

Oploďnenie rastlín v prácach Bohumila Němca

Němcov fenomén

„Fyziológia oploďnenia musí byť tým istým spôsobom spracovaná ako fyziológia rastu, dýchania, pohybu plazmy atď. Potrebne je pritom zistiť vonkajšie a vnútorné podmienky určujúce tento proces a hľadať kľúčové momenty pre zapojenie fyzikálnych a chemických faktorov účinných pri oploďnení.“
(Problém oploďnenia a iné cytologické otázky 1910)

Oľga Erdelská

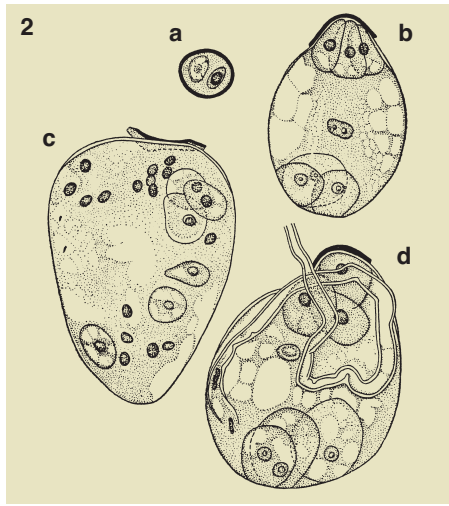


Pri spätnom pohľade na fyziológiu rastlín prvej polovice 20. storočia dodnes často dominujú objavy, práce a myšlienky Bohumila Němca, nestora českej a slovenskej rastlinnej fyziológie, mysliteľa a vedca svetového formátu. Hoci fyziológia oploďnenia, spolu s vývinom generatívnych orgánov a plodu nebola ústrednou témou jeho celoživotného vedecko-pedagogického pôsobenia, v sérii spomienok a reakcií na jeho originálne idey má svoje nezastupiteľné miesto.



V r. 1898, kedy S. Navašin a L. Guignard objavili dvojité oploďnenie krytosemenných rastlín, napísal B. Němec v Rozpravách České akademie pro vědy, slovesnost a umění (Třída II, roč. VII, č. 17, 1-18) článok o peľe v petaloidných tyčinkách hyacintu *Hyacinthus orientalis*. Petaloidia je premena samčích kvetných orgánov — tyčienok na korunné lupienky (korunné lístky). Vyskytuje sa zväčša v plnokvetých mutantoch s poruchou funkcie génov určujúcich vývin a usporiadanie kvetných členov v jednotlivých kruhoch kvetu. Petaloidné tyčinky sú útvary plošne rozšírené, zafarbené ako korunné lupienky, ktoré majú na niektorých miestach vrecúskovitú (vakovitú) rozšíreninu. V nich sa vyvíjajú peľové zrná. Bohumil Němec cytologickou analýzou zistil, že v niektorých petaloidných tyčinkách sa popri malých peľových zrnách obsahujúcich jednu vegetatívnu a jednu generatívnu bunku vyskytujú aj veľké peľové zrná s viacerými jadrami alebo bunkami. Tieto peľové zrná svojou polaritou a celkovou stavbou pripomínajú zárodočné miešky (zárodočné vaky, obr. 1). Vznikajú tak, že veľké peľové zrná, ktoré obsahujú aj zásoby škrobu, abnormálnym spôsobom vyklíčia už v petaloidnej peľnici (prašníku). Nevyklíčia však v tenké peľové vrecúško, ale vo vakovite rozšírený útvar, v ktorom sa jedno z pôvodných peľových jadier postupne tri razy rozdelí na osem jadier. Dcérske jadrá zaujmú svoje miesto na pólach vakovitého útvaru, podobne ako sa to deje aj pri vývine samičieho zárodočného mieška, teda pri vzniku vajcovkej bunky, synergíd, antipód a centrálnej bunky s polárnymi jadrami. Synergidy sú bunky pomocné, umiestnené spolu s vajcovou bunkou (vajecnou bunkou) na jednom póle zárodočného mieška. Na opačnom póle sú antipódy (bunky protistojné). V strede zárodočného mieška je centrálna bunka s dvomi polárnymi jadrami, ktoré neskôr splyvajú v jedno centrálné jadro (viz tiež Základní slovník rostlinné anatomie, Živa 2001, 1-6). Keďže peľové zrná a po ich vyklíčení peľové vrecúška krytosemenných rastlín predstavujú samčiu pohlavnú generáciu (samčí gametofyt) a zárodočné miešky samičiu pohlavnú generáciu (samičí gametofyt) v životnom cykle rastliny, vyslovil Bohumil Němec domnienku, že ide o feminizáciu samčieho gametofytu. Toto jeho pozorovanie novej zmeny samčieho na samičí gametofyt vzbudilo veľký záujem a zapísalo sa do dejín biológie ako Němcov fenomén. Neskôr podobné peľové zrná popisali aj J. Stow (1930) a S. F. Naithani (1937) u hyacintu a L. Geitler (1941) pri bledavke ovisnutej (snědek nič — *Ornithogalum nutans*). Stow ich získal aj experimentálne, vplyvom vysokej teploty na

