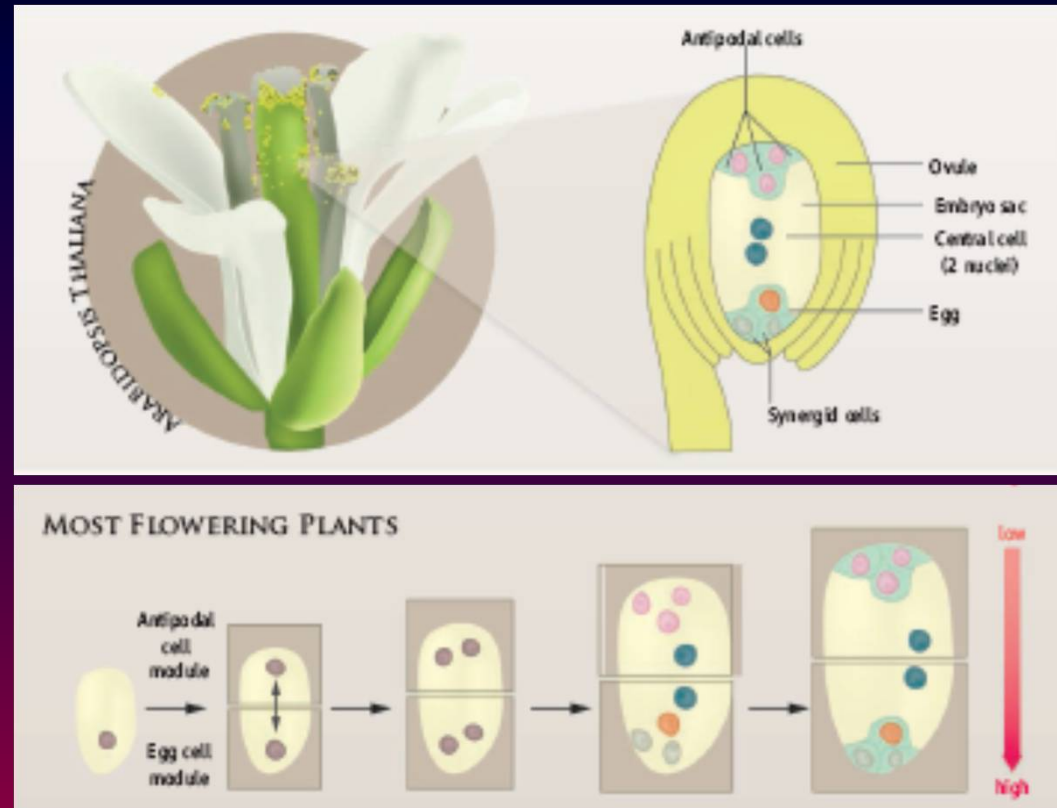
*Arabidopsis* mutant **fem2** – zastaven vývoj vajíčka před megagametogenezí

*Arabidopsis* mutant **gfa** – nedochází k fúzi jader centrální buňky

*Arabidopsis* mutant **gcd1** – narušené zrání vaječné buňky

Mitochondriální protein GCD1 je nezbytný pro konečné zrání samičích gamet.

Pagnussat GC et al. (2009) Science 324: 1684-1689



Distribuce auxinů v embryonálním vaku je polarizovaná - tvoří se gradient koncentrace auxinů. Na základě tohoto gradientu auxin určuje identitu buněk:

Vysoká koncentrace auxinu → Synergické buňky a vaječná buňka

Nízká koncentrace auxinu → Antipodální buňky

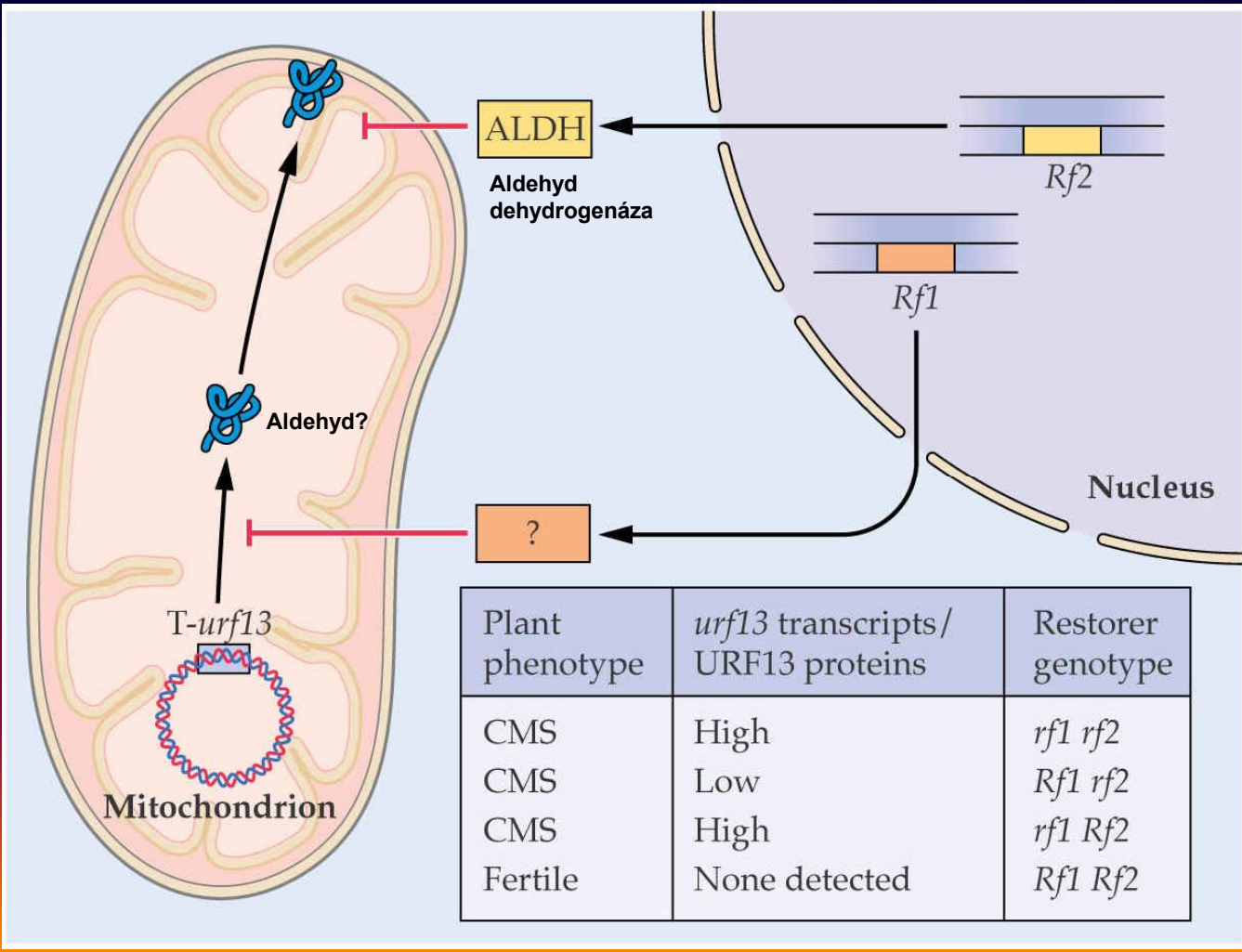
**Cytoplazmatická samčí sterilita (CMS)** = pylová sterilita přenášená pouze samičími orgány

- Odpovědné geny jsou většinou součástí chloroplastového či mitochondriálního genomu.
- Ve všech známých případech je CMS způsobena expresí abnormálních proteinů v mitochondriích prašníků.
- Mechanismus, jakým abnormální proteiny ovlivňují mitochondrie, není znám.
- Mitochondrie v prašníku mají vliv na vývoj pylu.
- Pokud je exprese abnormálního proteinu redukována, fertilita je obnovena.
- Ve všech CMS systémech existují jaderné geny, které potlačují expresi (tvorbu) abnormálních proteinů v prašníku.



