

Z každé buňky nový organismus

Regenerační kompetence rostlin

„Práce amerického biologa Jenningse o regeneraci *Turbellarií* dala mi podnět k pokusům o regeneraci kořenových vrcholů.“
(Vzpomínky, Archiv AV ČR 2002, str. 184)

Zdeněk Opatrný

B. Němec

Nebyl by to snad ani prof. Bohumil Němec, kdyby se, věren svému původnímu zoologickému vzdělání, neinspiroval při zkoumání rostlin nápady odjinud. Byť se dnes domníváme, že regenerační procesy u ploštěnek (*Rhabditimorpha*, dríve *Turbellaria*) jsou přece jen svou povahou principiálně odlišné od těch rostlinných a že jejich nositelkami nejsou (jako u rostlin) standardní somatické buňky organismu, ale jen totipotentní buňky kmenové. Ale o tom bude ještě řeč později.

Z pokusů B. Němce s regenerací kořenových vrcholů vyrostla velká práce, kterou pod názvem Studien über Regeneration vydal v r. 1905 R. Thost, majitel renowaného nakladatelství Gebrüder Borntraeger v Berlíně. Kniha měla 387 stránek a 180 obrázků v textu a podle slov autora „nebyla v rostlinné fyziologii dosti oceněna“. Při jejím čtení můžeme B. Němcovi závidět onen čas jednoduchých a chytrých pokusů, v nichž experimentátorovi mnohdy stačily jen rostlina, skalpel a mikroskop. A píle. Ale k tomu i pozorovací talent, všestranné znalosti a vysoký intelekt. Však také informace o regeneračních mechanismech rostlin v dalších jeho člancích či monografiích jsou natolik bohaté, že z něj nesporně činí klasika dané oblasti výzkumu. Oblasti vysoce zajímavé po stránce teoretické a velmi důležité i z pohledu praktického využití.

Zkusme v jejím kontextu volně navázat na článek Jiřího Frimla z minulého čísla tohoto časopisu (Živa 2007, 1: 8–12). V něm je obecně zmíněna základní životní strategie rostlin, projevující se jako rozsáhlá vývojová plasticita. Nepohyblivý rostlinný organismus je nezbytně vystaven působení mnoha stresových faktorů, škůdců, býložravců. Nemůže se spásit útekem. Obdobně má-li zajistit nejen přežití sebe samého, ale sebe jako rostlinného druhu, musí nějak řešit situace, za nichž je ohrožena ať již tvorbou semen či jejich distribuce nebo klíčením. Od hojení ran po různé typy sofistikovaného nepohlavního (vegetativního) rozmnožování coby alternativy k onomu generativnímu — v tom všem využívá rostlina různou měrou rozvinutou regenerační schopnost svých buněk a pletiv. Člověk tuto schopnost dobře zná a často ji využívá a vítá. Vegetativní množení patří k základům pěstování polních plodin (od bramboru po ananas) i zahradních rostlin (od pelargonii po vinnou révu).

Nejen buchlovské preludium

„...Po vyslechnutí ortelu mladý odsouzenec vytrhl opodál rostoucí mladou lípku a zasadil ji do země kořeny vzhůru. „Nespáchal jsem tento zločin a až se tento strom do roka zazelená, poznáte, že jste odsoudili nevinného! ...A skutečně! Příš-

tíbo roku z mladého stromku vyrazily první zelené lístky a zbrojnoš byl osvobozen.“ Tolik místní legenda od hradu Buchlova a tolik J. Friml úvodem k povídání o auxinu coby „univerzálním vývojovém signálu v životě rostlin“.

Četnost obdobných legend o stromech nevinny (autor tohoto článku pamatuje obdobnou lípu rostoucí v zámeckém parku hrabat Kinských v Kostelci nad Orlicí) nám naznačuje, že si jejich tvůrci projevu vysoké regenerační schopnosti některých dřevin dobře povšimli. Byly to dost často lípy (zkuste obdobný trik s dubem, borovicí či smrkem...), a to mladé (zkuste jen tak vytrhnout lípu starší — ona regenerační schopnost se stářím organismu či orgánu klesá). Nicméně — jakým způsobem, jakým mechanismem ona lípa vyrašila?

Nejprve trochu opakovaní učiva ze střední školy. Rostliny jsou obecně známy svým neukončeným růstem, zajišťovaným funkcí nejrůznějších primárních, sekundárních, latentních a dalších dělivých pletiv — meristémů. V těch asi nejnámějších — vrcholových (apikálních), umístěných na špičce pupenů či kořenů, neustále fungují buňky zvané iniciály. Dělí se a dělí, produkují nové a nové buňky postupně se diferencujícími pletivy, a tak i budoucích orgánů. Stonků, listů, kořenů, květů, plodů... S určitou mírou obecnosti bychom je mohli přirovnat k tzv. kmenovým buňkám živočišným.

