

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



Iveta Škrdlová

Rostlinná centra organizující mikrotubuly

Plant mikrotubule-organizing centers

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph. D.

Praha, 2014

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Kateřině Schwarzerové za trpělivost, vedení správným směrem, dobré rady a vstřícnost při vypracování práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 13. 5. 2014

Podpis

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Úvod	5
3. Definice a funkce centra organizujícího mikrotubuly	6
4. Diverzita center organizujících mikrotubuly	7
4.1 Bazální tělíska	7
4.2 Spindle pole body	8
4.3 Centrozom	10
5. Centrum organizující mikrotubuly u suchozemských rostlin	14
5.1 Evoluce výskytu centra organizujícího mikrotubuly	16
5.1.1 Řasy	16
5.1.2 Mechorosty	17
5.1.3 Kaprad'orosty	19
5.1.4 Cykasy a jinany	20
5.2 Spermatogeneze u suchozemských rostlin	20
5.2.1 Bicentriola	22
5.2.2 Blefaroplast	23
5.2.3 Lokomoční aparát	25
6. Nukleace mikrotubulárních struktur u vyšších rostlin	27
6.1 Mikrotubulární struktury rostlinné buňky	28
6.1.1 Kortikální mikrotubuly	28
6.1.2. Předprofázový prstenec	30
6.1.3 Dělicí vřeténko	30
6.1.4 Fragmoplast	31
6.1.5 Radiální mikrotubuly	31
6.2 Nukleace mikrotubulů v rostlinné buňce	31
6.2.1 Jaderný obal	31
6.2.2 γ -tubulin	32
7. Závěr	34
8. Použitá literatura	35

1. Abstrakt

V eukaryotických buňkách jsou mikrotubuly nukleovány a organizovány prostřednictvím proteinové struktury nazývané centrum organizující mikrotubuly. Napříč eukaryotickými organismy existuje velká diverzita ve struktuře a morfologii těchto struktur. Mezi nejznámější konkrétní centra organizující mikrotubuly, tedy taková centra, kde jsou mikrotubuly nukleovány pouze z jednoho nebo dvou míst v buňce, patří živočišný centrozom, kvasinkové polární tělísko dělicího vřeténka a bazální tělíška bičíkového aparátu. V buňkách vyšších rostlin jsou tato konkrétní centra organizující mikrotubuly nahrazena rozptýlenými centry, neboť jsou zde mikrotubuly nukleovány z více míst rozptýlených v buňce. Konkrétní centra organizující mikrotubuly se v buňkách suchozemských rostlin vyskytují jen zřídka. Mezi tato konkrétní centra patří bicentrioly a blefaroplasty dávající vznik lokomočnímu aparátu pohyblivého spermatozoidu mechorostů, kaprad'orostů, cykasů a jinanu. Dalším typem konkrétního centra organizujícího mikrotubuly u mechorostů jsou polární organizátory, povrch jaderné membrány a povrch plastidu v mitotických i meiotických buňkách.

Klíčová slova: mikrotubuly, MTOC, rostliny, evoluce, γ -tubulin, centrozom, SPB, bazální tělísko, blefaroplast

Abstract

In eukaryotic cells, microtubules are nucleated and organized by protein structures called microtubule-organizing centers. There is a great diversity in structure and morphology of these structures in eukaryotic organisms. Animal centrosome, yeast spindle pole body and basal bodies of flagellar apparatus are the best known types of so called focused microtubule-organizing centers, where microtubules are nucleated from one or two concrete sites in the cell. These focused microtubule-organizing centers are replaced by diffuse centers in higher plant cells, which means that microtubules are nucleated from dispersed nucleation sites. Focused centers are rarely found in land plant cells. These focused centers comprise bicentrioles and blepharoplasts, which give rise to the locomotory apparatus of motile spermatozoid of bryophytes, pteridophytes, cycads and Ginkgo. Another types of focused microtubule-organizing centers in bryophytes are polar organizers, and the nuclear and the plastid envelopes in mitotic and meiotic cells.

