Vývoj a funkce samčího gametofytu; přispění transkriptomiky a proteomiky

Habilitační práce

David Honys

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy Praha 2014

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem kolegům z Laboratoře biologie pylu Ústavu experimentální botaniky AV ČR za veškerou pomoc, podporu a pracovní zázemí, které mi poskytovali a poskytují a bez jejichž přičinění by práce nevznikla. Jmenovitě děkuji své školitelce a dnes kolegyni Věře Čapkové, která mi před lety dala možnost pracovat na velice zajímavém vědeckém tématu. Samozřejmě nemohu a nechci zapomenout na svou rodinu, obzvláště na svou ženu Barboru a syny Matyáše Davida, Mikuláše Jana a Kryštofa, kteří doma vytvořili velice dynamické a inspirativní prostředí a bez jejichž lásky, trpělivosti a tolerance bych se nemohl tak intenzivně věnovat pedagogické a výzkumné práci. Konečně děkuji svým rodičům za vše, co pro mne v životě dělali a dělají.

Obsah

	Téma a členění práce	**9**
A	**Úvodní komentář**	**11**
A.1	Samčí gametofyt	13
A.2	**Vývoj a funkce samčího gametofytu**	**13**
A.2.1	Zrání pylu: od mikrosporocytu ke zralému pylovému zrnu	13
A.2.1.1	Unikátní buněčná stěna pylového zrna	17
A.2.1.2	Mikrosporová embryogeneze	18
A.2.2	Progamická fáze: od opylení k oplození	20
A.2.2.1	Klíčení pylu	20
A.2.2.2	Růst pylové láčky	21
A.3	**Genetická kontrola vývoje pylu**	**23**
A.3.1	Mutace ovlivňující vývoj a funkci pylu	23
A.3.2	Pionýrské předtranskriptomické studie	29
A.3.3	Pylová transkriptomika	30
A.3.3.1	Kvantifikace gametofytické genové exprese	32
A.3.3.2	Globální genové expresní programy aktivní během vývoje samčího gametofytu	37
A.3.3.3	Druhá haploidní mitosa	39
A.3.4	Posttranskriptomické studie – funkční charakterizace pylových genů	41
A.3.5	Translace v pylu	44
A.3.6	Úsvit pylové proteomiky	47
A.3.6.1	Pylová proteomika	47
A.3.6.2	Pylová fosfoproteomika	51
A.4	**Shrnující poznámky**	**53**
A.5	**Použitá literatura**	**56**
A.6	**Příloha**	**68**
A.6.1	TAB 1. Příklady genů, jejichž mutace narušují vývoj pylu	68
A.6.2	TAB 2. Příklady genů, jejichž mutace narušují progamickou fázi	75
A.6.3	Použitá literatura (příloha)	79

B Soubor vlastních prací **87**

B.1 Honys D, Čapková V (2000) Temporal changes in the RNA distribution between polysomes and postpolysomal ribonucleoprotein particles in tobacco male gametophyte. Biol Plant 43(4): 517-522. 89

B.2 Honys D, Combe JP, Twell D, Čapková V (2000) The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. Sex Plant Reprod 13: 135-144. 95

B.3 Honys D (2001) Isolation of proteins comprising native gene-specific messenger ribonucleoprotein particles using paramagnetic beads. Plant Sci 161: 605-611. 105

B.4 Honys D, Twell D (2003) Comparative analysis of Arabidopsis pollen transcriptome. Plant Physiol 132: 640-652. 113

B.5 Honys D, Twell D (2004) Transcriptome analysis of developing haploid male gametophytes in Arabidopsis thaliana. Genome Biology 5: R85. 127

B.6 Lalanne E, Honys D, Johnson A, Borner G, Dupree P, Grossniklaus U, Twell D (2004) AtPIGC and AtPIGA, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in Arabidopsis. Plant Cell, 16: 229-240. 141

B.7 Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conéjero G, Li X, Twell D, Ward JM, Hirschi KD (2004) Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K+ homeostasis in pollen development. Plant Physiol 136: 2532-2547. 153

B.8 Honys D, Oh SA, Reňák D, Johnson A, Šolcová B, Boudová R, Twell D (2006) Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in Arabidopsis. BMC Plant Biology, 6(1): 31. 169

B.9 Bock KW, Honys D, Ward JM, Padmanaban S, Nawrocki EP, Hirschi KD, Twell D, Sze H (2006) Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. Plant Physiol, 140: 1151-1168. 179

B.10 Dupľáková N, Reňák D, Hovanec P, Honysová B, Twell D, Honys D (2007) Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP) - user-oriented transcriptomic database with easy-to-use graphic interface BMC Plant Biology 7:39. 197

B.11 Gibalová A, Reňák D, Matczuk K, Dupľáková N, Cháb D, Twell D, Honys D (2009) AtbZIP34 is required for Arabidopsis pollen wall patterning and the control of several metabolic pathways in developing pollen. Plant Molecular Biology, 70(5): 581-601. 205

B.12 Honys D, Reňák D, Feciková J, Jedelský PL, Nebesářová J, Dobrev P, Čapková V (2009) Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametopyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing and localisation. Journal of Proteome Research, 8(4): 2015-2031. 227

B.13 Hafidh S, Čapková V, Honys D (2011) Safe keeping the message: mRNP complexes tweaking after transcription. Adv Exp Med Biol 722: 118-136. 245

B.14 Fíla J, Honys D (2012) Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. Amino Acids 43: 1025-1047. 265

B.15 Fíla J, Matros A, Radau S, Peiman Zahedi R, Čapková V, Mock H-P, Honys D (2012) Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated in vitro. Proteomics 12(21): 3229-3250. 289

B.16 Hafidh S, Breznenová K, Růžička P, Feciková J, Čapková V, Honys D (2012) Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in polar-cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis. BMC Plant Biology, 12:24. 311

B.17 Hafidh S, Breznenová K, Honys D (2012) De novo post-pollen mitosis II tobacco pollen tube transcriptome. Plant Signaling Behavior 7(8): 918-921. 331

B.18 Reňák D, Dupľáková N, Honys D (2012) Wide-scale screening of T-DNA lines for transcription factor genes affecting male gametophyte development in Arabidopsis. Sex Plant Reprod 25(1): 39-60. 335

B.19 Ding Z, Wang B, Moreno I, Dupľáková N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pěnčík A, Chen X, Tejos R, Skůpa P, Pollmann S, Mravec J, Petrášek J, Zažímalová E, Honys D, Rolčík J, Murphy A, Orellana A, Geisler M, Friml J (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis. Nature Communications 3:941, doi: 10.1038/ncomms1941. 357

B.20 Reňák D, Gibalová A, Šolcová K, Honys D (2014) A new link between stress response and nucleolar function during pollen development in Arabidopsis mediated by AtREN1 protein. Plant Cell & Environ 37(3): 670-683. 367

B.21 Hafidh S, Potěšil D, Fíla J, Feciková J, Čapková V, Zdráhal Z, Honys D (2014) In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. Biochem Soc Trans 42(2): 388-394. 381

Téma a členění práce

Rozmnožování je charakteristickým rysem živých organismů, který zajišťuje kontinuitu života na Zemi prostřednictvím řady po sobě jdoucích generací. U rostlin dochází ke střídání nepohlavní a pohlavní generace, sporofytu a gametofytu. Ve sporofytní fázi vývoje sestávají jedinci z diploidních buněk a rozmnožují se nepohlavně haploidními sporami vzniklými redukčním dělením ve sporogenní tkáni. Spory klíčí v gametofyt, na němž ve specializovaných orgánech, archegoniích a antheridiích, vznikají taktéž haploidní gamety odděleného pohlaví. Splynutím samčí a samičí gamety vznikne diploidní zygota, jež dá základ další sporofytní generaci. Ve vývojové linii cévnatých rostlin (*Tracheophyta*) je patrná tendence k redukci gametofytu a jeho stále větší funkční závislosti na sporofytu. U vývojově nejpokročilejších rostlin krytosemenných, jež v současnosti se svými více než 280 000 druhy představují naprostou většinu rostlinných druhů, dosáhla redukce gametofytu svého maxima. Právě ta je spolu s dokonalou ochranou reprodukčních orgánů a využíváním mechanismů výběru životaschopnějšího pylu považována za jednu z hlavních příčin jejich evolučního úspěchu (Mulcahy, 1979; Mulcahy et al., 1996). Většina krytosemenných rostlin vytváří oboupohlavné květy obsahující prašníky i pestíky, kde vznikají a vyvíjejí se samčí i samičí gametofyty. Obě struktury - pylové zrno i zárodečný vak - jsou mikroskopické, sestávající jen z několika málo buněk a jsou naprosto neschopné vývoje bez podpory okolního sporofytu. Jediným obdobím, kdy se gametofyt semenných rostlin, a to pouze samčí, vyskytuje samostatně, je stádium zralého pylu po opuštění prašníku během svého přenosu na bliznu.

Právě malé rozměry činily poznávání samčího gametofytu značně komplikovaným. V úplných počátcích výzkumu pylu byl proto studován zejména jeho vnější vzhled (Malpighi, 1675; Purkyně, 1830) a až teprve postupně byly získávány znalosti struktury a funkce pylu a pylové láčky a byly popsány základní jevy související s pohlavním rozmnožováním krytosemenných rostlin, jako je např. existence dvoj- a trojjaderného pylu (Elfving, 1879), rozlišení vegetativní a generativní buňky (Strasburger, 1884) či dvojité oplození (Nawaschin, 1898). Následný značný pokrok ve studiu biologie pylu a pylové láčky byl podmíněn prudkým rozvojem cytologických a molekulárních výzkumných metod. Nemenší vliv mělo i zavedení *in vitro*, semi-*in vivo* a *in vivo* technik a zejména razantní vstup "high-throughput" technologií v posledních dvaceti letech.

Tato práce předložená k habilitačnímu řízení si klade za cíl přispět k poznání regulačních procesů ovlivňujících přirozený vývoj pylu a následné klíčení a růst pylových láček. Práce je tvořena souborem jedenadvaceti recenzovaných prací, jemuž předchází stručný přehled studované problematiky. Prvním či korespondujícím autorem jsem u sedmnácti z nich. Předkládané práce vznikly v letech 2000-2014 buď přímo v Laboratoři biologie pylu Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky nebo ve spolupráci s řadou laboratoří v Evropě i mimo ni. Většina prací navíc vznikala v úzké

spolupráci s Katedrou fyziologie rostlin, později Katedrou experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty University Karlovy za aktivní účasti řady jejích studentů. Publikace, jejichž jsem autorem či spoluautorem, jsou v textu a v přehledu použité literatury zvýrazněny tučným řezem. Práce naší laboratoře byla po celou dobu podporována řadou výzkumných grantů Grantové agentury České republiky, Grantové agentury Akademie věd České republiky, Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, The Royal Society, NATO a BBSRC.

A Úvodní komentář

A.1 Samčí gametofyt

Vývoj samčího gametofytu krytosemenných rostlin představuje komplexní proces, který vyžaduje koordinovanou spolupráci rozličných buněčných typů a pletiv a s tím související specifickou genovou expresi. Na tomto procesu se podílejí pletiva gametofytická (mikrospora, zrající pylové zrno, pylová láčka) i sporofytická (prašník, tapetum, vodící pletiva čnělky). Gametofytickou vývojovou fázi je možno rozdělit na dvě na sebe navazující období, vývojové a funkční.

Vývojová fáze se odehrává v prašných pouzdrech a je ukončena uvolněním zralých pylových zrn z prašníků. Je pro ni charakteristická funkční specializace dvou buněčných typů – vegetativní buňky a samčích gamet, buněk spermatických, které představují samčí zárodečnou linii. Tento proces je podložen dvěma na sebe navazujícími buněčnými děleními a v jeho průběhu dochází k výraznému morfologickému i fyziologickému rozrůznění zmíněných buněk doprovázenému masivní syntézou buněčné stěny pylového zrna a ukládáním řady ochranných a zásobních látek.

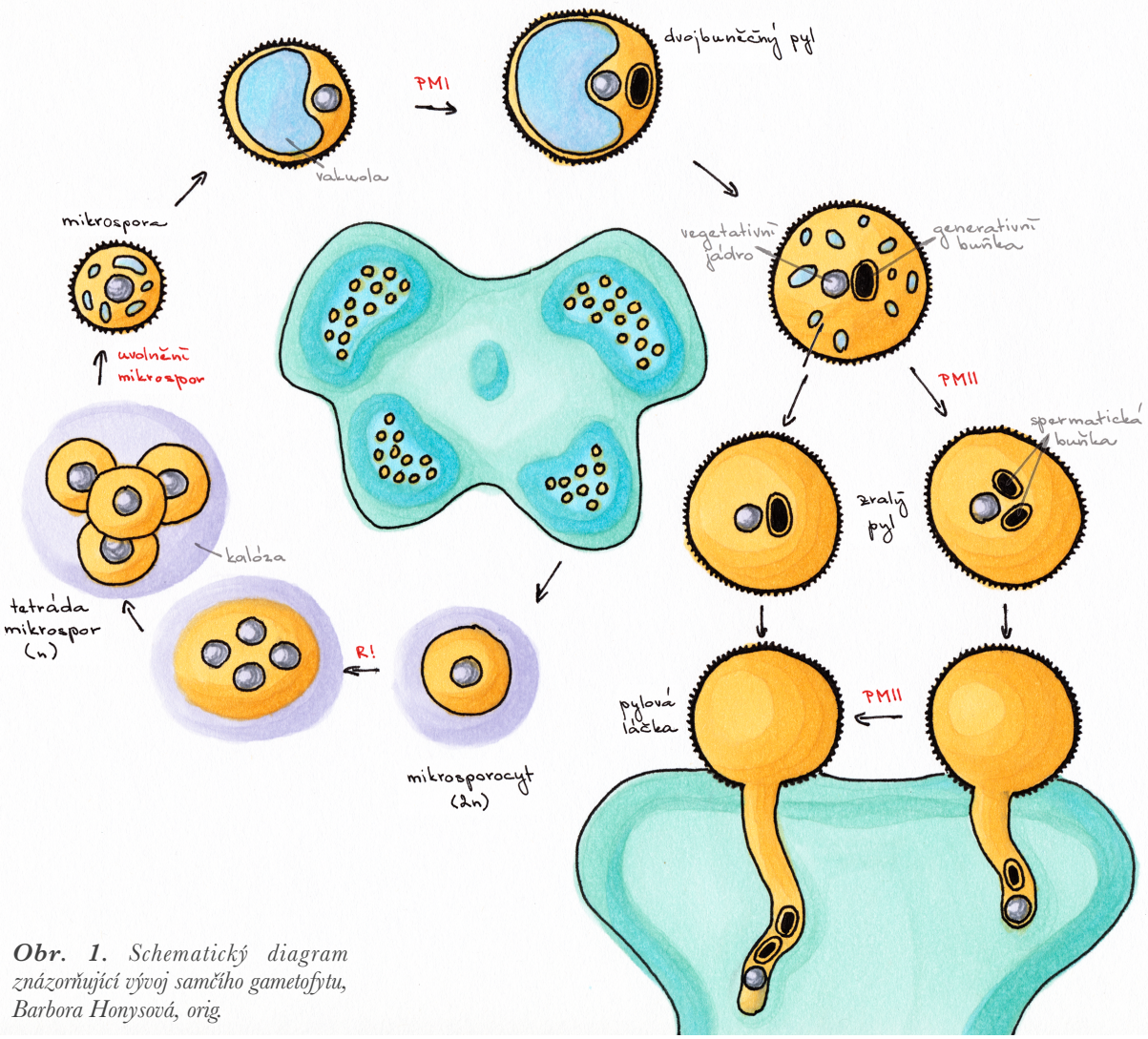
Funkční neboli progamická fáze začíná přenesením pylu na bliznu, pokračuje růstem pylové láčky a končí dvojitým oplozením. Ani tento proces nepostrádá na zajímavosti a mimo vlastní bouřlivý růst pylové láčky – pylová láčka je nejrychleji rostoucí buňkou rostlinného těla – je v současné době vysoce aktuálním tématem vzájemná aktivace pylu a pletiv pestíku a komunikace mezi oběma gametofyty, samčím a samičím.

Samčí gametofyt představuje zejména ve srovnání se sporofytem jednoduchý a vysoce redukovaný systém, který tak poskytuje unikátní příležitost ke studiu vývojové regulace genové exprese na mnoha úrovních a funkčních interakcí mezi různými typy buněk (Ma, 2005; **Honys et al., 2006; Twell et al., 2006**; Borg et al., 2009; Berger and Twell, 2011; Kessler and Grossniklaus, 2011; Twell, 2011; Dresselhaus and Sprunck, 2012; Sprunck et al., 2012; Loraine et al., 2013).

A.2 Vývoj a funkce samčího gametofytu

A.2.1 Zrání pylu: od mikrosporocytu ke zralému pylovému zrnu

Vysoce redukovaný samčí gametofyt krytosemenných rostlin představuje dvoj- nebo tříbuněčné pylové zrno, jehož úlohou je produkce dvou samčích gamet a jejich dopravení k samičímu gametofytu, zárodečnému vaku, kde dojde k dvojitému oplození (Bedinger, 1992; Bedinger et al., 1994; Smyth, 1997; Dresselhaus, 2006). Vlastní vývoj pylu, tedy proces mikrosporogeneze a mikrogametogeneze, byl již mnohokrát popsán (Mascarenhas, 1989; Scott et al., 1991; Bedinger, 1992; McCormick, 1993; Twell, 2002; **Honys et al., 2006**; **Twell et al., 2006**; Berger and Twell, 2011; Twell, 2011). Diploidní mateřské buňky mikrospor (mikrosporocyty) se nacházejí v prašnících, v prašných pouzdrech obklopených čtyřmi



Obr. 1. *Schematický diagram znázorňující vývoj samčího gametofytu, Barbora Honysová, orig.*

buněčnými vrstvami - tapetem, střední vrstvou, endotheciem a epidermis. Zde mikrosporocyty sekretují stěnu sestávající z β-1,3-glukanu, kalosy, a poté se během dvou meiotických dělení rozdělí ve čtyři haploidní mikrospory tvořící tetrádu (Obr. 1). Mateřské buňky mikrospor navzájem komunikují prostřednictvím cytoplasmatických můstků, což umožňuje synchronizaci jednotlivých meiotických dělení v celém prašníku. II. meiotické dělení je následováno syntézou kalosových stěn také mezi jednotlivými mikrosporami v tetrádě (Horner, 1977).

V době meiotického dělení mikrosporocytů se buňky tapeta diferencují v dvojjaderné polární sekreční buňky postrádající primární buněčnou stěnu, především v místě kontaktu s prašnými pouzdry. Tyto buňky obsahují výjimečné množství ribosomů, mitochondrií, endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a specializovaných organel bohatých lipidy, tapetosomů (Ting et al., 1998; Hsieh and Huang, 2005), a to zejména v blízkosti plasmatické membrány hraničící s prašnými pouzdry. I buňky tapeta jsou propojeny cytoplasmatickými můstky, což umožňuje koordinaci jejich aktivit. Recentní studie transkriptomů pletiv prašníků různých rostlinných druhů ukázaly precizní kontrolu

aktivity a následné programované buněčné smrti buněk tapeta a koordinace těchto procesů s vývojem pylu (viz Huang et al., 2011).

Mladé mikrospory v tetrádách podstupují bouřlivý vývoj doprovázený syntézou buněčné stěny sestávající z vnitřní intiny a vnější exiny. Po vytvoření částečně zformované exiny jsou mikrospory z tetrád uvolněny. K tomu dochází díky aktivitě směsi enzymů sekretovaných buňkami tapeta, jejíž zásadní složkou je kaláza (β-1,3-glukanáza) zodpovědná za rozpouštění kalosy (Scott et al., 2004). Správné načasování sekrece kalázy je jedním z kritických momentů mikrosporogenese a jeho narušení je jednou z příčin pylové samčí sterility (Worrall et al., 1992). Volné mikrospory rychle nabývají na velikosti a obsahují větší množství malých vakuol (Obr. 1). Tyto časem splývají v jedinou velkou vakuolu vyplňující většinu objemu mikrospory, jejíž přítomnost bývá spojována s přesunem původně centrálně uloženého jádra na přesně určené místo na periferii buňky. Samotný proces přesunu není pasivním jevem jen v důsledku růstu vakuoly, ale procesem dynamickým vyžadujícím aktivní účast mikrotubulů (Park et al., 1998; Twell et al., 2002; Oh et al., 2010). V tomto období také dochází k dokončení tvorby buněčné stěny syntézou intiny. Buňky tapeta jsou během mikrosporogenese mimořádně metabolicky aktivní. Sekretují do prostoru prašných pouzder množství bílkovin, lipidů, sacharidů a sekundárních metabolitů, které jsou využívány vyvíjejícími se mikrosporami k syntéze membrán, tvorbě exiny a v neposlední řadě jako zdroj energie (Pacini, 1990). Přes tuto zjevnou důležitost tapeta lze dosáhnout správného dozrání funkčního pylu v podmínkách *in vitro* již od pozdějších vývojových stadií mikrospor, pochopitelně za přítomnosti základních živin (Tupý et al., 1991).

Mikrospory s jádrem umístěným u stěny podstupují výrazně asymetrické dělení, I. haploidní či pylovou mitosu (PMI, Obr. 1). Výsledkem tohoto dělení jsou dvě nestejné buňky, buňka vegetativní a generativní. Obě se vyskytují v prostoru ohraničeném původní buněčnou stěnou mikrospory a generativní buňka je posléze zcela pohlcena svou vegetativní sestrou. Z terminologického hlediska také celý systém v tomto okamžiku přestává být mikrosporou a stává se nezralým pylovým zrnem. I. pylová mitosa představuje kritický moment ve vývoji samčího gametofytu, jeho hlavní zlomový bod spočívající v potvrzení nastoupeného gametofytického vývojového programu, jak ukázalo studium populací RNA (**Honys and Twell, 2003, 2004**) a bílkovin (Holmes-Davis et al., 2005; Noir et al., 2005; Sheoran et al., 2006). Generativní buňka také tvoří základ samčí zárodečné linie; ta však u rostlin nemá dlouhého trvání, zahrnuje vlastně jediné mitotické dělení a končí dvojitým oplozením (Berger and Twell, 2011; Twell, 2011). Zvrácení gametofytického vývojového programu na sporofytický je mnohem jednodušší u jednobuněčných mikrospor než u dvojbuněčných pylových zrn (Gaillard et al., 1991). Po skončení PMI jsou exprimovány pozdní pylově specifické geny a jejich aktivace již způsobuje nezvratnost gametofytické cesty (**Honys and Twell, 2004**; Wei et al., 2010). V případě narušení

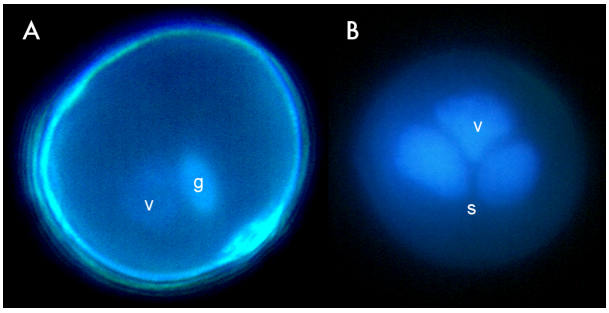
asymetričnosti mitotického dělení, ať už centrifugací (Terasaka and Niitsu, 1987), pomocí látek inhibujících formování mikrotubulů, např. kolchicinu (Zaki and Dickinson, 1991; Eady et al., 1995), či mutací genů zodpovědných v mikrosporách za organizaci a orientaci pole mikrotubulů dojde k vytvoření dvou podobných buněk vykazujících charakteristiky vegetativní buňky. Takovými geny jsou u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh.) *GEMINI1* (GEM*1*) kódující bílkovinu asociovanou s mikrotubuly MOR1/GEM1 (Park et al., 1998; Park and Twell, 2001; Twell et al., 2002) a jeho tabákový ortolog kódující protein TMBP200 (Oh et al., 2010). Tím bylo prokázáno, že buněčný osud vegetativní buňky představuje výchozí stav, zatímco asymetričnost PMI je nutnou podmínkou pro následnou indukci samčí zárodečné linie (Twell, 2011). Všechny tyto skutečnosti ukazují na nezastupitelnou roli asymetrického dělení pro určení dalšího vývoje obou dceřiných buněk.

Vegetativní buňka mladého pylového zrna se vyznačuje hustou cytoplasmou s množstvím organel a zásobních látek, mezi nimiž nalezneme i RNA a bílkoviny. Generativní buňka naproti tomu dědí z mikrospory jen velmi malou část cytoplasmy a organel. Zatímco jádro generativní buňky obsahuje vysoce kondensovaný chromatin, vegetativní jádro setrvávající v G1 fázi buněčného cyklu a obsahující dekondensovaný chromatin je větší s vyšším množstvím pórů. I na základě této skutečnosti můžeme usuzovat na daleko větší transkripční aktivitu vegetativního jádra ve srovnání s jádrem generativní buňky. Ani ta však není zanedbatelná (Borges et al., 2008). Vyvíjející se mladé pylové zrno se také vyznačuje značnou metabolickou aktivitou; v období od I. pylové mitosy do stadia plné zralosti se jeho objem zvětšuje dvakrát, obsah celkové RNA stoupá sedmkrát a obsah mRNA dokonce třináct- až dvacetkrát (Tupý, 1982; Schrauwen et al., 1990). Vegetativní buňka mimoto akumuluje značné množství sacharidových, lipidových i proteinových rezerv důležitých pro rychlý růst pylové láčky (Pacini et al., 2006).

Závěrečnou fází dozrávání pylového zrna je jeho dehydratace. Ve zralém pylu v době anthese rapidně klesá obsah vody až na hodnoty v rozmezí méně než 6 % (*Populus*) a 35 % a více (trávy; Heslop-Harrison, 1987). Stupeň dehydratace má pravděpodobně vztah k životaschopnosti pylu po uvolnění z prašníku. Pyl *Cucurbita pepo*, který neprochází dehydratační fází, si po anthesi zachovává svou životaschopnost jen po velice krátkou dobu (Pacini et al., 1997). Míra dehydratace pylového zrna souvisí s přítomností osmoprotektantů, např. disacharidů, prolinu a glycinbetainu, chránících zejména buněčné membrány a bílkoviny před poškozením (Schwacke et al., 1999).

Generativní buňka podstupuje ještě jedno mitotické dělení, II. haploidní či pylovou mitosu (PMII), na jejímž konci jsou dvě samčí gamety, první a druhá buňka spermatická. Podle časování PMII před nebo až po vyklíčení pylového zrna sestává zralý pyl ze dvou nebo tří buněk (Obr. 2), buňky vegetativní a generativní (dvojbuněčný pyl), anebo buňky vegetativní a dvou buněk spermatických (trojbuněčný pyl). Dvojjaderný typ pylu, který

můžeme považovat za evolučně starší, se vyskytuje u přibližně 70 % druhů krytosemenných rostlin (Brewbaker, 1967), nicméně trojbuněčný pyl se během evoluce objevil několikrát nezávisle na sobě. Zajímavostí je, že u druhu *Annona cherimola* (česky láhevník čerimoja, čeleď Annonaceae, řád Magnoliales) koexistují oba typy pylu, dvojjaderný i trojjaderný, v jednom prašníku a poměr mezi nimi závisí na teplotě, které je květ při zrání pylu vystaven (Lora et al., 2009). Vegetativní jádro zůstává v těsné fyzické vazbě s oběma buňkami spermatickými i po ukončení PMII. Zmíněný komplex se anglicky nazývá „male germ unit" (MGU) a zastává naprosto zásadní úlohu nejen při dopravě spermatických buněk k vajíčku, ale zejména v přímé komunikaci mezi buňkami a jejich jádry náležejícími k somatické a zárodečné linii (McCue et al., 2011) a snad i v regulaci jejich genové exprese (Slotkin et al., 2009).



Obr. 2. *Dvojbuněčný a trojbuněčný pyl. Dvojbuněčný pyl chmele otáčivého (Humulus lupulus; A) a trojbuněčný pyl bezu černého (Sambucus nigra; B) obarvený DAPI (Park et al., 1998). Jaderná DNA ve vegetativní (V), generativní (G) a spermatických (S) buňkách je označena popisky (převzato z* ***Honys et al., 2006****).*

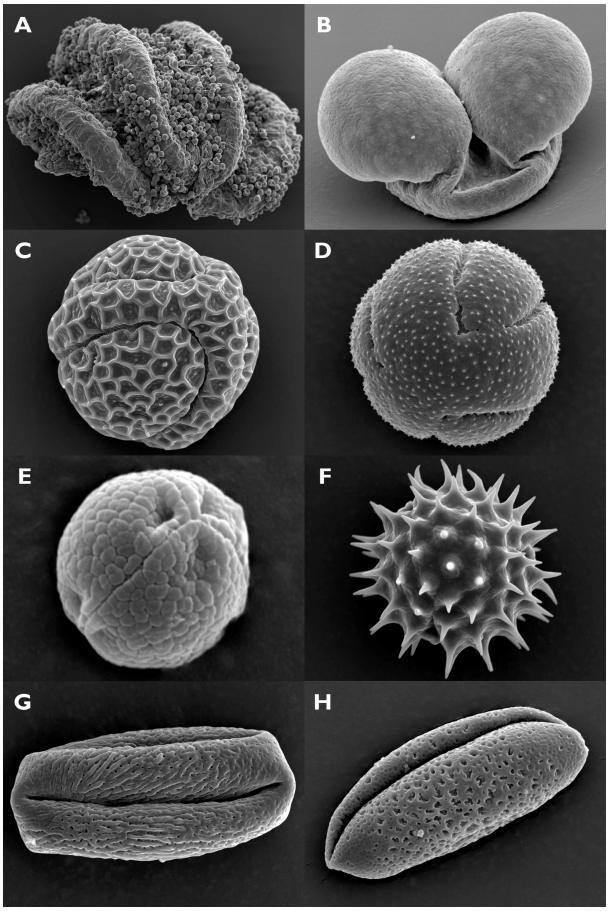
Po dopadu na bliznu se pyl rehydratuje, aktivuje a brzy se na jeho povrchu v místě jednoho z pórů v exině objevuje vegetativní buňka přetvořená v pylovou láčku. Pylová láčka roste vodícím pletivem čnělky směrem k mikropyle vajíčka a nese vegetativní jádro a obě spermatické buňky ve své špičce (Heslop-Harrison, 1987; Bedinger et al., 1994; Krichevsky et al., 2007).

A.2.1.1 Unikátní buněčná stěna pylového zrna

Specializované aktivity a biologická role pylového zrna se odráží v jedinečném složení buněčné stěny, která jej obklopuje. Pylová stěna a její obaly izolují a chrání samčí gametofyt a jeho cenný náklad a dále zprostředkovávají komplexní komunikaci s povrchem blizny (Scott et al., 2004). Vnitřní vrstva stěny, intina, je gametofytického původu. Naproti tomu vnější vrstva, exina, je z největší části původu sporofytického. Její syntéza začíná již v mikrosporách ve stádiu tetrád, bezprostředně po ukončení meiosy. Mikrospory v tetrádách syntetizují z vnější strany plasmalemmy pektinocelulosovou primexinu, která funguje jako matrix pro ukládání prekursorů sporopoleninu před jejich následnou polymerizací. Sporopolenin patří mezi chemicky nejodolnější známé biopolymery a jeho úlohou je ochrana vnitřního prostředí pylového zrna (včetně genetické informace) po jeho uvolnění z prašníku. Jedná se o komplexní sloučeninu mastných kyselin a fenylpropanoidů. Ačkoli biochemické dráhy vedoucí k syntéze sporopoleninu nejsou zcela známé, jeho syntéza vyžaduje úzkou spolupráci mezi mikrosporami a buňkami tapeta (Dobritsa et al., 2009; Dobritsa et al., 2010; Ariizumi and Toriyama, 2011). Exina není kolem pylového zrna rozprostřena rovnoměrně; v místech ztenčenin nebo v oblastech postrádajících

sporopolenin vznikají apertury (klíční póry), kudy po opylení vyrůstají pylové láčky. Počet a velikost apertur a konečná povrchová úprava exiny (Obr. 3) jsou pod striktní kontrolou sporofytu (Dobritsa et al., 2011; Dobritsa and Coerper, 2012).

Tvorba pylových obalů je ukončena v pozdějších stádiích mikrogametogeneze, kdy jsou zbytky degenerujících buněk tapeta ukládány na povrch pylového zrna. Pylové obaly určují adhezivitu, barvu a vůni pylového zrna. Díky tomu se uplatňují při hydrataci pylu a při jeho komunikaci pylu s pletivy pestíku. Žlutá až nachová barva zralého pylu je důsledkem přítomnosti karotenoidů a fenylpropanoidů. Tyto vlastnosti stejně jako často komplikovaná povrchová struktura sporopoleninu se velmi liší mezi jednotlivými druhy. U druhů využívajících služeb živočišných opylovačů je pyl často vybaven složitými strukturami usnadňujícími přilnutí k přenašeči, zatímco u druhů opylovaných větrem tyto struktury chybějí (Obr. 4).

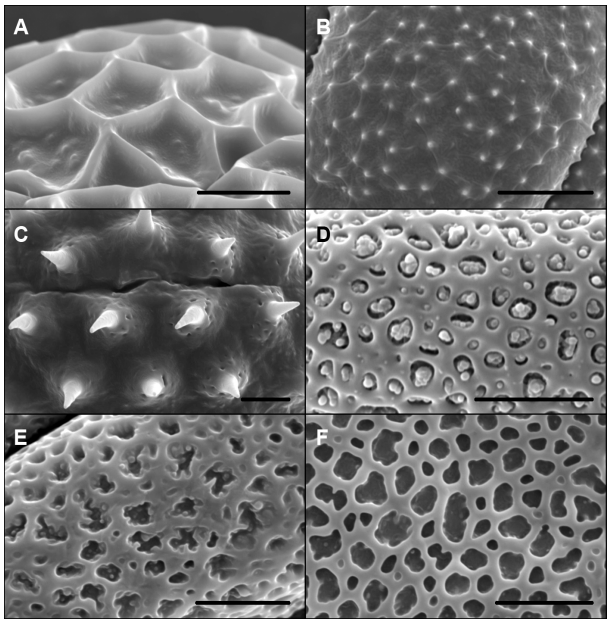


Obr. 3. *Morfologie pylových zrn různých rostlinných druhů. Skenovací elektronové mikrografy otevřeného prašníku citlivky stydlivé (Mimosa pudica; A), pylu borovice lesní (Pinus sylvestris; B), mučenky modré (Passiflora caerulea; C), máku setého (Papaver somniferum; D), citlivky stydlivé (Mimosa pudica; E), slunečnice roční (Helianthus annuus; F), tabáku virginského (Nicotiana tabacum; G) a chocholatice dvoubarevné (Eucomis bicolor; H).*

A.2.1.2 Mikrosporová embryogeneze

Mikrospory se normálně vyvíjejí v pylová zrna, ale za určitých stresových podmínek je možné tento vývoj zvrátit a mikrospory mohou nastoupit vývojovou dráhu vedoucí ke vzniku haploidních embryí. Haploidní rostliny jsou sterilní, poněvadž nemohou dokončit meiotické dělení, ale aplikací kolchicinu je možné získat plodné dihaploidní rostliny (Wang et al., 2000). Tato schopnost je spolu s vysokou produkcí mikrospor velice cenná ve šlechtitelské praxi díky produkci dihaploidních linií a rychlé produkci haploidních transformantů.

Androgeneze byla poprvé popsána u prašníků durmanu neškodného (*Durman innoxia*) kultivovaných *in vitro* (Guha and Maheswari, 1964). Od té doby byla publikována řada příkladů úspěšné androgeneze u řady rostlinných druhů. Androgeneze byla úspěšně indukována působením stresu na celé rostliny, poupata, prašníky či isolované mikrospory (Touraev et al., 1997). Rozsah induktivních stresových podmínek je velice široký a závisí na



Obr. 4. *Detailní pohled na strukturu povrchu pylových zrn. Skenovací elektronové mikrografy pylu mučenky stydlivé (Mimosa pudica; A), máku setého (Papaver somniferum; B), slunečnice roční (Helianthus annuus; C), papáji obecné (Carica papaya; D), chocholatice dvoubarevné (Eucomis bicolor; E) a Clivia (F). Délka úsečky je vždy 5 µm (převzato z* ***Honys et al., 2006****).*

rostlinném druhu stejně jako na vývojovém stádiu mikrospory či pylu. Mezi nejúčinnější patří hladovění či osmotický stres indukovaný manitolem (ječmen), teplotní šok (řepka olejná a paprika roční) a teplotní šok doplněný hladověním (pšenice a tabák). Androgeneze může být indukována také nedostatkem dusíku (tabák), chladovým stresem (kukuřice), ošetřením mikrospor kolchicinem (řepka olejka, pšenice a kukuřice), auxinem (pšenice, ječmen) či jinými látkami nebo působením gama záření (řepka olejka, pšenice, kukuřice) (Maraschin et al., 2005).