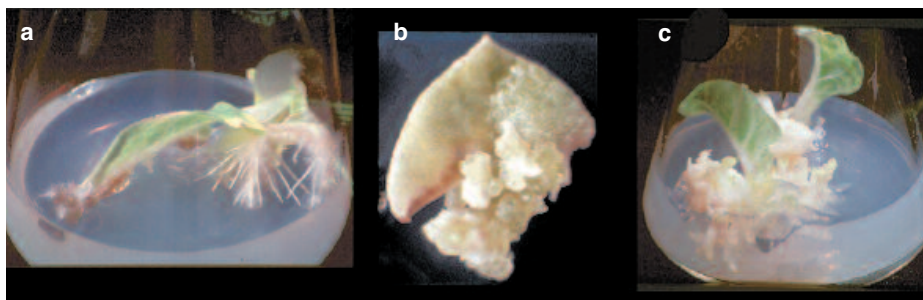


Obr. 1 Jeden z typů regeneračních procesů u vyšších rostlin — restituce *in vivo*. Řezem poškozený kořenový apikální meristém (dělivé pletivo) cibule — v místě poškození vzniká pletivo nové, se zachováním původního určení. Během restituce se původní kořenová špička odklání a z části meristému se tvoří nový apikální vrchol. B. Němec (1930)

Pokud jsou iniciály nějak poškozeny, přebírají jejich funkci buňky sousední. Pokud je nenávratně poškozen apikální pupen, mohou jeho funkci nahradit axilární pupeny umístěné v paždí listů. Jsou tak totiž osvozeny z korelativní inhibice dosud dominantního vrcholu, zejména změnou toku fytohormonů (snížením hladiny auxinů). Ale jejich růst můžeme vyvolat také aplikací látek inhibujících jejich transport — viz článek J. Frimla, nebo aplikací jejich funkčních antagonistů — zvláště cytokininů (viz dále), které nastupují na místo původního hlavního pupene — stonku — osy. Obdobně se tomu děje, je-li poškozena špička hlavního kořene, resp. kořenů do té doby funkčních.

Avšak nejen to. Za určitých situací a v případě určitých rostlinných druhů mohou obnovit schopnost buněčného dělení nejrůznější buňky nebo pletiva do té doby specializovaná na zcela jiné funkce — kupř. krycí pletiva jako pokožka, pletiva zásobní (dřeň), pletiva plnicí funkci fotosyntetické „továrny“ (listový mezofyl) apod. U některých rostlin je tento proces iniciován pouze v souvislosti s hojením ran — poranění kmene stromu, právě tak jako poškození bramborové hlízy vede k dočasné obnově buněčného dělení, později však vnější vrstvy takových pletiv dělení zastaví a pletivo se nakonec pokryje různým typem kůry — suberinovou či korkovou vrstvou. U jiných však tento hojivý proces přechází ve skutečnou funkční a strukturální re-generaci a v poškozeném okrsku se mohou vytvořit buď nové základy pupenů nebo kořenů a postupně i celý jedinec. K pěstitelově radosti — namnožil si takto, cíleně a vědomě, nové autentické kopie původního jedince. Nebo také starosti — špatně vyplel záhon, nechal v něm úlomky kořenů smetánky či oddenků svačce a ejhle! Aniž zasel, záhon se zelená, plevel se má čile k světu.

Obr. 2 Regenerační model tabáku W38: a) listové explantáty tabáku na médiu s auxinem (kyselinou indol-3-octovou — IAA) 2 mg/l — tvorba kořenů, b) médium s IAA 2 mg/l a kinetinem (jedním z cytokininů) 0,02 mg/l — tvorba kalusového (nediferencovaného) pletiva, c) médium s IAA 1 mg/l a kinetinem 0,2 mg/l — tvorba pupenů

