

MEIOTICKÉ DĚLENÍ V NEZRALÝCH PRAŠNÍCÍCH PAŽITKY (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.)

(Roztlakový preparát, barvení železitým acetokarmínem, fáze meiózy I a meiózy II, význam meiózy z genetického hlediska, proces crossing-over.)

ÚVOD

MEIÓZA

(redukční neboli alotypické dělení) je jaderné dělení, které předchází vzniku gamet. Probíhá ve dvou po sobě následujících děleních - první je označováno jako *heterotypické dělení* (redukční, meióza I), protože se odlišuje od mitózy; po něm může následovat interfáze, tzv. interkineze, ale bez S-fáze; a druhé je označováno jako *homeotypické dělení* (ekvační, meióza II) protože svým průběhem odpovídá mitóze.

Heterotypické dělení (meióza I)

PROFÁZE I :

Profáze heterotypického dělení zaujímá z celého meiotického dělení nejdelší část, až 90 %. V závislosti na organismu může trvat několik hodin až několik let. Lze ji rozdělit na 5 etap:

Leptotene (řec. leptos=tenký, tene=nit) - začíná spiralizace chromozomů, chromozomy mají vzhled dlouhých jemných vláken.

Zygotene (zygon=dvojitá nit) - homologní chromozomy se přikládají podélně těsně k sobě. Vytváří se *synaptonemální komplex*, zipu podobné propojení homologních chromozomů pomocí proteinů a RNA, Homologní chromozomy se navzájem ovíjejí, vzniká útvar označovaný jako *bivalent* (*geminus*). Na konci této fáze dochází k jevu označovanému jako *crossing-over*, tj. k výměně části materiálu chromozomů, a to mezi nesesterskými chromatidami homologních chromozomů. Podíl na tomto zlomu a opětovném spojení chromozomů mají pokračující spiralizace chromatid a s ní spojené odpudivé síly mezi oběma kolem sebe obtočenými homologními chromozomy.

Pachytene (pachys=tlustý) – pokračuje spiralizace (zkracování) chromozomů, v jeho důsledku jsou viditelné a odlišitelné jednotlivé chromatidy homologních chromozomů. Útvar, který v této fázi vzniká, tetradové stadium bivalentu, je tvořen dvěma homologními chromozomy a obsahuje dvě centromery. Od okamžiku vzniku tetradového stadia vznikají odpudivé síly mezi oběma původními homologními chromozomy; oba mají snahu se od sebe oddálit, ale brání jim v tom složité vzájemné propletení. Dokončuje se crossing-over, výměna genetického materiálu, tj. genů na sebe vázaných. Vlastní rekombinace může probíhat na více místech a mezi různými chromatidami zároveň, její frekvence je

závislá na stáří organismu, jeho pohlaví, charakteru chromozomů, teplotě, aj. Důsledek crossing-overu je viditelný jako překřížení, *chiasma*.

Diplotene (diplos=dvojitý) – dále pokračuje spiralizace chromozomů. Dvojice homologních chromozomů bivalentu se od sebe dále oddalují a jsou spolu spojeny pouze v tom místě, kde proběhla výměny. Jednotlivé bivalenty zaujmou postavení těsně při jaderné bláně, střed jádra zůstává volný.

U samic savců dochází k zastavení profáze a navození klidového stádia, *diktyoten*. Meiotické dělení je následně nastartováno s pohlavní dospělostí samice, kdy dochází ve vaječnicích k postupné indukci zrání folikulů.

Diakineze (diakino=rozpojují) - poslední etapa, při které se dokončuje spiralizace a zkracování chromozomů, chiasmata se posouvají ke koncům chromatid (*terminalizace chiasmata*). U organismů s centriolem se jeho zdvojené páry začnou přesouvat k budoucím pólům dělicího vřeténka.

PROMETAFÁZE I

Rozpadá se jaderná membrána a zaniká jadérko, z centrosomálních oblastí se diferencuje se dělicí vřeténko, jehož vlákna se nasouvají do oblasti jádra a napojují se na centromery bivalentů.

METAFÁZE I

Chromozomy se tahem dělicího vřeténka staví do ekvatoriální roviny navzájem přes sebe přeloženými konci chromatid (tj. terminalizovanými chiazmaty v ekvatoriální rovině), centroméry směřují k opačným koncům dělicího vřeténka a pólům buňky.

ANAFÁZE I

Z každého bivalentu se uvolňují dvouchromatidové chromozomy (nedochází dělení chromatid v místě centromery), a ty se rozestupují k protilehlým pólům dělicího vřeténka. V rámci tohoto rozestupu dochází k tzv. *segregaci chromozomů*. Distribuce chromozomů k pólům vřeténka je *naprosto nahodilá* s bez ohledu na to, který chromozom pocházel původně od otce a který od matky. Výsledkem je nahodilá kombinace chromozomů v haploidní sadě budoucí pohlavní buňky a faktická realizace *zákonu o volné kombinovatelnosti vloh*.

TELOFÁZE I

Může proběhnout stejně jako u mitózy, tzn. - vzniknou dvě haploidní jádra oddělená buněčnou přepážkou nebo vznikne jen buněčná přepážka a časná telofáze heterotypického dělení přechází do pozdní profáze homeotypického dělení.

V případě vzniku pylových *tetrád* u většiny dvouděložných rostlin nedochází v telofázi I k tvorbě buněčné přehrádky (simultánní typ), zatímco u jednoděložných rostlin k tvorbě buněčné přepážky dochází (sukcesivní typ, vznik *diády*).