Androgenezi můžeme rozdělit do tří částečně se překrývajících fází: fázi indukce, dediferenciace a vývoje uspořádanosti (pattern formation). Období citlivosti k indukčním podmínkám leží v různě širokém vývojovém okně kolem asymetrické I. pylové mitosy (Maraschin et al., 2005). Toto okno se obecně uzavírá v době, kdy mladé pylové zrno začíná akumulovat škrob (Binarová et al., 1997). Popsané časování také dobře koreluje s přepnutím mezi dvěma globálními vývojovými programy při vývoji pylu huseníčku (**Honys and Twell, 2004**), jak bude podrobně popsáno níže. Významného pokroku bylo dosaženo při identifikaci genu zodpovědného za regulaci androgeneze. U řepky olejky je tímto genem BABY BOOM (BBM), který patří mezi transkripční faktory rodiny AP2/EREBP a který je přednostně exprimován během androgeneze a zygotické embryogeneze. Ektopická overexprese genu BBM u řepky a huseníčku navíc indukuje spontánní tvorbu somatických embryí na listech a mladých semenáčcích (Boutilier et al., 2002). Podobnost regulačních procesů ovlivňujících zygotickou a mikrosporovou embryogenezi neleží pouze na úrovni regulačních faktorů, ale v poslední době byla potvrzena i závislost apikálně-bazální polarity nově vznikajícího haploidního embrya na polaritě mikrospory a asymetrického buněčného dělení po indukci embryogeneze (Tang et al., 2013), podobně jako je tomu i v případě asymetrického dělení zygoty (Jurgens et al., 1997). V obou případech byla *in vitro* pomocí techniky EDM (exine-dehisced microspore; Tian and Sun, 2003; Tang et al., 2013) a zygotických kultur (He et al., 2007) prokázána kritická role složení buněčných stěn mateřských buněk – mikrospory a zygoty.

A.2.2 Progamická fáze: od opylení k oplození

A.2.2.1 Klíčení pylu

K opylení dochází v okamžiku dosednutí pylového zrna na povrch kompatibilní blizny. Prvním krokem aktivace pylu je jeho rehydratace. Hydratace pylového zrna je navíc doprovázena masivním příjmem enzymů typu esteráz, kataláz, nukleáz, cellulázy a pektinázy. Zprostředkovatelem příjmu vody při hydrataci spojené se změnou buněčné organizace a architektury membránových struktur se zdají být akvaporiny, z nichž některé vykazují pylově specifickou expresi (Tyerman et al., 2002; Sommer et al., 2008; Soto et al., 2008). Prominentním procesem během rehydratace je formování velkého množství vezikulů, lipidových kapének a vakuol. Zároveň dochází k rapidnímu zvýšení respirační aktivity mitochondrií. Dvojbuněčná pylová zrna mají strukturně jednoduché mitochondrie, ve kterých se v průběhu aktivace pylu objevují početné kristy. Trojbuněčný pyl se naproti tomu vyznačuje přítomností vysoce organizovaných mitochondrií, které se v průběhu aktivační fáze adaptují bez dalších morfologických změn (Raghavan, 1997). Během aktivace pylu dále u většiny druhů dochází k formování polysomů, obnovení silné transkripční a translační aktivity, změnám cytoskeletu a zvýšené aktivitě diktyosomů (Raghavan, 1997). Aktinová filamenta, jejichž přítomnost je pro vyklíčení pylu nezbytná, jsou v aktivovaném pylu uspořádána směrem k místu vypučení budoucí pylové láčky podobně jako gradient vápenatých iontů (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1992). Méně je známo o úloze mikrotubulů, neboť tyto nejsou organizovány v budoucích klíčních pórech, nicméně krátké a větvené mikrotubuly se soustřeďují do podoby límce okolo báze postupně se objevující pylové láčky. Rozbití mikrotubulů pomocí cytoskeletálních jedů má jen velice malý či dokonce žádný efekt na klíčení pylu (Raghavan, 1997; Gossot and Geitmann, 2007).

Pylová zrna obsahují větší či menší množství skladovaných mRNA, které kódují bílkoviny potřebné pro vyklíčení pylu a růst pylové láčky (**Honys et al., 2000; Honys et al., 2009; Hafidh et al., 2011**). Potřeba transkripce a translace pro vyklíčení a růst pylové láčky je u různých druhů různá. U řady zkoumaných druhů bylo zjištěno, že aplikace inhibitoru transkripce, aktinomycinu D, nemá na klíčení pylu ani růst láček *in vitro* žádný vliv (Lafleur and Mascarenhas, 1978). Naproti tomu, aplikace cykloheximidu jako inhibitoru translace má bezprostřední a fatální vliv na klíčení pylu i na růst pylových láček (Čapková et al., 1980; Li et al., 1986), což ukazuje na zásadní potřebu masivní syntézy bílkovin pro zajištění růstu pylových láček. Bylo prokázáno, že i modelový druh huseníček Thalův se chová dle tohoto schématu, alespoň v počátečních fázích růstu pylové láčky *in vitro* (**Honys and Twell, 2004**). Pro zdárný průběh oplození *in vivo* je však nezbytná specifická aktivace transkripce v důsledku interakcí pylové láčky s pletivy pestíku (Leydon et al., 2013; Leydon and Johnson, 2013). Naproti tomu jiný model, tabák, vyžaduje pro splnění své biologické úlohy také aktivní transkripci i v podmínkách *in vitro*. U tabáku dokonce dochází k aktivaci

přepisu některých specifických transkriptů až po proběhnutí druhé pylové mitosy po více než 13 hodinách kultivace *in vitro* (**Hafidh et al., 2012a,b**). Není bez zajímavosti, že klíčení tříbuněčného pylu některých druhů není nijak ovlivněno zablokováním translace, což ukazuje, že tento pyl obsahuje kompletní sadu bílkovin potřebnou pro růst pylových láček.

A.2.2.2 Růst pylové láčky

Po proběhnutí všech důležitých změn spojených s hydratací a aktivací pylového zrna se v klíčním póru objeví pylová láčka. V průběhu tohoto procesu se vegetativní buňka extrémně polarizuje, což je spojeno s reorganizací a migrací organel, zejména Golgiho aparátu a velkého množství vezikulů, směrem ke klíčnímu póru a posléze špičce rostoucí pylové láčky (Malhó and Pais, 1992; Malhó et al., 2006). Rostoucí pylové láčky představují unikátní typ rostlinných buněk, a to zejména pro svou výjimečnou růstovou polaritu a rychlost růstu. Proto vedle kořenových vlásků, vláken bavlníku, houbových hyf či prvoklíčků mechorostů slouží jako výtečný model pro studium buněčného růstu mechanismem polárního vrcholového růstu (Cheung and Wu, 2007; Chebli et al., 2013). Ten může u kukuřice dosáhnout rychlosti až jednoho centimetru za hodinu (Bedinger, 1992). Schopnost vrcholového růstu je podpořena polarizovaným uspořádáním cytoplasmy. Právě proto jsou pylové láčky vhodným studijním materiálem i pro analýzy buněčné kompartmentalizace, metabolických drah a dynamiky ukládání buněčné stěny. Pro morfologii polarizované pylové láčky je charakteristické asymetrické uspořádání buněčných organel, jež v důsledku proudění cytoplasmy vykazují specifický pohyb popisovaný jako „obrácená fontána" (Hepler et al., 2001; Justus et al., 2004; Cardenas et al., 2005; Cardenas et al., 2008). Růst pylových láček je oscilační (viz Geitmann and Ortega, 2009; Chebli et al., 2013) a je korelován s oscilací příjmu kationtů Ca^{2+}, H^+ a K^+ a aniontů Cl^- (Feijo et al., 2001; Cardenas et al., 2008; Zonia and Munnik, 2011). V této souvislosti nepřekvapí objev řady silně exprimovaných a často pylově specifických genů kódujících odpovídající membránové přenašeče, jejichž vyřazení může mít pro správnou funkci pylové láčky fatální důsledky (Sze et al., 2004; Bock et al., 2006; Lu et al., 2011; Chanroj et al., 2013). Apikální oblast rostoucí pylové láčky nazývaná „clear zone" obsahuje téměř výhradně transportní vezikuly umožňující sekreci a endocytickou aktivitu potřebnou pro rychlou buněčnou expanzi právě v oblasti špičky (Hepler et al., 2013) spojenou se syntézou buněčné stěny, která je dokončena po reorganizaci jednotlivých komponent v subapikální oblasti (Chebli et al., 2012). Větší organely bývají uloženy distálněji od subapikálních oblastí cytoplasmy (Lancelle and Hepler, 1992; Moscatelli and Idilli, 2009; Chavarria-Krauser and Yejie, 2011). V této oblasti bývá lokalizován i komplex MGU (Cheung and Wu, 2007; McCue et al., 2011). Výsledky popsaných studií ultrastruktury byly potvrzeny i pozorováním živých pylových láček exprimujících bílkoviny asociované s jednotlivými organelami a značené GFP (Cheung, 2001; Chen et al., 2002; Cheung et al., 2002; de Graaf et al., 2005; Cheung et al., 2010). Kompartmentace organel je stejně jako jejich pohyb podmíněna zejména propracovanou strukturou aktinového cytoskeletu a jeho zřetelnými strukturálními a

dynamickými vlastnostmi v jednotlivých oblastech, jak bylo prokázáno mimo jiné řadou pokusů s látkami inhibujícími polymerizaci aktinových filament (Hepler et al., 2001; Vidali and Hepler, 2001; Vidali et al., 2001; Šamaj et al., 2006). Zatímco úloha mikrofilament v dálkovém vezikulárním transportu i kompartmentaci pylové láčky je poměrně probádaná (viz Yokota and Shimmen, 2006; Cai and Cresti, 2009), funkce mikrotubulů v pylových láčkách zůstává z velké míry nejasnou (viz Cai and Cresti, 2010). V této souvislosti je důležitý fakt, že apikální růst pylových láček krytosemenných rostlin je aplikací inhibitorů tvorby mikrotubulů ovlivněn jen minimálně (Hepler et al., 2001; Gossot and Geitmann, 2007), avšak přítomnost mikrotubulů je nezbytná pro schopnost udržení směru růstu pylové láčky *in vitro* (Gossot and Geitmann, 2007). Co se zdá být jasné, je úloha mikrotubulů v udržování komplexu MGU a jeho koordinované migraci v cytosolu pylové láčky (Astrom et al., 1995; McCue et al., 2011; Sanati Nezhad et al., 2013). U nahosemenných rostlin se navíc mikrotubuly podílejí na apikálním růstu pylových láček koordinovaně s aktinovým cytoskeletem. Mezi apikálním růstem pylových láček nahosemenných a krytosemenných rostlin celkově existují podstatné rozdíly (Anderhag et al., 2000; Justus et al., 2004).

Současné znalosti biologie pylových láček jsou do značné míry založeny na pokusech s pylovými láčkami kultivovanými *in vitro*. Pylové láčky ovšem intimně interagují s okolními pletivy a vodící pletivo hraje významnou roli v procesech vzájemného rozeznání kompatibilního pylu a blizny a následného vedení pylové láčky k vajíčku (viz Higashiyama, 2010; Ivanov et al., 2010; Tantikanjana et al., 2010; Zonia, 2010; Dresselhaus et al., 2011; McClure et al., 2011; De Franceschi et al., 2012). Během své cesty k vajíčku pylové zrno i pylová láčka intenzivně komunikují jak s rozličnými sporofytickými maternálními pletivy, tak s buňkami samičího gametofytu (viz Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013). Díky pokroku v oblasti buněčné a molekulární biologie a možnostem studia v podmínkách *in vivo* a semi-*in vivo* byla již popsána řada signálních molekul i příslušných receptorů.

Přes tyto dílčí pokroky však právě podrobné popsání komunikace mezi samčími a samičími pletivy před oplozením a kaskád signalizačních drah představuje v současné době jednu z nejaktuálnějších výzev v oblasti pohlavního rozmnožování rostlin.

Kompatibilní interakce jsou zajištěny prostřednictvím složitých drah zahrnujících řadu faktorů, například bílkoviny bohaté na cystein (Mollet et al., 2000), glykoproteiny (Bosch et al., 2003), pektiny (Mollet et al., 2000), flavonoidy (Mo et al., 1992), γ-aminomáselná kyselina (Palanivelu et al., 2003) a gradient vápenatých iontů (Zhao et al., 2003). K porozumění mechanismům růstu pylových láček, jejich vedení a oplození navíc značně přispěl i rozvoj technik opylení a oplození *in vitro* (Janson, 1992; Zenkteler, 1992; Higashiyama et al., 2001; Vervaeke et al., 2002; Willemse and Van Lammeren, 2002; Palanivelu and Preuss, 2006; Sandaklie-Nikolova et al., 2007).

A.3 Genetická kontrola vývoje pylu

Postupná charakterizace genové exprese v samčím gametofytu pochopitelně odrážela dostupné metody. První gametofytické geny a jejich funkce byly odhaleny a dosud jsou postupně odhalovány metodami přímé genetiky – studiem mutací. Paralelně s tím probíhaly pokusy popsat komplexnost gametofytické genové exprese a míru jejího překryvu se sporofytickými pletivy. Zde první krok představovaly studie isozymů, které z dnešního hlediska poněkud překvapivě ukazovaly na významný překryv genové exprese v samčím gametofytu a sporofytu u rajčete a ječmene, a to až ze 60 – 72 % (Tanksley et al., 1981; Pedersen et al., 1987). Výsledky pokusů s hybridisací RNA potvrdily míru tohoto překryvu a navíc poprvé ukázaly na podstatně menší komplexnost genové exprese v samčím gametofytu *Tradescantia paludosa* a kukuřice ve srovnání se sporofytickými pletivy (Willing and Mascarenhas, 1984; Willing et al., 1988). Následné hybridizační studie pylových cDNA knihoven pak přiblížily odhad frakce pylově specifických mRNA současným názorům – do blízkosti 10 % (Stinson et al., 1987; Mascarenhas, 1990).

Pro všechny zde popsané přístupy byla charakteristická jejich nespecifičnost; umožnily sice kvantifikovat komplexnost genové exprese, ale nebylo možné jimi příslušné geny identifikovat. Jako naprosto zásadní se z tohoto hlediska ukázal nástup vysoce účinných (high-throughput) metod koncem minulého století, který ohlásil současnou postgenomickou éru, dobu – omik. Jejich využití nejen umožnilo komplexně popsat genovou expresi a její dynamiku během vývoje pylu, ale značně urychlilo i charakterizaci konkrétních gametofytických genů pomocí obrácené neboli reverzní genetiky, k čemuž přispěla i naše laboratoř, zejména v oblastech pylové transkriptomiky dvou modelových druhů (**Honys and Twell, 2003, 2004; Hafidh et al., 2012a,b**), následných cílených studií (**Lalanne et al., 2004; Sze et al., 2004; Hrubá et al., 2005; Bock et al., 2006; Dupľáková et al., 2007; Gibalová et al., 2009; Ding et al., 2012; Reňák et al., 2012; Reňák et al., 2014**), pylové proteomiky a fosfoproteomiky (**Honys et al., 2009; Fíla et al., 2011; Fíla and Honys, 2011; Fíla et al., 2012; Hafidh et al., 2013; Fíla et al., 2014; Hafidh et al. 2014**).

A.3.1 Mutace ovlivňující vývoj a funkci pylu

Mutační analýza představuje vhodný nástroj k identifikaci strukturních a regulačních komponent konkrétních vývojových drah. Mutace ovlivňující vývoj pylu jsou také výtečným materiálem pro analýzu procesů specifikace buněčného osudu a buněčných funkcí. Známe celou řadu gametofytických, ale i sporofytických mutací narušujících vývoj pylu (Příloha A.7, Tab. 1) či progamickou fázi (Příloha A.7, Tab. 2), jejichž geny byly popsány a většinou úspěšně klonovány. Nejdéle známé a dnes již klasické pylové mutace byly nalezeny metodami přímé genetiky a následným pozičním klonováním (např. *gem1*, *duo1*, *duo3*, *tio*) či isolací přilehlých sekvencí (např. *ung3*, *agm*, *hap2*, *hap5*, *hap12*). Naprostá většina mutací však byla identifikována a funkčně analyzována za použití metodických postupů reverzní genetiky. Tyto postupy v kombinaci s vysoce účinnými metodami kvantifikace

genové exprese samozřejmě vedou k exponenciálnímu nárůstu charakterizovaných mutací. Proto zde publikované tabulky (Příloha A.7, Tab. 1 a 2) nemohou postihnout všechny známé mutace, neboť již v okamžiku svého vzniku nutně musejí být zastaralé. Spíše mají sloužit jako jakýsi obecný přehled vybraných skupin genů a jimi kódovaných bílkovin, u nichž byla prokázána souvislost s vývojem a funkcí samčího gametofytu. Jako reakce na postupné zveřejňování podobných přehledů byla v nedávné době zveřejněna databáze „Plant Male Reproduction Database", jejíž webové rozhraní se nachází na adrese www.pmrd.org (Cui et al., 2012). Cílem této databáze je podat přehled všech genů, jejichž aktivita souvisí s pohlavním rozmnožováním rostlin, a po odstranění řady dětských neduhů již poměrně dobře funguje, byť stále nepatří k nejrychlejším.

Poziční klonování vedlo k identifikaci tří tříd mutací postihujících buněčná dělení samčího gametofytu huseníčku na různých úrovních. **gemini pollen1** (*gem1*) vykazuje řadu fenotypových defektů I. pylové mitosy, mezi které patří rovnoměrné, nerovnoměrné či částečné rozdělení mikrospory (Park et al., 1998). Ani jedna z dceřiných buněk nepodstupuje další mitotické dělení a obě buňky nastupují vegetativní vývojovou dráhu. *gem1* také byla první samčí gametofytickou mutací, která byla pozičně klonována, což ukázalo její identitu s paralelně publikovanou mutací *mor1* (Whittington et al., 2001). MOR1/GEM1 je protein asociovaný s mikrotubuly rodiny MAP215/Dis1, který stimuluje růst mikrotubulů na kladném konci a podílí se na organizaci pole mikrotubulů dělícího vřeténka v mitotických mikrosporách (Twell et al., 2002). Stejnou funkci zastává i jeho tabákový ortolog TMBP200 (Oh et al., 2010), což ukazuje na příbuznost kontroly asymetričnosti buněčného dělení a s tím souvisejícího buněčného osudu u dvojjaderného i trojjaderného pylu.

Mikrospory mutanta **two-in-one** (*tio*) jsou schopny dokončit jaderné dělení I. pylové mitosy, ale vyznačují se neschopností dokončit cytokinezi, což vede ke vzniku dvojjaderných pylových zrn. Na rozdíl od *gem1* mikrospory *tio* sice vykazují normální jadernou polaritu, ale byla u nich pozorována řada defektů specifických pro cytokinezi, zejména formování nekompletní kalosové buněčné stěny. Bílkovina TIO byla lokalizována ve fragmoplastu a byla popsána jako Ser/Thr-proteinkináza rodiny FUSED (Oh et al., 2005), která je klíčovou složkou signální dráhy hedgehog u octomilek a savců (Lum and Beachy, 2004). Nedávná studie navíc ukázala obecnou důležitost funkce kinázy TIO pro cytokinesi nejen v gametofytu, ale i ve sporofytických pletivech (Oh et al., 2012).

U letálních mutantů **duo pollen 1** (*duo1*) dochází k normální asymetrické I. pylové mitose, ale II. pylová mitosa není ani započata (Durbarry et al., 2005). *DUO1* kóduje netypický transkripční faktor rodiny MYB podrodiny R2R3 obsahující stejně jako jeho orthology v kukuřici, rýži a tabáku nadpočetnou lysinovou signaturu v R3 MYB doméně, která definuje právě podrodinu DUO1 (Rotman et al., 2005). Protein DUO1 je exprimovaný

specificky v generativní buňce a v buňkách spermatických (Rotman et al., 2005) a představuje první popsaný regulátor působící výlučně v zárodečné linii a přímo regulující aktivitu genů potřebných pro přechod z G2- do M-fáze mitosy (Borg et al., 2011). Generativní buňky v mutantním pylu *duo1* namísto vstupu do II. pylové mitosy tak vstupují do neúplného endocyklu. Recentní analýzy regulačních sítí v samčím gametofytu tabáku naznačily konzervaci klíčové úlohy genů *AtDUO1* a *NtDUO1* v pylu huseníčku a tabáku (**Hafidh et al., 2012a**).

Postupy přímé genetiky sledující narušení štěpných poměrů markerových genů byly úspěšně použity k identifikaci genů účastnících se mikrogametogeneze. V těchto screenech byly většinou využity populace s T-DNA či transposonovými inserty obsahujícími dominantní marker nesoucí resistenci k antibiotikům či herbicidům. Například, je-li přítomností insertu inaktivován klíčový gametofytický gen, u potomstva se poměr odolných rostlin k citlivým může významně lišit od očekávaného poměru 3:1 směrem k meznímu poměru 1:1. Takové screeny navíc vedou k odhalení mutací ve vývojové i funkční fázi stejně jako mutací postihujících samičí gametofyt. Další výhodou popsaného postupu je přímá identifikace mutované sekvence. Takto byla nalezena řada „tagovaných" mutací, které ovlivňují proces mikrogametogeneze (Bonhomme et al., 1998; Howden et al., 1998; Christensen et al., 1998; Procissi et al., 2001; Johnson et al., 2004; **Lalanne et al., 2004a**,b). Mnoho z těchto mutací vede k aborci vývoje pylu, a to řadou mechanismů (Příloha A.7, Tab. 1). Jen pro příklad, **abnormal gametophytes** (*agm*) kóduje transmembránovou bílkovinu (Sorensen et al., 2004), **vha-A** podjednotku vakuolární H^+-ATPázy (Dettmer et al., 2005), **hapless5** (*hap5*) kóduje transkripční faktor rodiny AP2 a **hapless12** (*hap12*) kation-chloridový transportér (Johnson et al., 2004). Mutace v genu **ungud3** (*ung3*) se projevuje zastavením vývoje samčího gametofytu v časně dvojbuněčném stádiu (Lalanne et al., 2004b) z důvodu absence aktivity jím kódované giberelin-2-oxidázy (Singh et al., 2002).

Ve stále rostoucím počtu případů bylo pro objevení a popis genů hrajících roli ve vývoji samčího gametofytu použito charakterizace fenotypových defektů „loss-of-function" způsobených vyřazením (knockout) či snížením (knockdown) funkce konkrétního genu. Jako příklady takových genů mohou sloužit mutace v následujících několika genech s důležitou funkcí během mikrogametogeneze **AtPTEN, ADL1C, AHA3, GPT1, AtbZIP34, DEPOLL, AtREN1** (Gupta et al., 2002; Kang et al., 2003; Robertson et al., 2004; Niewiadomski et al., 2005; **Gibalová et al., 2009**; Dupľáková, 2010; **Reňák et al., 2014**) (Příloha A.7, Tab. 1). V řadě případů takový směr výzkumu ukázala znalost zesílené exprese zkoumaných genů v pylu *AtbZIP34, DEPOLL, AtREN1* (**Gibalová et al., 2009**; Dupľáková, 2010; **Reňák et al., 2014**) (viz níže). Klíčová role pylově specifického homologu proteintyrozinfosfatázy s dvojí specifitou (*AtPTEN*) byla odhalena pomocí exprese RNAi konstruktu (Gupta et al., 2002), a to pod promotorem *LAT52*, který byl před mnoha lety

prvním popsaným pylově specifickým promotorem (Twell et al., 1989). Promotor *LAT52* se tak stal prvním a dosud je zdaleka nejpoužívanějším nástrojem pro cílenou modifikaci exprese genů ve vegetativní buňce samčího gametofytu. V současné době je takových nástrojů celá řada, což umožňuje dále cílit modulaci exprese transgenů podle vývojového stádia či buněčného typu. Vedle pozdního promotoru LAT52 tak máme k dispozici i promotory časné, aktivní v mikrosporách, jejichž aktivita naopak po PMI klesá (*MSP1, MSP2, MSP3* (Honys et al., 2006) a *TCP16* (Takeda et al., 2006)) stejně jako promotory aktivní ve vegetativní buňce (*LAT52*) či v buňce generativní a následně v buňkách spermatických (*DUO1* (Rotman et al., 2005) a *GCS1* (Mori et al., 2006)).

Fenotypové screeny na sníženou fertilitu vedly k identifikaci řady gametofytických mutací postihujících progamickou fázi, které zejména negativně ovlivňovaly schopnost samčí kontroly nad pozdními progamickými událostmi (Wilhelmi and Preuss, 1996; Moore et al., 1997; Christensen et al., 1998; Shimizu and Okada, 2000; Huck et al., 2003; Rotman et al., 2003). Použití Ds transposonových linií vedlo k popsání dvaceti mutací **seth** a **ungud** postihujících funkce jak pouze samčích, tak samčích i samičích gametofytů (Příloha A.7, Tab. 2). Jejich společným znakem byla buď snížená klíčivost pylu, či pomalejší růst pylových láček. Geny *SETH1* a *SETH2* kódují bílkoviny účastnící syntézy glykosylfosfatidylinositolové kotvy (**Lalanne et al., 2004a**). Gen *SETH3* kóduje bílkovinu pravděpodobně se účastnící syntézy vzácných rhamnogalakturonanů. Několik mutantů *seth4* – *seth7* má sníženou klíčivost a schopnost růstu pylových láček, zatímco mutanti *seth8* – *seth10* vykazují pomalejší růst pylových láček a sníženou kompetitivní schopnost. Pylová zrna dalších samčích mutantů se sníženou schopností přenosu mutantních alel, *ungud6*, *ungud9* a *ungud10*, také nemají žádné viditelné fenotypové defekty ve velikosti, vzhledu či životaschopnosti pylových zrn. Popsané geny kódují bílkoviny účastnící se přenosu signálů, syntézy buněčné stěny a metabolismu sacharidů a ethanolu (**Lalanne et al., 2004a**). Poslední zde popsaný Ds-transposonový mutant, *vanguard1* (*vgd1*), vykazuje značně zpomalený růst pylové láčky vodícím pletivem. *VGD1* kóduje pylově specifickou pektinmethylesterázu, jejíž role může být v modifikaci pektinů v buněčné stěně pylové láčky, což může ovlivňovat jejich flexibilitu a roztažnost či schopnost interakcí s pletivy vodícího traktu (Jiang et al., 2005). Vzdáleným homologem genu *VANGUARD1* je i gen *NTP303* (Weterings et al., 1992) isolovaný z tabáku a kódující stěnový glykoprotein (Čapková et al., 1994) s možnou podobnou funkcí. Jeho vyřazení z funkce pomocí technologie RNAi však nevedlo k viditelnému fenotypovému projevu (**Hafidh et al., 2012a**).

Řada samčích gametofytických mutací „tagovaných" T-DNA byla opět zachycena použitím modifikovaného postupu narušených štěpných poměrů, který umožňuje precizní fenotypovou analýzu pylových mutantů. Homozygotní linie s mutací *quartet1* na pozadí byly transformovány T-DNA nesoucí geny pro rezistenci k BASTA a GUS exprimovanými pod silným pozdním pylově specifickým promotorem LAT52 (Johnson et al., 2004). To umožnilo

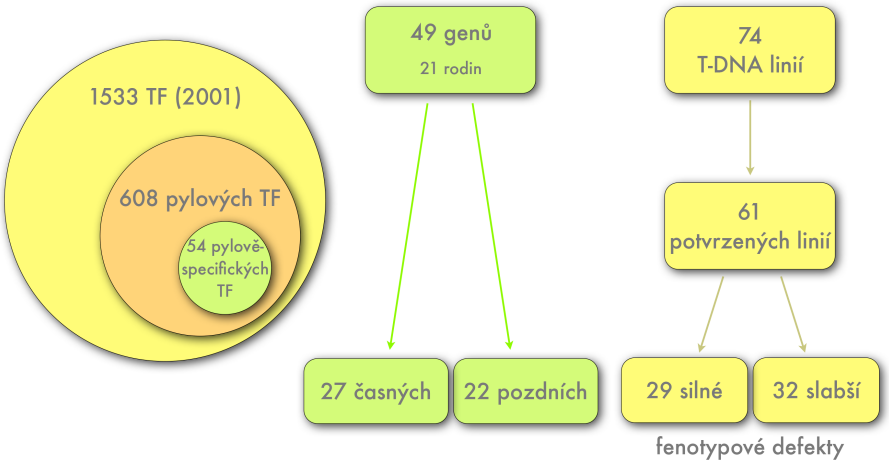
fenotypovou analýzu mutantních pylových láček značených GUS následující po úvodním screenu narušených štěpných poměrů. Popsaný postup vedl k popsání devíti progamických mutantů **hapless** (Příloha A.7, Tab. 2), které je lze rozdělit do několika fenotypových tříd: a) *hap3*, *hap6*, *hap8*, *hap13* a *hap15*, které mají krátké pylové láčky neschopné opustit čnělku; b) *hap1*, jehož pylové láčky neprorostou septem; c) *hap11*, u nichž pylové láčky nevniknou do mikropyle a d) *hap2* a *hap4* s pylovými láčkami chaoticky rostoucími ve vajíčku (von Besser et al., 2006; Frank and Johnson, 2009). Bílkoviny kódované popsanými geny se účastní transportu sacharidů, přenosu látek přes membrány, lokalizace mRNA, degradace bílkovin a energetického metabolismu (Johnson et al., 2004).

Metodické přístupy reverzní genetiky vedly k identifikaci řady dalších genů hrajících důležitou úlohu v konkrétních klíčových procesech progamické fáze. Příkladem může být gen **AtCSLA7** kódující člena podrodiny CSLA enzymů β-glykosyltransferáz (Příloha A.7, Tab. 2). Pylové láčky mutanta *atcsla7* mají narušenou buněčnou stěnu, zejména její roztažnost a stabilitu (Goubet et al., 2003). T-DNA inserce v genu **SPIK** potvrdila důležitost importu draselných iontů pro růst pylových láček. Bílkovina SPIK je členem rodiny draselných kanálů typu Shaker a představuje první kanál aktivní v membránách samčího gametofytu charakterizovaný na molekulární úrovni (Mouline et al., 2002). Následně byla popsána řada dalších membránových přenašečů aktivních v obou fázích vývoje samčího gametofytu (Sze et al., 2004; Bock et al., 2006). Zajímavý fenotypový defekt byl pozorován u mutanta s neotřelým názvem **kinky pollen** (*kip*). Přes silné aberace v růstu pylových láček byla ultrastrukturální zonace organel stejná jako u divokého typu. Jediným rozdílem byla absence kalosových zátek, a to přesto, že ukládání kalosy podél rostoucích pylových láček nebylo narušeno. Obří gen *KIP* kóduje 290-kDa protein podobný proteinu SABRE huseníčku; u obou se předpokládá úloha v sekretorickém aparátu nezbytném pro buněčný růst s tím, že KIP je třeba pro růst polární (Procissi et al., 2003). Analýza mutanta s insercí v genu **no pollen germination1** (*npg1*) vedla k demonstraci důležitosti bílkoviny vázající se na kalmodulin. Přes řadu referencí o úloze vápenatých iontů a kalmodulinu pro klíčení pylu a růst pylových láček byla NPG1 první bílkovinou zprostředkovávající aktivitu systému Ca^{2+}/kalmodulin charakterizovanou na genetické úrovni. Aktivita genu *NPG1* není kritická pro správný průběh mikrosporogeneze a mikrogametogeneze, ale je nezbytná pro klíčení pylu na blizně (Golovkin and Reddy, 2003). Konečně byla popsána i mutace v transkripčním faktoru, a to v genu **AtTAF6** kódujícím jednu ze složek komplexu TFIID. AtATF6 zastává pravděpodobně úlohu selektivního bazálního transkripčního faktoru účastnícího se regulace specifické skupiny gametofytických genů. Popsaná mutace specificky postihuje progamickou fázi, což překvapivě ukázalo na důležitost složek transkripčního iniciačního komplexu u huseníčku i v progamické fázi (Lago et al., 2005).

Příkladem koordinovaně působících transkripčních faktorů v samčím gametofytu může být popsání komplexu proteinů z rodiny MADS a tří faktorů rodiny MYB. Pět

MADS-box proteinů třídy MIKC* - AGL30, AGL65, AGL66, AGL95 a AGL104 koordinovaně řídí expresi řady genů během vývoje pylu, a to jak jejich aktivaci, tak represi (Verelst et al., 2007; Verelst et al., 2007). Tři proteiny rodiny **MYB** - MYB97, MYB101 a MYB120 naproti tomu působí až v rostoucí pylové láčce a jejich exprese je aktivována interakcí pylové láčky s pletivy pestíku. Pylové láčky trojitého mutanta *myb97/101/120* ztrácejí schopnost puknout po dosažení synergidy a naopak pokračují v růstu, snad v důsledku absence řady pozdních genů, jejichž exprese je komplexem MYB regulována (Leydon et al., 2013). Není bez zajímavosti, že exprese genu *MYB97* je nepřímo regulována výše popsaným komplexem MADS-box proteinů; prostředníkem zde může být transkripční faktor AtbZIP34 (**Gibalová et al., 2009**).

Dosud nejrozsáhlejší screen pylových genů kódujících **transkripční faktory** založený na přístupech reverzní genetiky vedl k identifikaci řady regulátorů vývoje samčího gametofytu huseníčku (**Reňák et al., 2012**). Bylo testováno 74 T-DNA inserčních linií zastupujících 49 genů sdružených ve 21 rodinách transkripčních faktorů exprimovaných v časných či pozdních stádiích vývoje samčího gametofytu (Obr. 5). Jedním z výsledků screenu bylo popsání čtyř genů, jejichž mutace způsobila velice výrazné fenotypové aberace v 75-100 % pylových zrn homozygotních rostlin. Jednalo se o transkripční faktory rodin **G2-like** (gen At2g20400), **C3H** (At3g15740), **bZIP** (At2g42380 AtbZIP34) a **C2C2-CO-like** (At5g54470). U šesti dalších genů bylo prokázáno výrazné narušení štěpných poměrů po samosprášení i po zpětném křížení, což je dalším důkazem důležitosti zkoumaných genů (viz výše). Zde se jednalo o transkripční faktory náležející do rodin **AP2-EREBP** (gen At1g25470), **MYB** (At2g39880), **CCAAT-HAP2** (At3g20910), **NAC** (At5g41090), **C2H2** (At4g05330) a **bHLH** (At5g54680). Ve všech případech s výjimkou genu *AtbZIP34* (**Gibalová et al., 2009**) se jednalo o vůbec první demonstraci důležitosti těchto transkripčních faktorů pro vývoj pylu. Neméně důležitým výstupem práce (**Reňák et al., 2012**) byla i kategorizace deseti tříd fenotypových aberací gametofytických mutací, která může sloužit jako reference pro následné studie (Obr. 6).