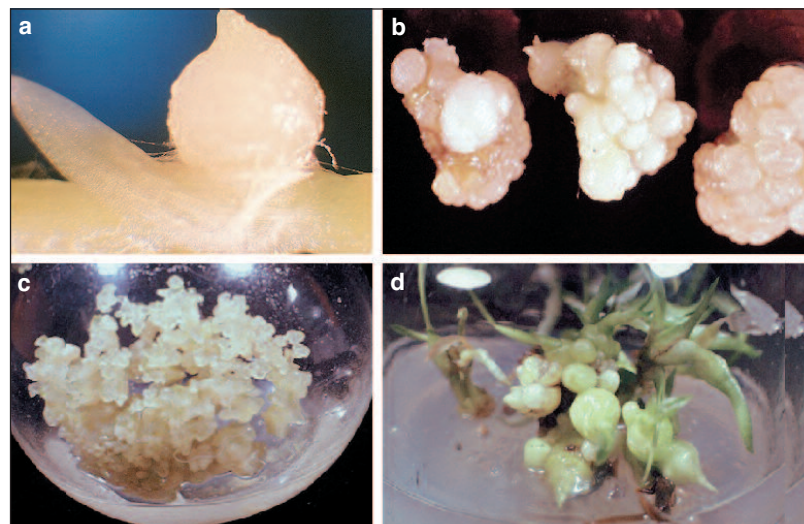


Jak zahradníkům, tak vědcům je a samozřejmě bylo (na základě empirie) již počátkem 20. stol. velmi dobře známo, že mnohé rostlinné druhy dávají přednost rozmnožování pohlavnímu, tedy semeny, jiné nepohlavnímu — vegetativnímu. Ty druhé vyvinuly celou řadu alternativních strategií, vytvářejí různé vegetativní orgány — od cibulí, pacibulí přes hlízy po cílené odlamování částí os či kořenů. Některé šly v této snaze až tak daleko, že funkční semena vytvářet zapoměly — kulturní česnek budíž názorným příkladem. Leč vše má své výhodné i nevýhodné stránky. Je kupř. výhodné rozmnožovat se snadno a rychle vegetativně — nepotřebují k tomu sexuálního partnera, ba ani samosprašení, mohou rychle okupovat vhodnou niku. Avšak zároveň tak stejně účinně dále šířím svého vlastního patogena, zejména různé typy viróz, pro něž by fáze opylení, tvorby a zrání semen mohla být zásadní překážkou. A tak je možná optimální životní strategií schopnost různých rostlin množit se tak i tak, podle potřeby a situace — buď generativně, nebo vegetativně.

Restituce není jen znovuzískání majetku

Na základě výsledků svého rozsáhlého studia — morfologického, ale i cytologického a anatomického — B. Němec mj. formuloval tři základní kategorie/typy regeneračních procesů u vyšších rostlin. První dvě využívají existence již formovaných meristémů — aktivních či spících. V případě tzv. restituce se v místě poškozeného meristému vytváří meristem (osní, kořenový) nový, který zachovává původní určení (obr. 1 a 3). Při reprodukci přebírá funkci zničeného meristému (přesněji vzrostného vrcholu) jiný orgánový základ. Rostlina po ztrátě apikálního pupene (kupř. mladé smrčky, jimž spárkatá zvěř okousala vršky) aktivuje pupeny úžlabní, vyhání postranní větve, z nichž posléze některá převezme úlohu hlavní osy. Obdobně se chová koře-

Obr. 3 Restituce in vitro — klonové množení orchidejí na příkladu rodu Cymbidium: a) úžlabní (axilární) pupen, b) na médiu s obsahem auxinu a cytokininu se z apikálního meristému vytvářejí nové „protokormy“ (coś jako pacibulky), které lze dále řízkovat, c) kontinuální regenerace protokormů, d) po převodu na médium bez fytohormonů regenerují z protokormů mladé rostliny



nový systém při zániku apikální dominance hlavního kořene. U řady rostlin a preferenčně některých jejich orgánů se však v reakci na masivní poranění či dokonce vynětí části rostliny z korelačního působení organismu (korelace aktivity orgánových základů zajišťuje, aby nepučelo najednou moc větví, nevzniklo moc hlíz) aktivuje schopnost regenerace *de novo*. Nejen různá dělivá pletiva (jako kambium), ale i pletiva trvalá, resp. zásobní (listový mezofyl, epidermis, kůra, stonková dřev apod.) mohou obnovit svoji organogenní schopnost. Jak však zahradníci či biologové dobře vědí — činí tak s příslušným omezením: druhem, stářím, orgánovým původem dotyčného řízku. A lze se tak dohadovat: jaké faktory tento sofistikovaný regenerační proces vlastně spouštějí či naopak blokují? Stačí k jeho realizaci pouze již vzpomínaný fytohormon auxin (jinak aktivní složka různých komerčních „stimulátorů“) či jsou nutné i jiné fytohormony nebo i další, nám možná dosud neznámé látky? Jak je aktuální regenerační kompetence určité rostlinné buňky vlastně podmíněna — korelačně fyziologicky, epigeneticky či přímo geneticky? Je tato schopnost dána do vínku všem rostlinným tělním buňkám, nebo jen některým?

Buněčná teorie a explantátové kultury

V polovině 19. stol. formulovali nezávisle na sobě pánové M. Schleiden a T. Schwann buněčnou teorii životní strategie mnohobuněčných organismů. Biologové studující rostliny s jistou mírou nadřazenosti rádi zdůrazňují, že první ji — snad — publikoval Schleiden s ohledem na organismus rostlinný. Schwann (možná v té době zaneprázdněný studiem nervové Schwannovy pochvy) přišel se svou troškou do mlýna poněkud později. Ať tak či tak, oba se shodli na představě, že všechny živé tělní (somatické) buňky mnohobuněčného organismu jsou *a priori* totipotentní (dělení na kmenové či nekmenové ještě zdaleka nepadlo, právě tak jako další rozeznávání buněk pluri- či omnipotentních). A tedy že jsou mj. schopné chovat se za vhodných podmínek jako oplodněná vaječná buňka — zygota. A dát vznik novému organismu, ať již cestou obdobnou embryogenezi, nebo jinak.

