

myši s genem pro GFP a myši s normálním genotypem (obr. 5). Po několikaměsíčním spojení a spolehlivém ustavení společného krevního oběhu mezi oběma samicemi nacházeli po stimulované ovulaci a výplachu vejcovodů pouze oocyty odpovídající genotypu dané samice. To znamená, že populace od dárců s genem pro GFP obsahovala pouze zeleně fluoreskující oocyty a naopak, z vejcovodů normálních jedinců nebyly získány oocyty se známkami fluorescence.

Ani další experimenty, ve kterých autoři podávali chemicky sterilizovaným příjemcům izolované buňky kostní dřene od dárců s genem pro GFP, nepotvrdily jejich kolonizaci a transformaci na oocyty. Ale ani tak jednoznačné výsledky se nevyhly kritickým připomínkám. Kritici postrádají důkladné vyhodnocení vaječníků a vylou-

čení, zda se v nich přece jen nenacházejí buňky připomínající buňky kmenové. Podle nich by jejich osud nemusel končit ovulací, ale mohly by poskytovat případnou, dosud blíže neurčenou podporu rostoucím a posléze ovulujícím oocytům. S přihlédnutím k současné úrovni poznání lze považovat také úvahy spíše za spekulace postrádající reálný základ.

I když jako model pro vyslovení základní představy o vzniku oocyty sloužila myš, mnoho argumentů dokazuje její platnost i pro převážnou většinu ostatních savců včetně člověka. Potvrdil to ve své monografii An Atlas of Human Prenatal Developmental Mechanics (Atlas prenatálního vývoje člověka) z r. 2004 i J. E. Jirásek z Ústavu péče o matku a dítě v Podolí v Praze. Také drtivá část komentářů z pera předních od-

borníků, které byly v návaznosti na téma oogeneze v poslední době zveřejněny, se přiklání k tradičnímu pojetí vzniku oocyty, i když někteří opatrnější kritici nevykládají nepředvídaná překvapení. Ta by se však mohla dotknout problematiky oogeneze spíše jen okrajově a zahrnovat pouze specifické případy, jako je např. vznik oocytů z embryonálních kmenových buněk či dalších podobných typů buněk nacházejících se např. v kůži.

Je třeba připomenout, že problematiku zárodečných buněk není jednoduché postihnout v takové šíři, aby si čtenář mohl vytvořit ucelenou představu o její složitosti. Proto zveřejňované příspěvky, nevyjímaje tento pokus, nabízejí jen neúplný výčet událostí, které se na původu, růstu a vůbec na osudu oocytů podílejí.

K statolitové teorii profesora Bohumila Němca

„Byl jsem v zimě r. 1900 na návštěvě u prof. Vejdovského a hovořili jsme o statických orgánech... Když jsem vyšel na ulici do chladného podzimního vzduchu, problesklo mi hlavou, že takovým statickým orgánem u rostlin jsou buňky, které obsahují přepadavá škrobová zrníčka. Znal jsem takové buňky z různých orgánů rostlinných, věděl jsem, že jsou umístěny právě v rostlinných částech, v nichž je tíže recipována (vrcholy kořenů a koleptil trav), měl jsem řadu pokusů, jimž chyběla jenom syntéza jednotčí myšlenkou. Nemohl jsem spát rozčilenou touhou, abych provedl další pokusy a revidoval dosavadní.“
(Vzpomínky, Archiv AV ČR 2002)