Obr. 5. *Schématické znázornění screenovacího experimentu pro identifikaci genů kódujících transkripční faktory aktivní v pylu huseníčku popsaného v* ***Reňák et al., 2012****.*

Funkční porucha		Mutantní fenotyp			Popis
A	Aborce pylu	1	Aborce		celkový kolaps pylového zrna
B	Inkluze	2	Inkluze		vetší množství inkluzí v cytoplasmě
C	Velikost pylového zrna, struktura buněčné stěny	3	Malý pyl		malá a kulatá pylová zrna o průměru přibližně jedné poloviny běžného pylu
		4	Oválná zrna		zřetelně oválná pylová zrna
		5	Deformace buněčné stěny		deformovaná buněčná stěna, hrubý povrch
D	Defekty buněčného cyklu	6	Jednobuněčný pyl		jen jedno jádro obsahující DNA kondensovanější než ve vegetativním jádru
		7	Dvojbuněčný pyl		jedno jádro vegetativní a jedno připomínající jádro spermatické
E	Uspořádání MGU	8	Excentrická poloha MGU		MGU posunuta z centrální pozice směrem k okraji
		9	Rozpadlá MGU		všechna jádra oddělená od ostatních
		10	Lineární MGU		všechna jádra uložena lineárně s vegetativním jádrem ve středu a spermatickými směrem k okraji

Obr. 6. *Přehled deseti fenotypových kategorií popsaných na základě základních funkčních poruch pylových zrn (upraveno podle* ***Reňák et al., 2012****).*

A.3.2 Pionýrské předtranskriptomické studie

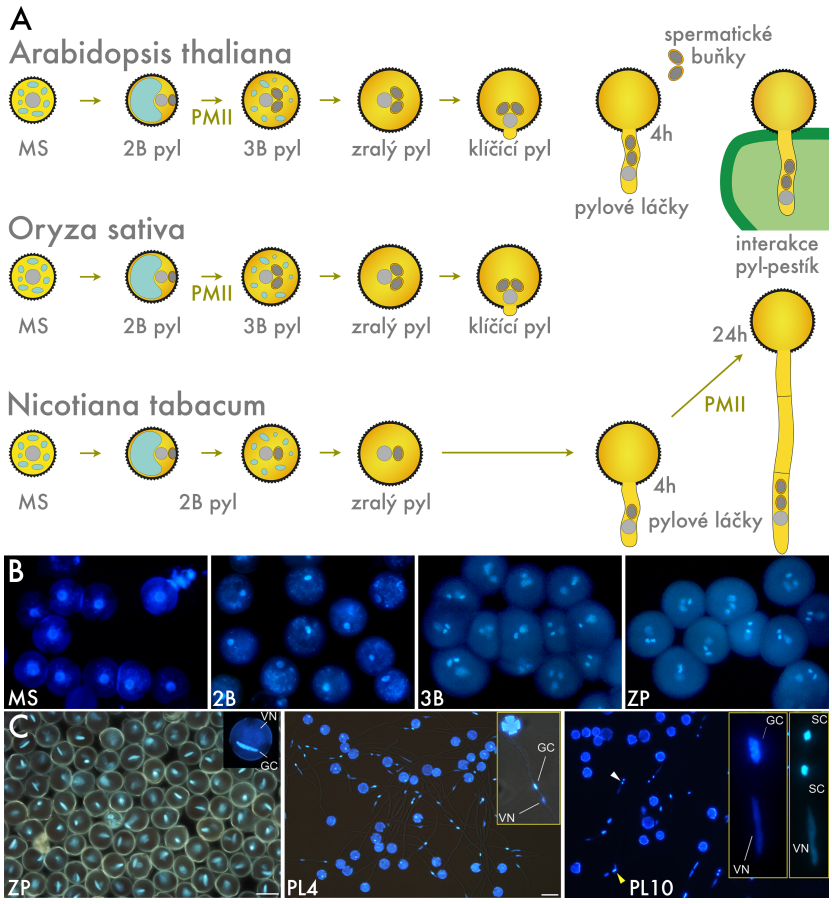
Klasický postup gen po genu vedl u různých rostlinných druhů k popsání několika set genů exprimovaných v pylu, z nichž u řady existují důkazy pro pylově specifickou expresi. Dostupnost nových vysoce účinných technologií umožnila analýzy haploidního transkriptomu v globálním měřítku. Tři pilotní studie využily jednak technologii sériové analýzy genové exprese (Serial analysis of gene expression, SAGE) (Lee and Lee, 2003) a jednak oligonukleotidové čipy první generace (8K AG Microarrays) firmy Affymetrix (Becker et al., 2003; **Honys and Twell, 2003**) pokrývající přibližně jednu třetinu genomu huseníčku. Oba přístupy přinesly podobné výsledky a poskytly první víceméně ucelený pohled na genovou expresi v samčím gametofytu. Čipové studie vedly k popsání 992 (**Honys and Twell, 2003**) a 1 587 (Becker et al., 2003) genů aktivních ve zralém pylu, z nichž 39 % či 10 % bylo možno na základě v té době dostupných referenčních datových souborů považovat za pylově specifické. Zejména druhá hodnota se výrazně blíží výše uvedeným odhadům publikovaným na základě hybridizačních studií. Odhady genové exprese ve

zralém pylu huseníčku se na základě těchto neúplných studií pohybovaly v rozsahu 3 500 až 5 500 aktivních genů, což na druhou stranu představovalo významné snížení tohoto počtu ve srovnání s předchozími odhady (Willing and Mascarenhas, 1984; Willing et al., 1988). Významným přínosem čipové technologie však byla možnost funkční kategorizace pylově exprimovaných a pylově specifických genů, jež odhalila několik funkčních skupin (metabolismus buněčné stěny, cytoskelet, přenos signálů, metabolismus), které byly významně zastoupeny zejména mezi pylově specifickými geny, a to v míře výrazně vyšší než v referenčních datových souborech. Dalším zajímavým zjištěním byla skutečnost, že předpokládané pylově specifické geny byly v pylu exprimovány daleko silněji než odpovídající geny nespecifické (**Honys and Twell, 2003**).

A.3.3 Pylová transkriptomika

Další upřesnění bylo umožněno díky dostupnosti druhé generace DNA čipů Affymetrix (*Arabidopsis* ATH1 microarray), které, přestože jsou prezentovány jako kompletní, pokrývají přibližně 85 % genomu huseníčku, přesně 22 591 genů. V současné době je k dispozici řada nezávislých datových souborů popisujících transkriptom zralého pylu huseníčku, ekotypů Landsberg erecta a Columbia (**Honys and Twell, 2004**; Pina et al., 2005; Schmid et al., 2005; Borges et al., 2008; Wang et al., 2008; Qin et al., 2009) a další, specializované studie. Použití genového čipu ATH1 vedlo k dalšímu zpřesnění počtu genů aktivních ve zralém pylu huseníčku na hodnotu 4774 - 7235 (**Honys and Twell, 2004**) v závislosti na použitém detekčním algoritmu. Tento počet byl mírně větší, než naznačovala data získaná pomocí staršího typu genového čipu. Některé z popsaných studií mimo zralý pyl popisují i dynamiku genové exprese buď během vývoje samčího gametofytu (čtyři vývojová stádia; Obr. 7; **Honys and Twell, 2004**), nebo během růstu pylových láček *in vitro* (Wang et al., 2008) či *semi in vivo* (Qin et al., 2009). Dalším zajímavým datovým souborem je transkriptom isolovaných spermatických buněk (Borges et al., 2008) či změny transkriptomu v důsledku interakce pylových láček s pletivy pestíku po opylení (Boavida et al., 2011). Vedle odhalení naprosté většiny genů aktivních v samčím gametofytu leží hlavní význam popsaných studií v dramatickém zvýšení našich znalostí komplexnosti a dynamiky haploidní genové exprese během vývoje a funkce efektivně jednobuněčného systému u rostlin. V tomto smyslu byla studie (**Honys and Twell, 2004**) u rostlin zcela prioritní, což dokládá i její stále vysoká citovanost.

V první dekádě 21. století, zejména v její druhé polovině, byla osekvenována a anotována řada rostlinných genomů, což konečně umožnilo navržení a výrobu DNA čipů i pro jiné druhy než huseníček. Vedle tradiční platformy Affymetrix se navíc postupně prosazují i další výrobci, v oblasti rostlinné transkriptomiky zejména firmy Agilent a NimbleGen. Důsledkem tohoto rozmachu je celá řada studií popisujících transkriptomy pylu a/nebo pylových láček rýže (Suwabe et al., 2008; Wei et al., 2010), kukuřice (Ma et al., 2008; Xu et al., 2012), sóji (Haerizadeh et al., 2009), tabáku (**Hafidh et al., 2012a,b**) a révy



Obr. 7. *Vývojová stádia samčího gametofytu použitá pro transkriptomické experimenty. A) Přehled všech vývojových stádií huseníčku (Arabidopsis thaliana), rýže (Oryza sativa) a tabáku (Nicotiana tabacum), pro která jsou k dispozici transkriptomická data (**Honys a Twell, 2003; Honys a Twell, 2004**; Becker et al., 2003; Pina et al., 2005; Borges et al., 2008; Wang et al., 2008; Qin et al., 2009; Wei et al. 2010; Boavida et al., 2011; **Hafidh et al., 2012a,b**). B) Mikrograf mikrospor (MS), dvojbuněčného (2B), trojbuněčného (3B) a zralého (ZP) pylu huseníčku (upraveno podle **Honys and Twell, 2004**). C) Mikrograf zralého pylu (ZP) a pylových láček tabáku kultivovaných in vitro 4 hodiny (PL4) a 10 hodin (PL10). Desetihodinové pylové láčky představují směsnou populaci, neboť mimo vegetativního jádra (VN) obsahují buď ještě předmitotické generativní buňky (GC, žlutá šipka), či již spermatické buňky (SC, bílá šipka) vzniklé druhou pylovou mitosou. (upraveno podle **Hafidh et al. 2012a**). Vzorky byly obarvené DAPI.*

vinné (Fasoli et al., 2012). To mimo jiné umožnilo srovnání vývojové transkriptomiky trojjaderného (huseníček a rýže) a původnějšího dvojjaderného pylu (tabák). Obrázek 7 znázorňuje vývojová stádia tří modelových druhů, pro která jsou k dispozici transkriptomická data, a je z něho patrné, že pro všechny tři druhy jsou k dispozici datové soubory z období před a po PMII.

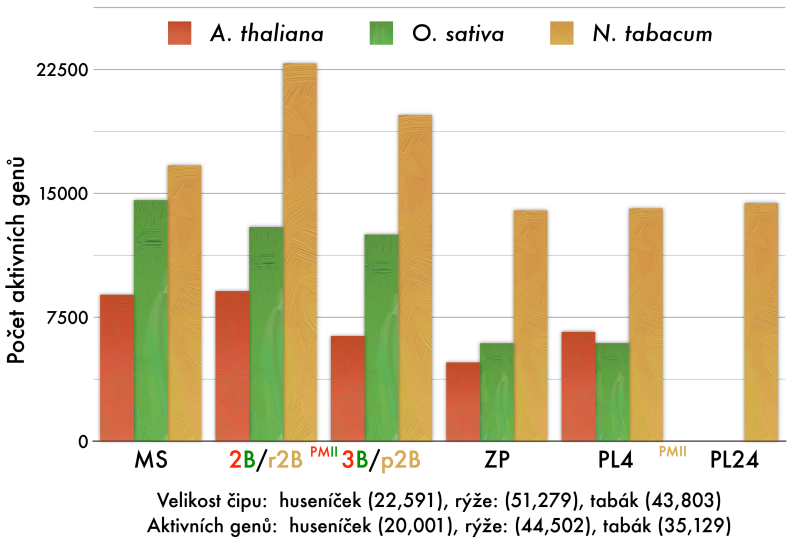
Dalším logickým krokem je nahrazení výrobně poněkud rigidních DNA čipů flexibilnější a citlivější technologií paralelního sekvenování cDNA, anglicky „RNA-Seq“ (Wang et al., 2009). První práce popisující transkriptomy zralého pylu huseníčku (Loraine et al., 2013) a oddělených vegetativních a spermatických jader zralého pylu rýže (Anderson et al., 2013) získané pomocí RNA-Seq pochopitelně vedly ke zvýšení počtu genů aktivních v samčím gametofytu, jednak v důsledku jen asi 85% pokrytí genomu huseníčku a rýže genovými čipy a jednak větší citlivosti sekvenační metody. Přesná kvantifikace pylových genů záleží na aplikaci hraniční hodnoty RPM (reads per million); použití konzervativní hodnoty 5 RPM, což odpovídá přítomnosti 150 překrývajících se osekvenovaných fragmentů ve vzorku, vedla k popsání aktivity 4172 unikátních genů v pylu, nicméně snížení hraniční hodnoty RPM toto číslo výrazně navýšilo o méně abundantní transkripty. Není bez zajímavosti, že srovnání překryvu transkriptomických dat získaných hybridizací genového čipu ATH1 a sekvenací ukázalo až zarážející shodu z 4021 genů

popsaných jako aktivní v pěti z šesti zkoumaných čipových datových souborech vykazovalo v transkriptomu získaném sekvenací hodnotu vyšší než 5 RPM celých 3991 genů, tedy 99,25 % (Loraine et al., 2013). Větší citlivost a flexibilita transkriptomiky založené na paralelním sekvenování se odráží v rychlém nástupu dalších takto získaných pylových transkriptomů zaměřených nejen na identifikaci aktivních genů, ale často i na zodpovězení konkrétních otázek. Příkladem mohou být transkriptomy kukuřice (Xu et al., 2012), rajčete (Sanetomo and Hosaka, 2013) a lilie (Obermeyer et al., 2013).

A.3.3.1 Kvantifikace gametofytické genové exprese

Pokud není uvedeno jinak, jsou v tomto textu použita samčí gametofytická transkriptomická data huseníčku (**Honys and Twell, 2004**; Borges et al., 2008; Wang et al., 2008; Qin et al., 2009), rýže (Wei et al., 2010) a tabáku (**Hafidh et al., 2012a,b**) jako zástupců dvouděložných i jednoděložných rostlin s trojjaderným a dvojjaderným pylem. V důsledku rychle rostoucího počtu čipových experimentů je pro srovnávací analýzy samčí gametofytické genové exprese k dispozici stále větší počet dostupných referenčních datových souborů. Sporofytické datové soubory huseníčku byly získány z databází NASC Arrays (http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl, služba AffyWatch; Craigon et al., 2004) a Genevestigator (www.genevestigator.com; Zimmermann et al., 2004; Hruz et al., 2008). Celkem se jedná o 62 experimentů (154 jednotlivých genových čipů), které poskytují transkriptomická data pro semenáčky, vegetativní prýty, listy, buněčné extrakty obohacené svěracími buňkami, řapíky, stonky, hypokotyl, xylém, korek, kořeny, kořenovou oblast kořenového vlášení, květenství, mladá a starší poupata, šešule a buněčné suspenzní kultury. Hrubá i normalizovaná data jsou k dispozici prostřednictvím portálu Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP; http://aGFP.ueb.cas.cz; **Dupľáková et al., 2007**). Všechna použitá data byla normalizována stejným algoritmem (detekční algoritmus MAS5, Perfect Match-only model) pomocí volně dostupného programu dChip 1.3 (Li and Wong, 2001a,b). V případě tabáku je situace jednodušší, což je dáno zejména mnohem kratší dobou, po kterou je dostupný genový čip Agilent 44K Tobacco Genome Microarray a díky tomu i výrazně menším počtem dostupných referenčních datových souborů – vlastně jen dvou (**Hafidh et al., 2012a,b**). Také tabáková data byla normalizována stejným algoritmem pomocí programu dChip, ke konkrétním analýzám byl využit komerční softwarový balík CLC Main Workbench (www.clcbio.com).

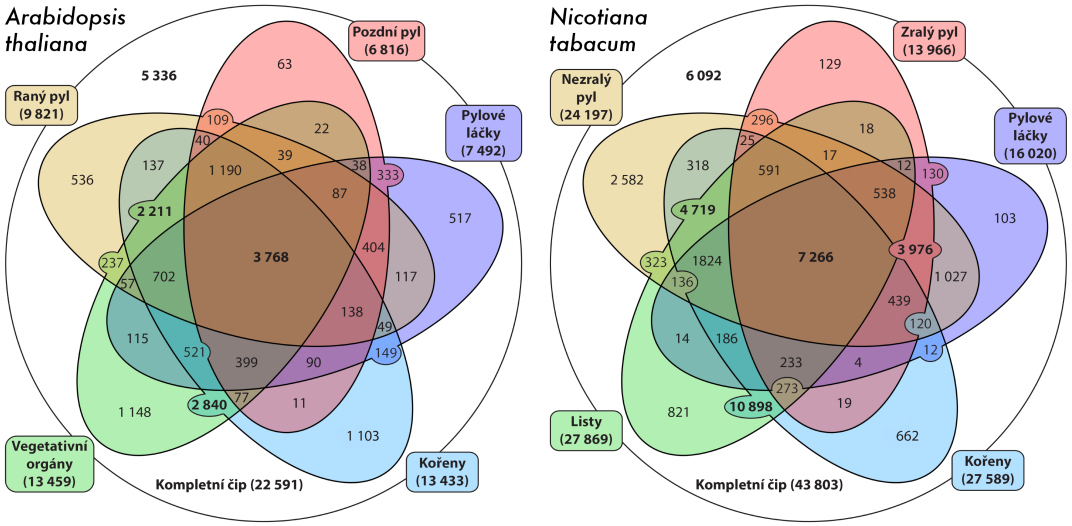
Z 22 591 genů, pro něž jsou na genovém čipu Affymetrix ATH1 příslušné sondy, mělo 12 164 genů reprodukovatelný expresní signál alespoň v jednom vývojovém stádiu samčího gametofytu huseníčku. Čip Agilent Tobacco genome Array obsahuje téměř dvakrát více sond (43 803) a podobně počet genů aktivních v samčím gametofytu tabáku byl přibližně dvojnásobný (25 130). Počty genů aktivních v jednotlivých vývojových stádiích jsou znázorněny na Obrázku 8. Je zřetelné, že počet aktivních genů viditelně klesá právě v pozdějších stádiích vývoje pylu (Obr. 8). Zdá se, že se jedná o obecný fenomén dozrávání



Obr. 8. *Počty genů aktivních v jednotlivých stádiích vývoje samčího gametofytu tří modelových druhů – huseníčku (Arabidopsis thaliana), rýže (Oryza sativa) a tabáku (Nicotiana tabacum). MS, jednobuněčné mikrospory; 2C, dvojbuněčný pyl; 3C trojbuněčný pyl; ZP, zralý pyl; PL4, 4h Pylové láčky; PL24, 24h pylové láčky.*

pylu, neboť zde není rozdíl mezi dvojjaderným a trojjaderným pylem. Ukončení proliferace samčího gametofytu, a to jak somatické tak zárodečné linie, tak nejspíše není doprovázeno poklesem celkové transkripční aktivity bez ohledu na to, zda k PMII dochází v nezralém pylu či až v rostoucí pylové láčce. Tomu odpovídá i skutečnost, že transkriptom spermatických buněk je překvapivě bohatý (Borges et al., 2008). Na druhou stranu komplexnost transkriptomu pylových láček přibližně odpovídá komplexnosti transkriptomu zralého pylu stejného druhu, a to i přesto, že u tabáku je aktivních přibližně dvakrát tolik genů než u obou druhů s trojjaderným pylem. Tento fakt může reflektovat skutečnost, že tabák *Nicotiana tabacum* není diploidním druhem, ale recentním allotetraploidem vzniklým před 200 000 lety mezidruhovou hybridizací druhů *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* (Leitch et al., 2008). Osekvenování genomů *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* navíc ukázalo, že více než 83 % clusterů orthologních genů se nalézá v genomech obou parentálních druhů (Sierro et al., 2013). Konečně je zřejmé, že u tabáku nedochází k poklesu genové exprese po PMII, která se odehrává mezi 9. a 12. hodinou růstu láčky. Podrobnější vyjádření překryvu exprese mezi jednotlivými vývojovými stádii, konkrétně mezi vývojovými stádii před a po PMII je znázorněno pomocí Vennova diagramu (Obr. 9).

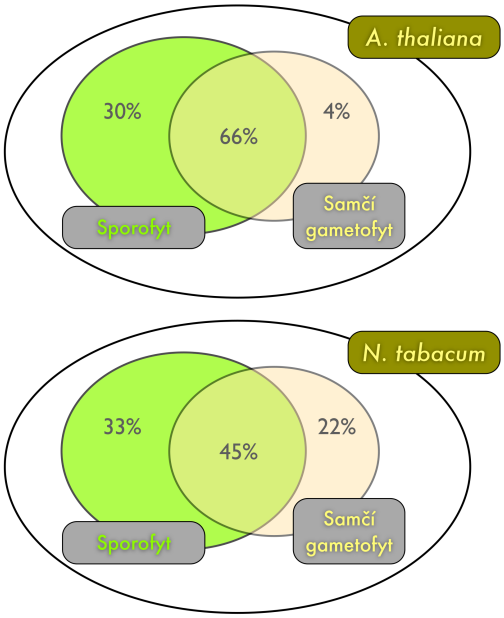
Zjednodušené znázornění překryvu sporofytické a gametofytické genové exprese (Obr. 10) pak ukázalo relativně malý počet genů vykazujících striktně specifickou expresi v samčím gametofytu, u huseníčku jen 4 % všech gametofytických genů. Toto číslo navíc postupně klesá podle toho, jak se objevují stále nové referenční sporofytické datové soubory, zejména ty, které pocházejí ze specializovaných pletiv či jednotlivých buněčných typů. To znamená, že počet striktně gametofyticky specifických genů je znatelně nižší, než bylo odhadováno ve všech předchozích studiích (Tanksley et al., 1981; Pedersen et al., 1987; Stinson et al., 1987; Mascarenhas, 1990; Becker et al., 2003; **Honys and Twell, 2003, 2004**; Pina et al., 2005). Nicméně právě tyto zbývající geny se vyznačují velice silnými hodnotami expresního signálu, což ukazuje na jejich důležitost a potenciál jako cílových genů pro funkční analýzy. U tabáku se situace zdá být odlišná, neboť dle dostupných datových



Obr. 9. *Vennovy diagramy znázorňující překryvy mezi samčími gametofytickými a sporofytickými transkriptomy huseníčku (Arabidopsis thaliana;* ***Honys a Twell, 2004****; Wang et al., 2008; Qin et al., 2009) a tabáku (Nicotiana tabacum;* ***Hafidh et al., 2012a,b****). Porovnávána jsou data pocházející z raného a pozdního samčího gametofytu (vysvětlení v textu), vegetativních orgánů (zelené nadzemní části rostlin) a kořenů. Hodnoty segmentů s výjimečně velkým překryvem jsou psány tučně.*

souborů je celých 22 % genů potenciálně pylově specifických (**Hafidh et al., 2012a**). Zde je však velice pravděpodobné, že se jedná o důsledek minimálního množství kontrolních sporofytických vzorků, vlastně jen dvou, a že procento pylově specifických genů bude podobné jako u huseníčku.

Genovou expresi během vývoje samčího gametofytu je lze rozdělit do dvou fází, časné a pozdní, a to podle toho, zda se jedná o geny, jejichž bílkovinné produkty se uplatňují spíše během dozrávání pylu či až během progamické fáze. U huseníčku bylo 9 821 genů aktivních v mikrosporách a dvojbuněčném pylu, zatímco 6 816 genů v trojbuněčných a zralých pylových zrnech. Z uvedeného je patrné, že zde musí být výrazný překryv a že 5 775 genů vykazuje pozitivní expresní signál v obou popsaných vývojových fázích (Obr. 9). Rozdělení pylových genů také umožňuje preciznější zviditelnění možných překryvů skupin samčích gametofytických genů se dvěma podskupinami genů sporofytických exprimovaných v nadzemních vegetativních orgánech a v kořenech (Obr. 9). Z této analýzy můžeme usoudit, že zdaleka nejvíce silně exprimovaných pylově specifických genů je mezi geny pozdními. Pozdní pylové geny jsou také jedinou skupinou, kde průměrný expresní signál specifických genů

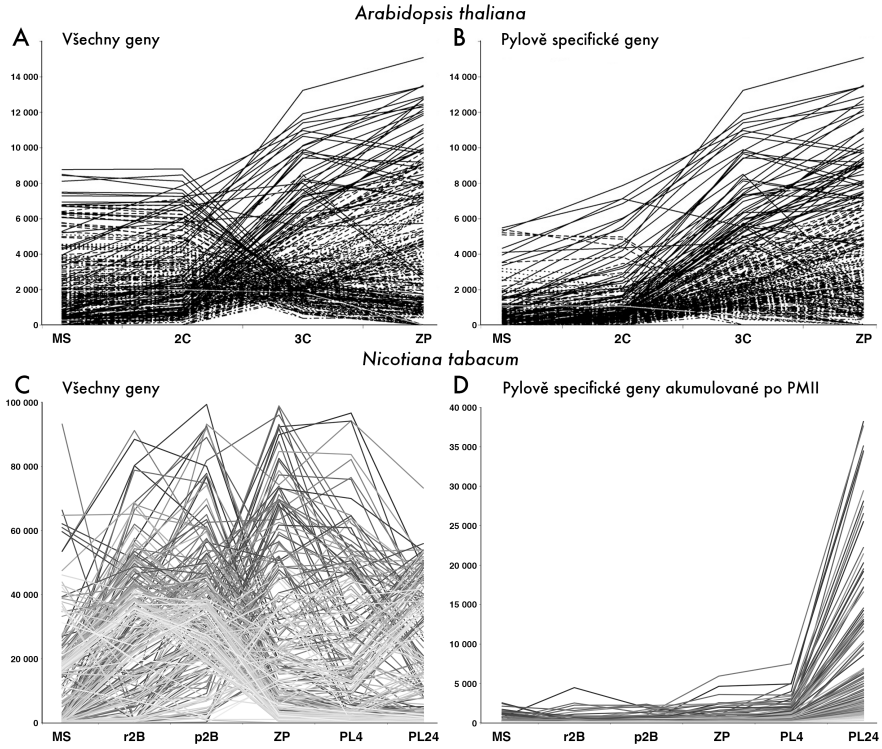


Obr. 10. *Zjednodušené Vennovy diagramy znázorňující překryvy mezi samčím gametofytickým a sporofytickými transkriptomy detailně popsanými na Obr. 9.*

je vyšší nežli u genů konstitutivních. Průměrný expresní signál pylově specifických genů exprimovaných ve dvou pozdních vývojových stádiích (2500 jednotek) je daleko vyšší nežli průměrný signál v jakémkoli jiném datovém souboru či jejich kombinaci (300-500 jednotek). Uvedená data navíc ukazují, že raný samčí gametofytický expresní program je mnohem podobnější programům sporofytickým.

Pohled na Vennův diagram znázorňující situaci v pylu a pylových láčkách tabáku (Obr. 9) dává v některých ohledech jiný obrázek. Předně potvrzuje již výše uvedený fakt, že PMII není následována poklesem komplexnosti transkriptomu (**Hafidh et al., 2012a,b**). Stabilita komplexnosti transkriptomu je také reflektována ve vysokém překryvu genové exprese mezi všemi zkoumanými vývojovými stádii, kdy z 25 130 genů aktivních alespoň v jednom stádiu bylo 12 219 transkriptů (49 %) přítomno ve všech. Tomu odpovídá jen malý počet genů specificky aktivních pouze v příslušném vývojovém stádiu (72 - 1873 genů). Podobně jako u huseníčku, i u tabáku je průměrný expresní signál genů exprimovaných specificky či alespoň přednostně v samčím gametofytu (1850-2750 jednotek) výrazně vyšší nežli je tomu u všech genů na čipu (400 jednotek) genů aktivních ve sporofytických pletivech (150 jednotek u striktně sporofytických genů). Z této skutečnosti můžeme usuzovat, že se jedná o obecnou vlastnost genů exprimovaných v samčím gametofytu krytosemenných rostlin.

Z 14 420 transkriptů identifikovaných ve 24h pylových láčkách tabáku má více než jedna čtvrtina (3893, tedy 27 % genů) expresní signál v tomto vývojovém stádiu silnější než ve všech časnějších stádiích. Řada z nich (268 genů) má dokonce relativní expresní signál nejméně 5-krát vyšší, než v kterémkoli z časnějších stádií (Obr. 11D). Na rozdíl od obecně stabilního a relativně nízkého podílu pylově specifických genů u různých rostlinných druhů je překvapivý vysoký podíl specifických genů (90 genů, 33,6 %) právě v této frakci. Tato data nejen potvrdila vysokou transkripční aktivitu v pylových láčkách tabáku a akumulaci a skladování transkriptů syntetizovaných *de novo* po PMII, ale také doplnila výsledky nedávné studie z huseníčku (Qin et al., 2009), která odhalila podskupinu 140 genů specificky indukovaných v pylových láčkách kultivovaných semi *in vivo*, ale nikoli *in vitro*, tedy pravděpodobně v souvislosti s kontaktem s pletivy pestíku. U tabáku je situace mírně odlišná, neboť přibližně polovina z nalezených tabákových homologů těchto genů byla výrazně indukována (některé dokonce 15krát) v pozdních pylových láčkách bez ohledu na kontakt s pestíkem, a tudíž představují spíše součást přirozeného pozdního transkripčního programu (**Hafidh et al., 2012a**) (viz níže). Ve světle identifikace a biochemické charakterizace EPP částic, tj. kompartmentu pro dlouhodobé skladování a transport RNA v pylových láčkách (Honys et al., 2009), je pravděpodobné, že tyto nově syntetizované a ukládané transkripty jsou součástí právě EPP částic.

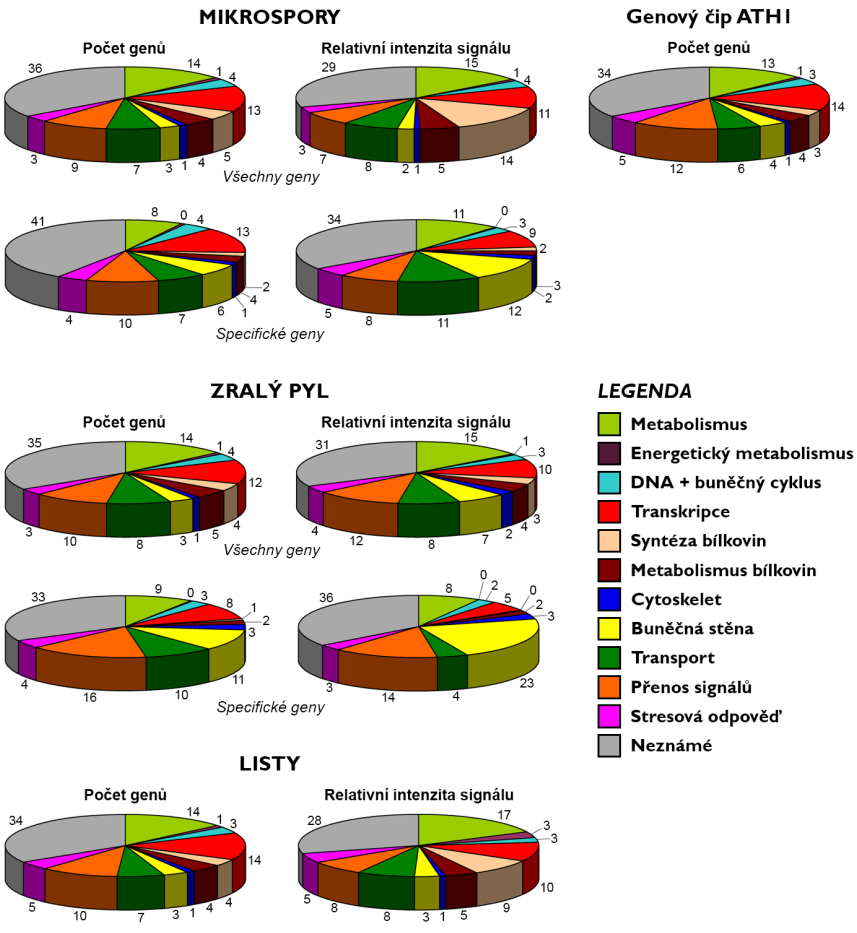


Obr. 11. *Transkriptomické profily gametofytických genů během vývojové a funkční fáze samčího gametofytu. Průběhy exprese všech aktivních (A) a pylově specifických (B) genů během vývoje samčího gametofytu huseníčku (Arabidopsis thaliana;* ***Honys a Twell, 2004****) a expresní profily všech aktivních genů (C) a genů specificky aktivovaných po PMII (D) u tabáku (Nicotiana tabacum;* ***Hafidh et al., 2012a,b****). Obrázek u obou druhů jasně ukazuje výrazně vyšší zastoupení vysoce abundantních pozdních genů mezi geny pylově specifickými. MS - mikrospora, 2B - dvojbuněčný pyl, 3B - trojbuněčný pyl, ZP - zralý pyl, PL4 - 4h pylové láčky, PL24 - 24h pylové láčky.*

Jednou z hlavních výhod čipové technologie oproti starším přístupům je mimo její robustnost i možnost současné identifikace a funkční kategorizace kvantifikovaných transkriptů, samozřejmě podmíněná kvalitní anotací genového čipu. V tomto ohledu je čip Affymetrix ATH1 výrazně lépe zpracován než jeho tabákový konkurent firmy Agilent, což je způsobeno zejména již poměrně dlouho dostupnou sekvencí kompletního genomu huseníčku (AGI, 2000) na rozdíl od tabáku, kde byl genomový čip navržen jen podle dostupných a často neúplně anotovaných sekvencí EST.

Distribuce časných genů huseníčku mezi dvanácti funkčními kategoriemi nikoli překvapivě připomínala distribuci genů aktivních v listech a také odpovídající distribuci všech genů přítomných na genovém čipu ATH1 (Obr. 12). Mezi vzácné a nevýrazné výjimky patřily geny účastnící se přenosu signálů a stresové odpovědi (cca o 1 % nižší zastoupení) a geny syntézy bílkovin a transportu (cca o 1 % vyšší zastoupení). Zajímavější rozdíly byly pozorovány po srovnání distribuce aktivních genů nikoli podle jejich počtu, ale podle relativní síly expresního signálu. To vedlo k výrazné změně příspěvku genů kódujících zejména translační aparát z 5 % na 14 %. To jen dokazuje důležitost syntézy bílkovin již od raných fází vývoje samčího gametofytu. Pozdní pylový transkriptom se naproti tomu čím dál více vzdaluje všem ostatním, což nejlépe dokládá radikální snížení jeho komplexnosti (Obr. 13) (Becker et al., 2003; **Honys and Twell, 2003, 2004**; Pina et al., 2005; Borges et al., 2008; Boavida et al., 2011; **Hafidh et al., 2012a,b**) a změna distribuce transkriptů mezi funkčními kategoriemi (Obr. 12). Navíc je vidět, že ačkoli postupná represe exprese řady genů aktivních před II. pylovou mitosou představuje obecný trend, významná skupina genů se od něho odchyluje a je aktivována v pozdních fázích vývoje a funkce samčího gametofytu

(Obr. 11). Ve srovnání s časnějšími stádii dochází k výrazné redukci exprese genů účastnících se syntézy bílkovin. Naproti tomu mezi objevující se funkční kategorie patří syntéza buněčné stěny, cytoskelet a přenos signálů. Další významné funkční kategorie jako transport a geny stresové odpovědi většinou obsahovaly jen méně abundantní nespecificky exprimované transkripty. Z tohoto pohledu představovaly transkriptomické experimenty s kompletními genovými čipy (**Honys and Twell, 2004; Hafidh et al., 2012a,b**) potvrzení již dříve publikovaných závěrů, poněvadž stejné funkční kategorie patřily mezi nejsilněji aktivované již na základě analýz třetinového čipu AG (**Honys and Twell, 2003**).