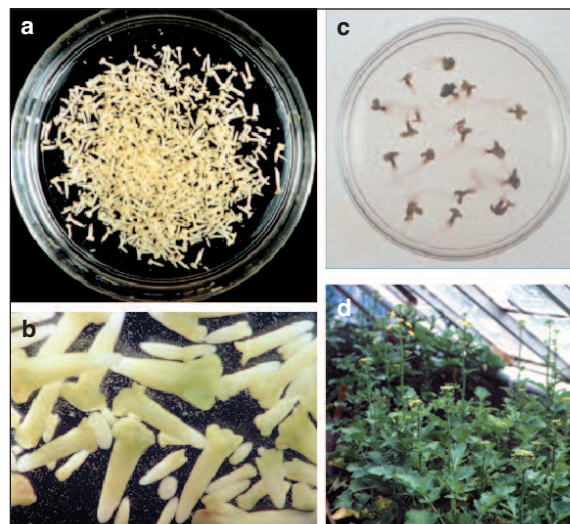
Jak tomu již bývá, je snadnější novou hypotézu formulovat, než její platnost prokázat. Než vypracovat metodologii izolace oné jedné somatické buňky či alespoň kousku pletiva či tkáně a dopěstovat je až do vzni-

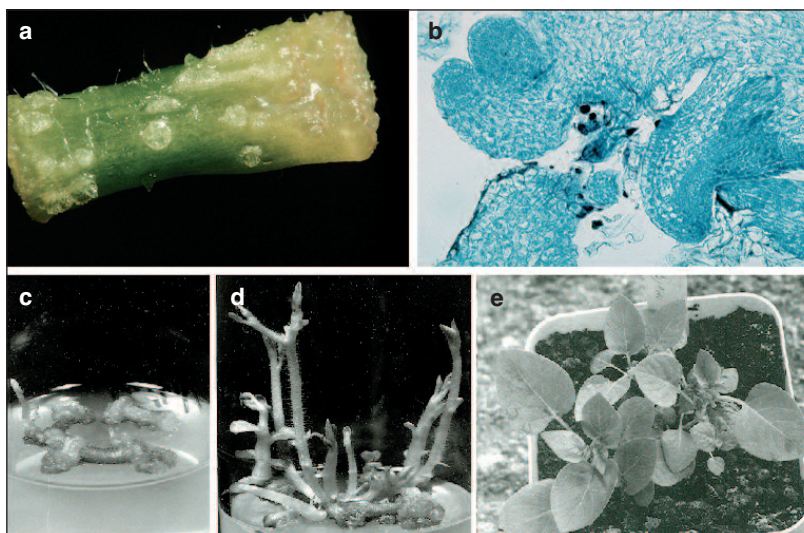
ku nového organismu. V každém případě si tak konkurenční laboratoře rostlinných a živočišných fyziologů připravili práci na dlouhá desetiletí, vlastně dodnes. A jejich úspěchy či neúspěchy byly střídavé.

V tomto místě se už zase můžeme vrátit k životu a dílu prof. Bohumila Němce. Život totiž někdy splétá zajímavé šarady. Již jednou (viz téma minulého článku o mechanismech geotropismu) zkrížil dráhu dvou ambiciózních hvězd rostlinné biologie — Gottlieba Haberlandta a Bohumila Němce. Nemohli asi o sobě nevědět ani v případě studia regeneračních procesů u rostlin. A byl to právě G. Haberlandt, jehož historiografie vědy o rostlinách považuje za otce metodologie, resp. problematiky pěstování rostlinných buněk, pletiv, orgánů, případně rostlin samých v podmínkách kultury *in vitro*. Tedy ve zkumavce, baňce, misce, fermentoru atp., za aseptických podmínek, na umělých živých půdách, tekutých či zpevněných agarem nebo substráty jemu podobnými. V půdách obsahujících nejrůznější anorganické, ale zejména organické složky včetně řady fytohormonů. Tedy látek, o nichž pojednával i minulý článek — ovšem nejen auxinů, ale také cytokininů, kyseliny abscisové ad. Látek, o nichž bohužel nejen G. Haberlandt, ale ani celá tehdejší věda neměla vůbec ponětí.

Výchozí pracovní strategie G. Haberlandta pravděpodobně z r. 1902 neměla z pohledu tehdejších znalostí biologie rostlin chybu: Rostliny jsou organismy autotrofní, ke svému životu tedy potřebují minerální látky, vodu, sluneční světlo, kyslík a oxid uhličitý. Vše ostatní si vytvoří samy. Z hlediska oné fotosyntézy coby základu všeho: nejlépe bude pěstovat ve zkumavce jako tzv. explantáty kousky pletiva listů — listového mezofylu. Samozřejmě sterilně, pro začátek je asi třeba jim přidat trochu cukru, než si jej samy vytvoří — a to by se velmi

Obr. 4 Pylová embryogeneze řepky — vývoj pylových embryí v kvetoucí dihaploidní rostlině: a) Petriho miska čtyři týdny po izolaci nezralých mikrospor — v tekutém médiu se z části z nich vytvořila opět haploidní „pylová“ embrya, jejich skutečná velikost je cca 1–3 mm, b) zvětšeno — je zřetelný kořenový pól i diferenciací děloh u většiny z embryí, c) embrya přenesená na agarovou půdu zhruba po týdnu „klíč“, rostou dělohy a kořen tvoří kořenové vlášení, d) kvetoucí regenerované rostliny ve skleníku, většinou dihaploidní (alely jsou zdvojeny). Snímky Z. Opatrného (a, b) a M. Vypadilové (c, d)