Alexander Lux, Olga Votrubová

Autoři věnují honorář Nadaci Živa

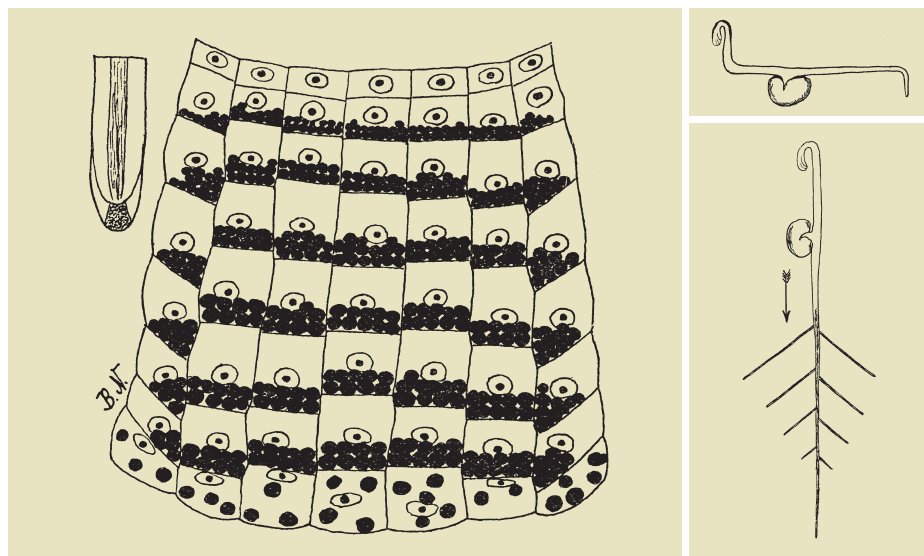
K najznámejším objavom prof. Bohumila Němca patrí statolitová teória formulovaná v dvoch publikáciách z r. 1900. Tato teória položila základy pre vysvetlenie reakcie rastlín na pôsobenie zemskej tiaže, ktorá umožňuje rastlinám orientáciu v priestore a správny rast ich orgánov, koreňov smerom do stredu Zeme (pozitívne geotropicky) a stoniek opačným smerom (negatívne geotropicky).

Na prelome 19. a 20. storočia sa nahromadil dostatok poznatkov, aby sa mohli formulovať predstavy o schopnostiach rastlín registrovať podnety prichádzajúce z vonkajšieho prostredia a reagovať na ne. Prof. Němec sa okrem mnohých iných problémov zaoberal aj týmito otázkami a svoje úvahy zhrnul v práci O smyslové a reflektivní činnosti rostlin, publikovanej v r. 1901. Hlav-

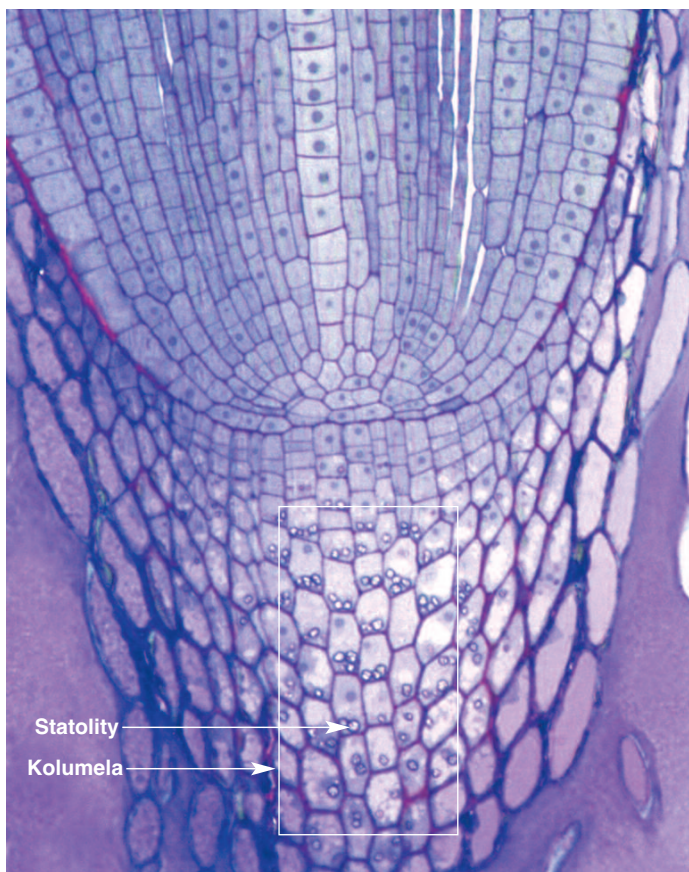
nou témou jeho prác z tejto oblasti sa stal geotropizmus (gravitropizmus). Je viac ako pravdepodobné, že bol pritom ovplyvnený svojimi predchádzajúcimi štúdiami z oblasti zoológie. Svoju vedeckú dráhu začínal totiž ako žiak významného českého zoológa prof. F. Vejdovského, známeho zavádzaním nových pokrokových metód do štúdia živočíchov. Pod jeho vedením sa zaoberal štú-