Obr. 1 Rôzne vývinové fázy feminizovaných peľových vrecúšok, vznikajúce v petaloidných tyčinkách hyacintu *Hyacinthus orientalis* (B. Němec, Rozpravy České akademie pro vědy, slovesnost a umění 1898): 1. Priečný prierez malým peľovým zrnom hyacintu; 2. Veľké peľové zrnó hyacintu; 3. a 4. Malé peľové zrná kľúčiacie vo vakovité útvary; 5. Veľké peľové zrnó, z ktorého kľúči vak; 6 – 14. Samičie vaky, ktoré vyklíčili z peľových zrn namiesto peľových vrecúšok (peľových láčiek) a majú rôzny počet jadier, umiestnených na pólach vakov č. 6, 7, 8, 10, 13 a 16. Niektoré vaky sú spojené aj s ďalšími peľovými zrnami (p). Obr. z Archivu Akademie věd ČR



Obr. 2 a) Normálne pelové zrno hyacintu, b) a c) útvary vznikajúce po vyklíčení veľkých pelových zrn v petaloidných tyčinkách, pripomínajúce svojou stavbou zárodočné miešky (zárodočné vaky) čiže samičí gametofyt hyacintu, d) feminizované pelové vrecúško (pylový vak) hyacintu, do ktorého vniklo normálne pelové vrecúško (pylová láčka) a uvoľnilo doňho spermatické bunky. Podľa J. Stowa (1930), upraveno

kvety počas vývinu peľu. Predpokladal, že bude možné takéto feminizované pelové zrná oplodniť spermatickými bunkami normálnych pelových zrn (obr. 2) a dosiahnuť aj vývin embrya a endospermu. Ani profesorovi Němcovi, ani iným sa však nepodarilo oplodniť takéto feminizované pelové zrná, či pelové vrecúška. Možno aj preto, že v tom čase neboli na dostatočnej úrovni rozpracované metódy pestovania buniek *in vitro*.

Po viac ako polstoročnom odstupe sa však Němcov fenomén predsa dostal do predia záujmu rastlinnej embryológie, genetiky a šľachtenia v súvislosti so skúmaním pôvodu androgenetických embryí, čiže embryí vznikajúcich z pelových zrn *in vitro* a nie z oplodnenej vajej bunky. Zistilo sa totiž (J. Guha a T. Maheshwari 1962 a po nich aj ďalší), že v pokusoch *in vitro* na umelej živnej pôde je možné stimulovať za určitých podmienok tvorbu embryí z pelových zrn a tak zmeniť gametofytický program vývinu mikrospór (čiže pelových zrn) na sporofytický (pozri článok Z. Opatrného v Žive 2007, 2: 53–56). Tieto práce boli úspešne pri niektorých voľne rastúcich aj kultúrnych rastlinách (viaceré obilniny, tabak a iné) a využili sa v šľachtení. Dodnes sa však metodika pokusov zdokonaľuje v snahe získať u ďalších pestovaných rastlín haploidné rastliny a z nich dihaploidy čiže homozygótne diploidy, ktoré majú obidve alely každého z génov rovnaké. Homozygótne (Čisté) línie potrebné pre ďalšie kríženie možno získať aj viacnásobným spätným krížením (opakovaným samoopelením rastlín), ktoré trvá zvyčajne niekoľko rokov, zatiaľčo indukcia vzniku haploidov z peľu *in vitro* prebehne za jeden rok, čím sa šľachtiteľský proces podstatne skracuje. Treba však poznamenať, že indukcia tvorby embryí z peľu je úspešná iba z niektorých raných vývinových štádií peľu a nie z peľu zrelého alebo vyklíčeného, ako to bolo v prípade feminizovaných pelových zrn v pozorovaniach prof. Němca. Vznik pelového embrya môže prebiehať *in vitro* viacerými spôsobmi, podľa toho, či iniciálnym je jadro