Obr. 5 Regenerace *de novo* ze stonkových explantů bramboru: a) původní stonkový řízek pěstovaný *in vitro* — tvoří se základy pupenů, b) anatomický řez novými pupeny, c) a d) *in vitro* regenerují mladé rostliny, e) regeneranti v zahradní zemi

líbilo kvasinkám, bakteriím — to už nám ukázal L. Pasteur a jiní. Soudě z dochovaných publikací i obrázků v nich, mezofylové či pokožkové buňky opravdu přežívaly a zvětšovaly se, ale nedělily se, a po několika týdnech až měsících tedy umíraly. A tak trvalo vlastně téměř 40 let, než se několika vědeckým týmům v USA a ve Francii podařilo trvale rostoucí rostlinné tkáňové kultury realizovat. Klíčem byly fytohormony.

Bez fytohormonů to prostě nejde

Základní živná média pro nejrůznější typy explantových kultur (buněk, pletiv, orgánů, embryí) obsahují vedle minerální složky i složku organickou — vitaminy, aminokyseliny, různé cukry. A hlavně různé typy, koncentrace, kombinace látek s hormonálním účinkem. Zdaleka nejen auxinu, resp. auxinů, ale také cytokininů, někdy kyseliny abscisové, občas polyaminů. Původní Haberlandtova úvaha o organické soběstačnosti autotrofních fotosyntetizujících buněk nebyla úplně zcestná. Většina somatických rostlinných buněk poslušna zásad buněčné teorie je asi opravdu totipotentní a klíčové fytohormony si sama vyrábí. Jenže v příliš malém množství na to, aby v podmínkách zkumavkové kultury, zbaveny metabolického zázemí celého organismu, byly samoživitelkami. Schopnými nejen přežít, ale také se dělit, a nadto regenerovat nový organismus. Neboť v těchto sofistikovaných procesech již nejde pouze o to, které fytohormony jsou buňce dostupné, ale také v jakém poměru, případně časovém režimu.

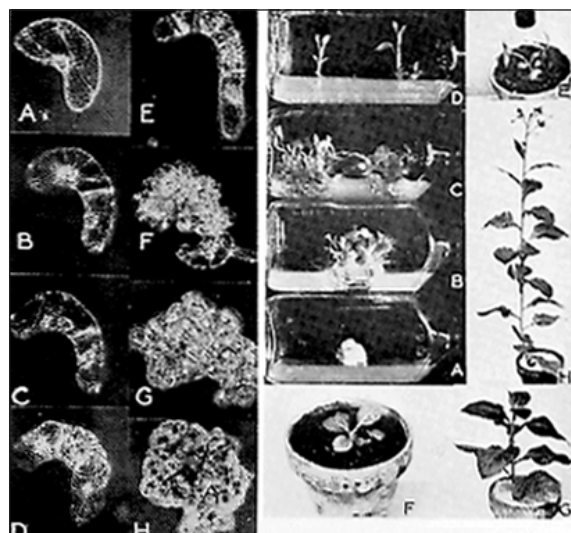
Čím dál více bylo zřejmé, že sám auxin na mnohé z těchto dějů nestačí. A jedním z klíčových kroků vývoje regeneračních kuchařek se tak stal objev cytokininů a ověření regenerační kuchařky postavené na poměru auxin:cytokinin v kultivačním médiu pro kultury stonkové dřevě tabáku Wisconsin 38 (obr. 2). Na počátku slavného modelu W38 z laboratoře prof. Folke Skooga ve Wisconsinu stál dlouhodobý závod o prvenství v identifikaci aktivního faktoru obsaženého v kokosovém mléce. Tedy v tekutém endospermu (vlastně analogii živočišných fetálních sér, klíčových v raných

fázích vývoje metodiky živočišných tkáňových kultur), jenž je potravou raného embrya. Jeho přidavek do živných půd nejen umožňoval dopěstovat ve zkumavce nezralá embrya v rostliny, ale v některých případech měl i regenerační účinky.

Historie popsaná ve vzpomínkové review (50 let od objevu) Richarda Amasina z r. 2005 se čte jako detektivka — včetně půvabné role náhody, jíž byla samovolná tvorba kinetinu (6-furfuryl aminopurinu) v nechtěně stárnoucích vzorcích DNA z mlčí sledě. Na úspěšném konci tohoto závodu bylo zjištění, že právě a jedině vhodný poměr auxinu (IAA, 2 mg/l) a kinetinu (aplikován do média v rozpětí 0–10 mg/l) může u banálních buněk tabákové dřevě vyvolat buď tvorbu nádorového/kalusového pletiva (IAA 2, kinetin 0,2) nebo pupenů (IAA 2, kinetin 0,5–1). Pokud byl přidavek kinetinu jen stopový (IAA 2, kinetin 0,02), z explantů regenerovaly pouze kořeny.