CMS-T systém u kukuřice – abnormální mitochondriální protein URF13

Obnovení fertility vyžaduje 2 jaderné geny: *Rf1* a *Rf2*



## Klíčení pylu

Pro klíčení vyžaduje vysušené pylové zrno **vlhkost**

1) Rostliny s **vlhkou bliznou** – pylové zrno bere vlhkost z blizny

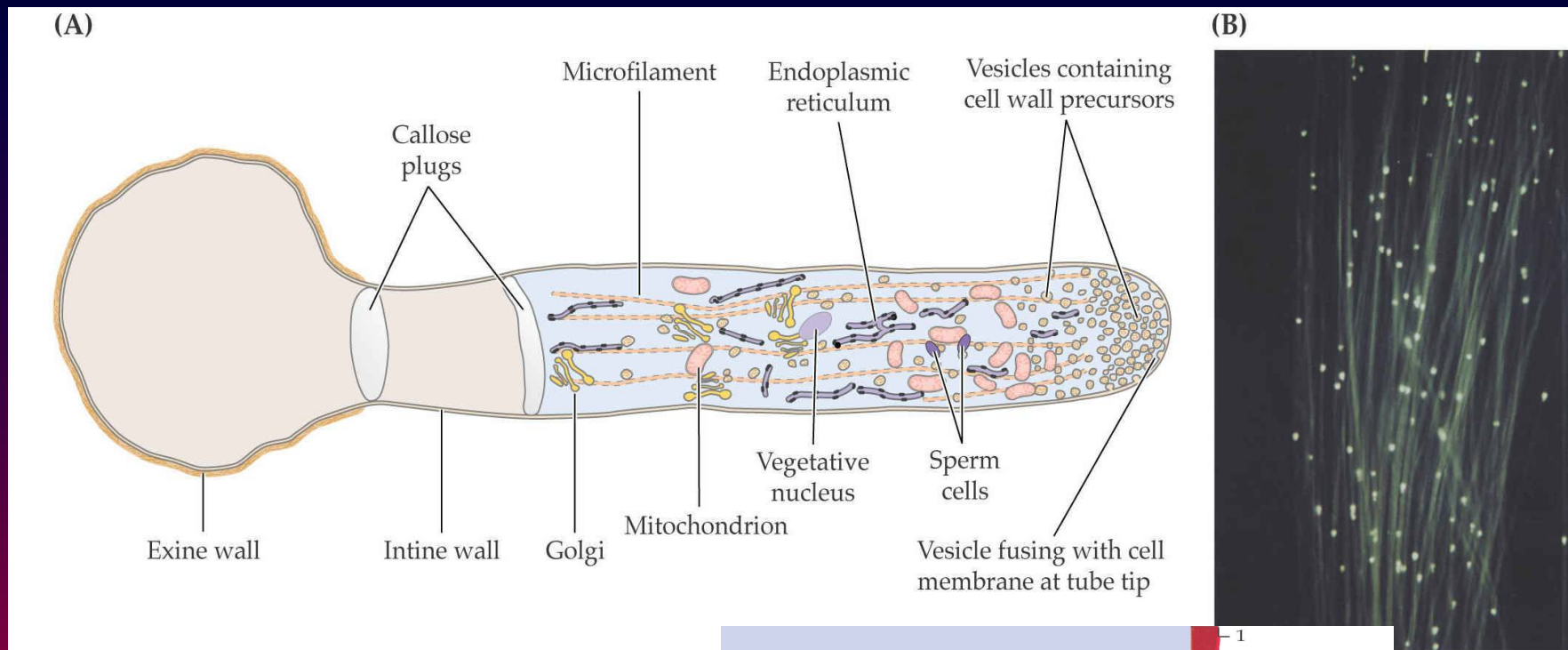
2) Rostliny se **suchou bliznou** – vlhkost je zajištěna **lipidy** na povrchu pylového zrna. Lipidy hrají významnou roli v klíčení pylu.

*Arabidopsis* mutant **cer** – má defektní lipidovou vrstvu – klíčí pouze za extrémní vlhkosti

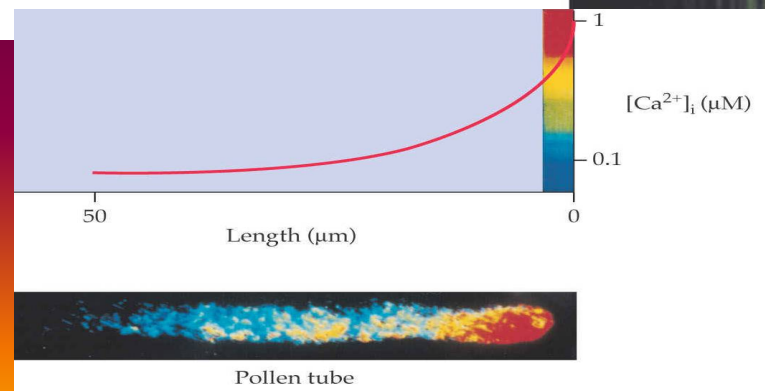
*Arabidopsis* mutant **fiddlehead** – má odlišné lipidy (vysokomolekulární) v epidermálních buňkách listů. Pylová zrna WT na těchto listech klíčí !!!

**Flavonoidy** na povrchu pylového zrna hrají roli v klíčení pylu. Rostliny kukuřice s mutací v genu, kódujícím enzym biosyntézy flavonoidů, jsou self-sterilní.

# Mechanismus klíčení pylu – není dosud přesně znám



**Ca<sup>2+</sup> gradient – pozorován při růstu pylové láčky**



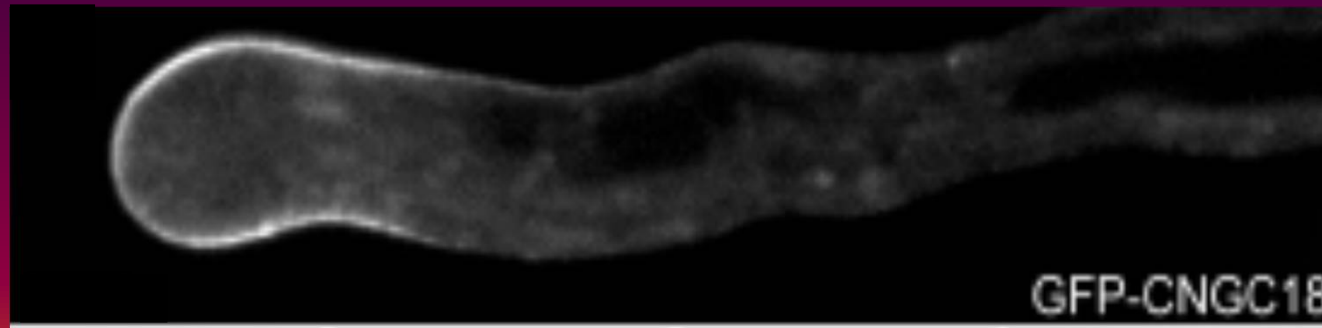
Není známo, jak je  $\text{Ca}^{2+}$  signál přeložen do finální reakce prodlužování pylové láčky.

***cngc18*** – nulový mutant s pylovou sterilitou

**CNGC18** – kóduje kationtový kanál regulovaný cyklickými nukleotidy

**GFP:CNGC18** analýza

*cngc18*: komplementovaný GFP:CNGC18

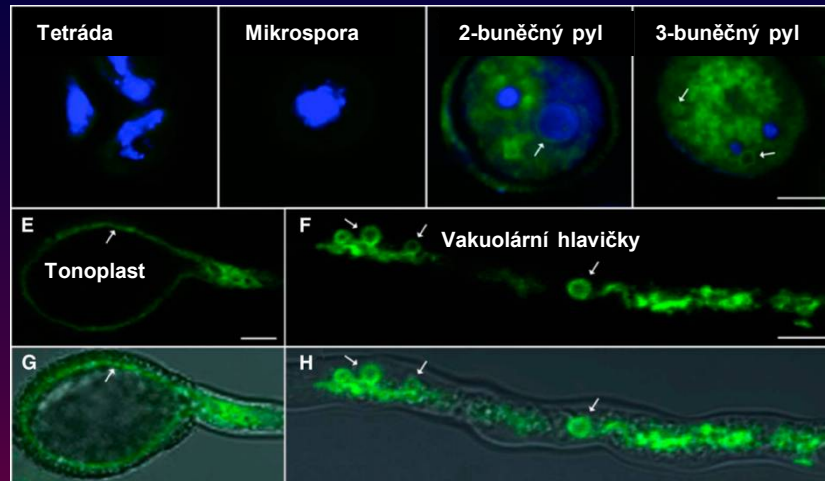


Frietsch S et al. (2007) PNAS 104: 14531 - 14536

**TIP1;3, TIP5;1** – jsou nejrozšířenější vysoce exprimované proteiny ve zralých pylových zrnech

**TIP1;3** – exprimován ve vezikulech a vakuolách vegetativní buňky

**TIP5;1** – exprimován ve vakuolách spermatických buněk



Expresse **TIP1;3-GFP** ve zrajícím pylovém zrně (jádra obarvena modře)