jednojadrovej mikrospóry, generatívnej či vegetatívnej bunky alebo dokonca produkt fúzie jadier obidvoch buniek budúceho pelového zrna. Výsledkom vývinu je androgenetické, alebo pelové embryo.

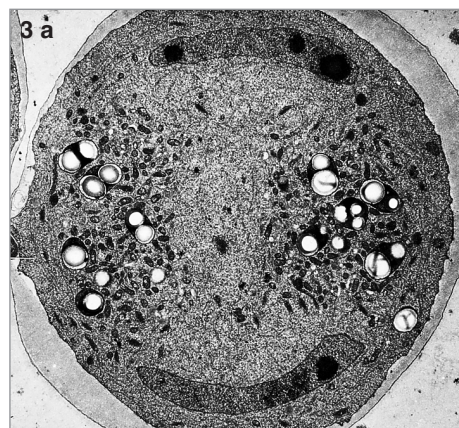
Na záver tejto kapitoly treba pripomenúť, že B. Němec robil pokusy aj s peľom smrekovca opadavého (modrín opadavý — *Larix decidua*) a ich výsledky publikoval v Žive (1910, 4: 105). Pod vplyvom pár chloroformu, ktorým vystavoval po istú dobu nezrelé samčie kvety na konárkoch (včivkách) smrekovca ponorených vo vode, pozoroval abnormálnu vývinovú cestu pelových zrn. Pelové zrná sa rozdelili na mnohobunkové pletivo s množstvom malých parenchymatických buniek. Autor vyslovuje názor, že by mohlo ísť o samčiu partenogézu, teda, podľa súčasnej terminológie pelovú embryogézu. V literatúre som nenašla zmienku o tom, že by sa niekto pokúsil pestovať takéto pelové zrná *in vitro*.

Pôvod plastidov v zygote

V čase, keď sa potvrdzovali a prehľbovali základné údaje o dvojitom oplodnení a embryogéze v pohlavnom procese krytosemenných rastlín, publikoval prof. Němec rozsiahlu knihu *Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen* — v preklade *Problém oplodnenia a iné cytologické otázky* (Borntraeger, Berlín 1910). V tejto knihe zhrnul pomerne veľké množstvo svojich dovtedajších pozorovaní a experimentov o vlastnostiach, perzistencii a individualite chromozómov, o delení buniek a jadier, o spĺvaní jadier a buniek, ale aj o mitóze a redukčnom delení (neskôr nazvanom termínom meióza).

V tomto diele si vytyčil úlohu porovnať najmä procesy spĺvania vegetatívnych a generatívnych buniek a ich jadier. Zaujal však aj postoj k mnohým ďalším otázkam súvisiacim s oplodnením. Stotožňuje sa napr. s vtedy originálnymi názormi E. Strassburgera o tom, že redukcia chromozómov pri sporogéze a vzniku pohlavných buniek v konečnom dôsledku súvisí s oplodnením.

