

Kmenové buňky rostlin: základ ontogeneze, odolnosti vůči virům i nástupu biotechnologií

Kmenové buňky – svatý grál zejména regenerativní medicíny, ale také předmět již mnohaletých polemik o jejich původu, vlastnostech, biologické roli i výskytu v nejrůznějších organismech, živočišných i rostlinných. Není to příliš dávné, co se ještě badatelé dělali na dva tábory – těch, kteří v rostlinné kmenové sestry živočišných věří, a těch, kteří je považují za zbytečný biologický luxus. Vždyť přece jak lidská tisíciletá zkušenost s vegetativním množением rostlin, tak technologie *in vitro* / tkáňových / explantátových kultur zřetelně ilustrují fascinující regenerativní schopnost „obyčejných“ rostlinných somatických buněk, o níž se živočichům může leda zdát. K čemu by jim v jejich snadno opakovatelné ontogenezi byly ty „kmenové“?

Otázka, jak je to vlastně s buněčnou podobností živočišných a rostlinných organismů, se stala předmětem systematického vědeckého zkoumání již počátkem 19. století. To přineslo Evropě nejen konec napoleonských válek, ale také řadu nových objevů v přírodních vědách a lékařství. Stoupá zejména zájem o morfologii a fyziologii živočichů (včetně člověka) a rostlin. Objevuje se potřeba tuto „tsunami“ poznatků nějakým způsobem utřídit, propojit teoretickým zářím. A tak v r. 1833 vyhlašuje Francouzská akademie věd mezinárodní soutěž na téma Existuje analogie vnitřní struktury u rostlin a živočichů? (Slípka 2011).

Zásadním způsobem se na tomto úsilí podílejí i Jan Evangelista Purkyně a jeho žáci. Postupně se díky nim utvářejí nové vědní obory. Zrození fyziologie rostlin také připomíná pomník Purkyněova schovance Julia Sachse (1832–1897) v dnešní pokusné zahradě Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve Viničné 5, jenž se v r. 1857 habilitoval na tehdejší Karlo-Ferdinandově univerzitě. Jedním z podstatných výsledků celého snažení a polemik se stala buněčná teorie. Jejimi autory jsou jednak botanik Mathias Jakob Schleiden (1804–1881), jednak živočišný fyziolog Theodor Schwann (1810–1882). Znali se dlouho, byli přátelé, prvenství se nicméně přisuzuje botanikovi (Vasil 2008). Rok zveřejnění – 1838. Jakže by buněčná teorie v překladu zněla? „Všechny rostlinné a živočišné struktury jsou tvořeny z buněk (či jejich derivátů), které zachovávají kompletní funkční potenciál organismu.“

Jedna věc je však postulovat teorii, druhá ji prakticky prokázat. Co to znamená „zachování kompletního funkčního potenciálu organismu“? Nejpresvědčivější demonstrací by samozřejmě měla být schopnost regenerace nového kompletního organismu z jakékoli hodiny živé tkáně (somatické) buňky organismu dárcovského. Tedy úkol

pro regenerativní medicínu na straně jedné, pro rostlinné biotechnologie na té druhé.

Realita následujících let a desetiletí ukázala, že biologický charakter rostlinných a živočišných modelů má sice mnoho podobností, ale také četné rozdíly.

● Biologie živočišná mimo jiné definovala celou škálu funkčních/regenerativních „potencií“. Základní kategorizace je řadí na principu „ztrátivosti“ – od totipotence zygoty (buňky schopné se dělit a produkovat všechny typy diferencovaných buněk organismu) se různé tkáně, resp. buňky vyvíjející se organismu postupně degradují ve směru pluripotence (buňky přetvořeny v různě definované tkáně dílčích orgánů, ale již nedokážou stvořit nového jedince) a multipotence (ztráta obecnější regenerační schopnosti, specializace na úzké funkce). A vůdčí postavou v této hierarchii si udržují „všehoschopné“ buňky kmenové.

I bez nich se však již před lety podařilo realizovat onen požadovaný důkaz. Od ovečky Dolly po další zvířata „zregenerovaná“ z nejrůznějších tělních buněk. Části veřejnosti ale morálně zatracovaná, a tím pádem i pro zemědělskou nebo potravinářskou praxi nezajímavá. A stvořit homunkula/„Frankensteina“? To asi nikdy. Nikdy?