diom kôrovcov (korýšů), živočíchov s jednoduchými statickými orgánmi, ktoré slúžia k priestorovej orientácii práve na základe vnímania polohy tela voči zemskej tiaži. V podstate ide o dutiny vyplnené tekutinou, v ktorých sa nachádzajú statolity, telieska s vyššou hmotnosťou, ktoré pri zmene polohy tlačia na určité oblasti buniek schopných na tento tlak reagovať. Němec sám uvádza v svojej obsiahlej štúdiu Ueber die Wahrnehmung des Schwerkraftes bei den Pflanzen (O vnímaní gravitace u rostlin) z r. 1901: „Vlastní pozorování mě přivedla k poznání, že buňky s tělísky, která se chovají jako specificky těžší nebo lehčí tělesa v kapalině, jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny. Starší studie sluchových orgánů nižších živočichů, zejména korýšů, ve mně vzbudily myšlenku, že toto by mohla být zařízení umožňující rostlinám percepci směru působení zemské tíže. Posléze byla správnost této myšlenky potvrzena experimentálně, což jsem předběžně uvedl ve vztahu ke kořenům (práce Němec, B.: Die reizleitende Strukturen bei den Pflanzen. Biol. Centralblatt, 1900) a později publikoval jako předběžné sdělení (Němec, B.: Ueber die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, 1900).“ (Preklad O. Votrubová.)

V rovnakom čísle tohto časopisu bola publikovaná aj podobná práca Němcovho súčasníka, významného rakúskeho anatóma Gottlieba Haberlandta (Über die Perception des geotropischen Reizes), ktorá prišla do redakcie len o desať dní neskôr ako práca Němcova a ktorá sa zaoberá predovšetkým geotropizmom stoniek. Haberlandt tu už cituje Němcovu prácu z Biol. Centralblatt a uvádza: „Němcova správa ma primála k tomu, aby som svoje, doposiaľ kusé pozorovania tohto javu už teraz v krátkosti publikoval.“ (Preklad O. Votrubová.) Němec aj Haberlandt prišli k zhodnému záveru: ako statolity fungujú amyloplasty — plastidy so



Vľavo schéma pozdĺžneho rezu koreňovou špičkou (kolumela vybodkovaná — vytečkovaná) a pozdĺžny rez kolumelou so škrobovými zrnami (čierne telieska) v spodnej časti buniek, nad nimi bunkové jadrá ♦ Vpravo hore klíčna rastlina bôbu (Vicia faba) v horizontálnej polohe, ktorá ukazuje ohyb koreňa smerom dole a stonky smerom hore ♦ Vpravo dole klíčna rastlina bôbu vo vertikálnej polohe s koreňom, ktorý rastie pozitívne geotropicky, a stonkou, ktorá rastie negatívne geotropicky. Originály B. Němca



Pozdĺžny rez koreňovou špičkou ryže s koreňovou čiapočkou so statolitovým škrobom. Foto A. Lux

škrobovými zrnami, ktoré sú v určitých typoch buniek schopné meniť svoju polohu v bunke so zmenou orientácie orgánu vzhľadom k pôsobeniu gravitácie.

Čo objavil profesor Němec

Němcovi sa dostalo všeobecného uznania predovšetkým za štúdie registrácie a sprostredkovania informácie o polohe koreňa vzhľadom k zemskej tiaži v koreňovej čiapočke (Čepičce). Aká teda bola Němcova predstava o reakcii koreňa na zemskú tiaž a aké sú naše dnešné predstavy?