Obr. 3 Materská bunka mikrospór netýkavky balzamínovej (*Impatiens balsamina*) počas tetradogézy: a) Rozdeľovanie sa plastidov a mitochondrií do buniek budúcich mikrospór ešte pred vznikom bunkových priebradiék; b) Plastidy a iné bunkové organely sú rozdelené v bunkách štyroch vznikajúcich mikrospór. Neskôr sa podobným spôsobom dostanú aj do generatívnej bunky a z nej do spermatických buniek u tých druhov, kde predčasne nedegenerujú a pri oplodnení vniknú do buniek zárodočného mieška. Orig. F. Dupuis (1981)



Jej fažisko a význam totiž spočíva v znovuzískaní pôvodného počtu chromozómov.

V jednej z posledných kapitol vychádzajúc z pokusov s krížencami rastlín so špecificky odlišnými plastidmi predpokladá aj možnosť prenosu plastidov zo samčej generatívnej bunky do zygoty pri oplodnení. V súhlase s C. E. Corrensom konštatuje, že nielen jadro, ale aj plazma (cytoplazma a jej organely) môže prenášať či podmieňovať niektoré dedičné vlastnosti. Keďže chloroplasty nemôžu vznikáť v bunke *de novo*, ale prenášajú sa z bunky do bunky iba delením (obr. 3a, 3b), treba predpokladať, že v rastline ďalšej generácie pochádzajú alebo len od matky, alebo aj od matky aj od otca. Dotýka sa tak otázka, ktorá sa stala aktuálnou až v ultraštruktúrnych prácach poslednej štvrtiny minulého storočia. Tie podrobne charakterizovali mimojadrový obsah spermatickej bunky krytosemenných rastlín. Môžu sa v ňom nachádzať mitochondrie aj plastidy, o ktorých dnes vieme, že sú nositeľmi mitochondriálnej a plastidovej DNA. Zistilo sa, že plastidy asi u 70 % krytosemenných rastlín pochádzajú iba od matky, zatiaľčo asi u 30 % od obidvoch rodičov. U niektorých druhov totiž samčie plastidy v tenkej vrstve cytoplazmy generatívnej bunky, alebo po jej rozdelení v plazme spermatickej bunky zanikajú ešte pred spĺvaním pohlavných buniek (napr. pri rode ľulok (lilek) — *Solanum*). Pri druhoch iných rodov, napr. pelargónie a lanu (lnu), sa pri dvojitom oplodnení prenášajú do vajej bunky a centrálnej bunky zárodočného mieška. Prítomnosť samčích plastidov potvrdili aj analýzy fragmentov chloroplastovej DNA v cytoplazme vajej bunky a centrálnej bunky niektorých druhov po oplodnení.

Jedno z podstatných a súhrnných konštatovaní knihy prof. Němca o oplodnení, ktorým dáva odpoveď na otázku položenú v úvode, možno v preklade uviesť takto: „Všetky moje závery o podstate procesov oplodnenia sa vzťahujú na moment, kedy dve pohlavné bunky spĺvajú. Ich jadrá sa správajú za určitých fyziologických podmienok ako jadrá dvojjadrových buniek bez ohľadu na to, či ide o vegetatívne alebo generatívne bunky. Pre oplodnenie je však špecifické harmonické spolupôsobenie všetkých podmienok, za ktorých môžu pohlavné bunky splynúť. Všetky anatomické a morfológické štruktúry a fyziologické reakcie, ktoré splynutie pohlavných buniek umožňujú, sú špecifické prispôbenia zabezpečujúci pohlavný akt. Väčšina sexuálnych buniek, a to môžeme tiež považovať za špecifické, je bez splynutia neschopná ďalšieho vývinu. Z tohto pravidla sú však aj výnimky, napr. partenogéza.“