Expresse **TIP1;3-GFP** v klíčícím pylovém zrně; exprese v tonoplastu vegetativní buňky a vakuolárních hlavičkách pylové láčky

Mutanti *tip1;3* a *tip5;1* ukazují krátké pylové láčky pouze v podmínkách při nedostatku dusíku



TIP1;3 a TIP5;1 jsou zapojeny v metabolické dráze N během klíčení pylu

### Update 2016

Di Giorgio JAP et al. (2016) Plant Cell 28: 1063 – 1077

**NIP4;1, NIP4;2** – nezbytné pro vývoj pylu a opylení; mutanti - nízký počet semen, redukované klíčení pylu, redukovaný růst pylové láčky; **NIP4;1** – velice nízká exprese ve zralém pylu, **NIP4;2** – nejvyšší exprese během růstu pylové láčky

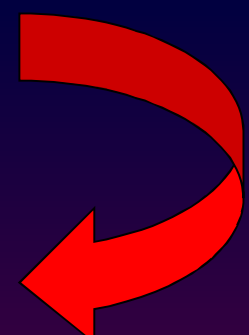
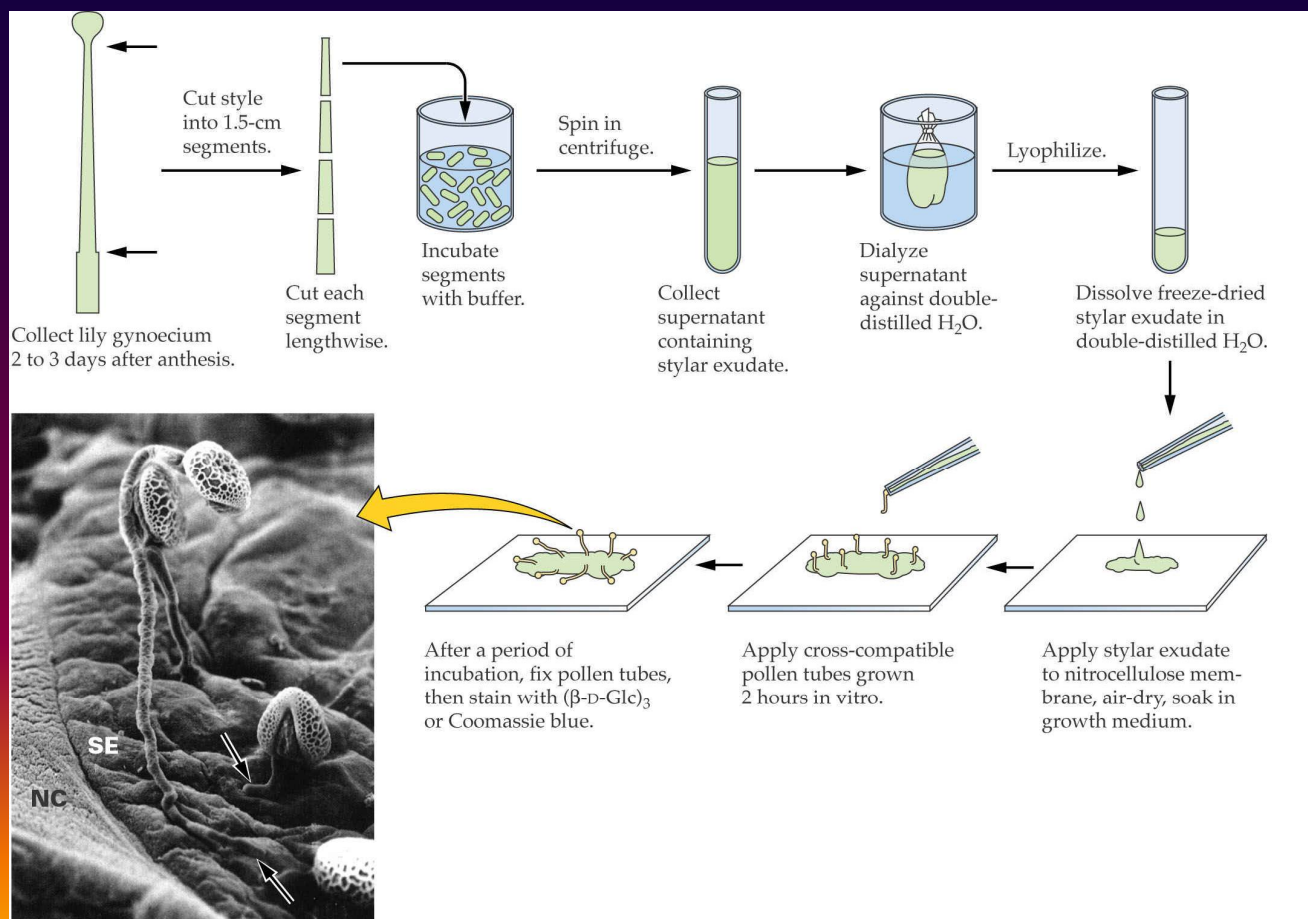
C-terminální domény **NIP4;1, NIP4;2** – fosforylovány pylově specifickými CPK (Ca<sup>2+</sup>- dependentní protein kinázy) => modifikace permeability pro H<sub>2</sub>O

**NIP4;1** – transportuje rovněž amoniak, močovinu, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



# Klíčení se dá indukovat *in vitro* na médiu obsahujícím cukr, kys. boritou, $Ca^{2+}$

Klíčení *in vivo* je vždy rychlejší → Další faktory (?) pocházející z blizny, hrající roli v klíčení pylu



## Další faktory ovlivňující klíčení pylové láčky – rostlinné hormony

**Gibereliny** – stimulují prodlužovací růst

GA deficientní mutanti

Mutanti s defektem v GA signaling

} trpasličí vzrůst, defekt ve vývoji prašníků a pylu

Overexprese enzymu deaktivující GA → Inhibice růstu pylové láčky

**Brasinosteroidy** – stimulují prodlužovací růst

Mutant *cpd* – CPD kóduje cytochrom P450 (biosyntéza BRs)

Mutant *bri1* – BRI1 kóduje receptor BRs

Zastaveno prodlužování pylové láčky



BRs a BRs signaling nutné pro růst pylové láčky



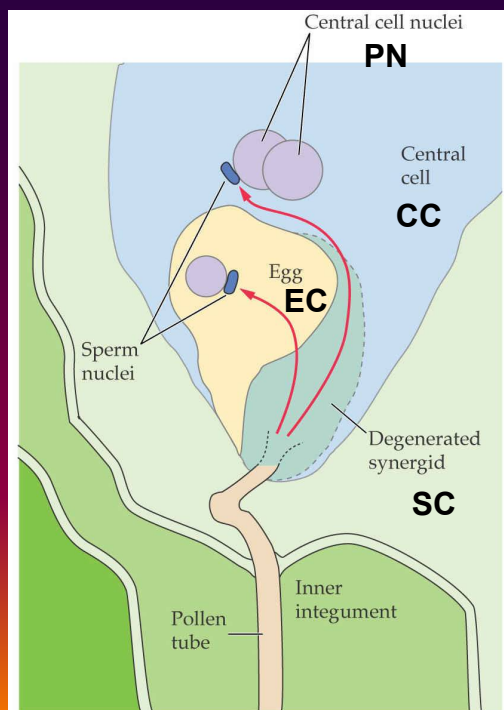
Clouse et al. (1996)  
Plant Physiol 111: 671-678

# f) Opylení, oplodnění

Obě spermatické buňky vnikají do jedné ze synergických buněk (SC).  
Dochází k dvojímu oplodnění:

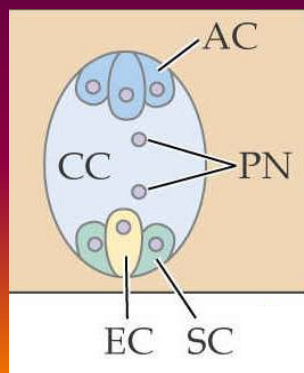
## 1. Oplodnění:

1. spermatická buňka oplodní haploidní vaječnou buňku (EC) => **diploidní zygota**



## 2. Oplodnění:

2. spermatická buňka oplodní diploidní centrální buňku (CC) = spojí se s jádry (PN) => **triploidní endosperm**