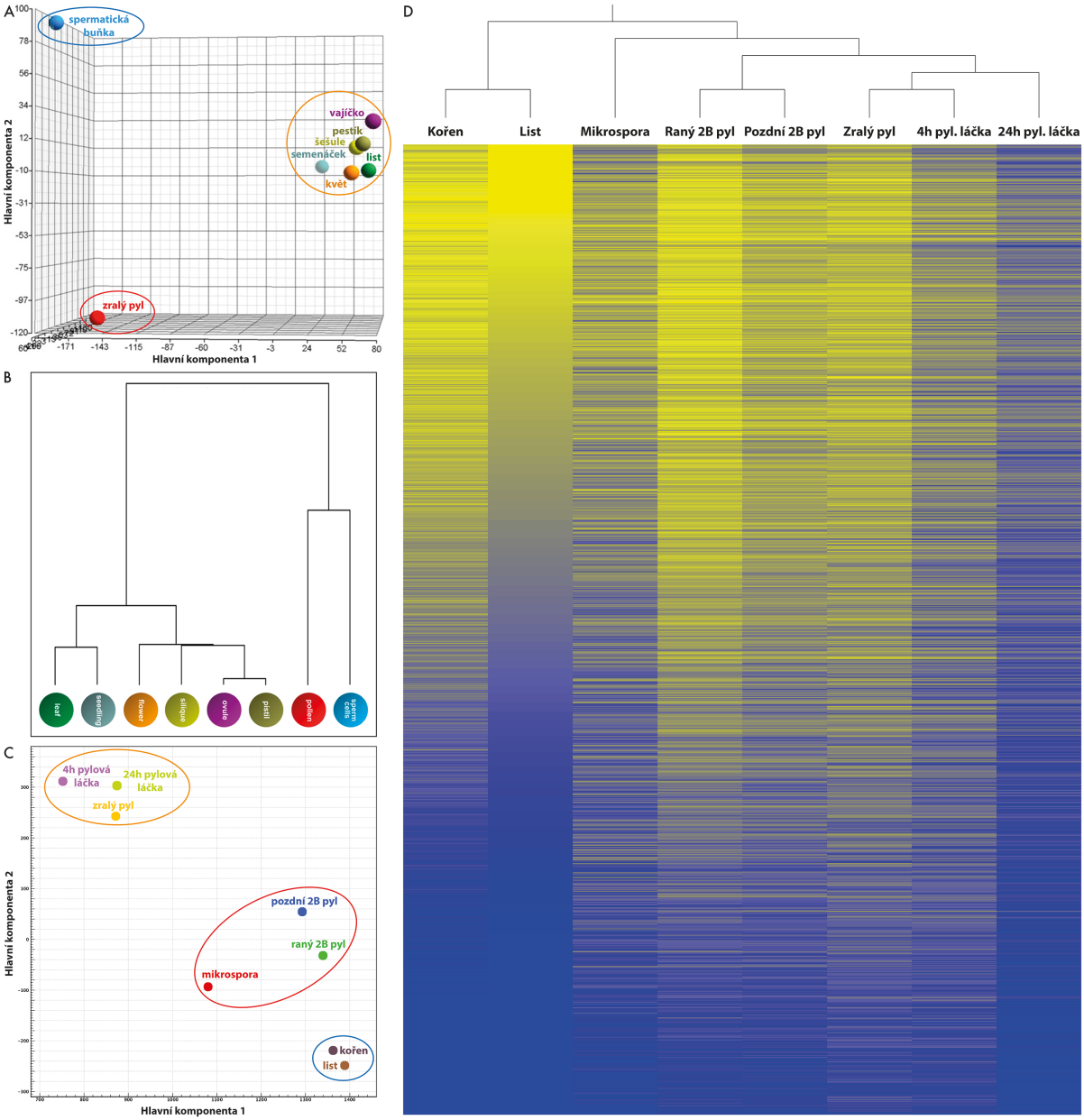


Obr. 12. *Distribuce transkriptů mezi dvanácti funkčními kategoriemi kódujících genů huseníčku (Arabidopsis thaliana;* ***Honys a Twell, 2004****). Obrázek znázorňuje proporční zastoupení jednak počtů genů a jednak relativních intenzit signálů mezi těmito kategoriemi v raném (MIKROSPORY) a pozdním (ZRALÝ PYL) vývojovém stádiu. Pro srovnání jsou k dispozici i odpovídající grafy ukazující distribuci všech genů přítomných na genovém čipu ATH1 a genů aktivních v listech.*

A.3.3.2 Globální genové expresní programy aktivní během vývoje samčího gametofytu

Analýzy překryvů mezi samčí gametofytickou a sporofytickou genovou expresí a relativní síla expresních signálů ukázaly značné rozdíly mezi oběma generacemi. Existence jasných rozdílů mezi raným a pozdním pylovým transkriptomem ještě zdůraznila jedinečnost transkriptomu pozdního (**Honys and Twell, 2004; Hafidh et al., 2012a,b**). Rozsah těchto rozdílů nejvíce vyplyne z grafického znázornění expresních profilů samčích gametofytických genů huseníčku a tabáku (Obr. 11). Vývoj a funkce samčího gametofytu je pod kontrolou dvou navazujících globálních expresních programů, raného a pozdního, které musejí být přesně kontrolovány na transkripční úrovni. Z přibližně 1533 předpokládaných transkripčních faktorů kódovaných genomem huseníčku (webová stránka AGRIS: http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/; Riechmann et al., 2000; Davuluri et al.,

2003; Parenicova et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2003) bylo 608 (40 %) exprimováno alespoň v jednom vývojovém stádiu samčího gametofytu. 542 z těchto genů bylo aktivních v raných stádiích a 405 v pozdních, což znamená, že více než polovina (339 genů) byla aktivních po celou dobu vývoje pylu (**Reňák et al., 2012**). Srovnávací analýza exprese transkripčních faktorů v samčím gametofytu rýže vedla k velice podobným výsledkům; z 1959 genů kódujících transkripční faktory v genomu rýže bylo na příslušném genomovém čipu přítomno 1827 a z nich bylo 772 (42 %) aktivních v pylu (Wei et al., 2010). Již méně očekávané bylo zjištění, že z těchto 608 (huseníček) a 772 (rýže) genů jen 189 genů představovalo vzájemně homologní sekvence implikující jejich sdílenou funkci v trojbuněčném pylu dvouděložných i jednoděložných rostlin (Wei et al., 2010). Zastoupení



Obr. 13. *Analýza hlavních komponent (A,C) a hierarchické clusterování (B,D) expresních profilů gametofytických a sporofytických pletiv huseníčku (Arabidopsis thaliana; A,B) a tabáku (Nicotiana tabacum; C,D; upraveno podle Borges et al. 2008 (A,B)* ***Hafidh et al. 2012b*** *(C) a orig. data (D)).*

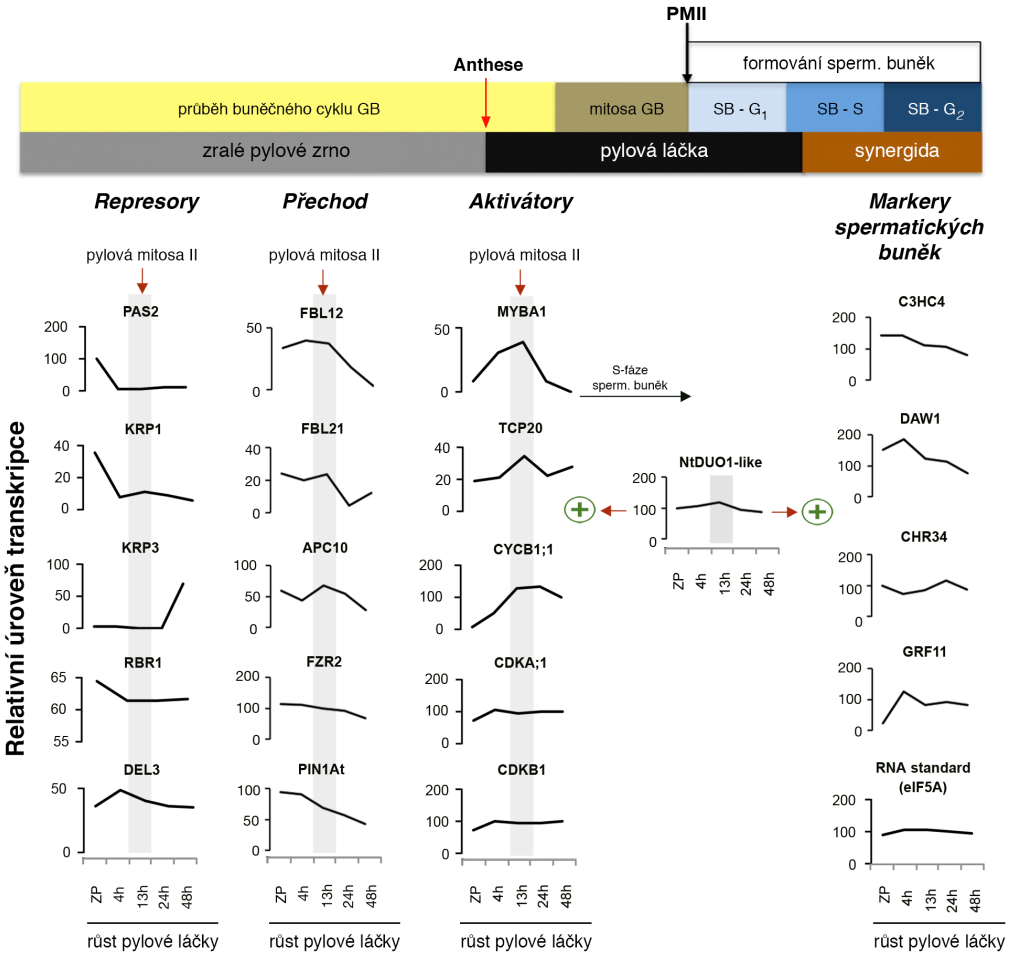
pylově specifických genů kódujících transkripční faktory bylo u huseníčku překvapivě nízké, jen 54 genů, což představuje 8,8 % samčích gametofytických genů v této kategorii. Tyto geny na druhou stranu představují horké kandidáty na funkci klíčových regulátorů vývoje samčího gametofytu. U některých z nich byla tato funkce již potvrzena (Verelst et al., 2007; Verelst et al., 2007; **Gibalová et al., 2009**; Dupľáková, 2010; Zou et al., 2010; Kwantes et al., 2011; **Reňák et al., 2012**; Leydon et al., 2013; **Reňák et al., 2014**).

K přepnutí mezi oběma vývojovými programy dochází v pozdějších stádiích dozrávání pylu (Obr. 11). U huseníčku počet aktivních genů v průběhu mikrogametogeneze postupně klesá a rané geny sledují tento obecný trend. Dobře tuto skutečnost ilustruje také absence většiny abundantních raných pylově specifických genů v transkriptomu trojbuněčného pylu. U tabáku dosahuje počet aktivních genů vrcholu v časném dvojbuněčném stádiu, nicméně pak je patrný podobný průběh jako u huseníčku. Na druhou stranu řada velmi abundantních pozdních genů vykazuje pylově specifický profil, a to u všech tří zkoumaných druhů. Právě popsané přepnutí mezi oběma vývojovými programy podporuje dříve publikovanou jedinečnost pozdního samčího gametofytického transkriptomu (**Honys and Twell, 2003, 2004; Hafidh et al., 2012a,b**) nejen ve srovnání se sporofytem, ale i s raným samčím gametofytem. Tato jedinečnost také může být demonstrována pomocí analýzy hlavních komponent (principal component analysis, PCA) expresních profilů různých gametofytických a sporofytických pletiv (Obr. 13) (Borges et al., 2008; Boavida et al., 2011; **Hafidh et al., 2012a,b**). Jak je vidět, samčí gametofytický transkriptom se s průběhem času stále více vzdaluje transkriptomům sporofytickým. Tato skutečnost může ukazovat na významný příspěvek předmeiotické genové exprese ke složení raného samčího gametofytického transkriptomu.

A.3.3.3 Druhá haploidní mitosa

V souvislosti s časováním přepnutí obou transkriptomických vývojových programů je zajímavé podívat se na expresní charakteristiky regulátorů buněčného cyklu generativní buňky identifikovaných pomocí programu MAPMAN (http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman) (Thimm et al., 2004). Kvantifikace obsahu DNA v dvojbuněčném pylu ukázala, že vývoj generativních buněk vyžaduje arest buněčného cyklu nebo pomalý průběh S-fáze bezprostředně po dokončení první haploidní mitosy mikrospory až do jejího vstupu do PMII, což je u tabáku 8-12 h po vyklíčení pylu (Friedman, 1999; Tian et al., 2005). Naše analýza ukázala dominantní přítomnost známých inhibitorů buněčného cyklu ve zralém pylu přetrvávající nejméně během prvních čtyř hodin růstu pylové láčky (Obr. 14). Sem patří RBR1 (RETINOBLASTOMA protein 1), KRP1 a KRP3 (Kip-related proteiny 1 a 3), DEL3 a PAS2 (**Hafidh et al., 2012a**). RBR1 hraje zásadní roli při blokování vstupu vegetativního jádra do S-fáze a ještě dříve se podílí na určení buněčného osudu vegetativní a generativní buňky samčího gametofytu huseníčku (Chen et al., 2009). U tabáku sleduje exprese genu *RBR1* předpokládaný trend výrazně klesá po vyklíčení pylové láčky a od čtyř

hodin zůstává na stabilní úrovni (Obr. 14). KRP6/7 jsou známé inhibitory progrese buněčného cyklu generativní buňky huseníčku a jejich represivní činnost je potlačena aktivitou F-box-proteinu FBL17 (Kim et al., 2008). U tabáku byli naproti tomu aktivní jiní členové těchto rodin - KRP1 a KRP3 a FBL12 a FBL21 (Obr. 14).



Obr. 14. *Expresní profily hlavních regulátorů (represory a aktivátory) progrese buněčného cyklu a markerů specifikace osudu spermatické buňky před a po PMII a schematické znázornění průběhu buněčného cyklu generativní buňky tabáku (Nicotiana tabacum) během růstu pylové láčky (upraveno podle* ***Hafidh et al., 2012a****).*

Progrese buněčného cyklu je umožněna zablokováním aktivity jeho represorů. Důležitou roli zde hrají F-box-proteiny zmíněné v minulém odstavci, konkrétně složky komplexu SCF (SKP1-CUL1-F-box protein), které působí proti represi CDKA indukované proteiny KRP. U tabáku exprese dvou z nich, FBL12 a FBL21, vrcholila právě v době tzv. mitotického okna a následně rychle poklesla (Obr. 14). Podobně protein APC10, součást komplexu (APC/C) stimulujícího anafázi, se podílí na obratu cyklinových podjednotek prostřednictvím proteolýzy cyklinů zprostředkované ubikvitinem, a tím brání předčasnému vstupu do mitotického cyklu a naopak podporuje jeho opuštění. Genetická charakterizace jiné složky komplexu APC/C u huseníčku, APC8, přímo propojila aktivitu proteinů APC s transkripční represí CycB1;1, a to prostřednictvím aktivace miR159, represoru proteinu DUO POLLEN 1 (Zheng et al., 2011). U tabáku exprese APC10 během prvních čtyř hodin

růstu láčky klesala, aby následně rostla až k maximu ve 13h láčkách (Obr. 14) (**Hafidh et al., 2012a**). Tato pozorování poukazují na dvojí roli komplexu APC/C v buněčném cyklu generativních buněk, v nichž je transkripční represe cyklinu B1 propojena s degradací bílkovin zprostředkovanou ubikvitinem.

Klidový stav mitotického buněčného cyklu ve 4h pylových láčkách byl dále zdůrazněn nižším zastoupením známých aktivátorů buněčného cyklu. Cyklin B1;1 jako hlavní regulátor přechodu G2/M byl ve zralém pylu téměř nedetekovatelný a jeho aktivita rostla během růsty láčky až k vrcholu během mitotického okna, aby následně klesla po proběhnutí PMII (Obr. 14) (**Hafidh et al., 2012a**). Klíčovým regulátorem integrujícím buněčný cyklus a určení buněčného osudu samčí zárodečné linie je nepochybně protein DUO1 (Rotman et al., 2005). Jeho tabákový ortolog byl anotován jako NtDUO1-like (NCBI blastp accession AB032537 (Q8H0H3), e-value 1e-78). Nepřekvapí proto, že jeho exprese i u tabáku kulminovala právě v období mitotického okna podobně jako exprese dalšího aktivátoru buněčného cyklu TCP20, což reflektovalo jejich cílový gen CycB1;1 stejně jako status generativní buňky či buněk spermatických (**Hafidh et al., 2012a**).

Propojení mitotického dělení generativní buňky s určením osudu spermatických buněk je vymezeno překrývající se expresí známých markerů diferenciace buněčného osudu uvnitř generativní buňky stejně jako nově vzniklých spermatických buněk. DUO1 integruje obě události, což umožňuje rozdělení generativní buňky a současnou regulaci transkripce řady markerů diferenciace spermatických buněk (Brownfield et al., 2009; Borg et al., 2011). U tabáku jsme popsali homology 29 cílových genů DUO1 identifikovaných původně v huseníčku, a to včetně dvou ověřených cílů. Patří mezi ně *CHR34* (chromatin remodelling protein), *DAW1* (WD-40 CUL4-RING ubikvuitin ligáza), gen kódující protein z rodiny faktorů vyznačujících se přítomností zinkového prstu (C3HC4-type RING finger), *DAU1* (DUO1 aktivovaný protein neznámé funkce) a *NAC074* (NAC-domain containing protein 74) (Obr. 14) (**Hafidh et al., 2012a**). Vzhledem k prokázané roli proteinu DUO1 můžeme důvodně předpokládat, že uvedené geny mohou kódovat regulátory specifikace osudu spermatických buněk také v tabáku (**Hafidh et al., 2012a**).

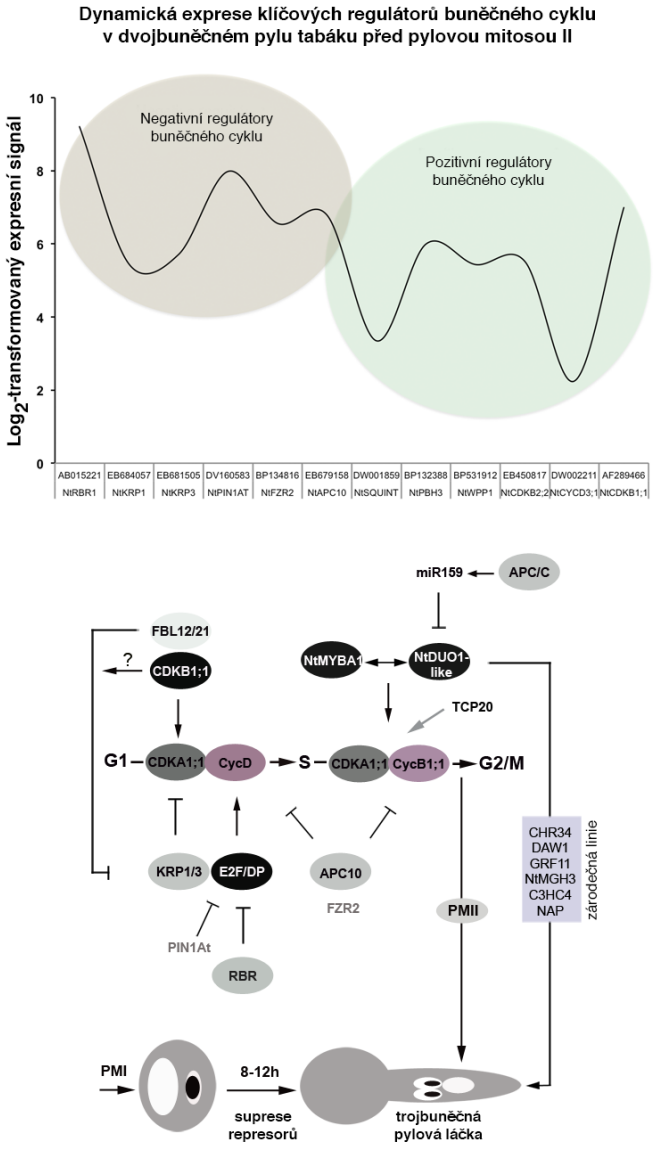
Souhrnně můžeme říci, že analýza vývoje samčího gametofytu v obdobích před druhou haploidní mitosou a po ní odkryla střídavou akumulaci konzervovaných regulátorů buněčné proliferace a determinant buněčného osudu synchronně s progresí cyklu buněk zárodečné linie (Obr. 15). Jejich aktivita je tak velice pravděpodobně příčinou heterochronického posunu, který vedl k diverzifikovaným vzorům spermatogeneze krytosemenných rostlin.

A.3.4 Posttranskriptomické studie – funkční charakterizace pylových genů

Pylové transkriptomické studie nejen daly možnost nahlédnout na komplexnost genové exprese a její dynamiku během vývoje efektivně jednobuněčného systému u rostlin,

a to v celogenomové šíři; jejich hlavní význam tkví v tom, že umožnily klást si komplexnější, ale i cílenější otázky týkající se buněčných funkcí a regulace samčí zárodečné dráhy. V průběhu následných studií tak byla charakterizována řada genů s přímou vazbou na studované procesy a identifikovaných právě díky výsledkům transkriptomických studií.

Jedním z prvních příkladů byla komplexní charakterizace bílkovin ukotvených na povrch pylového zrna prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy (**GAPs**, GPI-anchored proteins) (Ikezawa, 2002). GPI-kotvy jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu postupným přidáváním monosacharidů, mastných kyselin a fosfoethanolaminů na fosfatidylinositol. Defekty v biosyntéze GPI obecně mohou blokovat růst buněk, buněčné dělení či morfogenezi a jejich důsledky mohou být letální. V návaznosti na uveřejnění pylového transkriptomu bylo popsáno ne méně než 47 potenciálních GPI-ukotvených bílkovin aktivních v pylu s tím, že pro 11 z nich byla prokázána asociace s buněčnou membránou pylového zrna prostřednictvím GPI-kotvy (**Lalanne et al., 2004a**). Řada z popsaných proteinů má své homology mezi proteiny podílejícími se na syntéze či remodelaci buněčné stěny, mezibuněčné signalizaci, a proto pravděpodobně hrají důležitou roli při kontrole polarizovaného růstu pylové láčky. Geny *SETH1* a *SETH2* u huseníčku kódují homology dvou bílkovin účastnících se prvního kroku GPI-biosyntetické dráhy. Jejich vyřazení vede ke snížené klíčivosti pylových zrn a zpomalenému růstu pylových láček spojenému s abnormálním ukládáním kalosy, což ve svém důsledku specificky blokuje přenos mutantní alely do další generace prostřednictvím samčího gametofytu. Toto zjištění demonstrovalo zásadní roli

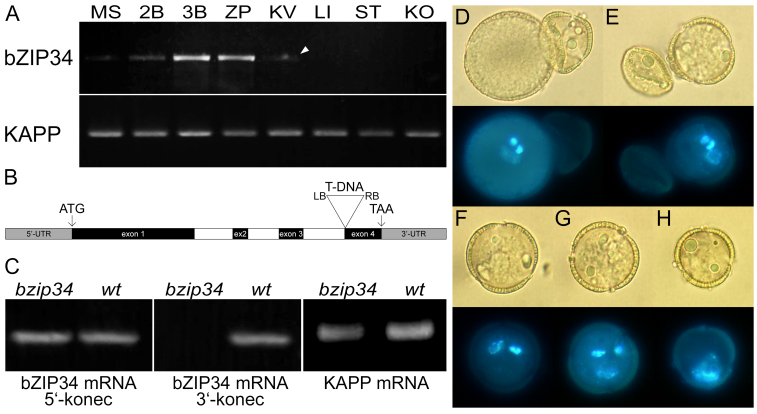


Obr. 15. *Předpokládaný model aktivity pozitivních a negativních regulátorů buněčného cyklu v samčí zárodečné linii ukazující jeho heterochronický posun u rostlin s dvojjaderným pylem oproti druhům s pylem trojjaderným (upraveno podle* ***Hafidh et al., 2012a****).*

biosyntézy GPI kotvy v pylu pro syntézu a metabolismus buněčné stěny (**Lalanne et al., 2004a**).

Druhým příkladem může být globální charakterizace další skupiny pylových membránových bílkovin, jejímž prvním krokem byla studie rodiny **CHX** (cation/H^+ exchangers; kation/H^+ antiportéry) (**Sze et al., 2004**), která vyústila až v komplexní analýzu pylových **membránových transportérů** (**Bock et al., 2006**). Konkrétním výstupem této kombinované bioinformatické a experimentální studie byl souhrn překvapivě vysokého počtu membránových transportérů aktivních v pylu, konkrétně se jednalo o 1046 genů z 1511 transportérových genů přítomných na genovém čipu ATH1. Mezi těmito geny bylo i relativně vysoké zastoupení předpokládaných pylově specifických genů – 150, tedy téměř 15%. Právě tyto geny jsou postupně charakterizovány ve spolupracující laboratoři (Dr. Heven Sze, University of Maryland, MA, USA) a jednotlivé výsledky jsou postupně uveřejňovány (Lu et al., 2011; Chanroj et al., 2013).

Mezi nejkonkrétnější výstupy posttranskriptomických studií patří charakterizace několika regulátorů vývoje samčí zárodečné linie – transkripčních faktorů rodin bZIP, HSF a C2. Protein **AtbZIP34** byl prvním transkripčním faktorem rodiny bZIP, u něhož byla experimentálně potvrzena důležitá úloha pro správný vývoj a funkci samčího gametofytu (**Gibalová et al., 2009**). Fenotypová analýza T-DNA-inserčních mutantů v genu *AtbZIP34* ukázala řadu morfologických defektů, které vyústily v nižší klíčivost pylu a pomalejší růst pylových láček *in vitro* i *in vivo*. Světelná i fluorescenční mikroskopie prokázala malformovaná a nesprávně umístěná jádra a přítomnost charakteristických lipidových inkluzí v cytoplazmě pylu *atbzip34*-(Obr. 16). Skenovací a transmisní elektronová mikroskopie dále odhalila defekty struktury exiny i intiny a redukci endomembránového systému. Transkriptomická studie navíc ukázala na významnou frakci membránových předašečů rodiny LTP (lipid transfer proteins) a dále na 34 genů kódujících transkripční faktory se změněnou expresí v pylu *atbzip34*-. Všechna tato data naznačují komplexní roli proteinu AtbZIP34 v kontrole



Obr. 16. *Funkční charakterizace genu AtbZIP34 v huseníčku (Arabidopsis thaliana). A) Expresní profily AtbZIP34 a KAPP (konstitutivní kontrola) mRNA získané pomocí RT-PCR v mikrosporách (MS), dvojbuněčném (2B), trojbuněčném (3B) a zralém (ZP) pylu, květenstvích (KV), listech (LI), stoncích (ST) a kořenech (KO). B) Model genu AtbZIP34 včetně lokalizace insertu T-DNA. C) Ověření exprese 5'- a 3'-koncových oblastí AtbZIP34 a KAPP mRNA v divokém (wt) a mutantním (atbzip34) pylu. D-H) Fenotypové defekty pylu nesoucího mutaci atbzip34, každý obrázek je ve světlém poli a v UV světle po použití barvičky DAPI. Obr. (D) zobrazuje divoký i mutantní pyl, ostatní jen mutanty atbzip34 (upraveno podle* ***Gibalová et al. 2009****).*

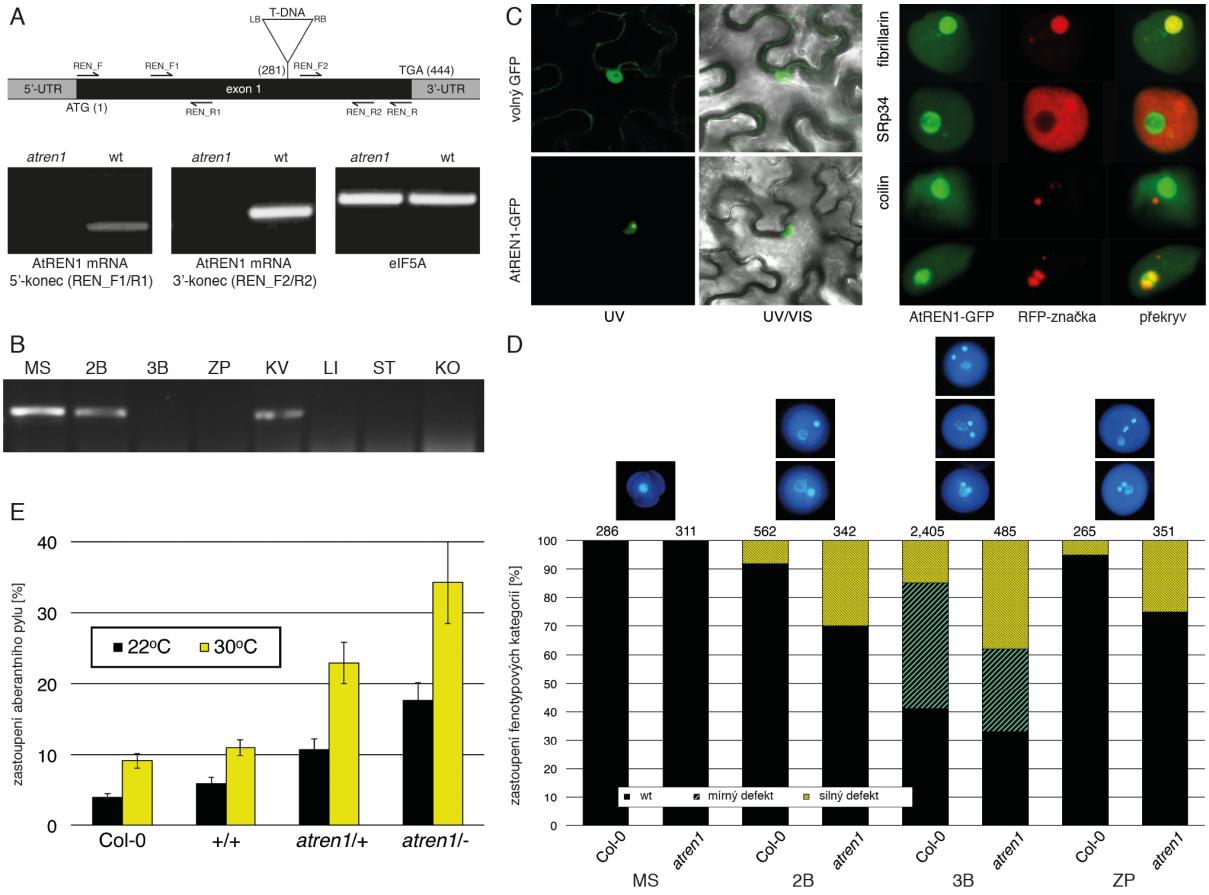
vývoje samčí zárodečné linie integrující sporofytickou (syntéza a vzorování exiny) a gametofytickou (syntéza intiny, regulace metabolismu lipidů) roli v tomto ohledu se jednalo o první takto detailně charakterizovaný pylový transkripční faktor.

Pozdní pylově-specifický protein **DEPOLL** byl původně anotován jako transkripční faktor rodiny C2H2, nicméně jeho detailní bioinformatická analýza ukázala nepřítomnost DNA-vazebné domény a tím vyvrátila hypotézu, že se jedná o transkripční faktor. Naopak jsme potvrdili přítomnost domény C2 v N-koncové oblasti bílkoviny. Doména C2 byla původně popsána jako Ca^{2+}-vazebná doména proteinkinázy C (Nalefski and Falke, 1996; Corbalan-Garcia and Gomez-Fernandez, 2010) a během své evoluce pravděpodobně divergovala za vzniku Ca^{2+}-dependentních a Ca^{2+}-independentních variant interagujících s řadou různých ligandů popsaných v široké skupině proteinů většinou asociovaných s membránami (Nalefski and Falke, 1996). Prašníky rostlin *depoll* obsahovaly zvýšený podíl abortovaných pylových zrn a dalším charakteristickým znakem, jak odhalila transmisní elektronová mikroskopie, bylo oddělení intiny a exiny, a to i na několika místech v jednom pylovém zrnu. Je zajímavé, že podobně jako u mutanta *atbzip34* transkriptomický experiment odhalil řadu členů několika genových rodin, jejichž exprese byla v mutantním pylu změněna; jednalo se o geny účastnící se membránového transportu (lipid transfer proteins, LTPs) a metabolismu buněčné stěny (Dupľáková, 2010).

AtREN1 (RESTRICTED-TO-NUCLEOLUS) z rodiny HSF (heat shock factors) naproti tomu patří mezi transkripční regulátory, jejichž aktivita obvykle souvisí s teplotním stresem a které nebývaly dávány do souvislosti s funkcí samčího gametofytu. Gen *AtREN1* vykazuje časný expresní profil a jím kódovaný protein AtREN1 je lokalizován specificky v jadérku (Obr. 17). Mutace *atren1* způsobuje řadu subtilnějších fenotypových defektů, z nichž nejtypičtějším je organizace MGU, konkrétně vzdálenost vegetativního a generativního jádra po první haploidní mitose (Reňák, 2011) a velikost jadérka (**Reňák et al., 2014**). Absence proteinu AtREN1 v mutantním pylu se navíc nepříznivě projevila při zrání pylu za zvýšené teploty homozygotní i heterozygotní rostliny obsahovaly za těchto podmínek vyšší zastoupení defektního či abortovaného pylu s tím, že v homozygotních rostlinách bylo zvýšení počtu defektních pylových zrn přibližně dvojnásobné proti heterozygotům (Obr. 17). Z těchto skutečností můžeme vyvodit pleiotropní efekt transkripčního faktoru AtREN1; jednak se pravděpodobně účastní biogenese ribosomální RNA či dalších procesů spojených s jadérkem a jednak má jeho přítomnost pozitivní vliv na vývoj pylu v podmínkách teplotního stresu (**Reňák et al., 2014**).

A.3.5 Translace v pylu

Přes jasnou a nepopiratelnou důležitost transkripce a její kontroly pro správný vývoj a zrání samčího gametofytu je klíčení pylu řady druhů víceméně nezávislé právě na transkripci, ale životně závislé na translaci (Twell, 1994; Twell, 2002). Také huseníček sleduje

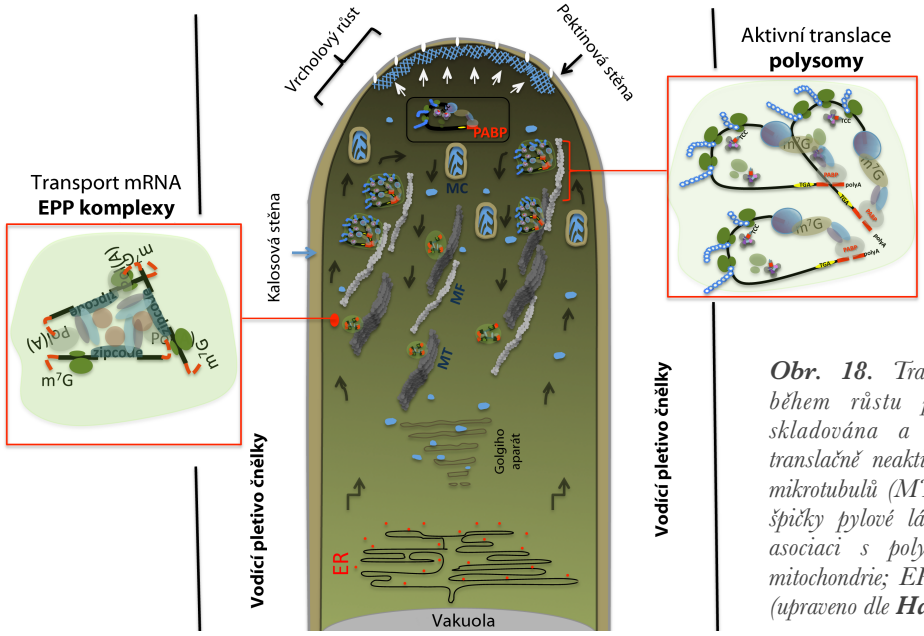


Obr. 17. *Funkční charakterizace genu AtREN1 v huseníčku (Arabidopsis thaliana). A) Model genu AtREN1 včetně lokalizace insertu T-DNA a ověření exprese 5'- a 3'-koncových oblastí AtREN1 a eIF5A (konstitutivní kontrola) mRNA v divokém (wt) a mutantním (atren1) pylu. B) Expresní profil AtREN1 mRNA získané pomocí RT-PCR v mikrosporách (MS), dvojbuněčném (2B), trojbuněčném (3B) a zralém (ZP) pylu, květenstvích (KV), listech (LI), stoncích (ST) a kořenech (KO). C) Lokalizace fúzního proteinu AtREN1-GFP v epidermálních buňkách Nicotiana benthamiana. Fúzní protein byl lokalizován specificky v jadérku, jak ukazuje kolokalizace AtREN1-GFP s markery jadérka (fibrillarin), nukleoplasmy (SRp34) a Cajalových tělísek (coilin). UV - epifluorescence, UV/VIS - překryv obrázků získaných pomocí epifluorescence a ve světlém poli. D) Zastoupení fenotypových defektů pylových zrn získaných z divokých (Col-0) a mutantních (atren1/-) rostlin. Čísla nad jednotlivými sloupci uvádějí počty pozorovaných mikrospor/pylových zrn. E) Vliv působení teplotního stresu na fenotyp zralého pylu. Černé sloupce ukazují zastoupení fenotypových defektů při standardní teplotě (22°C) u kontrolních rostlin (Col-0) a u segregujícího potomstva heterozygotních rostlin atren/+. Žluté sloupce ukazují zastoupení fenotypových aberací u pylu ze stejných rostlin po působení teplotního stresu 30°C po dobu dvou dní. Sloupce jsou doplněny úsečkami vyznačujícími standardní odchylky jednotlivých měření (upraveno dle* ***Reňák et al. 2014****).*

tento obecný trend (**Honys and Twell, 2004**) a jsou k dispozici přesvědčivé důkazy pro existenci zásobních mRNA skladovaných k následnému využití při translaci během růstu pylových láček (**Honys et al., 2009**). Akumulace pylových mRNA v pozdních fázích dozrávání pylu (Tupý, 1982; Schrauwen et al., 1990; **Honys and Čapková, 2000**) a přítomnost příslušných skladovaných transkriptů v pylových láčkách potvrzuje, že mnoho mRNA přežívá dehydrataci pylu i jeho následnou rehydrataci. Vývojové transkriptomické studie potvrdily existenci těchto skladovaných mRNA ve zralém pylu. Většina vysoce abundantních pylových transkriptů, jejichž exprese vzrůstá po II. pylové mitose, spadá právě do této kategorie a představuje skupinu zásobních mRNA (**Honys and Twell, 2004; Hafidh et al., 2012a,b**).

Translačně neaktivní mRNA byly opakovaně nalézány v asociaci s řadou bílkovin ve formě volných, skladovaných, translačně neaktivních ribonukleoproteinových částic (mRNP). mRNP částice byly poprvé popsány v živočišných (Spirin and Nemer, 1965) a kvasinkových buňkách, pro něž je také k dispozici nejvíce informací (viz Erickson and Lykke-Andersen, 2011; Rodriguez-Navarro and Hurt, 2011; Decker and Parker, 2012; Pratt and Mowry, 2013; Xing and Bassell, 2013). Znalosti rostlinných mRNP jsou zřetelně omezenější (Bailey-Serres et al., 2009; **Hafidh et al., 2011**; Lin et al. 2014; Mustroph et al., 2009; Mustroph et al., 2013). Fenomén translační represe skladované mRNA v pylu byl předpokládán Mascarenhasem (Mascarenhas, 1993) a záhy poté také prokázán (Štorchová et al., 1994). S využitím translačně regulovaného pylově specifického modelového systému NTP303/p69 (Čapková et al., 1987, 1988; Weterings et al., 1992) byla následně prokázána i přítomnost skladovaných mRNP ve zrajícím pylu tabáku (Honys and Čapková, 2000), jejichž významná část se nachází ve formě EPP granulí (**Honys et al., 2000; Honys et al., 2009**), které mimo vlastní skladované mRNA a s nimi asociované bílkoviny obsahují celou translační mašinérii ve vazbě na cytoskelet (**Honys et al., 2009; Hafidh et al., 2011**).