Němec vychádzal z pozorovania stavby koreňovej čiapočky, a to ako z pozorovaní vlastných, tak aj z pozorovaní svojich predchodcov, ktoré ukázali, že koreňová čiapočka (kalyptra) je útvar pravidelne prítomný na špičkách koreňov papradorastov, nahosemenných aj krytosemenných rastlín. Je to útvar tvorený skupinou buniek neustále dopĺňaný meristémom na koreňovom apexe a súčasne neustále uvoľňujúci bunky na svojej periférii. Koreňová čiapočka obvykle nie je veľká a napr. pri koreni kukurice má dĺžku približne 0,5 mm. Koreňová čiapočka je dôležitou súčasťou koreňa s početnými funkciami. Okrem iného chráni citlivé bunky apikálneho meristému koreňa, bráni nekontrolovanému prieniku látok do tejto citlivej oblasti koreňa a uľahčuje prenikanie koreňa pôdou.

V centrálnej oblasti čiapočky sa nachádza skupina buniek často zoradených do pravidelných stĺpcov, tzv. kolumela alebo stĺpik (sloupek). Jej bunky (označované aj ako statocyty a ich súbor ako statenčným) obsahujú početné amyloplasty fungujúce ako statolity (vid' obr.). Kolumela je obklopená periférnou časťou čiapočky, táto je



Prof. Bohumil Němec pri prednáške o geotropizme koreňa na Botanickom kongrese v Edinburgu v r. 1964. Na pozadí obrázok koreňovej čiapočky. Foto Jane Shen-Miller

tvorená bunkami bez amyloplastov. Pokiaľ rastie koreň vertikálne, sú škrobové zrná lokalizované na spodnej strane buniek kolumely, bunka registruje ich tlak a koreň rastie rovno, v smere pôsobenia zemskej tiaže, pozitívne geotropicky. Ak dôjde k vychýleniu polohy koreňa, amyloplasty menia polohu a bunky kolumely signalizujú túto zmenu do rastovej oblasti koreňovej špičky. Tam dôjde k nerovnomernému rastu a náprave polohy koreňa. Koreňová čiapočka je tiež miestom registrácie ďalších signálov, ktoré ovplyvňujú rast koreňa — okrem zemskej tiaže i tlaku, vlhkosti, mechanických signálov a iné. Tieto signály, ktoré pochádzajú z vonkajšieho prostredia, sú čiapočkou registrované a transportované z čiapočky do vlastného koreňa. V tejto súvislosti je zaujímavé uviesť záujem Charlesa Darwina a jeho syna Francisa o koreňovú čiapočku. Svoje predstavy vyjadrili v knihe *The Power of Movements of Plants* a čiapočke pripisujú dokonca funkciu mozgu. Na tieto myšlienky naväzuje tiež nedávno formulovaná predstava rastlinnej neurobiológie.

Němec robil svoje pokusy hlavne s koreňmi hrachu a bôbu. Starostlivo si tiež overoval, či je prítomnosť amyloplastov v koreňovej čiapočke všeobecným javom. S týmto cieľom preštudoval stavbu čiapočky veľkého počtu druhov z najrôznejších taxonomických skupín, vrátane cievnatých výtrusných rastlín. Jeho pozorovania, veľakrát neskôr potvrdené, ukázali prítomnosť amyloplastov v čiapočke takmer všetkých rastlín, a to aj u takých druhov, kde sa škrob v iných častiach rastliny nevyskytuje (napr. cesnak cibulový — *Allium cepa*). Uskutočnil aj presné merania počtov a veľkostí buniek kolumely pri niektorých rastlinách a u adventívnych koreňoch roripy obojzivej (rukev obojzivelná — *Rorippa amphibia*) spočítal bunky s presýpavým škrobom, počty zrn na bunky a celkový počet

škrobových zrn (5 832) schopných reagovať zmenou polohy na podnet. Dnes si vieme takúto analýzu bez moderného vybavenia počítačmi a analyzátorom obrazu len ťažko predstaviť. V rámci metodických možností svojej doby aj presne opísal vnútornú stavbu buniek kolumely a jej zmeny pri zmene polohy koreňa. Jeho opis dokumentuje polaritu buniek kolumely pri väčšine rastlín s amyloplastmi na spodnej strane buniek a jadrom na strane opačnej; táto stavba sa potvrdila aj s použitím súčasných metód.