Padesátá a šedesátá léta vůbec přinesla řadu nových metodických úspěchů. Metodologie W38 byla úspěšně aplikována na široké spektrum rostlinných druhů. Díky raným pracím J. Balla (1946) a zejména P. Morela (1950, 1963) byly postupy meristemového klonování kulturních rostlin rozpracovány až do aplikační podoby. Právě s pomocí cytokininů a některých nových syntetických auxinů (zejména 2,4-D) tak byly prakticky využity výše zmíněné regenerační mechanismy jak restituce (klonové množení orchidejí — obr. 3), tak reprodukce (klonové množení mnohých okrasných i ovocných rostlin, plodin — obr. 5).

A díky této kuchařce se tak konečně v r. 1965 objevila v tisku první práce potvrzující platnost buněčné teorie Schleiden a Schwanna: V. Vasilová a P. Hildebrandt izolovali jednotlivé tělní buňky z buněčné neorganizované rostoucí kultury tabáku, odvodili z nich buněčné kolonie a v takto získané kalusové kultuře vyvolali tvorbu pupenů a stonků, regeneranty zakořenili a převedli do zahradní země (obr. 6). Nedlouho po nich dokumentoval F. Lutz (1962) realizaci takového tabákového „single cell clone“ (tedy klonu odvozeného z jediné, dobře identifikované a průběžně sledované somatické buňky) pěstovaného dál až po kvetení. A 10 let nato již vědci dokázali dokonce regenerovat nové rostliny z buněk dočasně odbláňených — „nahatých“ (zbavených celulózní buněčné stěny). A díky nim i tvořit křížence do té doby nevídané — např. mezi bramborem a rajčetem.



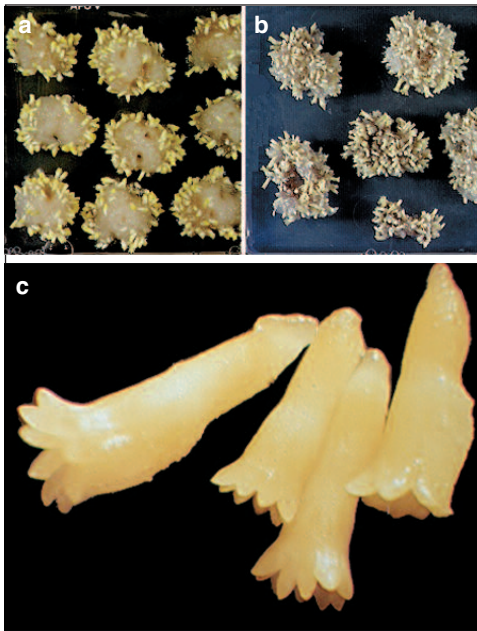
Obr. 6 Experimentální průkaz platnosti buněčné teorie u rostlin. Z jediné somatické kalusové buňky tabáku postupně regeneruje celá kvetoucí rostlina. Vlevo: dělení buňky izolované z rané suspenzní kultury (A) vzniká nejprve buněčná kolonie až mikrobrudka kalusu (H). Vpravo: kalusové pletivo (A) na agarové půdě s obsahem auxinu a cytokininu postupně regeneruje pupen/prýty (B–C), prýty zakořeňují na půdě s pouhým auxinem (D), poté jsou vyjmuty z lahvi a vsazeny do zahradní země — další růst a vývoj (E–G) končí kvetoucí rostlinou. V. Vasilová a P. Hildebrandt (1965)

Nejen nové orgány — ale také embrya

Výzkum přirozených fytohormonů i jejich syntetických analogů vedl i ke vzniku dalších kuchařek a objevu zcela nových regeneračních cest. Ukázalo se, že mnohé rostliny dávají ve zkumavce přednost nikoli organogenezi, ale embryogenezi — buď tzv. somatické (z buněk tělních), nebo pylové (z nezralých mikrospor). U některých fungují také nejrůznější alternativy vzniku embryí z neoploďných vajíček, dalších buněk zárodečné dráhy atd. — to koneckonců známe z přírody. Na počátku těchto snah byla tvorba somatických embryí v tkáňových kulturách mrkve, na mědiích s kokosovým mlékem. Později se ukázalo, že obdobný fenomén lze vyvolat pomocí syntetického auxinu 2,4-D, s případnou kombinací s cytokininu. Postup je vícefázový — nejprve se tímto auxinem navodí masivní buněčné dělení, po přenosu kultury do média bez 2,4-D se tvoří embrya. Pro jejich další vývin, růst, zrání a klíčení je pak nutno „kouzlit“ i s jinými faktory, včetně dalšího fytohormonu — kyseliny abscisové (obr. 7).