Identifikace EPP částic v samčím gametofytu tabáku potvrdila přítomnost komplexů podobných zárodečným granulím popsaných v gametách živočichů i u semenných rostlin (viz Arkov and Ramos, 2010; Hafidh et al., 2011; Nguyen-Chi and Morello, 2011; Voronina et al., 2011). Kupříkladu zárodečné granule octomilky se podílejí na transportu maternálních mRNA v počátečních fázích embryogeneze (Sengupta and Boag, 2012). Abundance a složení EPP částic nejen ukazuje na jejich důležitost, ale hlavně naznačuje jejich možnou podobnou úlohu během progamické fáze samčího gametofytu (Obr. 18). EPP částice představují komplexní aparát pro úpravy, transport a subcelulární lokalizaci a spřaženou iniciaci translace. Proteomická analýza EPP částic ukázala, že obsahují proteiny účastnící se jak metabolismu bílkovin, konkrétně jejich syntézy (eIF4A-8), úprav (BiP4) a transportu (Rab11a), tak lokalizace a translace mRNA včetně cytoskeletálních proteinů, kináz, fosfatas (**Honys et al., 2009**) a DEAD-box helikas (**Hafidh et al., 2013**). EPP částice navíc obsahují soubor skladovaných mRNA translačně umlčených v časnějších vývojových stádiích pylu (Honys a Hafidh, nepublikovaná data). Řada z uložených transkriptů je masivně překládána buď v pozdních fázích vývoje pylu a/nebo transportována do špičky rostoucí pylové láčky k translaci (Obr. 18). Tato možná úloha EPP částic navíc na první pohled překvapivě výrazně připomíná aktivitu neuronálních granulí v axonech lidských neuronů (Elvira et al., 2006; Hirokawa, 2006; Doyle and Kiebler, 2011). Směrový růst neuronů je podmíněn dopravou zásobních mRNA právě ve formě neuronálních granulí a jejich následnou translací v místech synaptických ploch. Podobně jako částice EPP, sestávají i neuronální granule z translačního aparátu a regulačních RNA-vazebných proteinů. Mezi popsané složky neuronálních granulí patří skladované mRNA, RNA-vazebné bílkoviny (HUD, G3BP, Sam68, SYNCRPI, hnRNP A2, RNG105, FMRP a STAUFEN) a konečně translační iniciační faktory



Obr. 18. *Transport a translace mRNA během růstu pylové láčky. mRNA je skladována a transportována ve formě translačně neaktivních EPP komplexů podél mikrotubulů (MT) a mikrofilament (MF) do špičky pylové láčky, kde je aktivována a v asociaci s polysomy translatována. MC, mitochondrie; ER, endoplasmatické retikulum (upraveno dle* ***Hafidh et al., 2011****).*

a malé a velké ribosomální podjednotky (Anderson and Kedersha, 2009). Jako takové představují neuronální granule mediátory směrového růstu a následné tvorby interakční sítě nervových buněk díky lokalizaci a iniciaci translace specifických transkriptů v rostoucích špičkách axonů. Analogická úloha v dynamice samčího gametofytu se rýsuje i pro EPP částice v rostoucích pylových láčkách semenných rostlin, nicméně pro její potvrzení je ještě třeba experimentálních důkazů.

A.3.6 Úsvit pylové proteomiky

A.3.6.1 Pylová proteomika

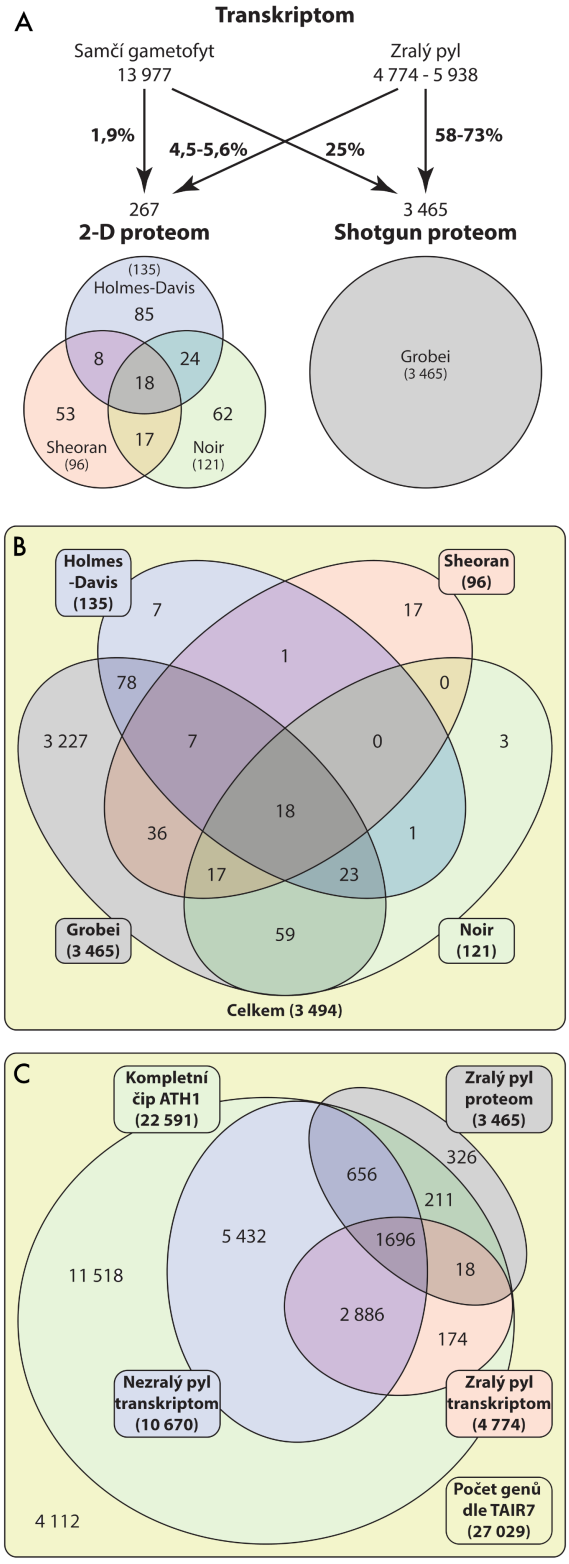
Transkriptomické analýzy nám poskytly a nadále poskytují cenné informace o globální i specifické genové expresi a její dynamice. Transkriptomická data jsou však výrazně méně vypovídající ve vztahu k přítomnosti a aktivitě funkčních produktů přepisovaných genů proteinů, neboť při studiu genové exprese musíme vzít v úvahu skutečnost, že proteom zcela neodpovídá transkriptomu (de Groot et al., 2007), což platí zejména pro systémy s výraznou měrou translační regulace. Mezi ty patří i samčí gametofyt. Zásadním důvodem je, že není v technických možnostech transkriptomiky vzít v potaz i možný vliv dalších regulačních úrovní genové exprese (Keene, 2007), které v této kaskádě následují úroveň transkripční. Vliv sestřihu (Lorkovic and Barta, 2004; Collins, 2011; Reddy et al., 2012) včetně identifikace potenciálně alternativně sestřižených transkriptů (Kazan, 2003; Sanchez et al., 2011; Xing and Li, 2011) je možné studovat pomocí kompletního „dlaždicovitého" genového čipu (Whole-Genome Tilling Array ATH6 ChIP, Nimblegen Systems, Inc.) či ještě lépe získáním transkriptomu pomocí RNA-Seq (Loraine et al., 2013). Velmi výraznou měrou se však při vývoji samčího gametofytu uplatňují i další post-trankskripční regulační úrovně, zejména úroveň translační a fenomén skladované mRNA

(**Hafidh et al., 2011**; Lin et al. 2014). Ze všech těchto důvodů byla a nadále přetrvává zřejmá nutnost doplnit transkriptomická data daty proteomickými.

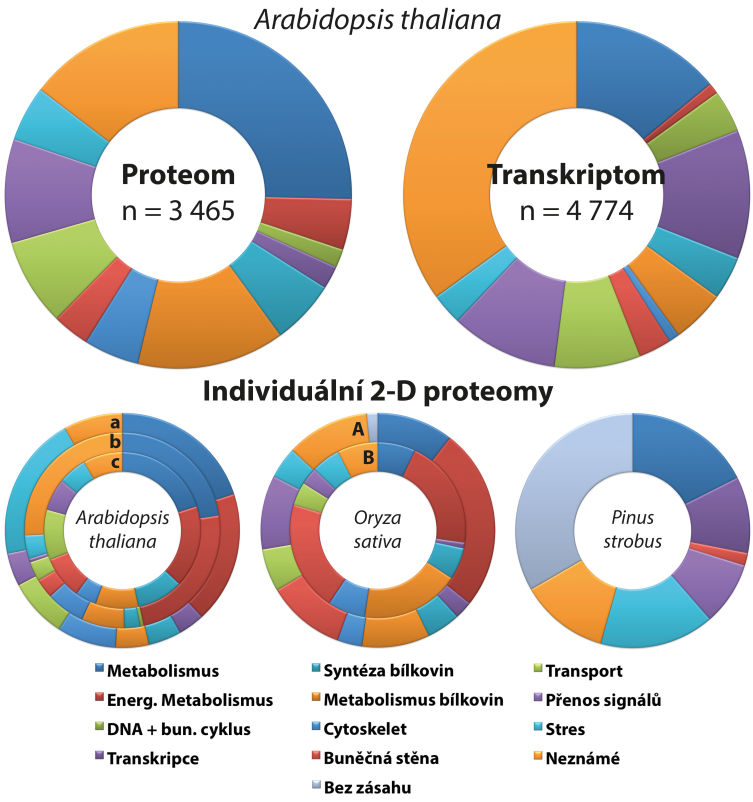
S určitým zpožděním proti transkriptomice se v polovině minulého desetiletí začaly objevovat první práce věnované studiu pylového proteomu. Překvapivě prvním druhem, jehož, byť značně neúplný, pylový proteom byl publikován, byla borovice (*Pinus strobus*) (Fernando, 2005). Následovala řada druhů huseníček (Holmes-Davis et al., 2005; Noir et al., 2005; Sheoran et al., 2006; Grobei et al., 2009; Zou et al., 2009), rýže (Dai et al., 2006; Dai et al., 2007), meruňka obecná (*Prunus armeniaca*) (Feng et al., 2006), čajovník (*Camellia sinensis*) (Li et al., 2008), lilie (*Lilium longiflorum*) (Pertl et al., 2009), řepka olejka (*Brassica napus*) (Sheoran et al., 2009), rajče (*Solanum lycopersicum*) (Sheoran et al., 2009; Lopez-Casado et al., 2012), dub cesmínovitý (*Quercus ilex*) (Valero Galvan et al., 2012) atd. Proteomické studie se samozřejmě nevěnovaly jen charakterizaci celkového proteomu zralých pylových zrn; cílem byla i srovnávací proteomika mapující vývoj pylu rajčete (*Solanum lycopersicum*) (Chaturvedi et al., 2013), tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Ischebeck et al., 2013) a smrku (*Picea wilsonii*) (Chen et al., 2012) či sledující změny pylového proteomu za stresu (Chen et al., 2012; Sarhadi et al., 2012). Jednotlivé studie se také často zaměřovaly na konkrétní buněčné typy (spermatické buňky; Zhao et al., 2013) nebo buněčné kompartmenty, např. membrány (Pertl et al., 2009; Han et al., 2010) či mRNP komplexy, (**Honys et al., 2009**). Další studie se zaměřují na specifické skupiny proteinů (např. alergeny; Petersen et al., 2006; Abou Chakra et al., 2012; Shahali et al., 2012) popřípadě proteiny vyznačující se konkrétní posttranslační modifikací, zejména fosforylací (**Fíla et al., 2012**; Mayank et al., 2012). Zajímavou skupinu proteinů tvoří proteiny asociované s růstem pylové láčky pletivy pestíku, konkrétně proteiny pylového apoplastu (Ge et al., 2011; Sang et al., 2012; Hafidh, Fíla, Čapková a Honys, nepublikovaná data) či srovnání proteomů opylené a neopylené blizny ve vztahu k pylové inkompatibilitě (Li et al., 2012; Sang et al., 2012; Chalivendra et al., 2013). Již z tohoto výčtu je patrné, že proteomika má výrazně širší taxonomický záběr než čipová transkriptomika, i mimo klasické modelové druhy, neboť proteomika není nutně tolik omezena znalostí sekvencí příslušných genomů.

Řada studií z ranějšího období byla založena na extrakci intaktních bílkovin ze spotů isolovaných z gelů po 2-D elektroforéze, které byly po ošetření proteázami analyzovány pomocí hmotnostní spektroskopie. Proto jejich výsledkem byla jen velice omezená frakce celkového proteomu čítající většinou několik set proteinů, téměř bez výjimky méně než 1000. To samozřejmě nutně vedlo k řádově nižší kvantitativní účinnosti této metody ve srovnání s transkriptomikou a s tím související malý překryv mezi jednotlivými experimenty. Jako příklad mohou posloužit tři první publikované pylové proteomické datové soubory, v nichž bylo postupně identifikováno 135 (Holmes-Davis et al., 2005), 121 (Noir et al., 2005) a 96 (Sheoran et al., 2006) bílkovin. S ohledem na určité překryvy mezi jednotlivými soubory zahrnovala známá frakce pylového proteomu 267

bílkovin (Obr. 19). Sondy pro odpovídající transkripty jsou na genovém čipu ATH1 přítomny pro 237 z těchto bílkovin. Naproti tomu již bylo několikrát zmíněno, že transkriptomická data udávají, že během vývoje samčího gametofytu huseníčku je aktivních 13 977 genů (**Honys and Twell, 2004**), z nichž 4 774 až 5 938 bylo identifikováno ve zralém pylu. Za zmínku stojí velice malý překryv mezi publikovanými proteomickými datovými soubory ze všech 267 popsaných bílkovin bylo 200, tedy 75 %, nalezeno vždy jen v jediné studii. S ohledem na velmi malou frakci pylového proteomu, která byla takto pokryta, není tento fakt nijak zarážející. Je možné předpokládat, že bílkoviny nalezené více autory jsou kódovány nejsilněji exprimovanými geny. Transkriptomická data tuto hypotézu potvrzují, protože všech 18 genů kódujících bílkoviny popsané ve všech třech studiích patří mezi nejvíce abundantní. Zároveň patří do funkčních kategorií obsahujících omezené množství obvykle velmi silně exprimovaných genů: energetický metabolismus (8), stresová odpověď (4), syntéza a metabolismus buněčné stěny (2), cytoskelet (2) a syntéza (1) a metabolismus (1) bílkovin. Významnou úlohu zde ovšem nepochybně sehrál také výběr metody použité jednotlivými skupinami pro extrakci pylových bílkovin, které složení proteomické frakce ovlivnily zcela zásadním způsobem, jak bylo nezávisle prokázáno pro pyl tabáku (**Fíla et al., 2011**). Transkriptomická data také



Obr. 19. *Srovnání známých frakcí pylového transkriptomu a proteomu huseníčku (Arabidopsis thaliana). A) Srovnání velikostí transkriptomu samčího gametofytu a zralého pylu se známou frakcí „gelového“ (2-D proteom) a "negelového" (Shotgun proteom) pylového proteomu B) Vennův diagram znázorňující překryvy mezi jedním "negelovým" a třemi "gelovými" proteomickými datovými soubory. C) Vennův diagram znázorňující překryvy mezi Shotgun proteomem a transkriptomy nezralého a zralého pylu huseníčku. Transkriptomická data pocházejí ze studie* ***Honys and Twell, 2004****, proteomické datové soubory byly převzaty z prací Holmes-Davis et al., 2005; Noir et al., 2005; Sheoran et al., 2006 a Grobei et al., 2009.*



Obr. 20. *Funkční kategorizace pylového proteomu a transkriptomu. Velké koláče znázorňují situaci ve zralém pylu huseníčku (Arabidopsis thaliana); shotgun proteom (Grobei et al., 2009) a transkriptom (**Honys et al., 2004**). Malé koláče představují datové soubory tvořící 2-D proteomy zralého pylu huseníčku (Sheoran et al., 2006, 96 proteinů (a); Noir et al., 2005, 121 proteinů, (b) Holmes-Davis et al., 2005, 135 proteinů (c)), rýže (Oryza sativa; zralý pyl, Dai et al., 2006, 122 proteinů (A) a pylové láčky, Dai et al., 2007, 187 proteinů (B)) a borovice (Pinus strobus, Fernando, 2005, 55 proteinů).*

ukázala, že bílkoviny tvořící „gelový" či 2-D pylový proteom většinou nebyly specifické, ale že většina genů kódujících tyto pylové bílkoviny byla aktivní nejen v dalších květních orgánech, ale také ve vegetativních pletivech. To opět odpovídá předpokladu, že zde popsaná část pylového transkriptomu zahrnuje zejména vysoce abundantní bílkoviny, které jen zřídka bývají pylově specifické. Přesto je možné více než 92 %-ní překryv se sporofytickými pletivy považovat za vysoký. Charakterizace byť omezené části pylového proteomu konečně poprvé umožnila také funkční kategorizaci pylového transkriptomu a proteomu a jejich porovnání (Obr. 20). V proteomických datových souborech opět vidíme zřetelně vyšší zastoupení funkčních kategorií sdružujících abundantní bílkoviny. Zároveň je ovšem zřejmá variabilita mezi jednotlivými pylovými proteomy. Ta se týká zejména frakce bílkovin s neznámou funkcí a bílkovin stresové odpovědi. Zejména v případě bílkovin, jejichž syntéza souvisí se stresem, však není možno vyloučit možný vliv zpracování biologického materiálu. Obecně ve srovnání s transkriptomem můžeme konstatovat vyšší zastoupení bílkovin účastnících se masivních procesů obecného a energetického metabolismu a syntézy a metabolismu bílkovin. Totéž můžeme říci i o referenčních datových souborech charakterizující proteom rýže (Dai et al., 2006; Dai et al., 2007), dalšího modelového druhu s trojbuněčným pylem, u něhož je mimo již popsaných kategorií výrazně vyšší zastoupení i bílkovin účastnících se přenosu signálů. V této souvislosti působí výrazně odlišně proteom pylu borovice (Fernando, 2005), nicméně mimo skutečnost, že se jedná o nahosemennou rostlinu, u níž se stavba a vývoj samčího gametofytu liší od krytosemenných, to může být částečně způsobeno i výrazně menší velikostí publikovaného souboru 55 bílkovin. Zajímavý je zejména velmi vysoký, přibližně třetinový podíl bílkovin, pro něž se v databázích nepodařilo nalézt žádný blízký homolog.

Zásadním průlomem nejen pylové proteomiky bylo zavedení negelových proteomických technik, které řádově zvýšily účinnost identifikace přítomných peptidů a následně i celých proteinů. Negelové techniky se navíc vyznačují i možností přesnější kvantifikace proteinů, což bylo v případě použití gelových postupů spíše nemožné. První tzv. shotgun proteomická studie identifikovala v pylu huseníčku 3465 bílkovin (Grobei et al., 2009). Mezi nimi byla i naprostá většina proteinů identifikovaných pomocí dřívějších gelových technik (Obr. 19). Značné, téměř třináctinásobné rozšíření známé frakce pylového proteomu se odrazilo i v kategorizaci popsaných bílkovin, která se velice přiblížila výsledkům získaným na bázi transkriptomických studií (Obr. 20). Potvrdilo se i významné zastoupení stabilních strukturních bílkovin. Srovnání proteomických a transkriptomických dat navíc ukázalo, že naprostá většina z 2928 (85 % popsaného proteomu) genů popsaných v pylu na proteomické i transkriptomické úrovni byla kódována transkripty přítomnými již v raných stádiích vývoje samčího gametofytu (Grobei et al., 2009), což představovalo nezávislé potvrzení rozsahu translační regulace genové exprese v pylu (**Honys et al., 2000; Honys and Čapková, 2000; Honys and Twell, 2004; Honys et al., 2009**). Konečně bylo identifikováno 537 pylových bílkovin (15 % pylového proteomu), které nebyly popsány v žádné v tu dobu známé transkriptomické studii, což učinilo z proteomiky zajímavou metodu studia genové exprese komplementární k transkriptomice.

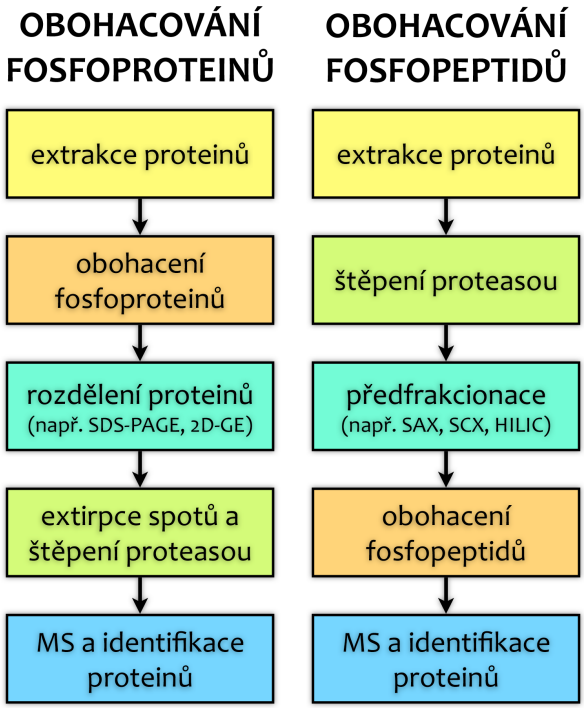
A.3.6.2 Pylová fosfoproteomika

Komplexní povaha regulace genové exprese na mnoha úrovních pochopitelně nemůže být v plné šíři postižena ani charakterizací globální genové exprese na úrovni transkriptomu a proteomu. Existuje řada dalších regulačních úrovní způsobujících daleko subtilnější změny jednotlivých bílkovin nežli vlastní aktivace či represe transkripce či translace příslušného genu. Mezi regulační děje, jejichž důsledky obvykle nemohou být popsány klasickými proteomickými přístupy, patří posttranslační modifikace proteinů klíčové jednak pro vlastní funkci nově syntetizovaných bílkovin, dále pro určení jejich osudu a konečně představující další regulační úroveň kontrolující aktivitu příslušných proteinů, a to v závislosti na vývojovém stádiu či fyziologickém stavu buňky či orgánu. Právě z tohoto hlediska se jeví účelným studovat jednotlivé specifické frakce proteomu obsahující bílkoviny, které například podstoupily stejnou posttranslační modifikaci. Takové datové soubory vhodným způsobem doplňují komplexní transkriptomické či proteomické soubory a přispívají k ucelenému pohledu na zkoumaný biologický systém.

Reversibilní fosforylace proteinů představuje jednu z nejdynamičtějších posttranslačních modifikací a uplatňuje se v mnoha buněčných procesech regulace buněčného cyklu, přenos signálů, regulace dynamiky cytoskeletu, lokalizace a regulace funkce bílkovin a v neposlední řadě i regulace transkripce a translace. Důležitost fosforylovaných proteinů (fosfoproteinů) se však většinou neodráží v jejich abundanci. Spíše naopak, jejich nefosforylované protějšky jsou často v buňkách přítomné v nadbytku.

Navíc se jedná o reversibilní modifikaci, a proto vždy sledujeme jakýsi rovnovážný stav mezi fosforylovanými a nativními proteiny. Pokroky v oblasti obohacovacích technik však umožnily charakterizaci fosfoproteomu jako specifické frakce proteomu sdružující právě bílkoviny s často významnou regulační funkcí či naopak jejich substráty bílkoviny s regulovanou aktivitou (**Fíla and Honys, 2011**). Je zřejmé, že právě úspěšnost obohacení isolované frakce proteomu fosfoproteiny představuje klíčový předpoklad úspěchu a vyžaduje v každé práci precizní kontrolu (**Fíla and Honys, 2011**; Leitner et al., 2011; Tichy et al., 2011; Wang et al., 2011; Beltran and Cutillas, 2012). Původnější jsou postupy obohacování na úrovni intaktních proteinů, což u isolovaných fosfoproteinů umožňuje zjistit i jejich fyzikální charakteristiky. Tento postup se však potýká s řadou technických problémů, a proto se stále více prosazují techniky obohacování na úrovni fosfopeptidů, kdy obohacovacímu kroku předchází působení proteáz na proteinový extrakt. To vede k získání směsi fosfopeptidů zaujímajících výrazně méně komplexní konformaci. Tato směs je následně analyzována pomocí hmotnostní spektroskopie (Obr. 21) (**Fíla and Honys, 2011**). Velkou výhodou druhé skupiny obohacovacích technik je možnost identifikace přesného místa fosforylace, což je považováno za nejlepší důkaz správné aplikace vhodného obohacovacího protokolu.

V nedávné době byly téměř současně publikovány dvě studie popisující fosfoproteom zralého pylu modelových rostlin huseníčku (Mayank et al., 2012) a tabáku (Fíla et al., 2012). Tabáková studie navíc postihla i dynamickou povahu fosforylace, poněvadž sledovala změnu fosfoproteomu ve zralém a aktivovaném pylu. V obou případech byla výsledkem poměrně komplexní frakce fosfoproteomu. Ve zralém pylu huseníčku bylo popsáno 598 fosfoproteinů, u nichž bylo spolehlivě identifikováno 609 míst fosforylace (Mayank et al., 2012). Naproti tomu u tabáku bylo popsáno 139 fosfoproteinů obsahujících 52 prokázaných míst fosforylace (**Fíla et al., 2012**). U obou rostlinných druhů byl potvrzen přednostní výskyt fosfoproteinů ve specifických funkčních kategoriích přenos signálů (11 % popsaných fosfoproteinů u huseníčku, 6 % u tabáku), translace (7 % u huseníčku, 9 % u tabáku), lokalizace a skladování bílkovin (21 % u



Obr. 21. *Schématické znázornění obohacovacích technik fosfoproteinů a fosfopeptidů (vzájemně si odpovídající kroky jsou stejně podbarveny; upraveno podle* ***Fíla et al. 2012****).*

huseníčku, 19 % u tabáku). V této souvislosti byla zajímavá především identifikace řady kináz, translačních iniciačních faktorů, ribosomálních bílkovin, aktinů a tubulinů včetně specifických fosforylačních míst, která jsou často identická v obou zkoumaných druzích (**Fíla et al., 2014**).

A.4 Shrnující poznámky

Pylové transkriptomické studie poskytly a nadále poskytují první souhrnný pohled na genovou expresi a její dynamiku během vývoje efektivně jednobuněčného systému u rostlin, a to v celogenomové šíři. To umožňuje formulovat a následně experimentálně ověřovat komplexní hypotézy snažící se popsat fungování a kontrolu regulačních procesů v celé jejich složitosti. V průběhu samčí gametogeneze dochází k masivní represi genové exprese, což souvisí s ukončením buněčné proliferace. Na druhou stranu dochází i k selektivní aktivaci nové skupiny genů účastnících se pozdních fází vývoje pylu a zejména událostí následujících po opylení. Vývoj samčího gametofytu probíhá pod kontrolou dvou na sebe navazujících genových expresních programů, raného a pozdního, v jejichž rámci je exprimováno přes 600 transkripčních faktorů jako potenciálních regulátorů. Dostupná transkriptomická data pro pyl huseníčku již inspirovala mimo jiné studii popisující nejen jednotlivé geny, ale na úrovni *in silico* právě celé regulační sítě transkripčních faktorů aktivní v pylu (Wang et al., 2011).

Publikovaná data navíc podtrhují stále důležitější roli post-transkripčních procesů spojených se skladováním a transportem mRNA i bílkovin, zejména ve srovnání s tradiční úlohou transkripce. Vysoké zastoupení genů účastnících se syntézy a metabolismu buněčné stěny, cytoskeletu a přenosu signálů ukazuje na značnou funkční specializaci pylu v přípravě na svou klíčovou progamickou úlohu, která mimo jiné zahrnuje komunikaci s cílovými pletivy, rychlý a přesně cílený růst pylové láčky a konečně vlastní dvojité oplození (Qin et al., 2009; Boavida et al., 2011; Kessler and Grossniklaus, 2011; **Hafidh et al., 2012a,b**; Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; Leydon et al., 2013; Leydon and Johnson, 2013).

Složitost regulace genové exprese však vyžaduje komplexnější pohled, než jaký nám může poskytnout jeden, byť sebesofistikovanější metodický přístup. Nové perspektivy se proto otevírají díky integraci dostupných postupně se objevujících dat z různých zdrojů a díky aplikaci hierarchických přístupů systémové biologie. Ty sledují nejen jednotlivé biologické systémy a jejich složky a vlastnosti, ale zejména interakce mezi nimi s cílem popsat základní vztahy a kauzalitu jednotlivých dějů (Baginsky et al., 2010). Základním přístupem je kombinace, korelace a integrace transkriptomických a proteomických dat s cílem popsat funkční a regulační sítě, typicky sítě transkripční (Pu and Brady, 2010) a post-transkripční (Loraine et al., 2013). Zejména při studiu proteomu je tendence k stále přesnějšímu zacílení zkoumané proteomické frakce buď na úroveň podbuněčných

kompartmentů, či posttranslačních modifikací zkoumaných proteinů, případně obojí (Wienkoop et al., 2010). Na druhou stranu transkriptomika není omezena pouze čipovými analýzami, které samy mají řadu limitů daných zejména rigidností svého uspořádání a nutností pracovat na modelovém organismu. Toto omezení odpadá při použití paralelního sekvenování (Next Generation Sequencing, NGS), v případě transkriptomiky konkrétně RNA-Seq (viz Wang et al., 2009). V jeho prospěch hovoří nejen stále se snižující cena, ale zejména dostatečné informační zázemí podmíněné již poměrně širokým spektrem plně osekvenovaných nejen rostlinných genomů umožňující nad rámec čipové transkriptomiky popsat i dříve neanotované geny a jejich sestřihové varianty. Příkladem použití a kombinace zde popsaných moderních technologií, u pylu prvním, je proteomická studie zralého pylu rajčete v kombinaci s RNA sekvenováním (Lopez-Casado et al., 2012) a transkriptomická studie zralého pylu huseníčku, která poprvé komplexně popsala fenomén alternativního sestřihu v samčím gametofytu (Loraine et al., 2013) . Je více než pravděpodobné, že právě podobných studií bude rychle přibývat.

Naše laboratoř nejen sleduje popsané moderní směry studia vývoje a funkce samčího gametofytu, ale v určitých směrech se dokonce aktivně podílí na jejich určování s tím, že data vzniklá v naší laboratoři slouží širší vědecké komunitě (**Honys and Twell, 2003, 2004; Fíla et al., 2012; Hafidh et al., 2012a**). Samozřejmě není možné setrvat na současných pozicích. Logickým pokračováním transkriptomických a proteomických studií byla a je probíhající funkční charakterizace konkrétních kandidátů, které popsané studie ukázaly. První výsledky již byly publikovány (**Gibalová et al., 2009; Reňák et al., 2012; Reňák et al., 2014**). Dalším krokem bude integrace znalostí získaných studiem jednotlivých genů, například možné zapojení transkripčních faktorů rodiny bZIP (**Gibalová et al., 2009**) do regulační kaskády pylových transkripčních faktorů rodin MADS-box (Verelst et al., 2007; Verelst et al., 2007) a MYB (Leydon et al., 2013) či možná úloha transkripčního faktoru AtREN1 (**Reňák et al., 2014**) v regulaci translace v pylu.

V současné době je patrný potenciál dvou směrů výzkumu samčího gametofytu. Předně se jedná o progamickou fázi a intenzivní komunikaci mezi rostoucí pylovou láčkou a maternálními pletivy pestíku a vlastním samičím gametofytem. Bylo popsáno, že během své pouti pestíkem k zárodečnému vaku se pylová láčka huseníčku setká nejméně se sedmi rozdílnými typy buněk (Palanivelu and Tsukamoto, 2012). To představuje ohromný komunikační potenciál a současný stav poznání (Kessler and Grossniklaus, 2011; Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; **Hafidh et al., 2014**) zjevně nepostihuje složitost celé situace. Druhým a do jisté míry souvisejícím směrem výzkumu je rozšíření záběru výzkumu hladin regulace genové exprese nad rámec kontroly transkripce. Neuvěřitelná rozmanitost ko-transkripčních a post-transkripčních dějů zrání pre-mRNA a zejména její (alternativní) sestřih, transport a lokalizace mRNA, řízená kontrola stability transkriptů a konečně translace - přispívá ohromné variabilitě exprese genetické informace, a je potešitelné, že

tato skutečnost začíná být postupně reflektována. Pyl ostatně představuje výtečný model studia post-transkripčních procesů. Pylová láčka je optimalizována pro rychlé a účinné dopravení samčích gamet k zárodečnému vaku a přítomnost skladovaných transkriptů (**Honys et al., 2000; Honys et al., 2009; Hafidh et al., 2013**) a jejich postupná translační aktivace představuje jeden z mechanismů, jak tohoto cíle dosáhnout. Další skladované transkripty přítomné ve spermatických buňkách dokonce mohou být aktivovány až po oplození a mohou tak představovat samčí příspěvek budoucí sporofytické generaci, podobně jako je tomu v případě produktu genu *SHORT SUSPENSOR* (Bayer et al., 2009).

Oba směry výzkumu představují značnou výzvu, nicméně výrazný pokrok na poli zobrazovacích technik, buněčné a molekulární biologie směrem k metodám *in vivo* či alespoň *semi in vivo* a konečně „high-throughput" technologií až k úrovni jednotlivých buněk či jejich frakcí činí dosažení konečných cílů realistickým ve střednědobém horizontu. Naše současné aktivity také mají ambici ubírat se těmito směry. Prvním krokem je popsání *in vitro* a *semi in vivo* sekretomu pylových láček tabáku (**Hafidh et al., 2014**; Hafidh, Fíla, Čapková a Honys, nepublikovaná data), který vhodně doplňuje transkriptomická data získaná pro pyl a pylové láčky tabáku (**Hafidh et al., 2012a,b**) a huseníčku (Qin et al., 2009), když experimentálně potvrzuje dříve popsanou aktivaci pylových láček buňkami pestíku (viz Leydon and Johnson, 2013) a její následnou intenzivní komunikaci s maternálními pletivy (viz Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013). Druhým krokem je charakterizace translatomu a sekvestromu, tedy aktivně translatované a skladované frakce pylového transkriptomu a jeho vývojové dynamiky (Hafidh, Breznenová, Bokvaj, Čapková a Honys, nepublikovaná data). Tento rozsáhlý datový soubor a jeho integrace s již existujícími informačními zdroji představují první krok k popsání mechanismů lokalizace a translační represe a aktivace konkrétních skladovaných transkriptů během progamické fáze.