● Biologie rostlinná v tomto směru prošla poměrně složitou cestou různých zákrut a rozčarování. Organismy oproti těm živočišným zdánlivě mnohem strukturálně a funkčně jednodušší kladly vehementní odpor. Navzdory desítkám tisíc let zkušenosti s rostlinným vegetativním rozmnožováním byly snahy o aseptické / *in vitro* pěstování jejich tělních buněk tentokrát po desítky let neúspěšné. Jen chabou alternativou sér pro živočišné tkáňové kultury se staly různé tekuté endospermy, především kokosové mléko. Nejprve musel základní výzkum rovněž objevit a odzkoušet potřebné typy rostlinných hormonů, zvláště auxinů a cytokininů.

První pokusy německého botanika Gottlieba Haberlandta z počátků minulého století (1902) tak byly uzavřeny až publikací Vimly Vasila a A. C. Hildebrandta (1965). Z izolované somatické buňky kalusového hybridu tabáku *Nicotiana glutinosa* × *N. tabacum* byly regenerovány kvetoucí a fertillní rostliny.

Ještě mnoho let se však tradovaly mylné představy o rozsáhlé, či dokonce univerzální funkční totipotenci rostlinných explantátových kultur. A teprve postupně byla přejata zkušenost terminologická, tedy platnost oněch multi-/pluri- apod. limitů i v rostlinné říši. Současné nazírání lze souhrnně nalézt mimo jiné v mém přehledu (Opatrný 2014). Odpovídá rovněž na otázku, zda se i v rostlinném organismu nacházejí ony kultovní buňky kmenové.

Hlavní niky kmenových buněk rostlin

Systematický základní výzkum na toto téma započal někdy před půlstoletím morfologickými a histochemickými studiemi zejména osního vrcholku (Stewart a Dermen 1970). Za oblast tvořenou jeho kmenovými buňkami byl označen prýtový apikální meristé (shoot apical meristem, SAM). Jen ten by se tedy měl honosit totipotenci, jeho buněčné potomstvo, které z této oblasti vyputuje, bylo již považováno za „pouze pluripotentní“.

Až o další čtyři desítky let později se však začínají objevovat první souborné práce analyzující podrobněji i další niky rostlinných kmenových buněk – plant stem cell niches. V přehledném článku Ernsta Aichingera a kol. (2012) lze nalézt jejich definici coby „souborů buněk, které jsou chráněny před diferenciací signály buněk sousedních, a (jen) v těchto nikách se tak mohou dělit a fungovat jako buňky kmenové. Pokud je jejich dceřině buňky opustí, diferencují pod vlivem faktorů nového endogenního prostředí.“

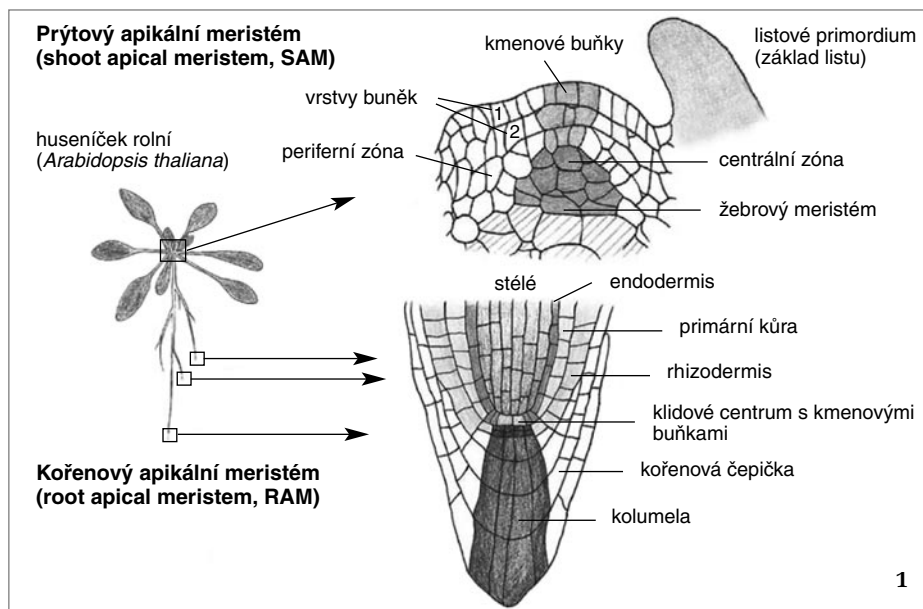
Současná věda rozlišuje čtyři klíčová teritoria rostlinných kmenových buněk (blíže viz Aichinger a kol. 2012, Opatrný 2014; obr. 1) – shoot apical meristem (SAM), kořenový apikální meristé (root apical meristem, RAM), niku buněk kambia (zodpovědnou hlavně za diferenciaci vaskulatury, tedy cév a cévic, a mechanickou podporu stonku) a niku felogenu (korového kambia).