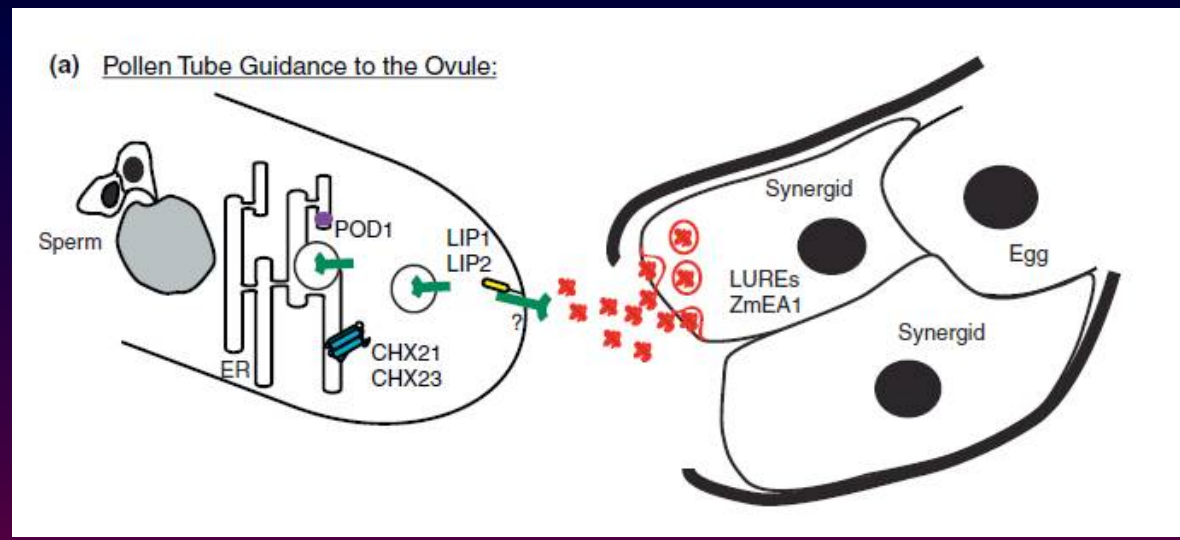
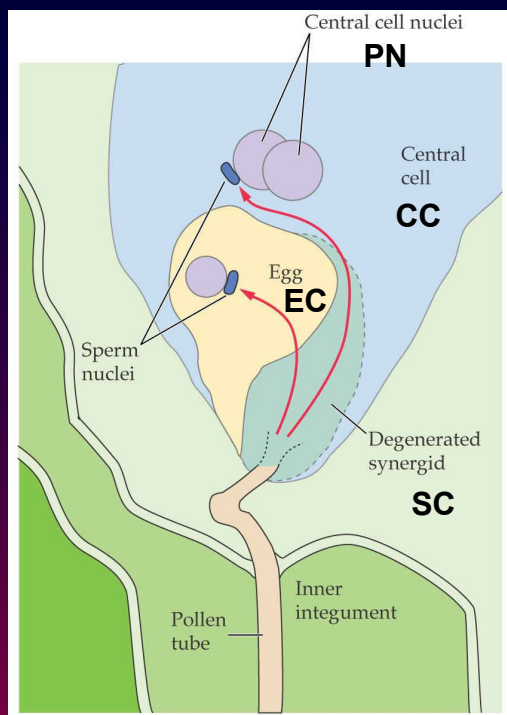


Update 2023

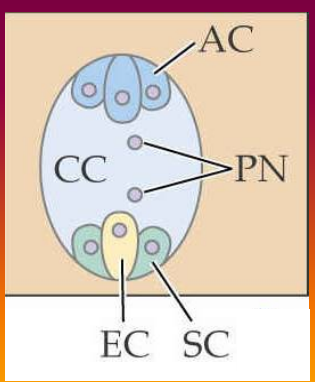
Baillie AL et al. (2023) TIPS August 26: 1360-1385  
(doi: 10.1016/j.tplants.2023.07.011)

Review o současných znalostech oplodnění u rostlin

# 1) Co nutí a směřuje pylovou láčku k embryonálnímu vaku?

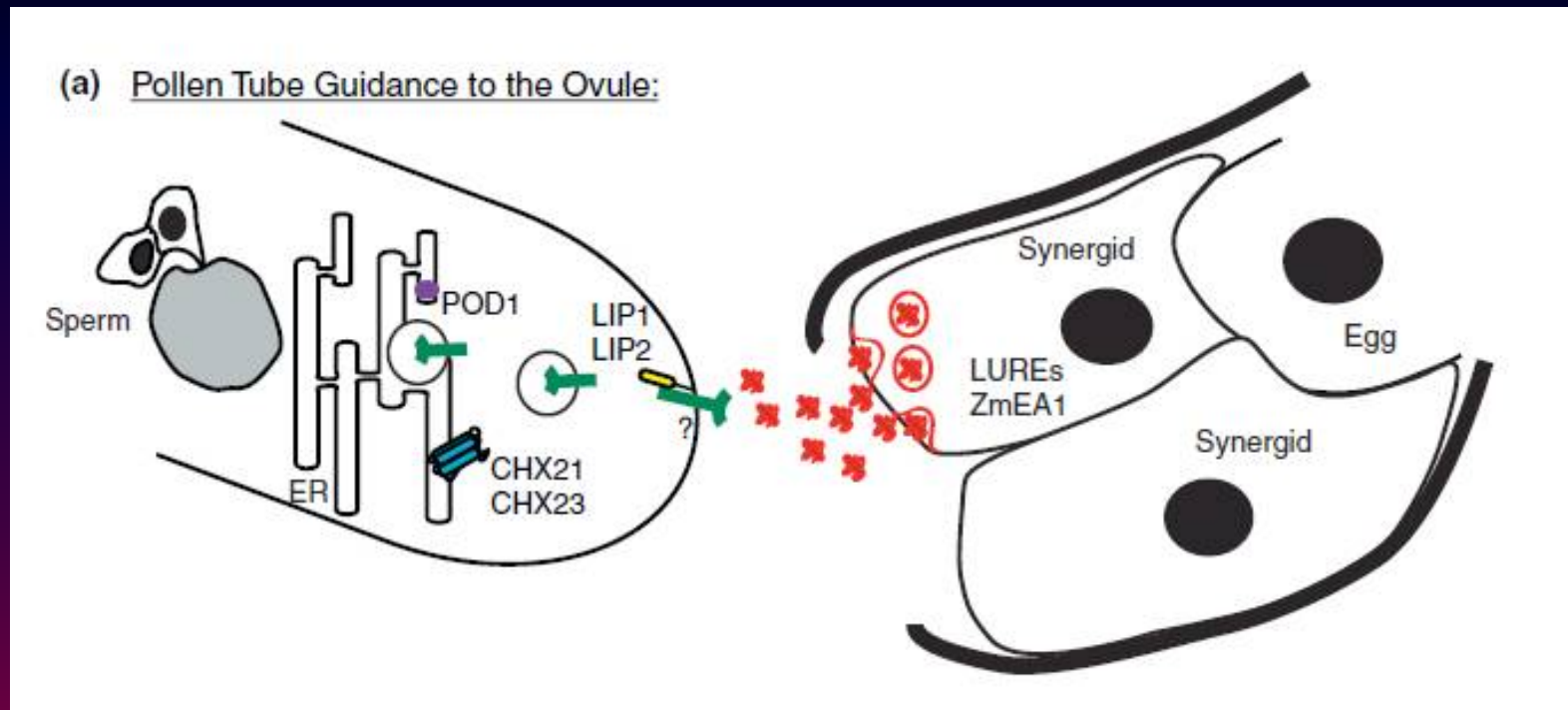


Beale KM, Johnson MA (2013) Current Opinion in Plant Biology 16: 1-8



## Peptidy sekretované synergickou buňkou:

- Kukuřice: EGG APPARATUS1 (ZmEA1)
- Torénie: LURE1/LURE2
- Arabidopsis: AtLURE1



Liu J et al. (2013) *Current Biology* 23: 1-6

***LIP1* a *LIP2* (*Lost In Pollen tube guidance 1* a *2*) – cytoplazmatická receptor-like kináza; k ní je ukotvený neznámý transmembránový protein – receptor (zelený). Neznámý receptor přijímá peptidy LURE a EA1.**