A.5 Použitá literatura

Abou Chakra OR, Sutra JP, Demey Thomas E, Vinh J, Lacroix G, Poncet P, Senechal H (2012) Proteomic analysis of major and minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules. *J Proteome Res* **11:** 1208-1216

AGI (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408:** 796-815

Anderhag P, Hepler KP, Lazzaro MD (2000) Microtubules and microfilaments are both responsive for pollen tube elongation in the conifer Picea abies (Noeway spruce). *Protoplasma* **214:** 141-157

Anderson P, Kedersha N (2009) RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10:** 430-436

Anderson SN, Johnson CS, Jones DS, Conrad LJ, Gou X, Russell SD, Sundaresan V (2013) Transcriptomes of isolated Oryza sativa gametes characterized by deep sequencing: evidence for distinct sex-dependent chromatin and epigenetic states before fertilization. *Plant J* **76**: 729-741

Ariizumi T, Toriyama K (2011) Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol* **62:** 437-460

Arkov AL, Ramos A (2010) Building RNA-protein granules: insight from the germline. *Trends Cell Biol* **20:** 482-490

Astrom H, Sorri O, Raudaskoski M (1995) Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sex Plant Reprod* **8:** 61-69

Baginsky S, Hennig L, Zimmermann P, Gruissem W (2010) Gene expression analysis, proteomics, and network discovery. *Plant Physiol* **152:** 402-410

Bailey-Serres J, Sorenson R, Juntawong P (2009) Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci* **14:** 443-453

Bayer M, Nawy T, Giglione C, Galli M, Meinnel T, Lukowitz W (2009) Paternal control of embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Science* **323:** 1485-1488

Becker JD, Boavida LC, Carneiro J, Haury M, Feijo JA (2003) Transcriptional Profiling of Arabidopsis Tissues Reveals the Unique Characteristics of the Pollen Transcriptome. *Plant Physiol* **133:** 713-725

Bedinger P (1992) The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant Cell* **4:** 879-887

Bedinger PA, Hardeman KJ, Loukides CA (1994) Travelling in style: the cell biology of pollen. *Trends Cell Biol* **4:** 132-138

Beltran L, Cutillas PR (2012) Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids* **43**: 1009-1024

Berger F, Twell D (2011) Germline specification and function in plants. *Annu Rev Plant Biol* **62:** 461-484

Binarová P, Hause G, Cenklová V, Cordewener JH, Van Lookeren Campagne M (1997) A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of Brassica napus L. *Sex Plant Reprod* **10:** 200-208

Boavida LC, Borges F, Becker JD, Feijo JA (2011) Whole genome analysis of gene expression reveals coordinated activation of signaling and metabolic pathways during pollen-pistil interactions in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155:** 2066-2080

Bock KW, Honys D, Ward JM, Padmanaban S, Nawrocki EP, Hirschi KD, Twell D, Sze H (2006) Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. ***Plant Physiol*** **140: 1151-1168**

Bonhomme S, Horlow C, Vezon D, de Laissardiere S, Guyon A, Ferault M, Marchand M, Bechtold N, Pelletier G (1998) T-DNA mediated disruption of essential gametophytic genes in Arabidopsis is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone. *Mol Gen Genet* **260:** 444-452

Borg M, Brownfield L, Khatab H, Sidorova A, Lingaya M, Twell D (2011) The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **23:** 534-549

Borg M, Brownfield L, Twell D (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot* **60:** 1465-1478

Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijo JA, Becker JD (2008) Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. *Plant Physiol* **148:** 1168-1181

Bosch M, Derksen J, Mariani C (2003) A functional study of stylar hydroxyproline-rich glycoproteins during pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* **16:** 87-98

Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AA, Miki BL, Custers JB, van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14:** 1737-1749

Brewbaker JL (1967) The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *Amer J Bot* **54:** 1069-1083

Brownfield L, Hafidh S, Durbarry A, Khatab H, Sidorova A, Doerner P, Twell D (2009) Arabidopsis DUO POLLEN3 is a key regulator of

male germline development and embryogenesis. *Plant Cell* **21:** 1940-1956

Cai G, Cresti M (2009) Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years. *J Exp Bot* **60:** 495-508

Cai G, Cresti M (2010) Microtubule motors and pollen tube growth--still an open question. *Protoplasma* **247:** 131-143

Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Hepler PK (2008) Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol* **146:** 1611-1621

Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Hepler PK (2005) Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. *Cell Motil Cytoskeleton* **61:** 112-127

Collins LJ (2011) Spliceosomal RNA infrastructure: the network of splicing components and their regulation by miRNAs. *Adv Exp Med Biol* **722:** 86-102

Corbalan-Garcia S, Gomez-Fernandez JC (2010) The C2 domains of classical and novel PKCs as versatile decoders of membrane signals. *Biofactors* **36:** 1-7

Craigon DJ, James N, Okyere J, Higgins J, Jotham J, May S (2004) NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res* **32:** D575-577

Cui X, Wang Q, Yin W, Xu H, Wilson ZA, Wei C, Pan S, Zhang D (2012) PMRD: a curated database for genes and mutants involved in plant male reproduction. *BMC Plant Biol* **12:** 215

Čapková V, Hrabětová E, Tupý J (1980) Effects of cycloheximide on pollen of Nicotiana tabacum in culture. *Biochem Physiol Pflanzen* **175:** 412-420

Čapková V, Hrabětová E, Tupý J (1987) Protein changes in tobacco pollen culture: A newly synthesized protein related to pollen tube growth. *J. Plant Physiol.* **130:** 307-314

Čapková V, Hrabětová E, Tupý J (1988) Protein synthesis in pollen tubes: Preferential formation of new species independent of transcription. *Sexual Plant Reproduction* **1:** 150-155

Čapková V, Zbrožek J, Tupý J (1994) Protein synthesis in tobacco pollen tubes: preferential synthesis of cell-wall 69-kDa and 66-kDa glycoproteins. *Sex. Plant Reprod.* **7:** 57-66

Dai S, Chen T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T (2007) Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated Oryza sativa pollen. *Mol Cell Proteomics* **6:** 207-230

Dai S, Li L, Chen T, Chong K, Xue Y, Wang T (2006) Proteomic analyses of Oryza sativa mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics* **6:** 2504-2529

Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M, Grotewold EP (2003) AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics* **4:** 25

De Franceschi P, Dondini L, Sanzol J (2012) Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the Pyrinae (Rosaceae). *J Exp Bot* **63:** 4015-4032

de Graaf BH, Cheung AY, Andreyeva T, Levasseur K, Kieliszewski M, Wu HM (2005) Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *Plant Cell* **17:** 2564-2579

de Groot MJ, Daran-Lapujade P, van Breukelen B, Knijnenburg TA, de Hulster EA, Reinders MJ, Pronk JT, Heck AJ, Slijper M (2007) Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes. *Microbiology* **153:** 3864-3878

Decker CJ, Parker R (2012) P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4:** a012286

Dettmer J, Schubert D, Calvo-Weimar O, Stierhof YD, Schmidt R, Schumacher K (2005) Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *Plant J* **41:** 117-124

Ding Z, Wang B, Moreno I, Dupľáková N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Penčík A, Chen X, Tejos R, Skůpa P, Pollmann S, Mravec J, Petrášek J, Zažímalová E, Honys D, Rolčík J, Murphy A, Orellana A, Geisler M, Friml J (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis. *Nat Commun* 3: 941

Dobritsa AA, Coerper D (2012) The novel plant protein INAPERTURATE POLLEN1 marks distinct cellular domains and controls formation of apertures in the Arabidopsis pollen exine. *Plant Cell* **24:** 4452-4464

Dobritsa AA, Geanconteri A, Shrestha J, Carlson A, Kooyers N, Coerper D, Urbanczyk-Wochniak E, Bench BJ, Sumner LW, Swanson R, Preuss D (2011) A large-scale genetic screen in Arabidopsis to identify genes involved in pollen exine production. *Plant Physiol* **157:** 947-970

Dobritsa AA, Lei Z, Nishikawa S, Urbanczyk-Wochniak E, Huhman DV, Preuss D, Sumner LW (2010) LAP5 and LAP6 encode anther-specific proteins with similarity to chalcone synthase essential for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **153:** 937-955

Dobritsa AA, Shrestha J, Morant M, Pinot F, Matsuno M, Swanson R, Moller BL, Preuss D (2009) CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of Arabidopsis. *Plant Physiol* **151:** 574-589

Doyle M, Kiebler MA (2011) Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J* **30:** 3540-3552

Dresselhaus T (2006) Cell-cell communication during double fertilization. *Curr Opin Plant Biol* **9:** 41-47

Dresselhaus T, Franklin-Tong N (2013) Male-Female Crosstalk during Pollen Germination, Tube Growth and Guidance, and Double Fertilization. *Mol Plant* **6:** 1018-1036

Dresselhaus T, Lausser A, Marton ML (2011) Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses. *Ann Bot* **108:** 727-737

Dresselhaus T, Sprunck S (2012) Plant fertilization: maximizing reproductive success. *Curr Biol* **22:** R487-489

Ducker SC, Knox RB (1976) Submarine pollination in seagrasses. *Nature* **263:** 705-706

Dupľáková N (2010) Identification and characterisation of transcription factors affecting late stages of male gametophyte development in Arabidopsis thaliana. Charles University in Prague, Prague

Dupľáková N, Reňák D, Hovanec P, Honysová B, Twell D, Honys D (2007) Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP)--user-oriented transcriptomic database with easy-to-use graphic interface. ***BMC Plant Biol*** **7: 39**

Durbarry A, Vizir I, Twell D (2005) Male germ line development in Arabidopsis. duo pollen mutants reveal gametophytic regulators of generative cell cycle progression. *Plant Physiol* **137:** 297-307

Eady C, Lindsey K, Twell D (1995) The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. *Plant Cell* **7:** 65-74

Elfving F (1879) Studien über die Pollenkörner der Angiospermen. *Jenaische Zeitschr Naturw* **13**: 1-28 (cit. podle Ducker a Knox, 1976)

Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* **5:** 635-651

Erickson SL, Lykke-Andersen J (2011) Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J Cell Sci* **124:** 293-297

Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, Tornielli GB, Farina L, Zamboni A, Porceddu A, Venturini L, Bicego M, Murino V, Ferrarini A, Delledonne M, Pezzotti M (2012) The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *Plant Cell* **24:** 3489-3505

Feijo JA, Sainhas J, Holdaway-Clarke T, Cordeiro MS, Kunkel JG, Hepler PK (2001) Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm. *Bioessays* **23:** 86-94

Feng J, Chen X, Yuan Z, He T, Zhang L, Wu Y, Liu W, Liang Q (2006) Proteome comparison following self- and across-pollination in self-incompatible apricot (Prunus armeniaca L.). *Protein J* **25:** 328-335

Fernando DD (2005) Characterization of pollen tube development in Pinus strobus (Eastern white pine) through proteomic analysis of differentially expressed proteins. *Proteomics* **5:** 4917-4926

Fíla J, Čapková V, Feciková J, Honys D (2011) Impact of homogenisation and protein extraction conditions on the obtained tobacco pollen proteomic patterns. ***Biol. Plant.*** **55: 499-506**

Fíla J, Čapková V, Honys D (2014) Phosphoproteomic studies in Arabidopsis and tobacco male gametophytes. ***Biochem Soc Trans*** **42(2): 383-387**

Fíla J, Honys D (2011) Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. ***Amino Acids*** **43: 1025-1047**

Fíla J, Matros A, Radau S, Peiman Zahedi R, Čapková V, Mock H-P, Honys D (2012) Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated in vitro. ***Proteomics*** **12: 3229-3250**

Frank AC, Johnson MA (2009) Expressing the diphtheria toxin A subunit from the HAP2(GCS1) promoter blocks sperm maturation and produces single sperm-like cells capable of fertilization. *Plant Physiol* **151:** 1390-1400

Friedman WE (1999) Expression of the cell cycle in sperm of Arabidopsis: implications for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes. *Development* **126:** 1065-1075

Gaillard A, Vergne P, Beckert M (1991) Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep* **10:** 55-58

Ge W, Song Y, Zhang C, Zhang Y, Burlingame AL, Guo Y (2011) Proteomic analyses of apoplastic proteins from germinating Arabidopsis thaliana pollen. *Biochim Biophys Acta* **1814:** 1964-1973

Geitmann A, Ortega JK (2009) Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends Plant Sci* **14:** 467-478

Gibalová A, Reňák D, Matczuk K, Dupľáková N, Cháb D, Twell D, Honys D (2009) **AtbZIP34 is required for Arabidopsis pollen wall patterning and the control of several metabolic pathways in developing pollen.** ***Plant Mol Biol*** **70: 581-601**

Golovkin M, Reddy AS (2003) A calmodulin-binding protein from Arabidopsis has an essential role in pollen germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 10558-10563

Gossot O, Geitmann A (2007) Pollen tube growth: coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton. *Planta* **226:** 405-416

Goubet F, Misrahi A, Park SK, Zhang Z, Twell D, Dupree P (2003) AtCSLA7, a cellulose synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **131:** 547-557

Grobei MA, Qeli E, Brunner E, Rehrauer H, Zhang R, Roschitzki B, Basler K, Ahrens CH, Grossniklaus U (2009) Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into Arabidopsis pollen development and function. *Genome Res* **19:** 1786-1800

Guha S, Maheswari SC (1964) In vitro production of embryos from anthers of Datura. *Nature* **204:** 497

Gupta R, Ting JT, Sokolov LN, Johnson SA, Luan S (2002) A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in Arabidopsis. *Plant Cell* **14:** 2495-2507

Haerizadeh F, Wong CE, Bhalla PL, Gresshoff PM, Singh MB (2009) Genomic expression profiling of mature soybean (Glycine max) pollen. *BMC Plant Biol* **9:** 25

Hafidh S, Čapková V, Honys D (2011) Safe keeping the message: mRNP complexes tweaking after transcription. ***Adv Exp Med Biol*** **722: 118-136**

Hafidh S, Breznenová K, Růžička P, Feciková J, Čapková V, Honys D (2012a) Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in polar cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis. ***BMC Plant Biol*** **12: 24**

Hafidh S, Breznenová K, Honys D (2012b) De novo post-pollen mitosis II tobacco pollen tube transcriptome. ***Plant Signal Behav*** **7: 918-921**

Hafidh S, Potěšil D, Zdráhal Z, Honys D (2013) DEAD-box RNA helicases are among the constituents of the tobacco pollen mRNA storing bodies. ***J Plant Biochem Physiol*** **1: 114**

Hafidh S, Potěšil D, Fíla J, Feciková J, Čapková V, Zdráhal Z, Honys D (2014) In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. ***Biochem Soc Trans*** **42(2): 388-394**

Han B, Chen S, Dai S, Yang N, Wang T (2010) Isobaric tags for relative and absolute quantification- based comparative proteomics reveals the features of plasma membrane-associated proteomes of pollen grains and pollen tubes from Lilium davidii. *J Integr Plant Biol* **52:** 1043-1058

He YC, He YQ, Qu LH, Sun MX, Yang HY (2007) Tobacco zygotic embryogenesis in vitro: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation. *Plant J* **49:** 515-527

Hepler PK, Rounds CM, Winship LJ (2013) Control of Cell Wall Extensibility during Pollen Tube Growth. *Mol Plant* **6:** 998-1017

Hepler PK, Vidali L, Cheung AY (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17:** 159-187

Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1992) Germination of monocolpate angiosperm pollen: effect of inhibitory factors and the calcium-channel blocker, nifedipine. *Annals of Botany* **69:** 395-403

Heslop-Harrison JS (1987) Pollen germination and pollen tube growth. *In* KL Giles, J Prakash, eds, Pollen: cytology and development, Vol 107. Academic Press, Orlando, pp 1-78

Higashiyama T (2010) Peptide signaling in pollen-pistil interactions. *Plant Cell Physiol* **51:** 177-189

Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima S, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* **293:** 1480-1483

Hirokawa N (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* **26:** 7139-7142

Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S (2005) Proteome mapping of mature pollen of Arabidopsis thaliana. *Proteomics* **5:** 4864-4884

Honys D, Čapková V (2000) Temporal changes in the RNA distribution between polysomes and postpolysomal ribonucleoprotein particles in tobacco male gametophyte. ***Biol. Plant.*** **43: 517-522**

Honys D, Combe JP, Twell D, Čapková V (2000) The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. ***Sex. Plant Reprod.*** **13: 135-144**

Honys D, Twell D (2003) Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. ***Plant Physiol*** **132: 640-652**

Honys D, Twell D (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte

development in Arabidopsis. *Genome Biol* 5: R85

Honys D, Oh SA, Reňák D, Donders M, Šolcová B, Johnson JA, Boudová R, Twell D (2006) Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* 6: 31

Honys D, Reňák D, Twell D (2006) Male gametophyte development and function. *In* JTd Silva, ed, Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues, Vol 1. Global Science Books, London, pp 76-87

Honys D, Reňák D, Feciková J, Jedelský PL, Nebesářová J, Dobrev P, Čapková V (2009) Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametophyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing, and localization. *J Proteome Res* 8: 2015-2031

Horner JHT (1977) A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (Helianthus annus). *Amer J Bot* **64:** 745-759

Howden R, Park SK, Moore JM, Orme J, Grossniklaus U, Twell D (1998) Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in Arabidopsis. *Genetics* **149:** 621-631

Hrubá P, Honys D, Twell D, Čapková V, Tupý J (2005) Expression of beta-galactosidase and beta-xylosidase genes during microspore and pollen development. *Planta* 220: 931-940

Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* **2008:** 420747

Hsieh K, Huang AH (2005) Lipid-rich tapetosomes in Brassica tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant J* **43:** 889-899

Huang MD, Hsing YI, Huang AH (2011) Transcriptomes of the anther sporophyte: availability and uses. *Plant Cell Physiol* **52:** 1459-1466

Huck N, Moore JM, Federer M, Grossniklaus U (2003) The Arabidopsis mutant feronia disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development* **130:** 2149-2159

Chalivendra SC, Lopez-Casado G, Kumar A, Kassenbrock AR, Royer S, Tovar-Mendez A, Covey PA, Dempsey LA, Randle AM, Stack SM, Rose JK, McClure B, Bedinger PA (2013) Developmental onset of reproductive barriers and associated proteome changes in stigma/styles of Solanum pennellii. *J Exp Bot* **64:** 265-279

Chanroj S, Padmanaban S, Czerny DD, Jauh GY, Sze H (2013) K+ Transporter AtCHX17 with Its Hydrophilic C Tail Localizes to Membranes of the Secretory/Endocytic System: Role in Reproduction and Seed Set. *Mol Plant* **6:** 1226-1246

Chaturvedi P, Ischebeck T, Egelhofer V, Lichtscheidl I, Weckwerth W (2013) Cell-specific Analysis of the Tomato Pollen Proteome from Pollen Mother Cell to Mature Pollen Provides Evidence for Developmental Priming. *J Proteome Res* **12**: 4892-4903

Chavarria-Krauser A, Yejie D (2011) A model of plasma membrane flow and cytosis regulation in growing pollen tubes. *J Theor Biol* **285:** 10-24

Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A (2012) The cell wall of the Arabidopsis pollen tube--spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiol* **160:** 1940-1955

Chebli Y, Kroeger J, Geitmann A (2013) Transport logistics in pollen tubes. *Mol Plant* **6:** 1037-1052

Chen CY, Wong EI, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu HM, Cheung AY (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* **14:** 2175-2190

Chen Y, Liu P, Hoehenwarter W, Lin J (2012) Proteomic and phosphoproteomic analysis of Picea wilsonii pollen development under nutrient limitation. *J Proteome Res* **11:** 4180-4190

Chen Z, Hafidh S, Poh SH, Twell D, Berger F (2009) Proliferation and cell fate establishment during Arabidopsis male gametogenesis depends on the Retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 7257-7262

Cheung AY (2001) Imaging elongating pollen tubes by the Green Fluorescent Protein. *Sex Plant Reprod* **9:** 330-336

Cheung AY, Boavida LC, Aggarwal M, Wu HM, Feijo JA (2010) The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. *J Exp Bot* **61:** 1907-1915

Cheung AY, Chen CY, Glaven RH, de Graaf BH, Vidali L, Hepler PK, Wu HM (2002) Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell* **14:** 945-962

Cheung AY, Wu HM (2007) Structural and functional compartmentalization in pollen tubes. *J Exp Bot* **58:** 75-82

Christensen CA, Subramanian S, Drews GN (1998) Identification of gametophytic mutations affecting female gametophyte development in Arabidopsis. *Dev Biol* **202:** 136-151

Ikezawa H (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* **25:** 409-417

Ischebeck T, Valledor L, Lyon D, Gingl S, Nagler M, Meijon M, Egelhofer V, Weckwerth W (2013) Comprehensive cell-specific protein analysis in early and late pollen development from diploid microsporocytes to pollen tube growth. *Mol Cell Proteomics* doi: 10.1074/mcp.M113.028100

Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T (2010) When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends Plant Sci* **15:** 387-394

Janson J (1992) Pollen tube growth and fertilisation in Lilium longiflorum after stigmatic and placental pollination. *In* E Ottaviano, DL Mulcahy, M Sari Gorla, GB Mulcahy, eds, Angiosperm Pollen and Ovules. Springer-verlag, New York, pp 315-320

Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puah CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *Plant Cell* **17:** 584-596

Johnson MA, von Besser K, Zhou Q, Smith E, Aux G, Patton D, Levin JZ, Preuss D (2004) Arabidopsis hapless mutations define essential gametophytic functions. *Genetics* **168:** 971-982

Jurgens G, Grebe M, Steinmann T (1997) Establishment of cell polarity during early plant development. *Curr Opin Cell Biol* **9:** 849-852

Justus CD, Anderhag P, Goins JL, Lazzaro MD (2004) Microtubules and microfilaments coordinate to direct a fountain streaming pattern in elongating conifer pollen tube tips. *Planta* **219:** 103-109

Kang BH, Busse JS, Bednarek SY (2003) Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* **15:** 899-913

Kazan K (2003) Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci* **8:** 468-471

Keene JD (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8:** 533-543

Kessler SA, Grossniklaus U (2011) She's the boss: signaling in pollen tube reception. *Curr Opin Plant Biol* **14:** 622-627

Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG (2008) Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* **455:** 1134-1137

Krichevsky A, Kozlovsky SV, Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V (2007) How pollen tubes grow. *Dev Biol* **303:** 405-420

Kwantes M, Liebsch D, Verelst W (2011) How MIKC* MADS-Box Genes Originated and Evidence for Their Conserved Function Throughout the Evolution of Vascular Plant Gametophytes. *Mol Biol Evol* **29**: 293-302

Lafleur GJ, Mascarenhas JP (1978) The dependence of generative cell division in Tradecantia pollen tubes on protein and RNA synthesis. *Plant Sci Lett* **12:** 251-255

Lago C, Clerici E, Dreni L, Horlow C, Caporali E, Colombo L, Kater MM (2005) The Arabidopsis TFIID factor AtTAF6 controls pollen tube growth. *Dev Biol* **285:** 91-100

Lalanne E, Honys D, Johnson A, Borner GH, Lilley KS, Dupree P, Grossniklaus U, Twell D (2004a) SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 229-240

Lalanne E, Michaelidis C, Moore JM, Gagliano W, Johnson A, Patel R, Howden R, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Twell D (2004b) Analysis of transposon insertion mutants highlights the diversity of mechanisms underlying male progamic development in Arabidopsis. *Genetics* **167:** 1975-1986

Lancelle SA, Hepler KP (1992) Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of Lilium longiflorum. *Protoplasma* **167:** 215-230

Lee JY, Lee DH (2003) Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol* **132:** 517-529

Leitch IJ, Hanson L, Lim KY, Kovarik A, Chase MW, Clarkson JJ, Leitch AR (2008) The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of Nicotiana (Solanaceae). *Ann Bot* **101:** 805-814

Leitner A, Sturm M, Lindner W (2011) Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. *Anal Chim Acta* **703:** 19-30

Leydon AR, Beale KM, Woroniecka K, Castner E, Chen J, Horgan C, Palanivelu R, Johnson MA (2013) Three MYB Transcription Factors Control Pollen Tube Differentiation Required for Sperm Release. *Curr Biol* **23:** 1209-1214

Leydon AR, Johnson MA (2013) Preparing for explosion: Pollen tubes are capacitated by the pistil. *Mol Reprod Dev* **80:** 427

Li C, Wong WH (2001a) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 31-36

Li C, Wong WH (2001b) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2:** R32

Li J, Chen J, Zhang Z, Pan Y (2008) Proteome analysis of tea pollen (Camellia sinensis) under different storage conditions. *J Agric Food Chem* **56:** 7535-7544

Li M, Sha A, Zhou X, Yang P (2012) Comparative proteomic analyses reveal the changes of metabolic features in soybean (Glycine max) pistils upon pollination. *Sex Plant Reprod* **25:** 281-291

Li Y-Q, Tsao TH, Linskens HF (1986) Dependence of Lilium pollen germination and tube growth on protein synthesis and glycosylation after inhibitor treatments. *Proc Kon Nederl Akad Wet C* **89:** 61-73

Lin S-Y, Chen P-W, Chuang M-H, Juntawong P, Bailey-Serres J, Jauh G-Y (2014) Profiling of Translatomes of in Vivo–Grown Pollen Tubes Reveals Genes with Roles in Micropylar Guidance during Pollination in Arabidopsis. *Plant Physiol* **26**: 602-618

Lopez-Casado G, Covey PA, Bedinger PA, Mueller LA, Thannhauser TW, Zhang S, Fei Z, Giovannoni JJ, Rose JK (2012) Enabling proteomic studies with RNA-Seq: The proteome of tomato pollen as a test case. *Proteomics* **12:** 761-774

Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2009) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in Annona cherimola (Annonaceae): Implications for pollen evolution. *Am J Bot* **96:** 802-808

Loraine AE, McCormick S, Estrada A, Patel K, Qin P (2013) RNA-seq of Arabidopsis pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiol* **162:** 1092-1109

Lorkovic ZJ, Barta A (2004) Compartmentalization of the splicing machinery in plant cell nuclei. *Trends Plant Sci* **9:** 565-568

Lu Y, Chanroj S, Zulkifli L, Johnson MA, Uozumi N, Cheung A, Sze H (2011) Pollen tubes lacking a pair of K+ transporters fail to target ovules in Arabidopsis. *Plant Cell* **23:** 81-93

Lum L, Beachy PA (2004) The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* **304:** 1755-1759

Ma H (2005) Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* **56:** 393-434

Ma J, Skibbe DS, Fernandes J, Walbot V (2008) Male reproductive development: gene expression profiling of maize anther and pollen ontogeny. *Genome Biol* **9:** R181

Malhó R, Liu Q, Monteiro D, Rato C, Camacho L, Dinis A (2006) Signalling pathways in pollen germination and tube growth. *Protoplasma* **228:** 21-30

Malhó R, Pais MSS (1992) Kinetics and hydrodynamics of Agapanthus umbellatus pollen-tube growth: a structural and stereological study. *Sex Plant Reprod* **5:** 163-168

Malpighi M (1675, 1679) Die Anatomie der Pflanzen. I und II Theil. London 1675 und 1679. Beabeitet von M. Möbius. Ostwald's Klassiker Nr. 120. Engelmann, Leipzig, 1901. (cit. podle Ducker a Knox, 1976)

Maraschin SF, de Priester W, Spaink HP, Wang M (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot* **56:** 1711-1726

Mascarenhas JP (1989) The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* **1:** 657-664

Mascarenhas JP (1993) Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell* **5:** 1303-1314

Mascarenhas JPP (1990) Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41:** 317-338

Mayank P, Grossman J, Wuest S, Boisson-Dernier A, Roschitzki B, Nanni P, Nuhse T, Grossniklaus U (2012) Characterization of the phosphoproteome of mature Arabidopsis pollen. *Plant J* **72**: 89-101

McClure B, Cruz-Garcia F, Romero C (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann Bot* **108:** 647-658

McCormick S (1993) Male Gametophyte Development. *The Plant Cell* **5:** 1265-1275

McCue AD, Cresti M, Feijo JA, Slotkin RK (2011) Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J Exp Bot* **62:** 1621-1631

Mo Y, Nagel C, Taylor LP (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89:** 7213-7217

Mollet JC, Park SY, Nothnagel EA, Lord EM (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* **12:** 1737-1750

Moore I, Diefenthal T, Zarsky V, Schell J, Palme K (1997) A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in Arabidopsis and is expressed predominantly in pollen grains and seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 762-767

Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T (2006) GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat Cell Biol* **8:** 64-71

Moscatelli A, Idilli AI (2009) Pollen tube growth: a delicate equilibrium between secretory and endocytic pathways. *J Integr Plant Biol* **51:** 727-739

Mouline K, Very AA, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud JB, Sentenac H (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in Arabidopsis. *Genes Dev* **16:** 339-350

Mulcahy DL (1979) The rise of the angiosperms: a genecological factor. *Science* **206:** 20-23

Mulcahy DL, Sari Gorla M, Bergamini Mulcahy G (1996) Pollen selection: past, present and future. *Sex Plant Reprod* **9:** 353-356

Mustroph A, Zanetti ME, Girke T, Bailey-Serres J (2013) Isolation and analysis of mRNAs from specific cell types of plants by ribosome immunopurification. *Methods Mol Biol* **959:** 277-302

Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJ, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J (2009) Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 18843-18848

Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* **5:** 2375-2390

Nawaschin S (1898) Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei Lilium martagon und Fritillaria tenella. *Bull Acad Imp Sci St. Peterburg* **5**: 377-382 (cit. podle Ducker a Knox, 1976)

Nguyen-Chi M, Morello D (2011) RNA-binding proteins, RNA granules, and gametes: is unity strength? *Reproduction* **142:** 803-817

Niewiadomski P, Knappe S, Geimer S, Fischer K, Schulz B, Unte US, Rosso MG, Ache P, Flugge UI, Schneider A (2005) The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17:** 760-775

Noir S, Brautigam A, Colby T, Schmidt J, Panstruga R (2005) A reference map of the Arabidopsis thaliana mature pollen proteome. *Biochem Biophys Res Commun* **337:** 1257-1266

Obermeyer G, Fragner L, Lang V, Weckwerth W (2013) Dynamic Adaption of Metabolic Pathways during Germination and Growth of Lily Pollen Tubes after Inhibition of the Electron Transport Chain. *Plant Physiol* **162:** 1822-1833

Oh SA, Allen T, Kim GJ, Sidorova A, Borg M, Park SK, Twell D (2012) Arabidopsis Fused kinase and the Kinesin-12 subfamily constitute a signalling module required for phragmoplast expansion. *Plant J* **72:** 308-319

Oh SA, Johnson A, Smertenko A, Rahman D, Park SK, Hussey PJ, Twell D (2005) A Divergent Cellular Role for the FUSED Kinase Family in the Plant-Specific Cytokinetic Phragmoplast. *Curr Biol* **15:** 2107-2111

Oh SA, Pal MD, Park SK, Johnson JA, Twell D (2010) The tobacco MAP215/Dis1-family protein TMBP200 is required for the functional organization of microtubule arrays during male germline establishment. *J Exp Bot* **61:** 969-981

Pacini E (1990) Tapetum and microspore function. *Microspores: Evolution and Ontogeny***:** 213-237

Pacini E, Franchi GG, Lisci M, Nepi M (1997) Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Ann Bot (Lond)* **80:** 83-87

Pacini E, Guarnieri M, Nepi M (2006) Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma* **228:** 73-77

Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell* **114:** 47-59

Palanivelu R, Preuss D (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel Arabidopsis thaliana pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biol* **6:** 7

Palanivelu R, Tsukamoto T (2012) Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1:** 96-113

Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC, Colombo L (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15:** 1538-1551

Park SK, Howden R, Twell D (1998) The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **125:** 3789-3799

Park SK, Twell D (2001) Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the Arabidopsis gemini pollen1 mutant. *Plant Physiol* **126:** 899-909

Pedersen S, Simonsen V, Loeschke V (1987) Overlap of gametophytic and sporophytic gene expression in barley. *Theor Appl Genet* **75:** 200-206

Pertl H, Schulze WX, Obermeyer G (2009) The pollen organelle membrane proteome reveals highly spatial-temporal dynamics during germination and tube growth of lily pollen. *J Proteome Res* **8:** 5142-5152

Petersen A, Dresselhaus T, Grobe K, Becker WM (2006) Proteome analysis of maize pollen for allergy-relevant components. *Proteomics* **6:** 6317-6325

Pina C, Pinto F, Feijo JA, Becker JD (2005) Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol* **138:** 744-756

Pratt CA, Mowry KL (2013) Taking a cellular road-trip: mRNA transport and anchoring. *Curr Opin Cell Biol* **25:** 99-106

Procissi A, de Laissardiere S, Ferault M, Vezon D, Pelletier G, Bonhomme S (2001) Five gametophytic mutations affecting pollen development and pollen tube growth in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **158:** 1773-1783

Procissi A, Guyon A, Pierson ES, Giritch A, Knuiman B, Grandjean O, Tonelli C, Derksen J, Pelletier G, Bonhomme S (2003) KINKY POLLEN encodes a SABRE-like protein required for tip growth in Arabidopsis and conserved among eukaryotes. *Plant J* **36:** 894-904

Pu L, Brady S (2010) Systems biology update: cell type-specific transcriptional regulatory networks. *Plant Physiol* **152:** 411-419

Purkyně JE (1830) De cellulis antherarum fibrosis nec non de granorum pollinarium formis: commentatio phytomica. Vratislaviae: Sumptibus J. D. Gruesonii, Breslau

Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R (2009) Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet* **5:** e1000621

Raghavan V (1997) Molecular embryology of flowering plants, Ed 1st. Cambridge University Press, Cambridge

Reddy AS, Day IS, Gohring J, Barta A (2012) Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. *Plant Physiol* **158:** 67-77

Reňák D (2011) Role of transcription factors in early male gametophyte development in Arabidopsis. Ph.D. University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice

Reňák D, Dupľáková N, Honys D (2012) Wide-scale screening of T-DNA lines for transcription factor genes affecting male gametophyte development in Arabidopsis. *Sex Plant Reprod* 25: 39-60

Reňák D, Gibalová A, Šolcová K, Honys D (2014) A new link between stress response and nucleolar function during pollen development in Arabidopsis mediated by AtREN1 protein. *Plant Cell and Environment* 37(3): 670-683

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290:** 2105-2110

Robertson WR, Clark K, Young JC, Sussman MR (2004) An Arabidopsis thaliana plasma membrane proton pump is essential for pollen development. *Genetics* **168:** 1677-1687

Rodriguez-Navarro S, Hurt E (2011) Linking gene regulation to mRNA production and export. *Curr Opin Cell Biol* **23:** 302-309

Rotman N, Durbarry A, Wardle A, Yang WC, Chaboud A, Faure JE, Berger F, Twell D (2005) A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. *Curr Biol* **15:** 244-248

Rotman N, Rozier F, Boavida L, Dumas C, Berger F, Faure JE (2003) Female control of male gamete delivery during fertilization in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* **13:** 432-436

Sanati Nezhad A, Naghavi M, Packirisamy M, Bhat R, Geitmann A (2013) Quantification of cellular penetrative forces using lab-on-a-chip technology and finite element modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110:** 8093-8098

Sandaklie-Nikolova L, Palanivelu R, King EJ, Copenhaver GP, Drews GN (2007) Synergid Cell Death in Arabidopsis Is Triggered Following Direct Interaction with the Pollen Tube. *Plant Physiol* **144**: 1753-1762

Sanderson MJ, Donoghue MJ (1994) Shifts in diversification rate with the origin of angiosperms. *Science* **264:** 1590-1593

Sanetomo R, Hosaka K (2013) Pollen transcriptome analysis of Solanum tuberosum (2n = 4x = 48), S. demissum (2n = 6x = 72), and their reciprocal F1 hybrids. *Plant Cell Rep* **32:** 623-636

Sang YL, Xu M, Ma FF, Chen H, Xu XH, Gao XQ, Zhang XS (2012) Comparative proteomic analysis reveals similar and distinct features of proteins in dry and wet stigmas. *Proteomics* **12:** 1983-1998

Sanchez SE, Petrillo E, Kornblihtt AR, Yanovsky MJ (2011) Alternative splicing at the right time. *RNA Biol* **8:** 954-959

Sarhadi E, Bazargani MM, Sajise AG, Abdolahi S, Vispo NA, Arceta M, Nejad GM, Singh RK, Salekdeh GH (2012) Proteomic analysis of rice anthers under salt stress. *Plant Physiol Biochem* **58:** 280-287

Scott RJ, Hodge R, Paul W, Draper J (1991) The molecular biology of anther differentiation. *Plant Sci.* **80:** 167-191

Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell* **16** Suppl**:** S46-60

Sengupta MS, Boag PR (2012) Germ granules and the control of mRNA translation. *IUBMB Life* **64:** 586-594

Shahali Y, Sutra JP, Haddad I, Vinh J, Guilloux L, Peltre G, Senechal H, Poncet P (2012) Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **33:** 462-469

Sheoran IS, Pedersen EJ, Ross AR, Sawhney VK (2009) Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (Brassica napus). *Planta* **230:** 779-793

Sheoran IS, Ross AR, Olson DJ, Sawhney VK (2009) Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (Solanum lycopersicum): a proteomic analysis. *J Proteomics* **71:** 624-636

Sheoran IS, Sproule KA, Olson DJH, Ross ARS, Sawhney VK (2006) Proteome profile and

functional classification of proteins in Arabidopsis thaliana (Landsberg erecta) mature pollen. *Sex Plant Reprod* **19:** 185-196

Shimizu KK, Okada K (2000) Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in Arabidopsis pollen tube guidance. *Development* **127:** 4511-4518

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* **37:** 501-506

Schrauwen JAM, Groot PFMd, Herpen MMAv, Lee Tvd, Reynen WH, Weterings KAP, Wullems GJ (1990) Stage-related Expression of mRNAs during Pollen Development in Lily and Tobacco. *Planta* **182:** 298-304

Schwacke R, Grallath S, Breitkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* **11:** 377-392

Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bovet L, Goepfert S, Bakaher N, Peitsch MC, Ivanov NV (2013) Reference genomes and transcriptomes of Nicotiana sylvestris and Nicotiana tomentosiformis. *Genome Biol* **14:** R60

Singh DP, Jermakow AM, Swain SM (2002) Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **14:** 3133-3147

Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzic M, Becker JD, Feijo JA, Martienssen RA (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* **136:** 461-472

Smyth DR (1997) Attractive ovules. *Curr Biol* **7:** R64-66

Snow AA, Spira TP (1991) Pollen vigour and the potential for sexual selection in plants. *Nature* **352:** 796-797

Sommer A, Geist B, Da Ines O, Gehwolf R, Schaffner AR, Obermeyer G (2008) Ectopic expression of Arabidopsis thaliana plasma membrane intrinsic protein 2 aquaporins in lily pollen increases the plasma membrane water permeability of grain but not of tube protoplasts. *New Phytol* **180:** 787-797

Sorensen AM, Kroeber S, Saedler H (2004) The ABNORMAL GAMETOPHYTES (AGM) gene product of Arabidopsis demonstrates a role in mitosis during gamete development. *Plant Cell Physiol* **45:** 905-913

Soto G, Alleva K, Mazzella MA, Amodeo G, Muschietti JP (2008) AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Lett* **582:** 4077-4082

Spirin AS, Nemer M (1965) Messenger RNA in early sea urchin embryos: Cytoplasmic particles. *Science* **150:** 214-216

Sprunck S, Rademacher S, Vogler F, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Dresselhaus T (2012) Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science* **338:** 1093-1097

Stinson JR, Eisenberg AJ, Willing RP, Pe ME, Hanson DD, Mascarenhas JP (1987) Genes expressed in the male gametophyte of flowering plants and their isolation. *Plant Physiology* **83:** 442-447

Strasburger E (1884) Neue Untersuchungen uber den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen als Grundlage fur eine Theorie der Zeugung. Gustav Fischer, Jena (cit. podle Ducker a Knox, 1976)