Problematika kmenových buněk samozřejmě poutá rozsáhlou pozornost základního výzkumu biologie rostlin – a zahrnuje i oblasti, jež motivovaly vědce před dvěma sty lety. Včetně otázky, zda existuje analogie vnitřní struktury u rostlin a živočichů. Teď už ovšem nejen morfologická, ale také všestranně funkční.

Jak je to s praktickým využitím znalostí?

Veřejnost se již dlouho zajímá o využití poznatků u kmenových buněk živočišných a zejména lidských. Zvláště v souvislosti se zmíněnou regenerativní medicínou (neurologií), léčbou nádorových onemocnění nebo imunologickými defekty.

Ale u rostlin? Tady je to spíše úsměvné. Tak tedy – budete mile překvapeni. Svět o nich nejen ví, praxe je dokonce intenzivně využívá. Různé „biofarmy“ je ve velkém pěstují v obřích fermentorech a jejich produkty úspěšně používají především v kos-



1 Niky rostlinných kmenových buněk – prýtový a kořenový apikální meristém. Orig. Z. Opatrný (Nick a Opatrný 2014)

metickém průmyslu. Uvedme jeden příklad za mnohé jiné – podnik Natural Poland.

Pravda, tato biomasa různých „meristémů“ má k výše definovaným kmenovým buňkám velmi daleko, ale sám termín poutá pozornost, a komerčně je tedy velmi prospěšný. Popravdě ale zemědělská, lesnická i zahradnická praxe unikátní vlastnosti rostlinných kmenových buněk už intenzivně využívá málem půlstoletí, aniž by to tušila. Metoda *in vitro* pěstování SAM kmenových buněk totiž naprosto zásadně přispěla k následnému světovému nástupu využití rostlinných biotechnologií v oblasti klonového množení a současně ozdravování mnoha kulturních rostlin.

V r. 1965 se již zdařilo prokázat funkční, jmenovitě regenerační totipotenci i „běžných“, nikoli kmenových somatických buněk tabáku. A později i obrovského spektra dalších rostlin. Ale zároveň se prokázalo, že tato potomstva nijak negarantují splnění požadavku zemědělské/lesnické/zahradnické praxe – klonovou čistotu, pokud možno nenáročnou množení „true to type“ sadby.

Zásadní změnu v tomto ohledu ale již předtím přinesly dvě práce z francouzského týmu prof. Georga Morela (1916–1973). První byla věnována „meristémovému“ klonování jirín, druhá popisovala obdobnou proceduru u bramboru (Morel a Martin 1952 a 1955). Obě vycházely z poznatků Američana Ernesta Balla (1909–1997) později získavšího přídomek „otec mikropropagace“. Tedy technik, jimiž lze zejména z izolovaného stonkového apikálního pupene, pěstovaného *in vitro*, odvodit klonové potomstvo dárce (Ball 1946). Co však bylo podstatné – obě práce spojovalo zjištění, že takto odvození regeneranti jsou bezviroví i v případě, že dárce rostlin byly virem kontaminovány. Proces současného ozdravování a mikropropagace měl samozřejmě obrovský komerční dopad.

Sám poznatek, že právě oblast apikálního meristému jinak virem napadených rostlin si uchovává úplné nebo částečné zdraví, nebyl v té době neznámý. Výjimečnosti chování pletiv rostlinných meristémů si

virologové povšimli již bezmála před 100 lety (Bennet 1940).

Eradikační *in vitro* postupy se začaly rychle šířit světem, tím kapitalistickým i tím socialistickým. V 80. letech pak i jinak rigidní ekonomika států Rady vzájemné hospodářské pomoci (RVHP) stvořila systém Výzkumných úkolů technického rozvoje (VÚTR) a z jeho fondů začaly být i u nás dotovány všemožné resorty – od ústavů Akademie věd přes instituce Ministerstva zemědělství po lokální zahradnictví. Vznikaly první banky bezvirové sadby, hlavně plodin množících se vegetativně – tedy s trvalým rizikem masivního přenosu zejména virových infekcí. Nepostradatelnou technologií se zvláště v našich podmínkách staly pro šlechtitele i pěstitele brambor – zajedte se přesvědčit třeba do Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod.

Nebylo podstatné, jak biologické ochranné mechanismy fungují, hlavně, že fungují. Proč ale jen u některých buněk nebo pletiv? Čím se liší od těch ostatních?