**Vypnutí *LIP1* a *LIP2* vede ke ztrátě orientace růstu pylové láčky.**



# Identifikován receptor atraktantů LURE1 a 2

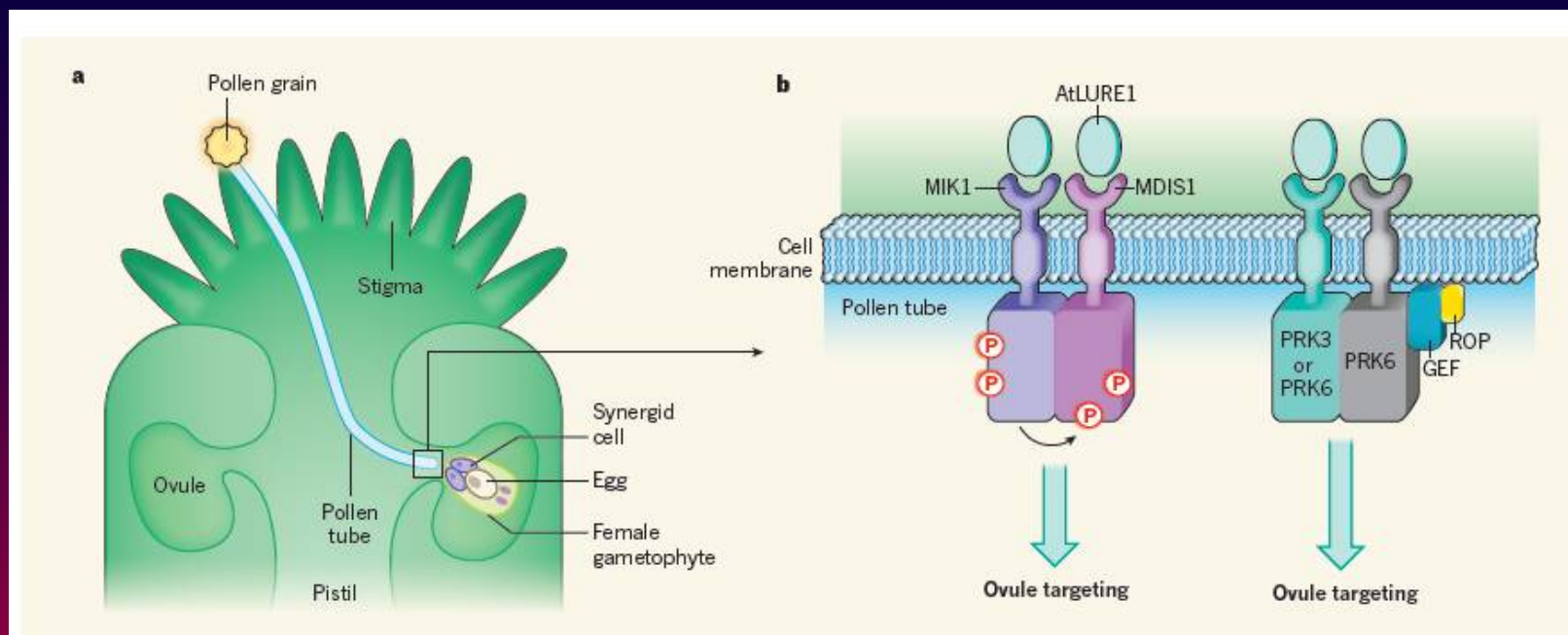
Update 2016

Takeuchi M, Higashiayma T (2016) Nature 531: 245 – 248

Wang T et al. (2016) Nature 531: 241 – 244

Wang T et al.

Takeuchi M, Higashiayma T



1) Dimer proteinů RLK MIK1 a MDIS1; vazba LURE1 vede ke vzniku dimeru a k autofosforylaci MIK1 a přenosu P z MIK1 na MDIS1

2) RLK PRK6 interaguje s druhým PRK6 nebo s PRK3, s guanin-exchange faktorem (GEFs), který aktivuje RhoGTPase protein from plants (ROPs).

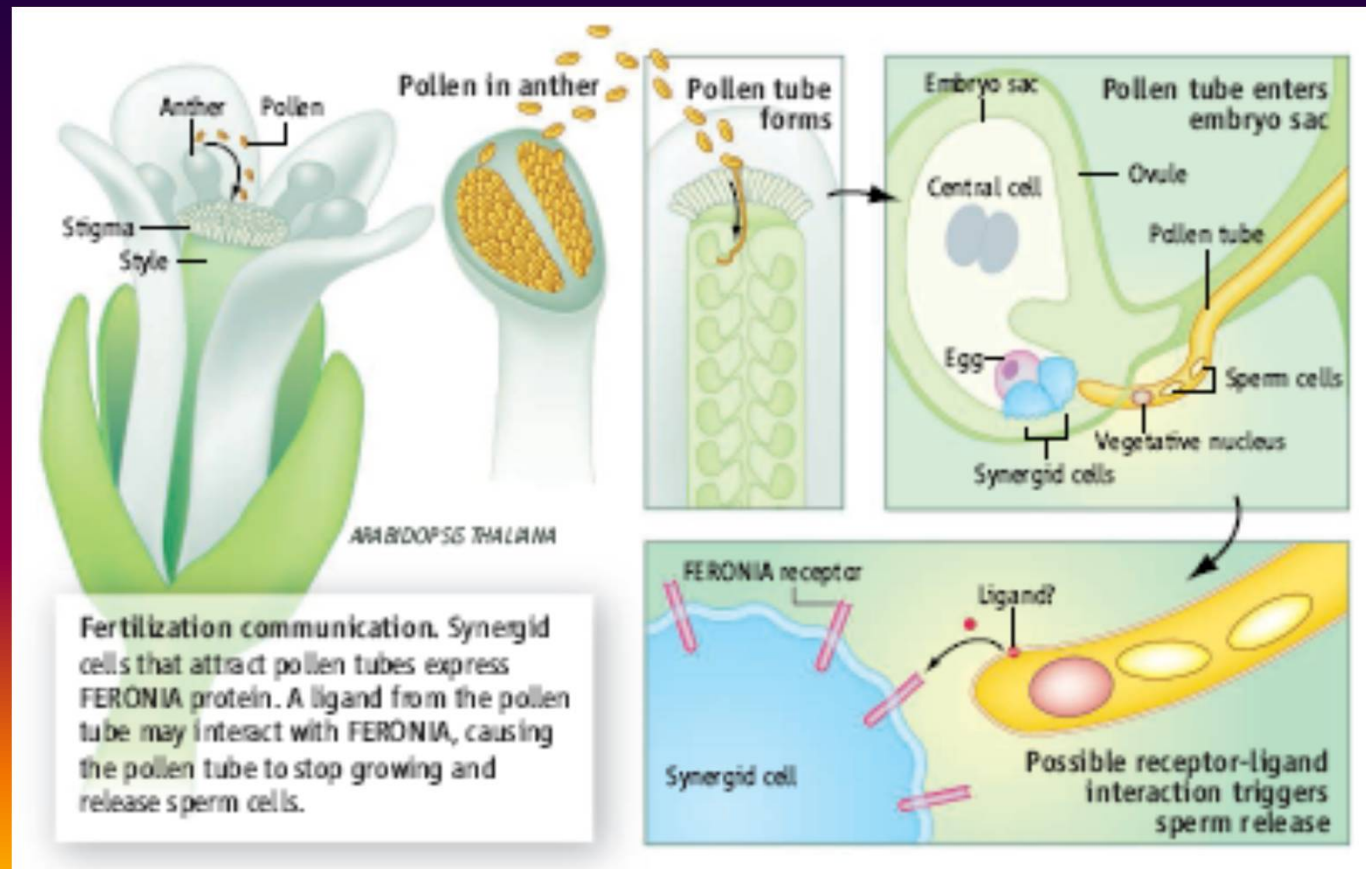
Vazba LURE na tyto transmembránové receptory => nasměrování růstu a vniknutí pylové láčky do synergidy

## 2) Co způsobuje přijetí pylové láčky, její prasknutí a uvolnění spermatických buněk?

Mutant *feronia* – pylová láčka vniká do synergické buňky, ale nepraská a neuvolňuje spermatické buňky

Synergické buňky exprimují protein **FERONIA** (FER, receptor-like kináza)

Neznámý ligand + receptor FERONIA → Zastavení růstu pylové láčky, uvolnění spermatických buněk