V úspěšnosti pokusů hraje klíčovou roli genotyp (proč až dosud nikdo nedokázal vyvolat tvorbu somatických embryí u tabáku či bramboru, proč naopak neumíme vyvolat organogenezi u většiny jehličnanů?), individuální stáří, typ výchozího explantátu (somaticko-embryogenní linie jehličnanů lze odvodit vlastně jen ze zygotických embryí). Máme tedy opravdu tu představu obecné regenerační totipotence u rostlin brát vážně?

A embryogeneze pylová? Jistě, i v přírodě si rostliny vytvořily a používají celou řadu náhradních cest vzniku semen jinak, než přímo ze zygoty (apomixy, různé typy adventivní embryogeneze). Častá je samičí partenogeneze či partenokarpie, tedy vznik



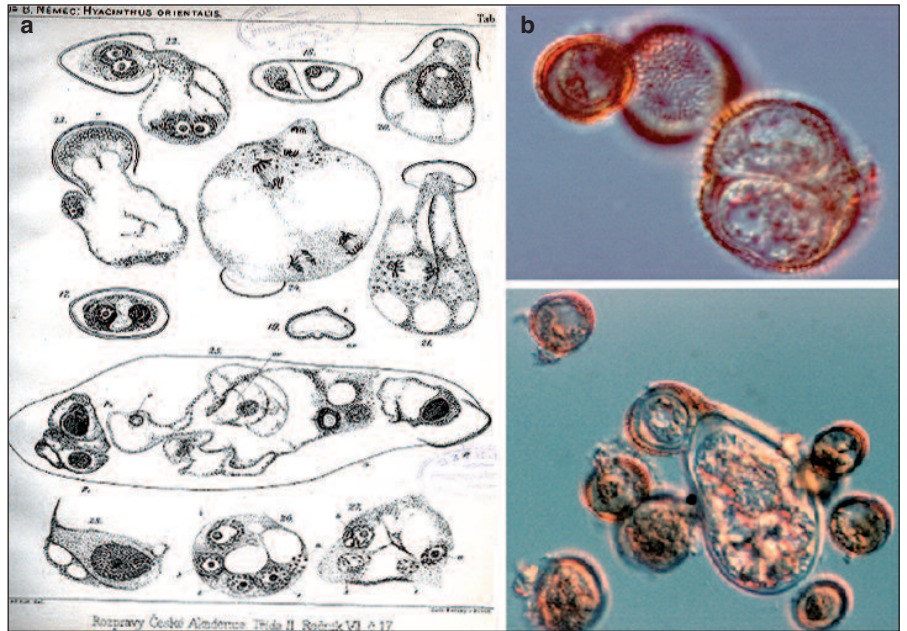
Obr. 7 Somatická embryogeneze v různých embryogenních liniích smrku: a) linie AFO (pracovní označení linie získané z Francie), b) linie C111 (vlastní linie, odvozená ze zygotických embryí v Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.), c) somatická embrya s již diferencovanými dělohami. Snímky J. Opatrné

plodů, semen či nového jedince z neopyleného vajíčka, z „panny“. Neznáme však případy vzniku nových rostlin z přímo z „pannic“ — tedy z pylu (ale vlastně ani ze spermií u živočichů). Jeden tomu blízký je sice dokumentován na obrázku B. Němce ze studia květní biologie hyacintu — ve výstelkovém pletivu prašníku se vytváří cosi jako zárodečné vaky, ale nevznikají rostliny (obr. 8).

Ve zkumavce však již od pokusů J. Guhy a T. Maheswariho z r. 1962 umíme kouzlit lépe — nezralá pylová zrna/mikrospory mnoha druhů jsou schopny překlápnout svůj vývojový program z cesty „zrají v pylové zrno“ na cestu „rozdělím se opakovaně a vytvořím embryo“. A opět — u některých druhů to již od té doby vědci realizovali a získávají tak mj. šlechtitelsky cenné haploidní či dihaploidní rostliny (obr. 4), u jiných ale ne. A opět se studují účinné faktory — stáří rostliny, mikrospory, složení média (kupodivu často bez nutnosti přidat fytohormony) a různé typy stresových působení coby induktorů onoho vývojového překlápnutí.

Od nádorů ke geneticky modifikovaným organismům

Vraťme se však k Bohumilu Němcovi, který velmi pečlivě sledoval rozvoj poznatků o růstových látkách, ba i předválečnou literaturu o tkáňových kulturách. Pokusům s nimi se však vyhnul. Byla příčinou jejich finanční náročnost? Měl nedůvěru či malou sympatii k pokusům s takovými rostlinnými artefakty? Koneckonců, ještě mnohem později, v 60. letech 20. stol., většina seriózních badatelů či šlechtitelů pohlížela na pokusy s rostlinnými explantátovými kulturami se značným despektem. Ale život přináší různé paradoxy, a tak lze říci, že B. Němec vstoupil vlastně mimoděk ještě do jedné z klíčových oblastí moderních biotechnologií. Důvodem byl jeho dlouhodobý zájem



Obr. 8 Alternativní ontogeneze v samčích zárodečné dráze: a) in vivo — útvary připomínající zárodečný vak v abnormálních prašnicích hyacintu *Hyacinthus orientalis* — B. Němec, *Rozpravy České Akademie* 1905; b) in vitro — mikrosporová kultura řepky, vznik pylových embryí. Snímky Z. Opatrného, není-li uvedeno jinak

o rostlinné nádory a současně úlohu různých patogenů při jejich vzniku.