Obecný pohled vědců i praktiků na tyto techniky byl v té době asi následující: podmínky *in vitro* kultur podporují rychlý nástup buněčného dělení původně „klidových pletiv“. A nově se vyvíjející pupenová primordia virové nákaze „utečou“. Metabolický pool virové infekce je dočasně vyhladověn, a ztrácí tak šanci překonat přirozené ochranné systémy rostliny. Zejména ty hormonální, zahrnující vstupy kyseliny salicylové i dalších standardních „stresových bojovníků“.

Kopírují rostlinné kmenové buňky antivirovou obranu živočišných sester?

Mechanismy spontánní antivirové ochrany mají dva zásadní cíle – bránit zdraví či život aktuálního hostitele a bránit přenosu patogenu na potomstvo semennou cestou. A to již od počátku tvorby generativních orgánů, tedy přeměny vegetativního vzrostlého vrcholu na květní základ. Naše dávne představy o pouhém „úteku“ dceřiných buněk izolovaného apikálního meristému ze zóny virové infekce byly jednoduše naivní. Především díky rozvoji molekulárních i mikroskopických technik víme o složitě vztahové síti, formované v průběhu koevoluce virů a jejich hostitelů.

Obrovským přínosem se stal objev odměněný v r. 2006 Nobelovou cenou za fyziologii a lékařství: osvětlení mechanismů RNA interference (RNAi, např. Živa 2017, 2: XLIV–XLVI). Tento jev byl studován původně u rostlin, podrobně objasněn na modelu hlístice hádatka obecného (*Caenorhabditis elegans*) a nakonec byl uznán jako univerzální biologický proces u všech živých organismů.

Ano, kmenové buňky rostlin i živočichů si osvojily obdobné strategie ochrany jich samých i jejich potomstva.

O unikátním významu RNAi pro chování rostlinných kmenových buněk, zejména niky SAM, se lze podrobně dočíst v publikacích posledních let – především ve skvělém přehledovém článku z vídeňského Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology (Bradamante a kol. 2021). Zabránit vertikálnímu virovému transgeneračnímu přenosu z hostitele na budoucí semenné potomstvo lze různými způsoby – od „mechanické blokády“ putování virových partikulí sítí vnitrobuněčných či mezibuněčných kanálů po aktivní exkluzi těchto virů/viroidů, které již do kmenové niky pronikly. Právě zde se uplatňuje systém RNAi dráhy, založený na koordinaci aktivit různých RNA-dependentních RNA polymeráz (RDR), tedy procesu posttranskripčního umlčování genů, při kterém dvoušroubovice rostlinné RNA indukuje degradaci homologiích (virových) transkriptů.

Jedna věc je sepsat přehledový článek, druhá své závěry a hypotézy z něj prokázat. Původní autorský kolektiv se vydal i touto cestou, a to po přesídlení Marca Incarbono do německého Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology v Golmu. Získal tím mimo jiné možnost využít tamní špičkové mikroskopické vybavení a precizně „časoprostorově“ dokumentovat chování buněk SAM u různých modelových mutantů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Od sofistikovaného pokusného schématu bylo zařazeno i sledování klíčového „stresového fytohormonu“, tedy kyseliny salicylové. Z molekulárně-chemických analýz i fotodokumentace je zřejmé, jak je v případě funkční RNAi dráhy oblast SAM chráněna proti vstupu modelových virů, nebo jak je naopak jimi okupována u mutantů postrádajících funkční RDR. Mechanismus RNAi exkluze však pro některé viry fungoval právě jen u buněk SAM – v jiných částech rostlin viry tuto bariéru překonaly. Potvrzena a opět „zviditelněna“ byla i úloha kyseliny salicylové v aktivaci tvorby RDR1 pro ochrannou tvorbu virových RNA dvoušroubovic (Incarbone a kol. 2023).

Práce byla nadšeně přijata (viz např. komentář ve věstníku Max-Planck Gesellschaft od Tobiasa Lortzinga z října téhož roku) a lze ji považovat za přelomovou v poznávání mechanismů rostlinné imunity vůči (nejen) virovým patogenům. A zároveň jako potvrzení nové vlny zájmu o plejádu nehormonálních faktorů, podmiňujících funkci rostlinných kmenových buněk nejen v kontextu odolnosti rostlin vůči patogenům, ale také v technologiích klonování dosud obtížně množitelných taxonů. Ale o tom až zase příště.

Použitá literatura uvedena na webu Živa.