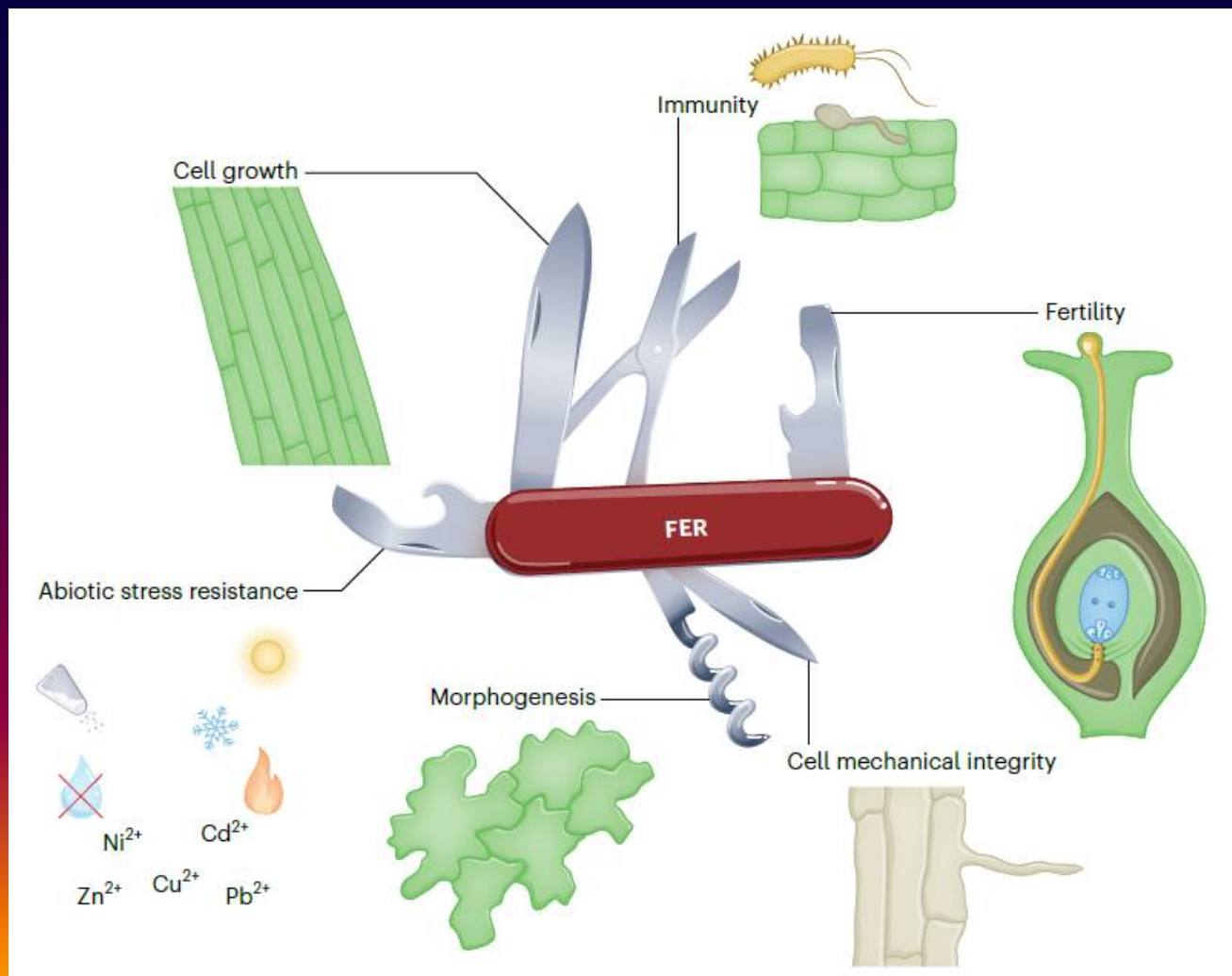


Update 2023

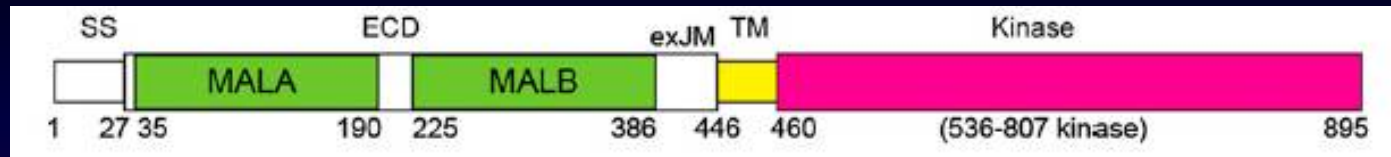
Malivert A, Hamant O (2023) Nature Plants 9: 1018 – 1025

Review o úloze proteinu FERONIA v rostlinách

Protein FERONIA hraje důležitou úlohu v mnoha vývojových procesech rostlin – je pleiotropní

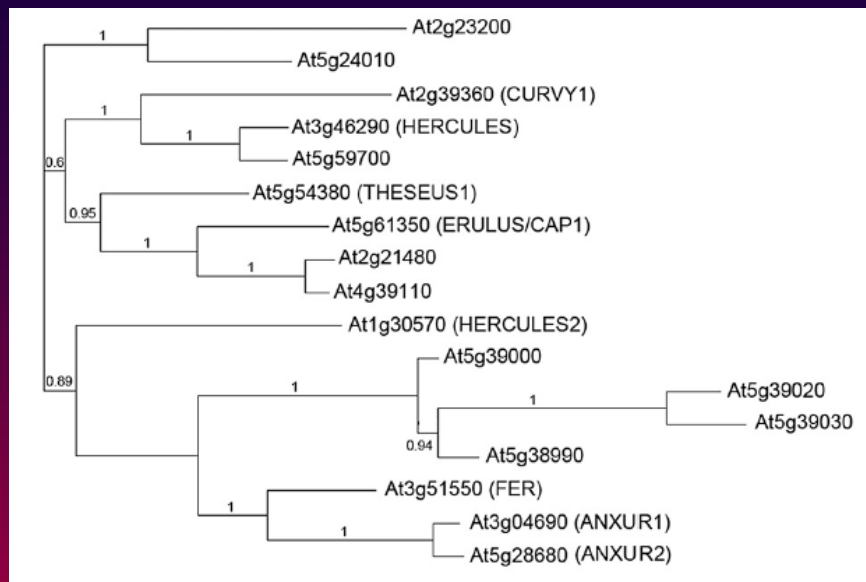


## Struktura a funkce FERONIA



**SS** – signální peptid; **ECD** – extracelulární doména; **TM** – transmembranová doména

**MALA, MALB** – tandemové malectin-like domény; **exJM** – extracelulární juxtamembranová oblast



**FERONIA** – kontroluje růst a samičí fertilitu, zprostředkuje patogenem indukované reakce, nutný pro normální vývoj buněčné stěny.

**RALF** = **R**apid **A**Lkalinization **F**actor = malý peptidový růstový regulátor, inhibuje růst hypokotylu a kořene; **první známý ligand receptoru FERONIA**

**THESEUS1** – příbuzný k FERONIA – funguje jako odhadce stavu buněčné stěny

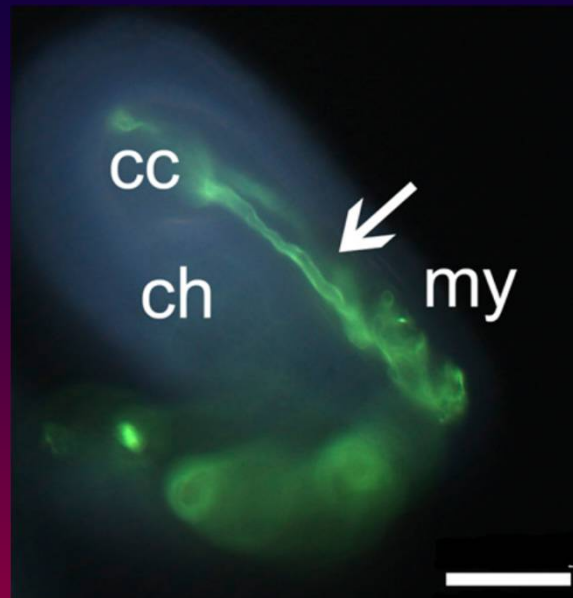
**ANXUR1 a 2** – homology FERONIA – zajišťují integritu pylové láčky a samčí sterilitu

Interakce pylové láčky a synergických buněk vede k programové smrti (PCD) pylové láčky a jedné ze synergid. Synergidy kontrolují tento proces - koordinují hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  synergid v reakci na dynamiku  $\text{Ca}^{2+}$  v pylové láčce a růstové chování láčky.