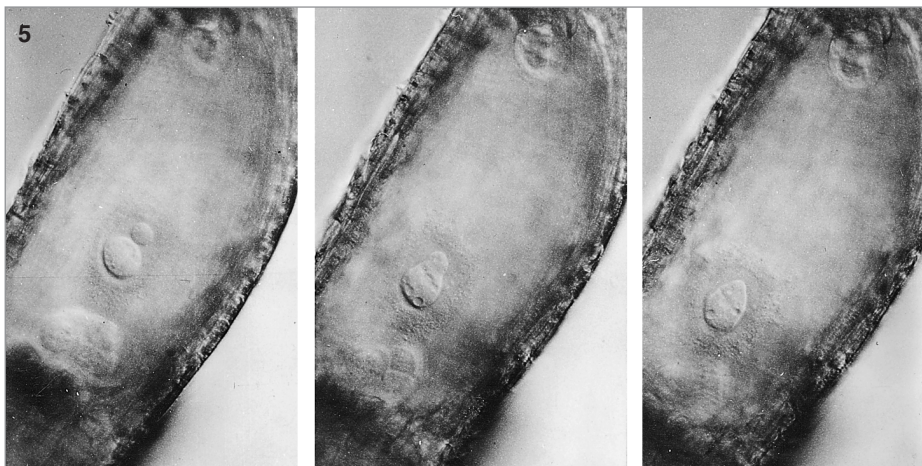
V strede záujmu partenogéza

Partenogéze (teda vzniku embrya z neoplozenej vajevej bunky či samičej gamety) a iným typom nepohlavného rozmnožovania rastlín semenami (apomixii) sa profesor B. Němec venoval viackrát. Jeho pozornosť upútala napr. apomixia púpavy (pampelišky) *Taraxacum officinale* (dnes komplex druhů řazených k *T. sect. Ruderalia*) a partenogéza posedu dvojdomého (*Bryonia dioica*), který má na samičích jedincoch iba samičie a na samčích iba samčie kvety. Ak pestoval rastliny so samičími kvetmi izolovane, bez možnosti ich oplodnenia pelovými zrnami zo samčích jedincov, neoplozene kvety po čase odumierali. Avšak z kvetov vzniknutých koncom vegetačného obdobia predsa získal niekoľko semien. Označil to za fakultatívnu partenogézu ako reakciu na nedostatok opelenia pri tendencii všetkých semenných rastlín tvoriť semená. Podotýkam, že aj podľa niektorých súčasných teórií vzniku apomixie môže nedostatok opelovačov na stanovišti rastlinnej populácie po dlhom čase indukovať vývin niektorého z typov nepohlavného rozmnožovania prostredníctvom semien, čiže nasmerovať prírodný výber vo smere uplatnenia sa mutácií apomiktického vývinu. Nemožno však vylúčiť ani fakt, že za nezvyčajných podmienok (teplo, dĺžka dňa, kvalita svetla), aké boli v pokusoch B. Němca koncom vegetačného obdobia, došlo k abnormálnemu vývinu istého množstva samčích generatívnych orgánov (tyčínok) v samičích kvetoch posedu. Vývin jedнопohlavných kvetov prebieha totiž v púčikoch (pupenech) najprv tak, že sa vyvinú primordiá samčích aj samičích orgánov. Až neskôr potom orgány niektorého z pohlaví nepokračujú vo vývine a degenerujú.

Štruktúrne bariéry polyspermie

Štúdium procesu oplodnenia sprevádzalo B. Němca po celý život. V r. 1912 a 1923 sa zaoberal špeciálne oplodnením u druhov rodu kriviec (krivátec — *Gagea*). Vracia sa k tejto téme v r. 1931. Vtedy sa zamerával aj na proces polyspermie, pri ktorom vnikajú výnimočne do zárodočného mieška dve alebo viaceré pelové vrecúška a tým aj viaceré spermatické bunky. Popisuje vznik anatomických (štruktúrnych) zábran tohto procesu po vniknutí prvého pelového vrecúška a jeho spermatických buniek. Patrí k nim predĺženie pútka oplodnených vajčiek, čím sa ich mikropylárny otvor vzdaluje od placenty a sťažuje či celkom bráni preniku ďalších pelových vrecúšok do vajčeka.

Tieto a iné štruktúrne zábrany veľmi často a pri mnohých druhoch podporujú genetické bariéry, ktoré sa manifestujú fyziologicky, už na molekulovej úrovni. Myslím tým medzibunkové signalizačné procesy sprevádzajúce oplodnenie od momentu styku pelového zrna s bliznou, reakcie znášanlivosti (kompatibility či inkompatibility) gamet, zmena funkcie alebo zánik molekulárnych receptorov na povrchu buniek po vniku spermatickej bunky do vajevej alebo centrálnej bunky zárodočného mieška atď. Súčasne s odzníevaním týchto procesov nastupujú štruktúrne zmeny, medzi ktoré možno rátať tvorbu súvislej bunkovej steny na povrchu zygoty, zmeny pletiva, cez ktoré prerastajú pelové vrecúška v čnelke, predĺžovanie pútka a ďalšie.