Prof. Němec sa neobmedzil len na pozorovanie a opis buniek obsahujúcich presýpavý škrob, s koreňmi experimentoval, aby svoju hypotézu dokázal. Nechal korene „vyhladať“, aby z nich odstránil škrob, a zistil, že takto pozmenené korene na zemskú tiaž nereagovali. Podobne to bolo, aj keď odstránil z koreňových špičiek koreňové čiapočky. Sledoval aj geotropickú reakciu bočných koreňov, ktoré rastú v určitom uhle k pôsobeniu zemskej tiaže, sledoval vplyv teploty, obsahu vody a celej série xenobiotík na prejavy geotropizmu.

Vnímanie a registrácia zemskej tiaže, geotropizmu alebo gravitropizmu je dodnes najštudovanejšia reakcia koreňa na vonkajšie podnety. Od čias formovania statolitej teórie prešla predstava o registrácii zemskej tiaže v čiapočke a prenose signálu z čiapočky do rastovej zóny koreňa viacerými zmenami. Bola a dodnes je aj predmetom sporov medzi jednotlivými vedeckými školami a nie všetci rastlinní cytológovia a fyziológovia súhlasia s tým, že statocyty a ich amyloplasty sú potrebné pre registráciu zemskej tiaže a pozitívnu geotropickú reakciu koreňa. (Väčšina sa však k správnosti statolitej teórie celkom určite pri-

kláňa.) Do protirečenia sa táto predstava dostala predovšetkým so zástancami „konkurenčnej“ hormonálnej teórie (N. Cholodny, F. Went), keď sa zistilo, že vplyvom gravitácie dochádza k redistribúcii auxínu z hornej do spodnej časti predlžovacej zóny horizontálne umiestneného koreňa (Živa 2007, 1: 8–12). Korene sú pritom veľmi citlivé na zmeny v obsahu endogénneho auxínu a aj malý nárast množstva tohto hormónu vedie k rýchlej inhibícii rastu.

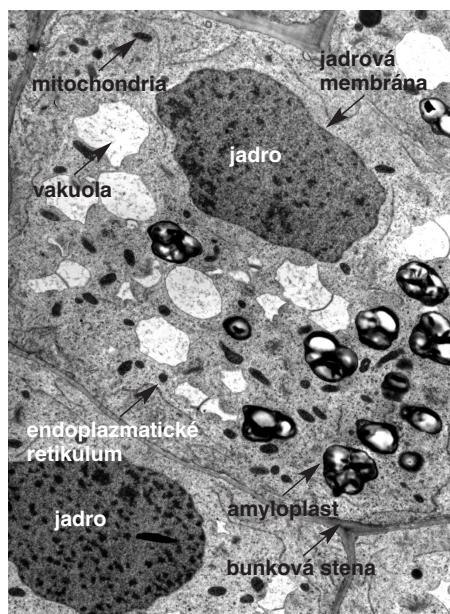
Ako vidíme statolity dnes?

Napriek viac ako storočiu, ktoré uplynulo od publikovania Némcovej práce, nie je stále presne opísaný prenos signálu od buniek kolumely do predlžovacej zóny koreňa, kde dochádza k nerovnomernému rastu a zakriveniu koreňa. Napriek tomu sa zaznamenal obrovský pokrok a súčasné predstavy postupne prepojujú statolitovú teóriu s predstavou nerovnomernej distribúcie auxínu v predlžovacej zóne koreňa.

Pôvodné cytologické svetelnomikroskopické pozorovania boli v 60. a 70. rokoch 20. storočia doplnené prácami elektrónmikroskopickými (viď obr.). Tieto okrem detailného opisu stavby statocytov, ich asymetrickej organizácie so sedimentujúcimi amyloplastmi v spodnej časti buniek a jadrom v hornej časti, riešili aj otázku citlivej zložky bunky, na ktorú amyloplasty tlačia. Neprišlo sa pritom celkom k zhode názorov, jedna skupina autorov za takúto zložku považovala membránový systém endoplazmatického retikula (ER). V bazálnej časti buniek kolumely sa obvykle nachádza špecializovaná forma ER, tzv. nodálne ER tvorené 5–7 cisternami pripojenými k stredovej časti tvaru tyčinky. Toto retikulum sa však nepozorovalo v spodnej časti statocytov vždy, a tak iní autori za takúto zložku bunky považovali cytoplazmatickú membránu, prípadne iné časti bunky. Dnes sa vie, že statolity — amyloplasty sú napojené na aktínové vlákna, ktoré sú súčasťou cytoskeletu bunky. Modernými metódami pomocou protilátok a konfokálnej mikroskopie (Živa 2006, 6: 245–248) sa dokázala lokalizácia aktínových vlákien predovšetkým v oblasti amyloplastov a jadra. Pri presune amyloplastov nastane reorganizácia aktínového cytoskeletu.