Homeotypické dělení (meióza II)

PROFÁZE II

Odpovídá telofázi předchozího dělení, na konci profáze se diferencují dvě dělicí vřeténka.

PROMETAFÁZE II

Rozpadá se jaderná membrána, vlákna dělicího vřeténka se připojují na centromery jednotlivých dvouchromatidových chromozomů.

METAFÁZE II

Probíhá u obou buněk vzniklých I. dělením synchronizovaně. Chromozomy se uspořádávají tahem dělicího vřeténka v ekvatoriální rovině svými centroméry. Délka chromozomů je poněkud kratší než u mitotické metafáze.

ANAFÁZE II

Dochází oddělení chromatid chromozomů v místě centromery, a jejich k rozchodu k pólům dělicího vřeténka. Délka chromozomů je již normální.

TELOFÁZE II

Odpovídá telofázi mitózy.

Produktem meiózy výchozí mateřské buňky ($2n$) je *čtveřice (tetráda) haploidních gamet (n)*.

(Pozn.: u pylové mateřské buňky (PMC) vznikají čtyři haploidní *mikrospory*, z každé pak následným vývojem vznikne pylové zrno.)

VÝZNAM MEIOTICKÉHO DĚLENÍ

Meióza je dělením, v jehož průběhu dochází k redukci počtu chromozomů z diploidní na haploidní výbavu a tím zajištění vzniku funkčních gamet a předávání genetické informace v procesu pohlavního rozmnožování. V jejím průběhu dochází realizaci základních Mendelových zákonů dědičnosti. Proběhlý crossing-over jsou zdrojem genetické proměnlivosti potomstva a organismů.

Pro pouhou redukci počtu chromozomů by stačil první krok dělení - jádra vzniklá meiózou I jsou již, co do počtu chromozomů, haploidní. Meióza se však bez výjimky skládá ze *dvou následných dělení* (I a II) -

z diploidní mateřské buňky vznikají čtyři haploidní gamety. Bez druhého dělení (meióza II) by byl účinek crossing-over geneticky neúčinný.

PROVEDENÍ

Rostlinný materiál

nafixovaná poupata pažitky¹ (*Allium schoenoprasum* L)

Pomůcky

mikroskop (objektiv 40x); preparační lupa s okulárovým mikrometrem; milimetrové měřítko; centrofix; podložní a krycí skla; pinzeta; preparační jehly – 2; žiletka; filtrační papír; lihový kahan; zápalky

Chemikálie a roztoky

barvivo acetokarmín²

Pracovní postup

1. Nafixované poupě změříme milimetrovým měřítkem nebo pod preparační lupou s okulárovým mikrometrem.
2. Poupě položíme na podložní sklo, na okraj zapíšeme jeho velikost (fixem na sklo) a s pomocí preparačních jehel vypreparujeme prašníky, zbytek odstraníme.
3. Obsah prašníků vytlačíme/rozmáčkneme pomocí jehel do kapky (železitého) acetokarmínu a zbytky prašníků rovněž odstraníme.
4. Lehce nahřejeme nad plamenem lihového kahanu a necháme asi 1 min barvit.
5. Přiložíme krycí sklo a opatrně roztlačíme.
6. Přebytečné barvivo odstraníme proužkem filtračního papíru.
7. Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení cca 200 a 400 x, případně s imersí při zvětšení 1000x.

¹ Fixáž alkohol-octová

3:1, 24 h při 4°C, pak přenesení přes 96% etanol do 70% etanolu a uchování v chladničce při 4°C

² Příprava acetokarmínu (1,5% roztok)

1,5g karmínu (např. Serva) přidáme do 100 ml 45% kyseliny octové a zvolna vaříme 0,5-1 h za stálého míchání v erlenmayerově baňce (s úzkým hrdlem přikrytým hodinovým sklíčkem). Vychladlý roztok zfiltrujeme. Uchováváme v hnědé zabroušené láhvi při pokojové teplotě. Občas přefiltrujeme.

ÚKOLY

1. zakreslete jednotlivá stádia meiózy ve vztahu k velikosti poupat (uvést velikost poupat, při kterém bylo příslušné stádium pozorováno, popsat viditelné struktury pylové mateřské buňky (PMC) a vedle uvést, co se děje s chromozomy, zapsat zvětšení mikroskopu!)
2. zakreslete meiotické stádium, v němž můžeme vidět důsledek crossing-overu (chiazmata) (podle nativního preparátu nebo podle mikrofotografie)
3. zjistte počet bivalentů v metafázi I, příp. v diakinezi I
4. určete počet chromozomů ($2n = \dots$) charakteristických pro pažitku (*Allium schoenoprasum* L.)
5. dokumentace pozorovaných fází meiotického dělení
6. srovnajte; na základě získaných vědomostí, nákrešů a fotodokumentace; meiotické a mitotické dělení (odlišnosti, shody)

ZÁVĚR

Zhodnoťte vlastní provedení roztlakového preparátu (kvalitu roztlaku a kvalitu barvení železitým acetokarmínem). Uveďte, která stádia meiózy jste pozorovali na vlastních preparátech a dejte je do vztahu s velikostí poupěte, označte stádium, v němž probíhá crossing-over a uveďte počet bivalentů v metafázi I meiotického dělení a počet diploidních chromozomů ($2n$) pro daný rostlinný materiál.