V pokusech, z nichž později vzešla brněnská škola experimentální morfologie, založená jeho žákem, prof. Rudolfem Dostálem, sledoval organogenezi *de novo* ve vodních či pískových kulturách různých stonkových nebo kořenových řízků (dřevin, čekanky, smetánky aj.). Jejich řezné plochy mj. natíral směsmi buď živých nebo předem usmrcených bakteriálních kultur a sledoval ovlivnění regeneračního procesu. Současného biologa nepřekvapí, že (alespoň soudě podle publikací) byly jeho favority bakterie *Bacillus tumefaciens* a *Bacterium rhizogenes*, podle současné taxonomie *Agrobacterium tumefaciens* a *A. rhizogenes*, což jsou v dnešní době nejčastěji používané „živé injekční stříkačky“ — vektory pro vnášení cizorodých genů do dvouděložných rostlin a přípravu geneticky modifikovaných organismů (GMO). Ale to už je další kapitola, možná jedna z budoucích tohoto seriálu.

Bohumil Němec — bezmála 20 let před prvními zevrubnými studiemi A. C. Browna a půlstoletí před vysvětlením molekulárního mechanismu, jímž *Agrobacterium* vnáší do rostliny svoje onkogeny — samozřejmě nevěděl, jaké je hormonální pozadí zjištěných změn v přirozené regenerační schopnosti těchto řízků.

Dnes už víme, že si tyto bakterie samy vyrábějí jak auxiny, tak cytokininy. Vytvořily si tuto schopnost samy? Zcizily příslušné geny rostlinám? Ci byla a je tato výměna oboustranná? Usmrcené kultury používané B. Němcem zřejmě obsahovaly jen zbytkové hladiny těchto látek. Plně funkční živé *Agrobacterium tumefaciens* či *A. rhizogenes* napadá hostitelskou rostlinu (třeba vinnou révu) a vpravuje do jejích buněk svoji plazmidovou T-DNA nesoucí mj. geny pro účinnou syntézu auxinu a cytokininu. Ta se přímo zabudovává do rostlinné jaderné DNA. Infikované a takto transformované buňky začínají nadprodukovat jak auxin, tak cytokinin, bouřlivě se dělí (vzniká nádorové pletivo) a pak i regenerují malformované listy a pupeny (vzniká tzv. teratoma — směska orgánových základů a kalusu). Mutace v příslušných genech značených 1,2 (auxin) a 4 (cytokinin) mění vzhled nádorů, případně zcela brání jejich vzniku — plazmid tak byl odzbrojen a je použitelný jen

jako univerzální dopravní prostředek pro nejrůznější jiné geny. A celý systém krásně simuluje účinnost Skoog-Millerova modelu.

Víme tedy, že to funguje, případně trochu jak. Ale přesně — kdo ví. Jak již bylo řečeno, nevíme ani, proč u řady materiálů různého druhu, stáří, orgánového původu apod. dokážeme výše zmíněné regenerační procesy ve zkumavce realizovat, zatímco mnohé jiné se realizaci buněčné regenerační teorie jen trvale posmívají. Nikdo zatím úspěšně nevyvolal tvorbu pupenů z kousku dospělého listu pšenice či kukuřice, hrachu, dubu, smrkové jehlice. Není to zřetelně jen stářím, ale i mechanismy, jež ho provázejí, podmiňují a vyvolávají spíše programovanou smrt buněk tam, kde bychom rádi stimulovali buněčné dělení. Možná proto, že jim náš zásah — již samo ukojení kousku listu, natož pak jeho (být šetrné) rozmělnění na jednotlivé protoplasty připomíná útok patogena. A vede tak k dobrovolné sebevraždě dílčích buněk s cílem ochránit proti „nákaze“ zbylou rostlinu.

Jakže to bylo s buchlovskou lípkou?

Profesor Němec asi u tohoto případu nebyl a pokud víme, ani ho pokusně neověřoval. Schopnost stonkových řízků mnoha dřevin zakořenit není nijak překvapivá. Mohla však lípka, jen tak *in vivo*, bez aplikace fytohormonů vyhnat nové pupeny z původních kořenů? Spíše ne, i když mnozí čtenáři vědí, jak často mohou znovu obrůst (vyhánět vlky) kořeny pařezů ponechané v zemi. S regenerací *de novo* tedy pravděpodobně nepočítejme, leda v části kmínku blízko povrchu. Ale hypotéza spuštění reprodukčního mechanismu u některých původně spících pupenů na větvičkách zahrnutých zemí a poté prorůstajících na svět by se nejspíš uhlájit dala. A tak milí čtenáři, bude-li nezbytné, zkoušejte dál prokázat své nevíny vhodným biotestem. Ale raději začněte třeba s vrbou.