Detailné experimentálne práce z obdobia intenzívneho elektrónmikroskopického výskumu geotropizmu opisujú aj cytologické zmeny v bunkách statocytov pri vychýlení koreňa z vertikálnej polohy. Amyloplasty sa presypú na jednu z bočných stien a ich tlak na bunku sa stane asymetrickým. K ideálnemu premiestneniu amyloplastov dôjde pri vychýlení o 90°, aj malé, niekoľkostupňové vychýlenie však koreň citlivo a rýchlo registruje a vzápätí dochádza ku korekcii v dôsledku predĺženia koreňa na jednej strane.

Dôležitý príspevok k riešeniu problému geotropizmu a funkcie koreňovej čiapočky znamenali mutanty, predovšetkým modelového druhu arábkovky *Thalovaja* (huseničky roľního — *Arabidopsis thaliana*, viz také Živa 2007, 1: 5–7). Známe sú napr. mutanty, ktoré netvoría v bunkách koreňovej čiapočky škrob, prípadne ho tvoria redukované množstvo. Tieto práce majú stále väčší význam nielen pri zisťovaní vzorov genetickej aktivity v rôznych typoch buniek čiapočky, ale aj pri ozrejmovaní, aký je vzťah jednotlivých bielkovín k funkciám



Statocyt so statolitovým škrobom z koreňovej čiapočky kukurice v transmisnom elektrónovom mikroskope. Foto A. Lux

individuálnych buniek a aké sú komponenty signálnej dráhy vedúcej od buniek čiapočky do rastovej (predlžovacej) zóny koreňa.

Význam amyloplastov pre geotropickú reakciu koreňov potvrdzujú aj práce využívajúce diamagnetické vlastnosti škrobu. Aplikácia magnetického poľa viedla k vychýleniu amyloplastov a následnému zakriveniu koreňov. Pôvodné Némcové práce a neskoršie výskumy mnohých ďalších autorov s vplyvom odstránenia čiapočky na geotropizmus koreňa sa tiež potvrdili s využitím citlivejších metód — napr. pomocou laseru, kedy je možné odstrániť len malú skupinu buniek, prípadne dokonca len jedinú bunku. Tieto pokusy nielen potvrdili význam statocytov, ale ukázali, že všetky bunky kolumely nie sú pre vnímanie signálu rovnako citlivé. Pri arábkovke sa ukázalo, že najaktívnejšie sú prvé dve vrstvy kolumely. Zaujímavé zistenie bolo tiež, že variabilita veľkosti čiapočky a rozsahu jej centrálnej časti vnímajúcej tiaž súvisí s intenzitou vnímania a reakcie na zemskú tiaž. Ďalšia séria prác využila aplikáciu zníženej gravitácie na korene, a tak sa experimenty s koreňmi presunuli na palubu kozmických lodí.

Prenos gravitropického signálu — vysvetlenie a ďalšie otázky

Veľkým prínosom pre pochopenie prenosu signálu z čiapočky do rastovej zóny je tiež možnosť mapovania prítomnosti a distribúcie auxínu a jeho prenášačov v koreňovej čiapočke a v ďalších častiach koreňa. Auxínové gradiendy, toky auxínu v koreňovej špičke a im odpovedajúce transportné proteíny PIN boli nedávno podrobne v Žive opísané J. Frimlom (2007, 1: 8–12). Dnes je známe, že pri vychýlení koreňa z vertikálnej polohy a pri sedimentácii amyloplastov v smere zemskej tiaže na jednu z bočných stien bunky dôjde k reorganizácii aktínového cytoskeletu buniek čiapočky, statocytov, a k zmene transportných dráh vezikul (váčků), ktoré obsahujú jeden z PIN proteínov. Takto sa pôvodne symetricky rozmiestnený PIN presúva v smere pôsobenia zemskej tiaže a dôjde k smerovaniu toku auxínu v koreňovej špičke.