**FERONIA** je vyžadován k iniciaci a modulaci reakcí k  $\text{Ca}^{2+}$  a jejich spojení s PCD.

Mutant *lorelei* - defekt v uvolnění spermatických buněk

Pylová láčka mutanta po dosažení embryonálního vaku nepraská, ale pokračuje v růstu uvnitř embryonálního vaku směrem k centrální buňce (CC). Tam se ale otočí a směřuje zpátky k mikropyle.



cc – central cell  
my – micropylární konec  
ch – chalaziální konec

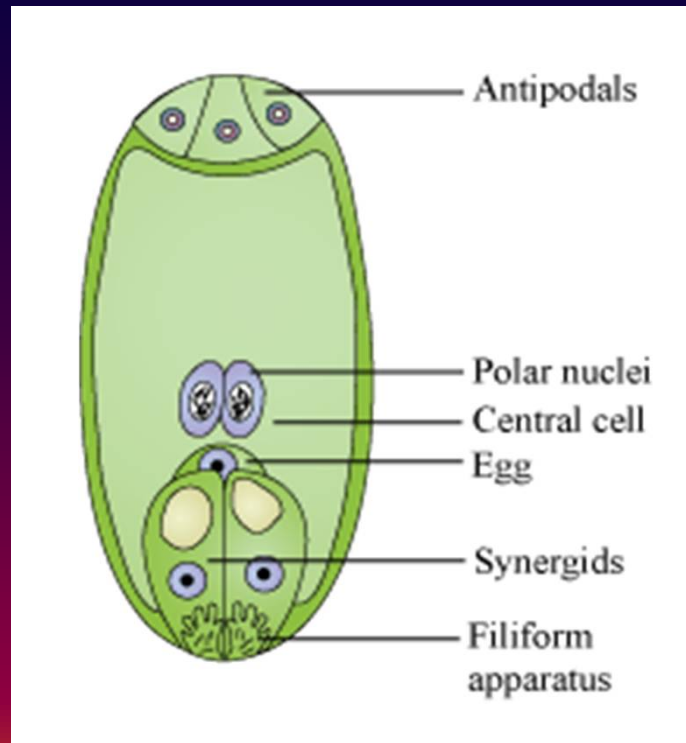
**LORELEI (LRE)** - exprimován v synergických buňkách

**LORELEI** je glucosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein – umožňuje samičímu gametofytu rozpoznat vniknutí kompatibilní pylové láčky a umožňuje uvolnění spermatických buněk.

**Update 2016**

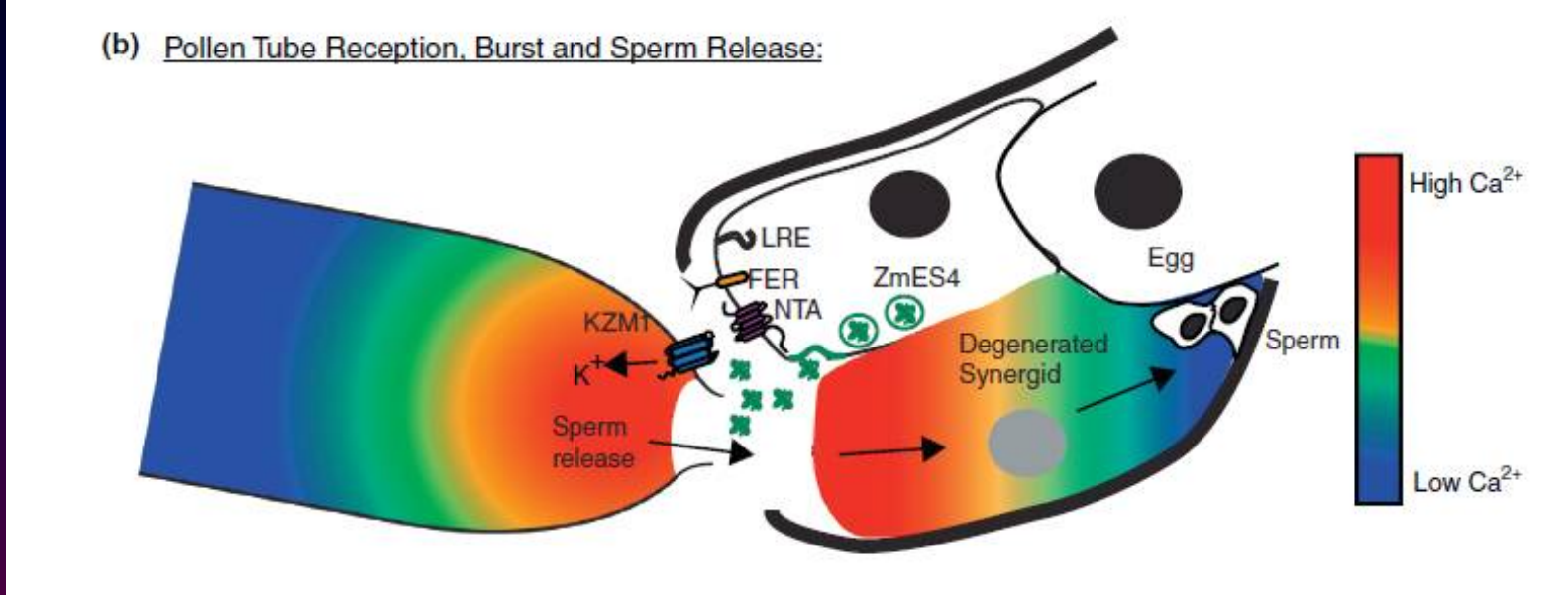
Liu X et al. (2016) Plant Cell 28: 135 – 1052

**Protein LORELEI (LRE) je exprimován v tzv. filiform aparátu – membránová struktura, která je prvním místem styku pylové láčky se samičím gametofytem.**

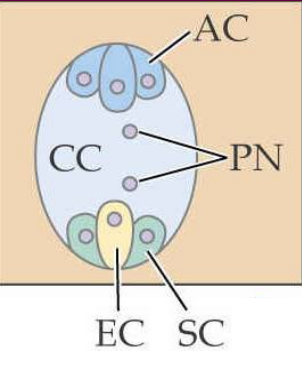


**Ve filiform aparátu je rovněž exprimován receptor FERONIA; proteiny LORELEI a FERONIA spolupracují; LORELEI indukuje expresi FERONIA.**





Beale KM, Johnson MA (2013) Current Opinion in Plant Biology 16: 1-8



**Přiblížení pylové láčky k vaječné buňce**

**Ca<sup>2+</sup> ↑ , exprese proteinů FER, LRE a NTE**

**Prasknutí pylové láčky, uvolnění spermatických buněk**

*anx1anx2* – pylová láčka praská ještě předtím, než dosáhne samičího gametofytu



Geny *ANXUR1* a *ANXUR2* – homology genu *FERONIA*

Funkce *ANX1* a *ANX2* : konstitutivní inhibice prasknutí pylové láčky; specificky exprimované v pylové láčce