Suwabe K, Suzuki G, Takahashi H, Shiono K, Endo M, Yano K, Fujita M, Masuko H, Saito H, Fujioka T, Kaneko F, Kazama T, Mizuta Y, Kawagishi-Kobayashi M, Tsutsumi N, Kurata N, Nakazono M, Watanabe M (2008) Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol* **49:** 1407-1416

Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conejero G, Li X, Twell D, Ward JM, Hirschi KD (2004) Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K+ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol* 136: 2532-2547

Šamaj J, Muller J, Beck M, Bohm N, Menzel D (2006) Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci* **11:** 594-600

Štorchová H, Čapková V, Tupý J (1994) A *Nicotiana tabacum* mRNA encoding a 69-kDa glycoprotein occuring abundantly in pollen tubes is transcribed but not translated during pollen development in the anthers. *Planta* **192:** 441-445

Takeda T, Amano K, Ohto MA, Nakamura K, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C (2006) RNA interference of the Arabidopsis putative transcription factor TCP16 gene results in abortion of early pollen development. *Plant Mol Biol* **61:** 165-177

Tang X, Liu Y, He Y, Ma L, Sun MX (2013) Exine dehiscing induces rape microspore polarity, which results in different daughter cell fate and fixes the apical-basal axis of the embryo. *J Exp Bot* **64:** 215-228

Tanksley SD, Zamir D, Rick CM (1981) Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicum esculentum*. *Science* **213:** 454-455

Tantikanjana T, Nasrallah ME, Nasrallah JB (2010) Complex networks of self-incompatibility

signaling in the Brassicaceae. *Curr Opin Plant Biol* **13:** 520-526

Terasaka O, Niitsu T (1987) Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells I. Centrifugal, cold and caffeine treatments. *Bot Mag Tokyo* **100:** 205-216

Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37:** 914-939

Tian H, Sun MX (2003) Embryoid formation and plantlet regeneration from exine-dehisced microspores in Brassica L. cv. Topas. *Acta Agronomica Sinica* **29:** 49-53

Tian HQ, Yuan T, Russell SD (2005) Relationship between double fertilization and the cell cycle in male and female gametes of tobacco. *Sex Plant Reprod* **17:** 243-252

Tichy A, Salovska B, Rehulka P, Klimentova J, Vavrova J, Stulik J, Hernychova L (2011) Phosphoproteomics: searching for a needle in a haystack. *J Proteomics* **74:** 2786-2797

Ting JT, Wu SS, Ratnayake C, Huang AH (1998) Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in Brassica campestris tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. *Plant J* **16:** 541-551

Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15:** 1749-1770

Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci* **2:** 297-302

Tupý J (1982) Alterations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination. *Biologia Plantarum* **24:** 331-340

Tupý J, Říhová L, Žárský V (1991) Production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension culture and its storage for in situ pollination. *Sex Plant Reprod* **4:** 284-287

Twell D (2002) Pollen developmental biology. *In* SD O'Neil, JA Roberts, eds, Plant Reproduction. Annual Plant Reviews, Vol 6. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp 86-153

Twell D (2011) Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sex Plant Reprod* **24:** 149-160

Twell D, Oh S-A, Honys D (2006) Pollen development, a genetic and transcriptomic view. *In* R Malhó, ed, The Pollen Tube, Vol 3. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 15-45

Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat Cell Biol* **4:** 711-714

Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol Gen Genet* **217:** 240-245

Twell D (1994) The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. *In* RJ Scott, AD Stead, eds, Molecular and cellular aspects of plant reproduction. Cambridge University Press, Cambridge, pp 83-135

Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* **25:** 173-194

Valero Galvan J, Valledor L, Gonzalez Fernandez R, Navarro Cerrillo RM, Jorrin-Novo JV (2012) Proteomic analysis of Holm oak (Quercus ilex subsp. ballota [Desf.] Samp.) pollen. *J Proteomics* **75:** 2736-2744

Verelst W, Saedler H, Munster T (2007) MIKC* MADS-protein complexes bind motifs enriched in the proximal region of late pollen-specific Arabidopsis promoters. *Plant Physiol* **143:** 447-460

Verelst W, Twell D, de Folter S, Immink R, Saedler H, Munster T (2007) MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biol* **8:** R249

Vervaeke I, Parton E, Maene L, Deroose R, de Proft MP (2002) Pollen tube growth and fertilization after different *in vitro* pollination techniques of *Aechmea fasciata*. *Euphytica* **124:** 75-83

Vidali L, Hepler PK (2001) Actin and pollen tube growth. *Protoplasma* **215:** 64-76

Vidali L, McKenna ST, Hepler PK (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol Biol Cell* **12:** 2534-2545

von Besser K, Frank AC, Johnson MA, Preuss D (2006) Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. *Development* **133:** 4761-4769

Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I (2011) RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**

Wang F, Song C, Cheng K, Jiang X, Ye M, Zou H (2011) Perspectives of comprehensive phosphoproteome analysis using shotgun strategy. *Anal Chem* **83:** 8078-8085

Wang J, Qiu X, Li Y, Deng Y, Shi T (2011) A transcriptional dynamic network during Arabidopsis thaliana pollen development. *BMC Systems Biology* **5:** S8

Wang M, van Bergen S, Van Duijn B (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol* **124:** 523-530

Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH (2008) Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen

germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148:** 1201-1211

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10:** 57-63

Wei LQ, Xu WY, Deng ZY, Su Z, Xue Y, Wang T (2010) Genome-scale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in Oryza sativa. *BMC Genomics* **11:** 338

Weterings K, Reijnen W, van Aarssen R, Kortstee A, Spijkers J, van Herpen M, Schrauwen J, Wullems G (1992) Characterization of a pollen-specific cDNA clone from Nicotiana tabacum expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Mol Biol* **18:** 1101-1111

Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteneys GO (2001) MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* **411:** 610-613

Wienkoop S, Baginsky S, Weckwerth W (2010) Arabidopsis thaliana as a model organism for plant proteome research. *J Proteomics* **73:** 2239-2248

Wilhelmi LK, Preuss D (1996) Self-sterility in Arabidopsis due to defective pollen tube guidance. *Science* **274:** 1535-1537

Willemse M, Van Lammeren AA (2002) Fertilization, from attraction fo embryo. *Biologia* **57:** 13-22

Willing RP, Bashe D, Mascarenhas JP (1988) An analysis of the quantity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of Zea mays. *Theoretical And Applied Genetics* **75:** 751-753

Willing RP, Mascarenhas JP (1984) Analysis of the complexity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of Tradescantia. *Plant Physiology* **75:** 865-868

Worrall D, Hird DL, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* **4:** 759-771

Xing D, Li QQ (2011) Alternative polyadenylation and gene expression regulation in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2:** 445-458

Xing L, Bassell GJ (2013) mRNA localization: an orchestration of assembly, traffic and synthesis. *Traffic* **14:** 2-14

Xu XH, Chen H, Sang YL, Wang F, Ma JP, Gao XQ, Zhang XS (2012) Identification of genes specifically or preferentially expressed in maize silk reveals similarity and diversity in transcript abundance of different dry stigmas. *BMC Genomics* **13:** 294

Yokota E, Shimmen T (2006) The actin cytoskeleton in pollen tubes actin and actin binding proteins. *In* R Malhó, ed, The Pollen Tube, Vol 3. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 139-155

Zaki MAM, Dickinson H (1991) Microspore-derived embryos in Brassica: the significance of division asymmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex Plant Reprod* **4:** 48-55

Zenkteler M (1992) In vitro fertilisation: A method facilitating the production of hybrid embryos in plants. *In* E Ottaviano, DL Mulcahy, M Sari Gorla, GB Mulcahy, eds, Angiosperm Pollen and Ovules. Springer-verlag, New York, pp 331-335

Zhao J, Yang HY, Lord EM (2003) Calcium levels increase in the lily stylar transmitting tract after pollination. *Sex Plant Reprod* **16**

Zhao X, Yang N, Wang T (2013) Comparative proteomic analysis of generative and sperm cells reveals molecular characteristics associated with sperm development and function specialization. *J Proteome Res* **12**: 5058-5071

Zheng B, Chen X, McCormick S (2011) The anaphase-promoting complex is a dual integrator that regulates both MicroRNA-mediated transcriptional regulation of cyclin B1 and degradation of Cyclin B1 during Arabidopsis male gametophyte development. *Plant Cell* **23:** 1033-1046

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136:** 2621-2632

Zonia L (2010) Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. *J Exp Bot* **61:** 1939-1957

Zonia L, Munnik T (2011) Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model. *Trends Plant Sci* **16:** 347-352

Zou C, Jiang W, Yu D (2010) Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61:** 3901-3914

Zou J, Song L, Zhang W, Wang Y, Ruan S, Wu WH (2009) Comparative proteomic analysis of Arabidopsis mature pollen and germinated pollen. *J Integr Plant Biol* **51:** 438-455

A.6 Příloha

A.6.1 TAB 1. Příklady genů, jejichž mutace narušují vývoj pylu

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At1g06660	**JASON**	*jason*	Defekt II. samčí meiosy, neredukovaný pyl s diploidními gametami	Neznámá	Kontrola meiosy - snad regulace AtPS1	*De Storme et al. 2011*
At1g10290/ At1g59610	**DRP2A/ BRP2B**	*dynamin-related protein 2*	Aborce vývoje PZ, defekty syntézy a ukládání kalosy	GTPasa	Verzikulární transport	*Backues et al. 2010*
At1g11890	**AtSEC22**	*atsec22*	Defekt vývoje PZ v dvojbuněčném stádiu	v-SNARE protein	Kontrola počátků sekreční dráhy mezi ER a Golgiho aparátem	*El-Kasmi et al. 2011*
At1g14830	**ADL1C**	*arabidopsis dynamin-like 1C*	Aborce vývoje PZ během dozrávání	Dymanin-like protein	Udržování pylové plasmatické membrány; syntéza buněčné stěny	*Kang et al., 2003*
At1g15110	**PSS1**	*phosphatidylserine synthase 1*	Nepřítomnost fosfatidylserinu, aborce mikrosporogeneze	Fosfatidyl serin synthasa	Biosyntéza fosfatidylserinu	*Yamaoka et al., 2011*
At1g17420/ At1g72520	**LOX3/ LOX4**	*lox3/lox4, dvojitý mutant*	Aborce vývoje PZ	13-Lipoxygenasa	Biosyntéza jasmonátů	*Caldelari et al. 2011*
At1g19890	**MGH3**	*male-germline-specific histone H3.3*	Funkční redundance, absence fenotypových defektů	Histon H3.3	Modifikace histonů, regulace transkripce	*Okada et al. 2005, Ingouff et al. 2007*
At1g20330	**SMT2**	*smt2*	Polyploidizace meiocytů	Sterol methyltransferasa 2	Biosyntéza sterolu	*De Storme et al. 2013*
At1g24520	**BCP1**	*homolog of Brassica campestris pollen protein 1*	Aborce vývoje PZ ve dvojbuněčném stádiu	Arabinogalaktanový protein	Složka buněčné stěny	*Xu et al. 1995*
At1g30450	**HAP5**	*hapless5*	Aborce vývoje PZ	Kation-chlorid kotransportér	Iontová homeostáze během vývoje pylu	*Johnson et al., 2004*
At1g31660	**atEnp1**	*enp1*	Opožděný vývoj PZ	Jaderný protein - essential nuclear protein 1	Biogeneze 40S ribosomální podjednotky	*Missbach et al. 2013*
At1G32310	**SAMBA**	*samba*	Defekt PMI	Anafázi podporující komplex	Buněčný cyklus	*Eloy et al. 2012*
At1g34355	**AtPS1**	*parallel spindle 1*	Defekt II. samčí meiosy, neredukovaný pyl s diploidními gametami	Protein účastnící se kontroly orientace dělicího vřeténka	Kontrola meiosy - orientace dělicího vřeténka během metafáze meiosy II	*De Storme et al. 2011*
At1g50230	**TIO**	*two-in-one*	Mikrospory zahájí, ale nedokončí cytokinezi při PMI	TIO: Homolog kinasy rodiny FUSED	Signální úloha v expanzi fragmoplastu	*Oh et al., 2005*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At1g64570	**DUO3**	*duo pollen 3*	Absence či opoždění PMII	Homeodomain-like protein	Přechod G2/M	*Brownfield et al. 2009*
At1g65470	**FAS1**	*fasciata1*	Mitotický arest mezi fázemi G2/M	Chromatin-assembly factor CAF-1	Struktura chromatinu v S-fázi	*Chen et al. 2008*
At1g70790	**DEPOLL**	*depoll*		Membránový C2 protein		*Dupľáková 2010*
At1g76090	**SMT3**	*smt3*	Polyploidizace meiocytů	Sterol methyltransferasa 3	Biosyntéza sterolu	*De Storme et al. 2013*
At1g77300	**ASHH2**	*ashh2*	Nízký počet pylových zrn v prašníku	Histon H3 methyltransferasa	Modifikace histonů, regulace transkripce	*Grini et al. 2009*
At1g77570	**AtREN1**	*atren1*	Dislokace MGU, citlivost k teplotnímu stresu	HSFA5-like protein, člen rodiny HSF	Pravděpodobně biogeneze rRNA	*Reňák et al. 2014*
At1g77850	**ARF17**	*arf17*	Aborce vývoje PZ, defekty dekorace buněčné stěny	Transakripční faktor ARF (auxin response factor)	Regulace transkripce	*Yang et al. 2013*
At1g78900	**VHA-A**	*Vacuolar-ATPase V1 subunit A*	Aborce pylu v dvojbuněčném stádiu a později; zvětšené cisterny ER	Vakuolární ATPasa V1, podjednotka A	Organizace Golgiho aparátu, homeostáze pH	*Dettmer et al., 2005*
At2g02810/ At1g14360	**AtUTr1/ AtUTr3**	*atutr1/atutr3, dvojitý mutant*	Aberantní vývoj pylu, defekt formování exiny	Přenašeč UDP galaktosy/UDP glukosy lokalizovaný na membráně ER	Posttranslační modifikace proteinů	*Reyes et al. 2010*
At2g13680	**CalS5**	*calS5*	Aborce vývoje PZ, defekty syntézy a ukládání kalosy	1,3-beta-D-glukan synthasa	Syntéza kalózy	*Dong et al., 2005; Nishikawa et al., 2005*
At2g16910	**AMS**	*aborted microspores*	Degenerace mikrospor záhy po uvolnění z tetrád, nedostatečný vývoj tapeta	Transkripční faktor bHLH	Regulace transkripce	*Sorensen et al. 2003, Xu et al. 2010*
At2g19690/ At4g29460/ At4g29470	**PLA2-β/ PLA2-γ/ PLA2-δ**	*pla2-β/pla2-γ/pla2-δ, trojitý mutant*	Aborce vývoje PZ a snížená klíčivost PL	Fosfolipasa A2	Metabolismus lipidů, snad signalizační kaskády	*Kim et al. 2011*
At2g21870	**MGP1**	*male gameophyte defective 1*	Degenerace mitochondrií, kolaps PZ	Podjednotka ATP synthasy F0F1	Regulace aktivity ATP synthasy	*Li et al. 2010*
At2g22950	**ACA7**	*aca7*	Aborce vývoje PZ	Ca(2+)-ATPasa	Přenos Ca(2+) přes membránu	*Lucca and Leon 2012*
At2g29980/ At3g11170/ At5g05580	**FAD3/ FAD7/ FAD8**	*fad 3/7/8, trojitý mutant*	Aborce vývoje PZ	Omega-3 fatty acid desaturasa	ER enzym zodpovědný za syntézu 18:3 mastných kyselin	*McConn a Browse 1996*
At2g34550	**UNG4**	*ungud4*	Aborce pylu v dvojbuněčném stádiu	GA-2-oxidasa	Regulace metabolismu giberelinů	*Lalanne et al., 2004*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At2g35630	**MOR1/ GEM1 (syn.)**	*gemini pollen1*	Dvojbuněčný a dvojjaderný pyl; abnormální symetrické dělení při PMI	Homolog proteinu asociovaného s mikrotubuly chTOGp/XMAP215	Polarita mikrospor a cytokinese prostřednictvím organizace mikrotubulů	*Park et al., 1998; Park and Twell; 2001; Twell et al., 2002*
At2g36850	**GSL8**	*glucan synthase-like gene 8*	Defekt PMI, aberantní ukládání kalosy	1,3-beta-D-glukan synthasa, kalosa synthasa (syn.)	Syntéza buněčné stěny	*Tóller et al. 2008, De Storme et al. 2013*
At2g38185	**APD1**	*apd1*	Dvojbuněčný pyl, arest PMII	E3 ubikvitin ligasa typu RING	Regulace PMII	*Luo et al. 2012*
At2g38195	**APD4**	*apd4*	Dvojbuněčný pyl, arest PMII	E3 ubikvitin ligasa typu RING	Regulace PMII	*Luo et al. 2012*
At2g38220	**APD3**	*apd3*	Dvojbuněčný pyl, arest PMII	E3 ubikvitin ligasa typu RING	Regulace PMII	*Luo et al. 2012*
At2g39800	**P5CS1**	*p5cs1*	Aborce vývoje PZ, malý pyl	Δ1-pyrrolin-5-karboxylát synthetasa 1	Biosyntéza prolinu	*Funck et al 2012, Mattioli et al. 2012*
At2g42380	**AtbZIP34**	*atbzip34*	Defekty syntézy buněčné stěny a metabolismu lipidů	Transkripční faktor bZIP	Regulace transkripce	*Gibalová et al. 2009*
At2g54260	**AtMRE11**	*atmre11*	Fragmentace chromosomů, hypersensitivita k poškození DNA	Exonukleasa účastnící se reparace DNA	Reparace DNA	*Pulzina et al. 2004*
At3g01780	**TPLATE**	*tplate*	Scvrklý pyl neschopný vyklíčit	Předpokládaná membránová transportní bílkovina	Vezikulární transport a modifikace buněčné stěny	*Van Damme et al., 2006*
At3g02230/ At5g15650	**RGP1/ RGP2**	*rgp1/rgp2, dvojitý mutant*	Abnormální vakuoly, defekt syntézy intiny, dezintegrace PZ při PMI	Reverzně glykolysovaný polypeptid	Biosyntéza polysacharidů	*Drakakaki et al., 2006*
At3g03250/ At5g17310	**UGP1/ UGP2**	*ugpase1/ ugpase2*	Defekt syntézy buněčné stěny PZ	UDP-glukosa pyrofosforylasa (UGPasa)	Ukládání kalosy a celulosy	*Park et al. 2010*
At3g07100	**AtSEC24 A**	*atsec24a*	Defekty vývoje PZ	Složka protein-exportního komplexu COPII	Export proteinů z ER do Golgiho aparátu	*Conger et al. 2011*
At3g07160	**GSL10**	*glucan synthase-like gene 10*	Defekt PMI, aberantní ukládání kalosy	1,3-beta-D-glukan synthasa, kalosa synthasa (syn.)	Syntéza buněčné stěny	*Tóller et al. 2008*
At3g09090	**DEX1**	*defective in exine formation 1*	Defekty formování buněčné stěny a v ukládání sporopoleninu	Membránový protein	Vazba vápenatých iontů	*Paxson-Sowders et al., 2001*
At3g11170	**FAD7**	*fatty acid desaturase 7*	Aborce vývoje PZ, trojitý mutant fad3/ fad7/fad8	Omega-3 fatty acid desaturasa	ER enzym zodpovědný za syntézu 18:3 mastných kyselin	*McConn a Browse 1996*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At3g11980	**MS2**	*male sterility 2*	Redukce počtu pylových zrn v prašníku, velice slabá buněčná stěna	plastidová fatty-acyl-CoA reduktasa	Modifikace vyšších mastných kyselin, syntéza buněčné stěny	*Aarts et al., 1997, Chen et al. 2011*
At3g12280	**RBR**	*retinoblastoma-related*	Proliferace mikrospor a defekty buněčného osudu	Represor buněčného cyklu	Buněčný cyklus, přechod G1/S	*Chen et al. 2009, Chen et al. 2011*
At3g13220	**ABSG26/ WBC27 (syn.)**	*abc cassette protein g6 / wbc27*	Defekt formování exiny	Protein z nadrodiny přenašečů ABC (ATP-binding cassette transporter)	Syntéza buněčné stěny, axiny	*Quilichini et al. 2010*
At3g13530/ At3g07980	**MAP3Kε 1/ MAP3Kε 2**	*map3kε1/ map3kε2, dvojitý mutant*	Nepravidelná PM, ztluštělá intina, degenerace mitochondrií, neobvyklé vakuoly, kolaps PZ	Protein kinasa	Funkce plasmatické membrány	*Chaiwongsa r et al., 2006*
At3g20475	**AtMSH5**	*muts-homologue*	Defekty meiosy	Homolog MutS		*Lu et al. 2008*
At3g22780	**AtTSO1**	*tso1*		TESMIN-like transkripční faktor		*Andersen et al. 2007*
At3g45150	**TCP16**	*tcp-domain protein 16*	Redukce DNA mikrospor a aborce vývoje PZ	Transkripční faktor bHLH, podrodina TCP	Regulace transkripce	*Takeda et al. 2006*
At3g47870	**SIDECAR**	*sidecar*	Defekty buněčného dělení, aborce vývoje PZ či přítomnost nadbytečné buňky vegetativního typu	Člen rodiny proteinů s doménou LOB/AS2	Kontrola časování a orientace asymetrické PMI	*Chen et al. 2006, Oh et al. 2010 a 2011*
At3g48750	**CDKA;1**	*cdka-1*	Absence PMII, zralý dvojbuněčný pyl, embryonální arest	Cyklin dependentní kinasa typu A	Kontrola PMII	*Iwakawa et al., 2006*
At3g54650	**FBL17**	*F-box-like 17*	Dvojjaderný pyl, arest PMII v S-fázi	F-box protein, E3 ubikvitin protein ligasa	cílená proteolýza inhibitoru CDKA KRP6	*Kim et al. 2008*
At3g55200/ At3g55220	**AtSAP130a/ AtSAP130b**	*spliceosome-associated protein atsap130a/ atsap130b, dvojitý mutant*	Defekt PMI	Protein asociovaný se spliceosomem	Zrání mRNA	*Aki et al. 2011*
At3g55610	**P5CS2**	*p5cs2*	Aborce vývoje PZ, malý pyl	Δ1-pyrrolin-5-karboxylát synthetasa 2	Biosyntéza prolinu	*Funck et al 2012, Mattioli et al. 2012*
At3g57390	**AGL18**	*agl18*	Funkční redundance, absence fenotypových defektů	MADS box transkripční faktor	Regulace transkripce	*Alvarez-Buylla et al. 2000, Verelst et al. 2007*
At3g60460	**DUO1**	*duo pollen1*	Dvojbuněčný pyl; generativní buňka nevstoupí do mitosy a přeskočí ji	R2R3 MYB transkripční faktor (MYB125)	Regulátor genové exprese nutný pro vstup do mitosy	*Durbarry et al., 2005; Rotman et al., 2005*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At3g61650/ At5g05620	**TUBG1/ TUBG2**	*tubg1/tubg2, dvojitý mutant*	Dvojbuněčný a dvojjaderný pyl; abnormální symetrické dělení při PMI	γ-Tubulin	Formování dělícího vřeténka, fragmoplastu a kortikálních mikrotubulů	*Pastuglia et al., 2006*
At4g04970/ At4g03550	**GSL1/ GSL5**	*gsl1/gsl5, dvojitý mutant*	Kolaps a abnormální velikost PZ, nerozpadlé tetrády	1,3-beta-D-glukan synthasa, kalosa synthasa (syn.)	Syntéza buněčné stěny	*Enns et al., 2005*
At4g05410	**YAO**	*yaozhe*	narušení vývoje pylu a zárodečného vaku, embryo-letální zygotický arest	Jadérkový protein WD40, součást komplexu U3 snoRNA	Zrání ribosomální RNA	*Li et al. 2010*
At4g11820	**FKP1**	*flaky pollen 1*	Defekty ukládání vnějších pylových obalů (pollen coat)	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A synthasa	Formování tapetosomů	*Ishiguro et al. 2010*
At4g14450/ At3g23670	**PAKRP1/ PAKRP1 L**	*pakrp1/ pakrp1L, dvojitý mutant*	Dezorganizace chromatinu v mikrosporách, absence PMI	Kinesin-12A and kinesin-12B	Organizace mikrotubulů fragmoplastu během cytokineze PMI	*Lee et al. 2007*
At4g23920/ At1g63180	**UGE2/ UGE4**	*uge2/uge4, dvojitý mutant*	Aborce vývoje PZ	UDP-glukosa-4-epimerasa	Biosyntéza sacharidů buněčné stěny	*Rosti et al., 2007*
At4g26440	**WRKY34**	*wrky34*	Nižší citlivost k chladovému stresu	Transkripční faktor WRKY	Regulace transkripce	*Honys et al. 2006, Zou et al. 2010*
At4g29380	**AtVPS15**	*atvps15*	Vakuolizovaný pyl, snížená klíčivost PL	Fosfatidylinositol 3-kinasa	Mambránový transport	*Xu et al. 2011*
At4g34850/ At1g02050	**LAP5/ LAP6 (syn. PKSA/ PKSB/**	*less adhesive pollen 5+6 (syn. polyketide synthase a+b), dvojitý mutant*	Aborce vývoje PZ, defekty syntézy exiny	Polyketid synthasa A a B	Syntéza a ukládání sporopoleninu	*Dobritsa et al. 2010, Kim et al. 2010*
At4g36900	**HAP12**	*hapless12*	Aborce vývoje PZ	Bílkovina obsahující AP2 doménu (RAP2.10)	Regulátor pylové genové exprese	*Johnson et al., 2004*
At4g39910/ At2g22310	**AtUBP3/ AtUBP4**	*ubikvitin-specifická proteasa 3/4, dvojitý mutant*	Defekt PMII, aberantní morfologie vakuol	Ubikvitin-specifická proteasa 3 a 4	Deubikvitinace v (Ub)/26S proteasomu	*Doelling et al. 2007*
At5g01450	**APD2**	*apd2*	Dvojbuněčný pyl, arest PMII	E3 ubikvitin ligasa typu RING	Regulace PMII	*Luo et al. 2012*
At5g05580	**FAD8**	*fatty acid desaturase 8*	Aborce vývoje PZ, trojitý mutant fad3/ fad7/fad8	Omega-3 fatty acid desaturasa	ER enzym zodpovědný za syntézu 18:3 mastných kyselin	*McConn a Browse 1996*
At5g05850/ At3g11330	**PIRL1/ PIRL9**	*pirl1/pirl9, dvojitý mutant*	Aborce vývoje PZ v pozdně mikrosporovém stádiu	Protein bohatý leucinovými repeticemi (plant intracellular ras-group-related leucine-rich repeat (LRR) protein, PIRL)	Neznámá	*Forsthoefel et al. 2011*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At5g13390	**NEF1**	*no exine formation 1*	Aborce vývoje pylu, defekty formování buněčné stěny PZ - exiny	Membránový protein s homologií k přenašečům	Syntéza buněčné stěny	*Arüzumi et al., 2004*
At5g16390	**CAC1A/ BCCP1 (syn.)**	*cac1a/bccp1*	Aborce vývoje PZ a snížená klíčivost PL	Heteromerická acetyl-koenzym A karboxylasa	Biosyntéza mastných kyselin v plastidech	*Li et al. 2011*
At5g16530	**PIN8**	*pin8*	Dislokace MGU	Přenašeč auxinu PIN8	Homeostáze auxinu	*Ding et al. 2012*
At5g16530	**PIN5**	*pin5*	Dislokace MGU	Přenašeč auxinu PIN5	Homeostáze auxinu	*Ding et al. 2012*
At5g18700	**RUNKEL**	*runkel*	Defekty cytokineze při meiose	Kinasa-like protein asociovaný s mikrotubuly	Cytokinese, složka komplexu fragmoplastu	*Krupnova et al. 2013*
At5g20850	**AtRAD51 C**	*atrad51c*	Meiotický arest	Homolog RecA rekombinasy	Homologní rekombinace při meiose a mitose	*Li et al., 2004; Abe et al., 2005*
At5g22260	**MS1**	*male sterile 1*	Degenerace mikrospor po uvolnění z tetrád	PHD transkripční faktor	Rané fáze vývoje mikospor	*Vizcay-Barrena and Wilson 2006*
At5g23670/ At3g48780	**AtLCB2a/ AtLCB2b**	*Atlcb2a/ Atlcb2b, dvojitý mutant*	Defekty membrán a buněčné stěny při PMI	Podjednotky serin palmitoyltransferasy AtSPT	Biosyntéza sfingolipidů	*Dietrich et al. 2008, Teng et al. 2008*
At5g26940	**DPD1**	*defective in pollen organelle DNA degradation 1*	Zvýšené množství organelové DNA ve zralém pylu	Mg2+-dependentní exonukleasa	Aktivní degradace organelové DNA v pozdních fázích vývoje pylu	*Matsushima et al. 2011*
At5g39400	**PTEN**	*Arabidopsis phosphatase and tensin homologue*	Aborce vývoje PZ po PMII	Fosfatasa a tensin homolog (Tyrosin/ PIP3 fosfatasa)	Zrání pylu	*Gupta et al., 2002*
At5g40260	**RPG1**	*ruptured pollen grain 1*	Defekt formování exiny	Nodulin, člen rodiny MtN3/saliva	Transmembránový transport sacharidů	*Guan et al. 2008*
At5g41190	**atNob1**	*nob1*	Opožděný vývoj PZ	Nin1-vazebný protein, kofaktor biogeneze ribosomu	Biogeneze 40S ribosomální podjednotky	*Missbach et al. 2013*
At5g44860	**AGM**	*abnormal gametophytes*	Aborce vývoje PZ v pozdně mikrosporovém stádiu	Předpokládaný transmembránový protein	Vývoj a/nebo dělení mikrospor	*Sorensen et al., 2004*
At5g47030	**ATPδ**	*atpδ*	Aborce vývoje PZ, defekty syntézy intiny, abnormální tvar mitochondrií	ATP synthasa, podjednotka delta	Oxidativní fosforylace	*Geisler et al. 2012*
At5g51330	**SWITCH 1/DYAD**	*switch1/dyad*	Nepravidelná segregace chromatid	Složka chromatidového komplexu	Koheze sesterských chromatid	*Siddiqi et al. 2000, Mercier et al. 2001*
At5g52560	**AtUSP**	*atusp*	Aborce vývoje PZ	UDP-sacharid pyrofosforylasa	Biosyntéza sacharidů buněčné stěny	*Schnurr et al., 2006*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At5g54800	**GPT1**	*glucose-6-phosphate translocator1*	Aborce vývoje PZ v trojbuněčném stádiu; snížený počet lipidových tělísek, vesikulů a vakuol	Glukosa-6-fosfát translokátor	Glc6P import pro biosyntézu škrobu a mastných kyselin v plastidech	*Niewiadomski et al., 2005*
At5g57350	**AHA3**	*arabidopsis H+-ATPase 3*	Aborce a kolaps vývoje PZ	Membránová H+-ATPasa typu P	Transport živin, zrání mikrospor / pylu	*Robertson et al., 2004*
At5g57800	**FLP1**	*faceless pollen 1*	Defektní sporopollenin a tryfin	Transmembránový protein	Syntéza tryfinu a sporopolleninu	*Ariizumi et al. 2003*
At5g58230	**MSI1**	*multicopy supressor of IRA1*	Arest buněčného cyklu ve fázi G2/M	WD40 protein	Remodelace chromatinu a replikace DNA	*Chen et al. 2008*
At5g64560	**AtMGT9**	*magnesium transporter 9*	Aborce vývoje PZ	Přenašeč hořečnatých iontů	Transmembránový přenos hořečnatých iontů	*Chen et al., 2009*
At5g64630	**FAS2**	*fasciata2*	Arest buněčného cyklu ve fázi G2/M	Chromatin-assembly factor CAF-1	Struktura chromatinu v S-fázi	*Chen et al. 2008*
At5g66760	**SDH1-1**	*sdh1-1*	Mikrospora nevstoupí do PMI a degeneruje	Sukcinát dehydrogenasa, flavoproteinová podjednotka	Součást dýchacího řetězce	*Leon et al., 2007*
	TDE1	*transient defective exine 1*	Defekt formování exiny			*Ariizumi et al. 2008*
	SGC	*small, glued together and collapsed pollen*	Aborce vývoje PZ	Lektinová receptor-like kinasa	Signalizace	*Wan et al. 2008*
	DUO2	*duo2*	Dvojbuněčný pyl, arest PMII	Neznámá	Mitotická progrese PMII	*Durbarry et al. 2005*
	GEM2	*gemini pollen 2*	Defekt cytokineze v PMI	Neznámá	Asymetrické dělení při PMI a cytokineze	*Park et al. 2005*
	GUM	*germ unit malformed*	Dislokace MGU	Neznámá	Organizace a integrita MGU	*Lalanne a Twell 2002*
	LIP	*limpet pollen*	Defekt migrace generativní buňky do středu PZ po PMI	Neznámá	Ukládání kalosy, faktor účastnící se migrace buněk	*Howden et al. 1998*
	MAD1	*male gametophytic defective*	Variabilita fenotypických defektů generativní buňky	Neznámá	Účast při PMII	*Grini et al. 1999*
	MAD2	*male gametophytic defective*	Defekt generativní buňky	Neznámá	Účast při PMII	*Grini et al. 1999*
	MAD3	*male gametophytic defective*	Defekt PMI a formování intiny	Neznámá	Účast při PMII	*Grini et al. 1999*
	MUD	*male germ unit displaced*	Dislokace MGU	Neznámá	Organizace a integrita MGU	*Twell, nepublikovaná data*