Obr. 4 Kriviec žltý (krivátec žltý — *Gagea lutea*) z čeľade ľaliovitých (Liliaceae), jedna z obľúbených pokusných rastlín B. Němca. Foto O. Erdelská ♦ Obr. 5 Živý zárodočný miešok snežienky jarnej (*Galanthus nivalis*). Na sekvencii snímok je zachytené splyvanie jadriok spermatickej bunky a centrálneho jadra pri dvojitom oplodnení. Foto O. Erdelská a IWF — Institut für den wissenschaftlichen Film Göttingen, 1980

Vo svojej poslednej práci tohto druhu v r. 1965 doplňuje prof. Němec pozorovanie štruktúrnych zábran vniku ďalších spermatických buniek do zárodočných mieškov krivca žltého (krivátec žltý — *Gagea lutea*, obr. 4) z čeľade ľaliovitých (Liliaceae). Dokumentuje upchatie (ucpání) mikropylárneho otvoru vajčeka zvyškami pelového vrecúška, ktoré vniklo ako prvé do mikropylárneho otvoru, čím sa pôsobenie synergid v atrakcii pelových vrecúšok k zárodočnému miešku oslabuje alebo prerušuje.

A ešte oplodnenie z rôznych zorných uhlov...

S procesom oplodnenia súvisia aj originálne práce B. Němca venované rôznym aspektom biológie oplodnenia a tvorby semien a plodov. V r. 1912 robil pokusy s jagavkou ľaliovitou (bélózarka ľaliovitá — *Anthericum liliago*) a zistil, že sa oplodňuje aj autogamicky (opelenie blizny vlastným pelom kvetu), ale oveľa väčšiu násadu semien možno získať pri cudzoopelení. V rokoch 1935–37 ho zaujala tvorba plodu a semien ľalie belostnej (ľilie belostná — *Li-*

lium candidum). V r. 1939 sa venoval morfológickým, cytologickým a fyziologickým príčinám sterility u rastlín. Hlavnú pozornosť obrátil na ovocné druhy, najmä višne, slivy a marhule, ktorých niektoré odrody sú samoopelivé a iné cudzoopelivé, zatiaľ čo čerešne sú všetky cudzoopelivé a broskyne väčšinou samoopelivé. Treba poznamenať, že fyziológia ovocných stromov bola jeho obľúbenou výskumnou doménou.

V r. 1941 opísal a časovo vymedzil zakladanie generatívnych orgánov (primordií kvetov) v cibulkách snežienky jarnej (*Galanthus nivalis*) a bledule jarnej (*Leucojum vernum*), oplodnenie hmyzom a nyktinastické pohyby okvetných lístkov, v dôsledku ktorých sa kvety na noc zatvárajú a cez deň otvárajú, čo chráni generatívne orgány pred nočným mrazom. Jeho práca bola jednou z východísk pre neskoršie podrobné štúdie týchto druhov, najmä keď sa ukázalo, že snežienka je výborným modelovým objektom pre výskum oplodnenia a prvých postfertilizačných procesov v živých zárodočných mieškoch (obr. 5).

Široký záber prác a ideí prof. B. Němca v oblasti štúdia rozmnožovania rastlín, podmienený hlbokou znalosťou procesu rozmnožovania nielen u vyšších rastlín, ale aj u nižších organizmov (baktérií, húb a bezcievných rastlín), ako aj originálne spájanie štruktúry s funkciou na všetkých úrovniach organizmov (bunka, pletivo, orgán, organizmus) sa stali nevysychajúcim zdrojom vedeckej inšpirácie cytológov, fyziológov a iných výskumníkov nielen v minulosti, ale až dodnes.