Pylová láčka dosahuje samičího gametofytu



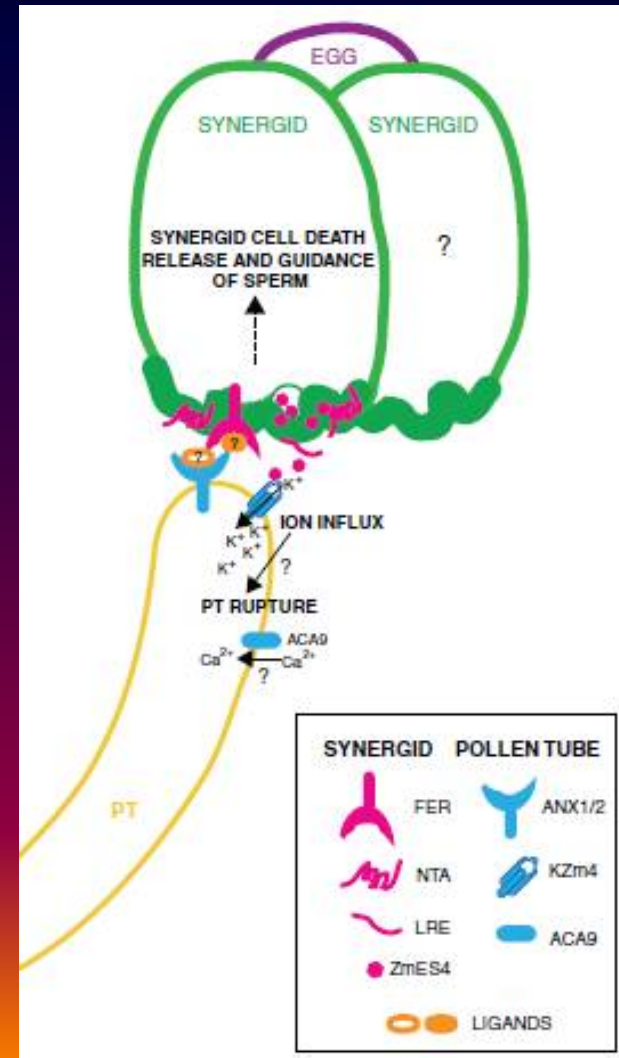
Aktivace dráhy *FERONIA*



Deaktivace *ANX1/ANX2*



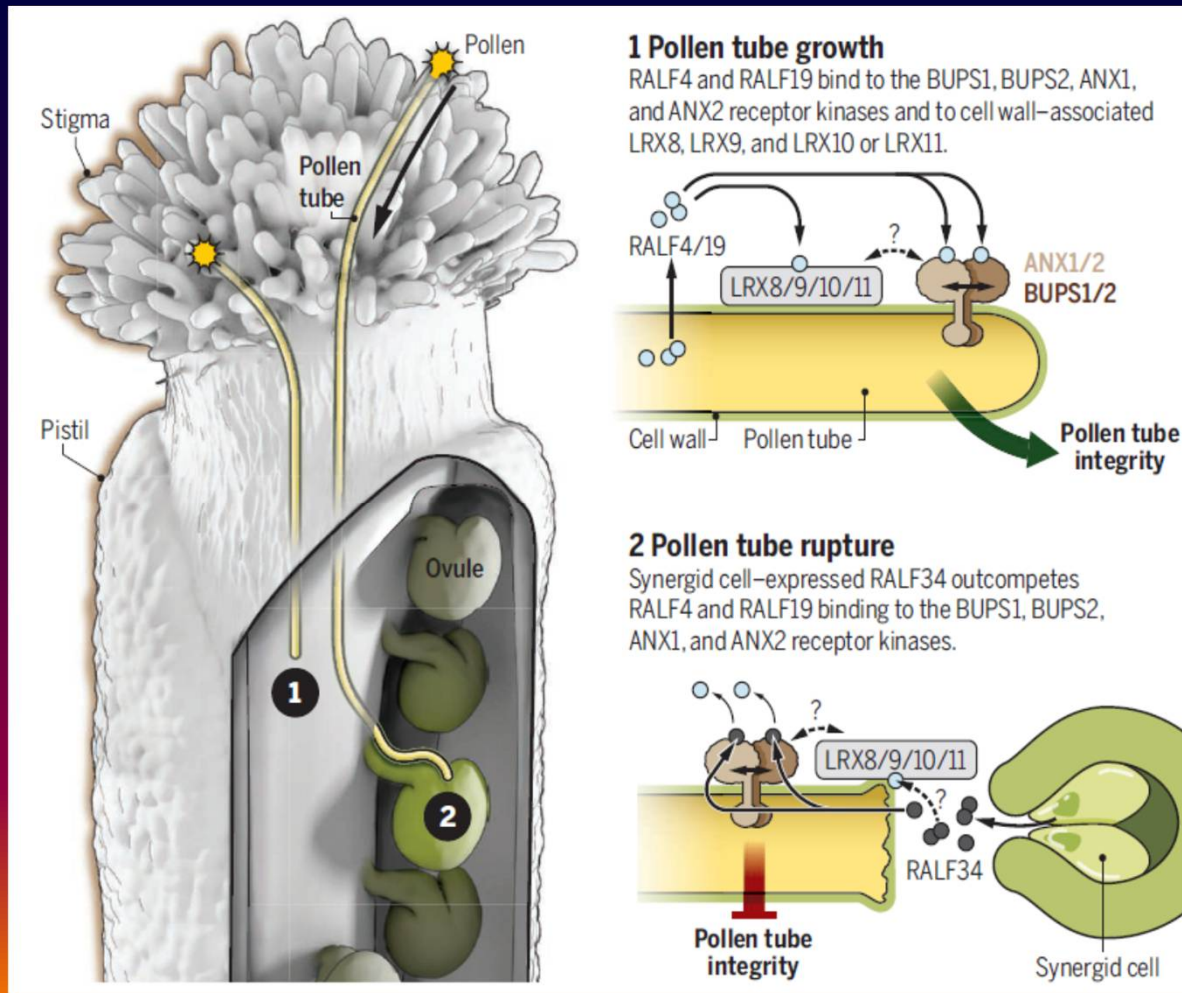
Prasknutí pylové láčky, uvolnění spermatických buněk.



## Update 2017

Ge Z et al. (2017) Science 358, 1596–1600

Mecchia MA et al. (2017) Science 358, 1600-1603



BUPS1/2 – receptory na pylové láčce

ANX1/2 – receptory na pylové láčce

BUPS, ANX = receptor-like kinázy

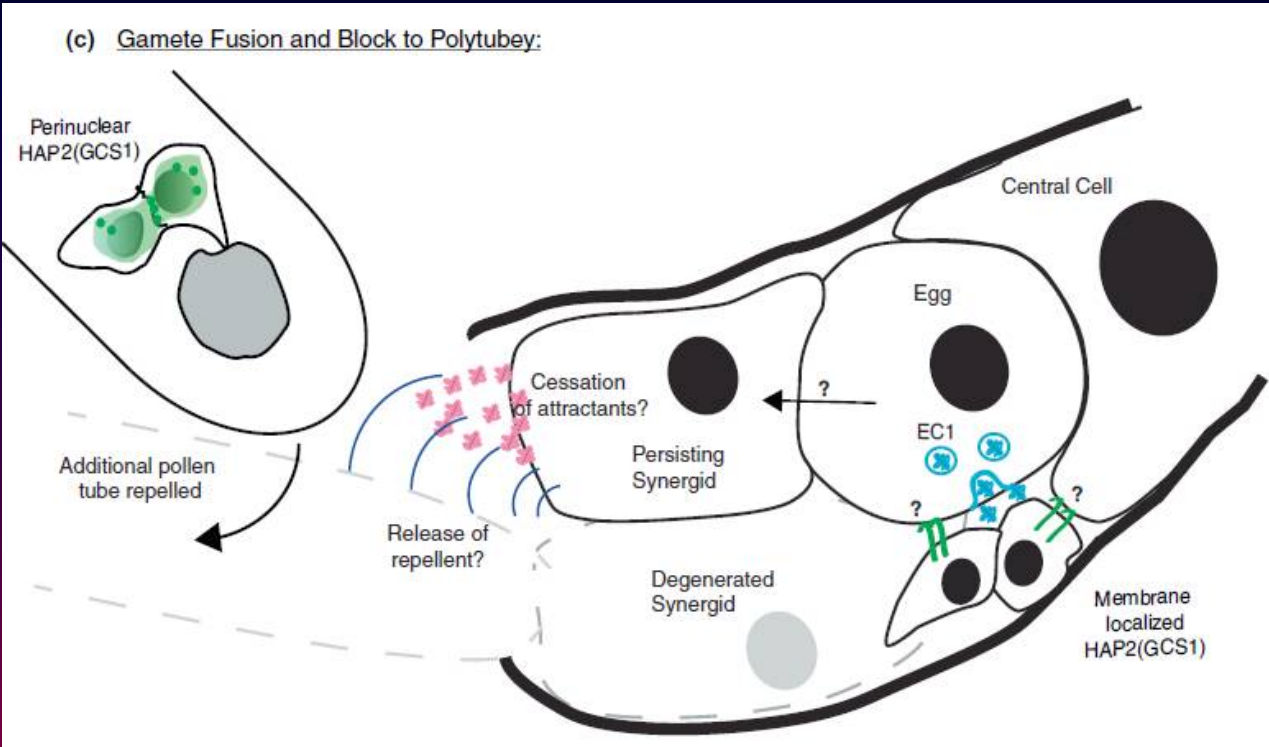
LRX8/9/10/11 – proteiny pylové láčky, funkce není známa, hrají roli ve vývoji buněčné stěny

RALF4, RALF19 – peptidové ligandy pylu; interagují s LRX =&gt; monitorují změny buněčné stěny – přenáší signál dovnitř pylové láčky = udržování integrity pylové láčky

Receptor-ligandové interakce ANX/BUPS s RALF4/19 soutěží se samičím ligandem RALF34 =&gt; deregulace signalizace ANX/BUPS =&gt; prasknutí pylové láčky.

Fig. z Stegmann M and Zipfel C (2017) Science 358, 1544–1645 – shrnuje závěry obou skupin

### 3) Co způsobuje fúzi gamet a zablokování pronikání další pylové láčky?



Beale KM, Johnson MA (2013) Current Opinion in Plant Biology 16: 1-8

**Mechanismus fúze gamet není znám.**

Signál z vaječné buňky (EC1) vede k relokizaci proteinů HAP2 ve spermatické buňce – reorientace proteinu směrem k membráně. Ve fúzi gamet jsou zapojeny neznámé proteiny.

Dva navržené mechanismy zablokování dalšího oplodnění:

- 1) Přerušeni tvorby atraktantů sekretovaných synergickou buňkou (růžová)
- 2) Uvolnění odpuzovačů sekretovaných vaječnou buňkou (modrá)