A.6.2 TAB 2. Příklady genů, jejichž mutace narušují progamickou fázi

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At1g01750	**ADF10**	*adf10*	Defekt růstu PL	Aktin depolymerizující faktor	Metabolismus aktinu	*Daher and Geitmann 2012*
At1g02140	**HAP1**	*hapless1*	Narušené vedení růstu PL; láčka neopustí septum	Mago nashi	Metabolismus mRNA / lokalizace	*Johnson et al., 2004*
At1g04950	**AtTAF6**	*attaf6*	Krátké PL	TBP-asociovaný faktor 6	Bazální transkripční faktor	*Lago et al., 2005*
At1g08660	**MGP2**	*male gameophyte defective 2*	Snížená klíčivost PZ	Sialyltransferasa (Glykosyltransferasa, rodina GT29)	Pravděpodobně glykosylace	*Deng et al. 2010*
At1g20200	**HAP15**	*hapless15*	Krátké PL neopustí pestík	26S proteasom, protein S3 regulační podjednotky	Degradace bílkovin	*Johnson et al., 2004*
	CKS	*cks*	Inhibice růstu PL	CMP-KDO synthetasa (CKS)	Integrita buněčné stěny PL	*Kobayashi et al. 2011*
At1g60780	**HAP13**	*hapless13*	Krátké PL neopustí pestík	Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein	Membránový transport	*Johnson et al., 2004*
At1g66570/ At1g66580	**HAP3**	*hapless3*	Krátké PL neopustí pestík	Sacharosový transportér SUC1 / 60S ribosomální protein L40	Metobolismus sacharidů / syntéza bílkovin	*Johnson et al., 2004*
At1g68990	**MGP3/ RPOTm (syn.)**	*male gametophyte defective 3/ rpoTm*	Inhibice růstu PL	Mitochondriální RNA polymerasa T3/T7 fágového typu (RPOT)	Exprese genů kódovaných mitochondriálním genomem	*Tan et al. 2010*
At1g70730/ At1g23190	**PGM2/ PGM3**	*cytosolická fosfoglukomutas a 2+3, dvojitý mutant*	Snížená klíčivost PZ	Cytosolická fosfoglukomutasa	Nitrobuněčná distribuce karbohydrátů	*Egli et al. 2010*
At1g71270	**POK**	*poky pollen tube*	Krátké PL	Protein rodiny Vps52/Sac2	Polární růst PL, vesikulární transport	*Lobstein et al., 2004*
At1g71880	**AtSUC1**	*arabidopsis sucrose transporter 1*	Snížená klíčivost PZ	Transportér sacharosy	Sacharosová signalizace, akumulace anthokyanů v semenáčcích	*Sivitz et al. 2008*
At2g03070	**SETH10**	*seth10*	Snížená kompetitivita, pomalý růst PL	Předpokládaný protein	Neznámá	*Lalanne et al., 2004b*
At2g31910/ At1g05580	**CHX21/ CHX23**	*cation/proton exchangers 21/23, dvojitý mutant*	Defekt vedení PL, neschopnost najít vajíčko a mikropyle	Kation/protonový přenašeč	Transport draselných iontů, vedení PL	*Lu et al. 2011*
At2g33100	**CSLD1**	*csld1*	Silně snížená klíčivost PZ	Protein D podobný celulosa synthase (cellulose synthase-like D protein)	Syntéza buněčné stěny PL	*Wang et al. 2011*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At2g34680	**UNG9**	*ungud9*	Narušený přenos alely přes samčí gametofyt	Auxin-indukovaný protein (AIR9), podobný to leucine-rich repeat family proteinu	Metabolismus buněčné stěny/přenos signálů	*Lalanne et al., 2004b*
At2g34980	**SETH1**	*seth1*	Silně snížená klíčivost pylu; abnormální ukládání kalosy	Podjednotka C fosfatidylinositol-glykan synthasy	Složka biosyntetické dráhy bílkovin s GPI kotvou	*Lalanne et al., 2004b*
At2g35650	**AtCSLA7**	*cellulose synthase-like 7*	Pomalý růst PL, defekty vývoje embrya	Procesivní β-glykosyltransferasa	Syntéza polysacharidů buněčné stěny	*Goubet et al., 2003*
At2g39990	**eIF3f**	*eif3f*	Snížená klíčivost PZ	Eukaryotický translační iniciační faktor 3f	Translace	*Xia et al. 2010*
At2g41110	**CAM2**	*calmodulin 2*	Snížená klíčivost PZ	Kalmodulin	Signalizace	*Landoni et al. 2010*
At2g41630	**AtTFIIB**			Transkripční faktor TFIIB	Regulace transkripce	*Zhou et al. 2013*
At2g41930	**SETH7**	*seth7*	Snížená klíčivost pylu a pomalý růst PL	Ser/Thr protein kinasa	Iniciace klíčení pylu	*Lalanne et al., 2004b*
At2g43040	**NPG**	*no pollen germination 1*	Neklíčící pyl, absence PL	Calmodulin-vazebný protein	Vazba ke calmodulinu	*Golovkin and Reddy, 2003*
At2g47040	**VGD1**	*vanguard1*	Pomalý růst PL	Homolog pektin methylesteras	Metabolismus buněčné stěny	*Jiang et al. 2005*
At2g47860	**SETH6**	*seth6*	Snížená klíčivost pylu a pomalý růst PL	RPT2/NPH3-like protein	Přenos signálů	*Lalanne et al., 2004b*
At3g04080/ At5g18280	**AtAPY1/ AtAPY2**	*apyrase 1/2, dvojitý mutant*	Neklíčící pyl, absence PL	Apyrasa	Signalizace, metabolismus nukleotidů	*Steinebrunner et al. 2003*
	TMS1	*thermosensitive male sterile 1*	Snížená termotolerance PL	DnaJ protein	Kontrola termotolerance během progamické fáze	*Yang et al. 2009*
At3g10380	**SEC8**	*exocyst complex component*	Neklíčící pyl, absence PL	Podjednotka komplexu exocyst	Polarisovaná exocytosa sekrečních vesikulů	*Cole et al., 2005*
At3g36150	**MIRO2**	*miro2*	Snížená klíčivost pylu a pomalý růst PL	MIRO GTPasa	Vazba GTP, lokalizace v mitochondrii	*Sormo et al. 2011*
At3g45100	**SETH2**	*seth2*	Silně snížená klíčivost pylu; abnormální ukládání kalosy	GPI-GnT katalytická podjednotka PIG-A	Složka biosyntetické dráhy bílkovin s GPI kotvou	*Lalanne et al., 2004a,b*
At3g51300	**Rop1At**	*rho-related protein from plants 1*	Inhibice růstu PL	Rop GTPasa	Gradient Ca++ v PL	*Li et al. 2001*
At3g52590	**HAP4**	*hapless4*	Chaotický růst PL ve vajíčku	Ubiquitin extension protein 1 (UBQ1) / 60S ribosomální protein L40	Syntéza a metabolismus bílkovin	*Johnson et al., 2004*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At3g54090	**UNG10**	*ungud10*	Narušený přenos alely přes samčí gametofyt	Protein podobný fruktokinase (fructokinasa-like protein)	Metabolismus sacharidů	*Lalanne et al., 2004b*
At3g54690	**SETH3**	*seth3*	Snížená klíčivost pylu a pomalý růst PL	Arabinosa-5-fosfát isomerasa	Syntéza vzácných rhamnogalaktouronanů	*Lalanne et al., 2004b; nepublikovaná data*
At3g61710	**AtATG6/ AtBECLIN1** (**syn.**)	*atatg6/ atbeclin1*	Neklíčící pyl	Vacuolar protein sorting homolog	Autofágie, vakuolární transport	*(Fujiki et al., 2007; Qin et al., 2007)*
At4g00800	**SETH5**	*seth5*	Snížená klíčivost pylu a pomalý růst PL	Neznámý transmembránový protein	Neznámá	*Lalanne et al., 2004b; nepublikovaná data*
At4g01220	**MGP4**	*male gameophyte defective 4*	Inhibice růstu PL	Xylosyltransferasa	Integrita buněčné stěny PL, biosyntéza pektinového rhamnogalaktouronanu II	*Liu et al. 2011*
At4g04710	**UNG6**	*ungud6*	Narušený přenos alely přes samčí gametofyt	Kalcium-dependentní protein kinasa	Kalcium-dependentní přenos signálů	*Lalanne et al., 2004b*
At4g11720	**HAP2**	*hapless2*	Chaotický růst PL ve vajíčku	Exprimovaný pravděpodobně transmembránový protein	Neznámá	*Johnson et al., 2004*
At4g21150	**HAP6**	*hapless6*	Krátké PL neopustí pestík	Riboforin II (RPN2) family protein	Membránový transport	*Johnson et al., 2004*
At4g25590	**ADF7**	*adf7*	Defekt růstu PL	Aktin depolymerizující faktor	Metabolismus aktinu	*Daher and Geitmann 2012*
At4g32500	**AKT5**	*spik*	Narušený růst PL	K+ kanál rodiny Shaker	Transport iontů	*Mouline et al. 2002; Cherel et al. 2002*
At4g34940	**SETH4**	*seth4*	Snížená klíčivost pylu	Protein obsahující ARM repetice	Neznámá	*Lalanne et al., 2004b; nepubl. data*
At4g35950	**Rop5At**	*rho-related protein from plants 5*	Inhibice růstu PL	Rop GTPasa	Gradient Ca2+ v PL	*Li et al. 2001*
At4g38190	**CSLD4**	*csld4*	Silně snížená klíčivost PZ	Protein D podobný celulosa synthase (cellulose synthase-like D protein)	Syntéza buněčné stěny PL	*Wang et al. 2011*
At5g04560	**DME**	*demeter*	Snížená transmise přes samčí gametofyt	5'-methylcytozin DNA glycosylasa	Demetylace DNA	*Schoft et al. 2011*
At5g12250	**SETH9**	*seth9*	Snížená kompetitivita, pomalý růst PL	Protein podobný alkohol dehydrogenase (alcohol dehydrogenase-like protein)	Metabolismus alkoholu	*Lalanne et al., 2004b*

Lokus	***Gen***	*Mutant*	*Mutantní fenotyp*	*Bílkovina*	*Funkce*	*Citace*
At5g13150	**EXO70C1**	*exocyst70 family protein c1*	Inhibice růstu PL	Podjednotka EXO70C1 komplexu exocyst	Exocytosa	*Li et al. 2010*
At5g13650	**SETH8**	*seth8*	Snížená kompetitivita, pomalý růst PL	GTP-binding typA-related protein	Neznámá	*Lalanne et al., 2004b*
At5g14380/ At3g01700	**AGP6/ AGP11**	*arabinogalaktanový protein 6 a 11, dvojitý mutant*	Snížená klíčivost PZ	Membránový protein	Snad import vody při klíčení PZ	*Coimbra et al. 2010*
At5g14870	**AtCNCG 18**	*atcngc18*	Defekty morfologie PL a pomalý růst	Cyclic nucleotide gated channel 18	Ca2+ signalizace, regulace signalizace ve špičce PL	*Frietsch et al. 2007*
At5g19610	**GNL2**	*gnl2*	Snížená klíčivost PZ, defekt růstu PL	GNOM-like2, ARF GTPasa	Polární recyklace přenašečů auxinu	*Richter et al. 2012*
At5g27540	**MIRO1/ EMB2473**	*miro1/embryo defective 2473*	Snížená klíčivost pylu a pomalý růst PL, abnormálně prodloužené mitochondrie	MIRO GTPasa	Vazba GTP, lokalizace v mitochondrii	*Yamaoka et al. 2008, Sormo et al. 2011*
At5g47020/ At5g47030	**HAP11**	*hapless11*	Defekt vedení PL, neschopnost najít mikropyle	Neznámý protein / Mitochondriální ATP synthesa, řetězec δ	Neznámá / energetický metabolismus	*Johnson et al., 2004*
At5g47030			Neschopnost proniknout do mikropyle	Mitochondriální ATP synthasa, řetězec delta	Energetický metabolismus, signalizace	*Johnson et al. 2004*
At5g47200/ At4g17530	**AtRabD2b/ AtRabD2c**	*atrabd2b/ atrabd2c*	Deformovaná PZ a PL se zbytnělou a rozvětvenou špičkou	Rab GTPasa	Vesikulární transport během růstu PL	*Peng et al. 2011*
At5g49150	**GEX2**	*gamete expressed 2*	Defekty růstu PL a fertility		Vedení PL a oplození	*Engel et al. 2005*
At5g49680	**KIP**	*kinky pollen*	Zvrácený tvar PL	SABRE-like protein	Komponent sekreční dráhy	*Procissi et al., 2003*
At5g55490	**GEX1**	*gamete expressed 1*	Defekty růstu PL a fertility	Membránový protein	Vedení PL a oplození	*Engel et al. 2005*
At5g55810	**AtNMNAT**	*atnmnat*	Pomalý růst PL	Nikotinát/ nikotinamid mononukleotid adenyltransferasa	Syntéza NaAD a NAD	*Hashida et al., 2007*
At5g56250	**HAP8**	*hapless8*	Krátké PL neopustí pestík	Exprimovaný protein	Neznámá	*Johnson et al., 2004*
At5g57320	**VLN5**	*villin5*	Inhibice růstu PL	Vilin	Dynamika aktinu - formování aktinových filament	*Zhang et al. 2010*
	MAD4	*mad4*	Defekt elongace PL	Neznámá	Neznámá	*Grini et al. 1999*
	RTG	*raring-to-go*	Předčasné klíčení pylu ještě v prašníku	Neznámá	Neznámá	*Johnson a McCormick 2001*

A.6.3 Použitá literatura (příloha)

Aarts MG, Hodge R, Kalantidis K, Florack D, Wilson ZA, Mulligan BJ, Stiekema WJ, Scott R, Pereira A (1997) The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J* **12:** 615-623

Abe K, Osakabe K, Nakayama S, Endo M, Tagiri A, Todoriki S, Ichikawa H, Toki S (2005) Arabidopsis RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiol* **139:** 896-908

Aki S, Nakai H, Aoyama T, Oka A, Tsuge T (2011) AtSAP130/AtSF3b-3 function is required for reproduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **52:** 1330-1339

Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* **24:** 457-466

Andersen SU, Algreen-Petersen RG, Hoedl M, Jurkiewicz A, Cvitanich C, Braunschweig U, Schauser L, Oh SA, Twell D, Jensen EO (2007) The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc in vitro and TSO1 is required for both male and female fertility in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **58:** 3657-3670

Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Inatsugi R, Nishida I, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K (2004) Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **39:** 170-181

Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K (2003) A novel male-sterile mutant of Arabidopsis thaliana, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol Biol* **53:** 107-116

Ariizumi T, Kawanabe T, Hatakeyama K, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K (2008) Ultrastructural characterization of exine development of the transient defective exine 1 mutant suggests the existence of a factor involved in constructing reticulate exine architecture from sporopollenin aggregates. *Plant Cell Physiol* **49:** 58-67

Backues SK, Korasick DA, Heese A, Bednarek SY (2010) The Arabidopsis dynamin-related protein2 family is essential for gametophyte development. *Plant Cell* **22:** 3218-3231

Brownfield L, Hafidh S, Durbarry A, Khatab H, Sidorova A, Doerner P, Twell D (2009) Arabidopsis DUO POLLEN3 is a key regulator of male germline development and embryogenesis. *Plant Cell* **21:** 1940-1956

Caldelari D, Wang G, Farmer EE, Dong X (2011) Arabidopsis lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Mol Biol* **75:** 25-33

Chaiwongsar S, Otegui MS, Jester PJ, Monson SS, Krysan PJ (2006) The protein kinase genes MAP3K epsilon 1 and MAP3K epsilon 2 are required for pollen viability in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **48:** 193-205

Chen J, Li LG, Liu ZH, Yuan YJ, Guo LL, Mao DD, Tian LF, Chen LB, Luan S, Li DP (2009) Magnesium transporter AtMGT9 is essential for pollen development in Arabidopsis. *Cell Res* **19:** 887-898

Chen W, Yu XH, Zhang K, Shi J, De Oliveira S, Schreiber L, Shanklin J, Zhang D (2011) Male Sterile2 encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **157:** 842-853

Chen YC, McCormick S (1996) sidecar pollen, an Arabidopsis thaliana male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development* **122:** 3243-3253

Chen Z, Hafidh S, Poh SH, Twell D, Berger F (2009) Proliferation and cell fate establishment during Arabidopsis male gametogenesis depends on the Retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 7257-7262

Chen Z, Higgins JD, Hui JT, Li J, Franklin FC, Berger F (2011) Retinoblastoma protein is essential for early meiotic events in Arabidopsis. *EMBO J* **30:** 744-755

Chen Z, Tan JL, Ingouff M, Sundaresan V, Berger F (2008) Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in Arabidopsis thaliana. *Development* **135:** 65-73

Cherel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud JB (2002) Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14:** 1133-1146

Coimbra S, Costa M, Mendes MA, Pereira AM, Pinto J, Pereira LG (2010) Early germination of Arabidopsis pollen in a double null mutant for the arabinogalactan protein genes AGP6 and AGP11. *Sex Plant Reprod* **23:** 199-205

Cole RA, Synek L, Zarsky V, Fowler JE (2005) SEC8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiol* **138:** 2005-2018

Conger R, Chen Y, Fornaciari S, Faso C, Held MA, Renna L, Brandizzi F (2011) Evidence for the involvement of the Arabidopsis SEC24A in male transmission. *J Exp Bot* **62:** 4917-4926

Daher FB, Geitmann A (2012) Actin depolymerizing factors ADF7 and ADF10 play distinct roles during pollen development and pollen tube growth. *Plant Signal Behav* **7:** 879-881

De Storme N, De Schrijver J, Van Criekinge W, Wewer V, Dormann P, Geelen D (2013) GLUCAN SYNTHASE-LIKE8 and STEROL METHYLTRANSFERASE2 are required for ploidy consistency of the sexual reproduction system in Arabidopsis. *Plant Cell* **25:** 387-403

De Storme N, Geelen D (2011) The Arabidopsis mutant jason produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II. *Plant Physiol* **155:** 1403-1415

Deng Y, Wang W, Li WQ, Xia C, Liao HZ, Zhang XQ, Ye D (2010) MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 2, encoding a sialyltransferase-like protein, is required for normal pollen germination and pollen tube growth in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* **52:** 829-843

Dettmer J, Schubert D, Calvo-Weimar O, Stierhof YD, Schmidt R, Schumacher K (2005) Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *Plant J* **41:** 117-124

Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM, Cahoon EB (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J* **54:** 284-298

Ding Z, Wang B, Moreno I, Dupľáková N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pěnčík A, Chen X, Tejos R, Skůpa P, Pollmann S, Mravec J, Petrášek J, Zažímalová E, Honys D, Rolčík J, Murphy A, Orellana A, Geisler M, Friml J (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis. *Nat Commun* **3:** 941

Dobritsa AA, Lei Z, Nishikawa S, Urbanczyk-Wochniak E, Huhman DV, Preuss D, Sumner LW (2010) LAP5 and LAP6 encode anther-specific proteins with similarity to chalcone synthase essential for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **153:** 937-955

Doelling JH, Phillips AR, Soyler-Ogretim G, Wise J, Chandler J, Callis J, Otegui MS, Vierstra RD (2007) The ubiquitin-specific protease subfamily UBP3/UBP4 is essential for pollen development and transmission in Arabidopsis. *Plant Physiol* **145:** 801-813

Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, Mahfouz M, Verma DP (2005) Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. *Plant J* **42:** 315-328

Drakakaki G, Zabotina O, Delgado I, Robert S, Keegstra K, Raikhel N (2006) Arabidopsis reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. *Plant Physiol* **142:** 1480-1492

Dupľáková N (2010) Identification and characterisation of transcription factors affecting late stages of male gametophyte development in Arabidopsis thaliana. Charles University in Prague, Prague

Durbarry A, Vizir I, Twell D (2005) Male germ line development in Arabidopsis. duo pollen mutants reveal gametophytic regulators of generative cell cycle progression. *Plant Physiol* **137:** 297-307

Egli B, Kolling K, Kohler C, Zeeman SC, Streb S (2010) Loss of cytosolic phosphoglucomutase compromises gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **154:** 1659-1671

El-Kasmi F, Pacher T, Strompen G, Stierhof YD, Muller LM, Koncz C, Mayer U, Jurgens G (2011) Arabidopsis SNARE protein SEC22 is essential for gametophyte development and maintenance of Golgi-stack integrity. *Plant J* **66:** 268-279

Eloy NB, Gonzalez N, Van Leene J, Maleux K, Vanhaeren H, De Milde L, Dhondt S, Vercruysse L, Witters E, Mercier R, Cromer L, Beemster GT, Remaut H, Van Montagu MC, De Jaeger G, Ferreira PC, Inze D (2012) SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109:** 13853-13858

Engel ML, Holmes-Davis R, McCormick S (2005) Green sperm. Identification of male gamete promoters in Arabidopsis. *Plant Physiol* **138:** 2124-2133

Enns LC, Kanaoka MM, Torii KU, Comai L, Okada K, Cleland RE (2005) Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Mol Biol* **58:** 333-349

Forsthoefel NR, Vernon DM (2011) Effect of sporophytic PIRL9 genotype on post-meiotic expression of the Arabidopsis pirl1;pirl9 mutant pollen phenotype. *Planta* **233:** 423-431

Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF (2007) A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 14531-14536

Fujiki Y, Yoshimoto K, Ohsumi Y (2007) An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol* **143:** 1132-1139

Funck D, Winter G, Baumgarten L, Forlani G (2012) Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biol* **12:** 191

Geisler DA, Papke C, Obata T, Nunes-Nesi A, Matthes A, Schneitz K, Maximova E, Araujo WL, Fernie AR, Persson S (2012) Downregulation of the delta-subunit reduces mitochondrial ATP synthase levels, alters respiration, and restricts growth and gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Cell* **24:** 2792-2811

Gibalová A, Reňák D, Matczuk K, Dupľáková N, Cháb D, Twell D, Honys D (2009) AtbZIP34 is required for Arabidopsis pollen wall patterning and the control of several metabolic pathways in developing pollen. *Plant Mol Biol* **70:** 581-601

Golovkin M, Reddy AS (2003) A calmodulin-binding protein from Arabidopsis has an essential role in pollen germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 10558-10563

Goubet F, Misrahi A, Park SK, Zhang Z, Twell D, Dupree P (2003) AtCSLA7, a cellulose synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **131:** 547-557

Grini PE, Schnittger A, Schwarz H, Zimmermann I, Schwab B, Jurgens G, Hulskamp M (1999) Isolation of ethyl methanesulfonate-induced gametophytic mutants in Arabidopsis thaliana by a segregation distortion assay using the multimarker chromosome 1. *Genetics* **151:** 849-863

Grini PE, Thorstensen T, Alm V, Vizcay-Barrena G, Windju SS, Jorstad TS, Wilson ZA, Aalen RB (2009) The ASH1 HOMOLOG 2 (ASHH2) histone H3 methyltransferase is required for ovule and anther development in Arabidopsis. *PLoS One* **4:** e7817

Guan YF, Huang XY, Zhu J, Gao JF, Zhang HX, Yang ZN (2008) RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in Arabidopsis. *Plant Physiol* **147:** 852-863

Gupta R, Ting JT, Sokolov LN, Johnson SA, Luan S (2002) A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in Arabidopsis. *Plant Cell* **14:** 2495-2507

Hashida SN, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H (2007) Arabidopsis thaliana nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. *Plant J* **49:** 694-703

Honys D, Oh SA, Reňák D, Donders M, Šolcová B, Johnson JA, Boudová R, Twell D (2006) Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **6:** 31

Howden R, Park SK, Moore JM, Orme J, Grossniklaus U, Twell D (1998) Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in Arabidopsis. *Genetics* **149:** 621-631

Ingouff M, Hamamura Y, Gourgues M, Higashiyama T, Berger F (2007) Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr Biol* **17:** 1032-1037

Ishiguro S, Nishimori Y, Yamada M, Saito H, Suzuki T, Nakagawa T, Miyake H, Okada K, Nakamura K (2010) The Arabidopsis FLAKY POLLEN1 gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol* **51:** 896-911

Iwakawa H, Shinmyo A, Sekine M (2006) Arabidopsis CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *Plant J* **45:** 819-831

Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puah CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *Plant Cell* **17:** 584-596

Johnson MA, von Besser K, Zhou Q, Smith E, Aux G, Patton D, Levin JZ, Preuss D (2004) Arabidopsis hapless mutations define essential gametophytic functions. *Genetics* **168:** 971-982

Johnson SA, McCormick S (2001) Pollen germinates precociously in the anthers of raring-to-go, an Arabidopsis gametophytic mutant. *Plant Physiol* **126:** 685-695

Jullien PE, Mosquna A, Ingouff M, Sakata T, Ohad N, Berger F (2008) Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in Arabidopsis. *PLoS Biol* **6:** e194

Kang BH, Busse JS, Bednarek SY (2003) Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* **15:** 899-913

Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG (2008) Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* **455:** 1134-1137

Kim HJ, Ok SH, Bahn SC, Jang J, Oh SA, Park SK, Twell D, Ryu SB, Shin JS (2011) Endoplasmic reticulum- and Golgi-localized phospholipase A2 plays critical roles in Arabidopsis pollen development and germination. *Plant Cell* **23:** 94-110

Kim SS, Grienenberger E, Lallemand B, Colpitts CC, Kim SY, Souza Cde A, Geoffroy P, Heintz D, Krahn D, Kaiser M, Kombrink E, Heitz T, Suh DY, Legrand M, Douglas CJ (2010) LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl alpha-pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22:** 4045-4066

Kobayashi M, Kouzu N, Inami A, Toyooka K, Konishi Y, Matsuoka K, Matoh T (2011) Characterization of Arabidopsis CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidylyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **52:** 1832-1843

Krupnova T, Stierhof YD, Hiller U, Strompen G, Muller S (2013) The microtubule-associated kinase-like protein RUNKEL functions in somatic and syncytial cytokinesis. *Plant J* **74:** 781-791

Lago C, Clerici E, Dreni L, Horlow C, Caporali E, Colombo L, Kater MM (2005) The

Arabidopsis TFIID factor AtTAF6 controls pollen tube growth. *Dev Biol* **285:** 91-100

Lalanne E, Honys D, Johnson A, Borner GH, Lilley KS, Dupree P, Grossniklaus U, Twell D (2004) SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **16:** 229-240

Lalanne E, Michaelidis C, Moore JM, Gagliano W, Johnson A, Patel R, Howden R, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Twell D (2004) Analysis of transposon insertion mutants highlights the diversity of mechanisms underlying male progamic development in Arabidopsis. *Genetics* **167:** 1975-1986

Lalanne E, Twell D (2002) Genetic control of male germ unit organization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129:** 865-875

Lee YR, Li Y, Liu B (2007) Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis. *Plant Cell* **19:** 2595-2605

Leon G, Holuigue L, Jordana X (2007) Mitochondrial complex II Is essential for gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143:** 1534-1546

Li H, Shen JJ, Zheng ZL, Lin Y, Yang Z (2001) The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126:** 670-684

Li HJ, Liu NY, Shi DQ, Liu J, Yang WC (2010) YAO is a nucleolar WD40-repeat protein critical for embryogenesis and gametogenesis in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **10:** 169

Li S, van Os GM, Ren S, Yu D, Ketelaar T, Emons AM, Liu CM (2010) Expression and functional analyses of EXO70 genes in Arabidopsis implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis. *Plant Physiol* **154:** 1819-1830

Li W, Chen C, Markmann-Mulisch U, Timofejeva L, Schmelzer E, Ma H, Reiss B (2004) The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 10596-10601

Li WQ, Zhang XQ, Xia C, Deng Y, Ye D (2010) MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1, encoding the FAd subunit of mitochondrial F1F0-ATP synthase, is essential for pollen formation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **51:** 923-935

Li X, Ilarslan H, Brachova L, Qian HR, Li L, Che P, Wurtele ES, Nikolau BJ (2011) Reverse-genetic analysis of the two biotin-containing subunit genes of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase in Arabidopsis indicates a unidirectional functional redundancy. *Plant Physiol* **155:** 293-314

Liu XL, Liu L, Niu QK, Xia C, Yang KZ, Li R, Chen LQ, Zhang XQ, Zhou Y, Ye D (2011) Male gametophyte defective 4 encodes a rhamnogalacturonan II xylosyltransferase and is important for growth of pollen tubes and roots in Arabidopsis. *Plant J* **65:** 647-660

Lobstein E, Guyon A, Ferault M, Twell D, Pelletier G, Bonhomme S (2004) The putative Arabidopsis homolog of yeast vps52p is required for pollen tube elongation, localizes to Golgi, and might be involved in vesicle trafficking. *Plant Physiol* **135:** 1480-1490

Lu X, Liu X, An L, Zhang W, Sun J, Pei H, Meng H, Fan Y, Zhang C (2008) The Arabidopsis MutS homolog AtMSH5 is required for normal meiosis. *Cell Res* **18:** 589-599

Lu Y, Chanroj S, Zulkifli L, Johnson MA, Uozumi N, Cheung A, Sze H (2011) Pollen tubes lacking a pair of K+ transporters fail to target ovules in Arabidopsis. *Plant Cell* **23:** 81-93

Lucca N, Leon G (2012) Arabidopsis ACA7, encoding a putative auto-regulated Ca(2+)-ATPase, is required for normal pollen development. *Plant Cell Rep* **31:** 651-659

Luo G, Gu H, Liu J, Qu LJ (2012) Four closely-related RING-type E3 ligases, APD1-4, are involved in pollen mitosis II regulation in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* **54:** 814-827

Matsushima R, Tang LY, Zhang L, Yamada H, Twell D, Sakamoto W (2011) A conserved, Mg(2)+-dependent exonuclease degrades organelle DNA during Arabidopsis pollen development. *Plant Cell* **23:** 1608-1624

Mattioli R, Biancucci M, Lonoce C, Costantino P, Trovato M (2012) Proline is required for male gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **12:** 236

McConn M, Browse J (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* **8:** 403-416

Mercier R, Vezon D, Bullier E, Motamayor JC, Sellier A, Lefevre F, Pelletier G, Horlow C (2001) SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes Dev* **15:** 1859-1871

Missbach S, Weis BL, Martin R, Simm S, Bohnsack MT, Schleiff E (2013) 40S ribosome biogenesis co-factors are essential for gametophyte and embryo development. *PLoS One* **8:** e54084

Mouline K, Very AA, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud JB, Sentenac H (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in Arabidopsis. *Genes Dev* **16:** 339-350

Niewiadomski P, Knappe S, Geimer S, Fischer K, Schulz B, Unte US, Rosso MG, Ache P, Flugge UI, Schneider A (2005) The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17:** 760-775

Nishikawa S, Zinkl GM, Swanson RJ, Maruyama D, Preuss D (2005) Callose (beta-1,3 glucan) is essential for Arabidopsis pollen

wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol* **5:** 22

Oh SA, Johnson A, Smertenko A, Rahman D, Park SK, Hussey PJ, Twell D (2005) A Divergent Cellular Role for the FUSED Kinase Family in the Plant-Specific Cytokinetic Phragmoplast. *Curr Biol* **15:** 2107-2111

Oh SA, Park KS, Twell D, Park SK (2010) The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. *Plant J* **64:** 839-850

Oh SA, Twell D, Park SK (2011) SIDECAR POLLEN suggests a plant-specific regulatory network underlying asymmetric microspore division in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **6:** 416-419

Okada T, Endo M, Singh MB, Bhalla PL (2005) Analysis of the histone H3 gene family in Arabidopsis and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3. *Plant J* **44:** 557-568

Park JI, Ishimizu T, Suwabe K, Sudo K, Masuko H, Hakozaki H, Nou IS, Suzuki G, Watanabe M (2010) UDP-glucose pyrophosphorylase is rate limiting in vegetative and reproductive phases in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **51:** 981-996

Park SK, Howden R, Twell D (1998) The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **125:** 3789-3799

Park SK, Rahman D, Oh SA, Twell D (2004) gemini pollen 2, a male and female gametophytic cytokinesis defective mutation. *Sex Plant Reprod* **17:** 63-70

Park SK, Twell D (2001) Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the Arabidopsis gemini pollen1 mutant. *Plant Physiol* **126:** 899-909

Pastuglia M, Azimzadeh J, Goussot M, Camilleri C, Belcram K, Evrard JL, Schmit AC, Guerche P, Bouchez D (2006) Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in Arabidopsis. *Plant Cell* **18:** 1412-1425

Paxson-Sowders DM, Dodrill CH, Owen HA, Makaroff CA (2001) DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127:** 1739-1749

Peng J, Ilarslan H, Wurtele ES, Bassham DC (2011) AtRabD2b and AtRabD2c have overlapping functions in pollen development and pollen tube growth. *BMC Plant Biol* **11:** 25

Procissi A, Guyon A, Pierson ES, Giritch A, Knuiman B, Grandjean O, Tonelli C, Derksen J, Pelletier G, Bonhomme S (2003) KINKY POLLEN encodes a SABRE-like protein required for tip growth in Arabidopsis and conserved among eukaryotes. *Plant J* **36:** 894-904

Puizina J, Široký J, Mokroš P, Schweizer D, Říha K (2004) Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* **16:** 1968-1978

Qin G, Ma Z, Zhang L, Xing S, Hou X, Deng J, Liu J, Chen Z, Qu LJ, Gu H (2007) Arabidopsis AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res* **17:** 249-263

Quilichini TD, Friedmann MC, Samuels AL, Douglas CJ (2010) ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **154:** 678-690

Reňák D, Gibalová A, Šolcová K, Honys D (2014) A new link between stress response and nucleolar function during pollen development in Arabidopsis mediated by AtREN1 protein. *Plant Cell and Environment* **37(3)**: 670-683

Reyes F, Leon G, Donoso M, Brandizzi F, Weber AP, Orellana A (2010) The nucleotide sugar transporters AtUTr1 and AtUTr3 are required for the incorporation of UDP-glucose into the endoplasmic reticulum, are essential for pollen development and are needed for embryo sac progress in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **61:** 423-435

Richter S, Muller LM, Stierhof YD, Mayer U, Takada N, Kost B, Vieten A, Geldner N, Koncz C, Jurgens G (2012) Polarized cell growth in Arabidopsis requires endosomal recycling mediated by GBF1-related ARF exchange factors. *Nat Cell Biol* **14:** 80-86

Robertson WR, Clark K, Young JC, Sussman MR (2004) An Arabidopsis thaliana plasma membrane proton pump is essential for pollen development. *Genetics* **168:** 1677-1687

Rosti J, Barton CJ, Albrecht S, Dupree P, Pauly M, Findlay K, Roberts K, Seifert GJ (2007) UDP-glucose 4-epimerase isoforms UGE2 and UGE4 cooperate in providing UDP-galactose for cell wall biosynthesis and growth of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **19:** 1565-1579

Rotman N, Durbarry A, Wardle A, Yang WC, Chaboud A, Faure JE, Berger F, Twell D (2005) A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. *Curr Biol* **15:** 244-248

Schnurr JA, Storey KK, Jung HJ, Somers DA, Gronwald JW (2006) UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in Arabidopsis. *Planta* **224:** 520-532

Schoft VK, Chumak N, Choi Y, Hannon M, Garcia-Aguilar M, Machlicova A, Slusarz L, Mosiolek M, Park JS, Park GT, Fischer RL, Tamaru H (2011) Function of the DEMETER DNA glycosylase in the Arabidopsis thaliana male gametophyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108:** 8042-8047

Siddiqi I, Ganesh G, Grossniklaus U, Subbiah V (2000) The dyad gene is required for progression through female meiosis in Arabidopsis. *Development* **127:** 197-207

Sivitz AB, Reinders A, Ward JM (2008) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* **147:** 92-100

Sorensen AM, Krober S, Unte US, Huijser P, Dekker K, Saedler H (2003) The Arabidopsis ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* **33:** 413-423

Sorensen AM, Kroeber S, Saedler H (2004) The ABNORMAL GAMETOPHYTES (AGM) gene product of Arabidopsis demonstrates a role in mitosis during gamete development. *Plant Cell Physiol* **45:** 905-913

Sormo CG, Brembu T, Winge P, Bones AM (2011) Arabidopsis thaliana MIRO1 and MIRO2 GTPases are unequally redundant in pollen tube growth and fusion of polar nuclei during female gametogenesis. *PLoS One* **6:** e18530

Steinebrunner I, Wu J, Sun Y, Corbett A, Roux SJ (2003) Disruption of apyrases inhibits pollen germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* **131:** 1638-1647

Takeda T, Amano K, Ohto MA, Nakamura K, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C (2006) RNA interference of the Arabidopsis putative transcription factor TCP16 gene results in abortion of early pollen development. *Plant Mol Biol* **61:** 165-177

Tan XY, Liu XL, Wang W, Jia DJ, Chen LQ, Zhang XQ, Ye D (2010) Mutations in the Arabidopsis nuclear-encoded mitochondrial phage-type RNA polymerase gene RPOTm led to defects in pollen tube growth, female gametogenesis and embryogenesis. *Plant Cell Physiol* **51:** 635-649

Teng C, Dong H, Shi L, Deng Y, Mu J, Zhang J, Yang X, Zuo J (2008) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **146:** 1322-1332

Toller A, Brownfield L, Neu C, Twell D, Schulze-Lefert P (2008) Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant J* **54:** 911-923

Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat Cell Biol* **4:** 711-714

Van Damme D, Coutuer S, De Rycke R, Bouget FY, Inze D, Geelen D (2006) Somatic cytokinesis and pollen maturation in Arabidopsis depend on TPLATE, which has domains similar to coat proteins. *Plant Cell* **18:** 3502-3518

Verelst W, Twell D, de Folter S, Immink R, Saedler H, Munster T (2007) MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biol* **8:** R249

Vizcay-Barrena G, Wilson ZA (2006) Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant. *J Exp Bot* **57:** 2709-2717

Wan J, Patel A, Mathieu M, Kim SY, Xu D, Stacey G (2008) A lectin receptor-like kinase is required for pollen development in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **67:** 469-482

Wang W, Wang L, Chen C, Xiong G, Tan XY, Yang KZ, Wang ZC, Zhou Y, Ye D, Chen LQ (2011) Arabidopsis CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. *J Exp Bot* **62:** 5161-5177

Xia C, Wang YJ, Li WQ, Chen YR, Deng Y, Zhang XQ, Chen LQ, Ye D (2010) The Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F (AteIF3f), is required for pollen germination and embryogenesis. *Plant J* **63:** 189-202

Xu H, Knox RB, Taylor PE, Singh MB (1995) Bcp1, a gene required for male fertility in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 2106-2110

Xu J, Yang C, Yuan Z, Zhang D, Gondwe MY, Ding Z, Liang W, Zhang D, Wilson ZA (2010) The ABORTED MICROSPORES regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22:** 91-107

Xu N, Gao XQ, Zhao XY, Zhu DZ, Zhou LZ, Zhang XS (2011) Arabidopsis AtVPS15 is essential for pollen development and germination through modulating phosphatidylinositol 3-phosphate formation. *Plant Mol Biol* **77:** 251-260

Yamaoka S, Leaver CJ (2008) EMB2473/MIRO1, an Arabidopsis Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen. *Plant Cell* **20:** 589-601

Yamaoka Y, Yu Y, Mizoi J, Fujiki Y, Saito K, Nishijima M, Lee Y, Nishida I (2011) PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for microspore development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **67:** 648-661

Yang J, Tian L, Sun MX, Huang XY, Zhu J, Guan YF, Jia QS, Yang ZN (2013) AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for pollen wall pattern formation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162:** 720-731

Yang KZ, Xia C, Liu XL, Dou XY, Wang W, Chen LQ, Zhang XQ, Xie LF, He L, Ma X, Ye D (2009) A mutation in Thermosensitive Male Sterile 1, encoding a heat shock protein with DnaJ and PDI domains, leads to thermosensitive gametophytic male sterility in Arabidopsis. *Plant J* **57:** 870-882

Zhang H, Qu X, Bao C, Khurana P, Wang Q, Xie Y, Zheng Y, Chen N, Blanchoin L, Staiger CJ, Huang S (2010) Arabidopsis VILLIN5, an actin filament bundling and severing protein, is necessary for normal pollen tube growth. *Plant Cell* **22:** 2749-2767

Zhou JJ, Liang Y, Niu QK, Chen LQ, Zhang XQ, Ye D (2013) The Arabidopsis general transcription factor TFIIB1 (AtTFIIB1) is required for pollen tube growth and endosperm development. *J Exp Bot* **64:** 2205-2218

Zou C, Jiang W, Yu D (2010) Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61:** 3901-3914