Objasnilo sa tým aj protirečenie dvoch „konkurenčných“ predstáv o podstate geotropizmu, statolitovej a hormonálnej, ktoré v skutočnosti predstavujú dve neoddeliteľné zložky jedného procesu. Túto predstavu podporujú aj pokusy s početnými mutantmi arábkovky, ktoré majú poruchy v transporte auxínu; majú totiž aj poruchy reakcie na zemskú tiaž. Mohlo by sa zdať, že záhada prenosu signálu z kolumely do predlžovacej zóny koreňa je týmto vyriešená. Ukazuje sa však, že to celkom tak nie je a že na prenose signálu sa zúčastňujú ešte ďalší hráči. Jedným z nich je nepochybne Ca^{2+} — ión, ktorý sa zúčastňuje na prenose najrôznejších signálov ako pri rastlinách, tak aj pri živočíchoch.

Aplikácia Ca^{2+} na jednu stranu koreňa vyvolá jeho zakrivenie v smere, kde bol Ca^{2+} aplikovaný. Chelátory, slúčeniny alebo látky, ktoré pevne viažu Ca^{2+} , narušujú geotropizmus, zatiaľ čo po gravistimulácii dochádza k výraznému nárastu koncentrácie Ca^{2+} na spodnej strane koreňa, predovšetkým v bunkách pokožky. Pre pochopenie prepojenia medzi auxínom a Ca^{2+} zatiaľ chýba dostatok experimentálnych dôkazov a úvahy o prepojení asymetrických tokov auxínu s asymetrickým tokom Ca^{2+} sú zatiaľ len hypotézami. Zaujímavé možnosti ďalšieho štúdia ponúka predstava, že pohyb amyloplastov mení napätie v aktívnej sieti, ktoré sa prenáša do plazmalemý (cytoplazmatickej membrány), kde spôsobuje otváranie kanálov pre transport Ca^{2+} , ktoré sú riadené mechanickým napätím membrány. Ďalší faktor, ktorý sa môže podieľať na prenose signálov, sú zmeny pH. Po gravistimulácii stúpa pH cytoplazmy v bunkách kolumely a následne klesá pH v apoplaste bunkových stien. Súvislosť s percepciou podnetu sa natíska (nabízí) — k zmenám pH nedochádza pri mutantoch, ktoré neobsahujú škrob; okrem toho, ak zabránime zmenám pH, naruší sa aj geotropická reakcia koreňa. Je teda jasné, že aj keď základná Némcová predstava o reakcii koreňa na zemskú tiaž sa potvrdzuje, nie je ani po viac ako 100 rokoch od jej vyslovenia úplne jasné, ako vnímanie a prenos signálu funguje.

Na záver ešte jeden citát zo Vzpomínok Bohumila Němca, ktorý dokrešuje históriu vzniku statolitovej teórie:

„Uverejnil jsem v roce 1900 v Biologisches Centralblatt článku o vláknitých strukturách v kořenových vrcholech a o tom jsem jen letmo pronesl myšlenku, že náraz (Anprallen) přepadavých škrobových zrn v buňkách rostlinných vybavuje geotropickou reakci pohybovou. Ještě téhož roku jsem uveřejnil ve zprávách německé botanické společnosti v Berlíně předběžné sdělení o způsobu recepce tíže rostlinami. Většina mých nálezů je tu již uvedena. O několik dní později došel do společnosti rukopis sdělení prof. G. Haberlandta ze Štýrského Hradce o témže předmětu. Je uveřejněno ve stejném sešitě zpráv (Berichte) německé botanické společnosti jako sdělení moje, ale Haberlandt přiznává, že jsem myšlenku již před ním uveřejnil v Biologisches Centralblatt. Zde ji Haberlandt nalezl a svou práci, která neobsahuje téměř žádné pokusy, mohl vykonat pohodlně během jednoho týdne. Nazval náš názor statolitovou teorií. Šla potom do světa literatury jako Němec-Haberlandtova, později Haberlandt-Némcová a často jen jako Haberlandtova (též u nás) teorie.“