Key words: microtubules, MTOC, plants, evolution, γ -tubulin, centrosome, SPB, basal body, blepharoplast

2. Úvod

Nukleace a organizace mikrotubulů v eukaryotních buňkách je esenciální pro řadu buněčných procesů, z nichž hlavní je buněčné dělení a diferenciace. Tuto úlohu nukleace a organizace mikrotubulů zastává struktura zvaná centrum organizující mikrotubuly, která se během evoluce eukaryotních organismů rozrůznila a vytvořila tak různé typy v odlišných organismech. Nejznámějšími a nejlépe prostudovanými centry organizace mikrotubulů jsou bazální tělíska, polární tělísko vřeténka a centrozom. Většina suchozemských rostlin tyto struktury nevytváří. Protože však rostlinné buňky využívají mnoho mikrotubulárních struktur, dlouho řešenou otázkou bylo, jak jsou tyto struktury u rostlin nukleovány. S objevem γ -tubulinu bylo možno pochopit nukleaci rostlinných mikrotubulů, jež je nezávislá na konkrétním centru organizujícího mikrotubuly typu centrozomu. Konkrétní centrum organizující mikrotubuly vytváří pouze malá část suchozemských rostlin v některých fázích svého životního cyklu. V této práci se věnuji definici centra organizujícího mikrotubuly a popisují výskyt různých typů těchto center u zvláště suchozemských rostlin.

Cíle této práce jsou:

1. Definovat centrum organizující mikrotubuly a popsat jeho různé typy v eukaryotních organismech s ohledem na nejlépe prostudované struktury.
2. Shrnout poznatky získané v dostupné literatuře týkající se centra organizujícího mikrotubuly v buňkách suchozemských rostlin s ohledem na evoluční vývoj nukleace mikrotubulů.

3. Definice a funkce centra organizujícího mikrotubuly

Mikrotubuly jsou jednou ze tří hlavních složek cytoskeletu v eukaryotních buňkách. Jsou to duté trubky o průměru 25 nm, které se skládají z α - a β - tubulinových dimerů. Mikrotubuly jsou dynamická struktura, která má schopnost rychlé polymerace a depolymerace. Ve všech eukaryotních buňkách jsou mikrotubuly nukleovány proteinovým komplexem obsahujícím γ -tubulin (Moritz a kol., 1995; Zheng a kol., 1995). Mikrotubuly vytvářejí polarizovanou strukturu, jejíž polarita je dána orientací mikrotubulů vzhledem k jejich nukleačnímu počátku. Mikrotubuly jsou svým minus koncem ukotveny ve svém nukleačním počátku a plus koncem vybíhají do cytoplasmy. Mikrotubuly mají mnoho funkcí, mezi které patří buněčný pohyb, udržení tvaru buněk, fagocytóza, transport váčků, buněčná polarita a buněčné dělení.

Centrum organizující mikrotubuly (microtubule-organizing center, MTOC) je proteinová struktura, jejíž hlavní funkcí je nukleace a organizace mikrotubulů. Než se však začnu věnovat problematice MTOC, je třeba, vzhledem k neustálené terminologii a různému použití odlišných termínů v literatuře, definovat termíny použité v této práci. Pojmem **konkrétní MTOC** je myšleno takové MTOC, které má jedno nebo více fyzických ohnisek, která výhradně nukleují a organizují mikrotubuly v buňce. Příkladem takového MTOC jsou bazální tělíska, polární tělísko dělicího vřeténka nebo živočišný centrozom. Naopak **rozptýlené MTOC** představuje způsob nukleace mikrotubulů, který není vázán na existenci konkrétní jedné či dvou struktur v buňce, ale mikrotubuly jsou nukleovány z mnoha makromolekulárních komplexů rozptýlených v buňce. Příkladem rozptýleného MTOC je způsob nukleace mikrotubulů u vyšších rostlin.

Ve většině eukaryotních buněk jsou mikrotubuly organizovány z jednoho nebo více míst. Ačkoli centrozom, jedno z nejlépe prozkoumaných konkrétních MTOC, byl jakožto velká buněčná struktura popsán již v roce 1876 díky pozorování ve světelném mikroskopu, funkční popis MTOC jako místo organizace mikrotubulů byl učiněn až téměř o sto let později. To souvisí hlavně s tím, že centrozom, jakožto velká ultrastruktura byl v buňkách dobře viditelný i bez využití elektronového mikroskopu. Mikrotubuly, které představují struktury výrazně menší, než je centrozom, byly popsány až s využitím elektronového mikroskopu v roce 1953 (De Robertis a Franchi, 1953). MTOC byla popsána nezávisle v několika studiích, proto byla zpočátku nazývána mnoha jmény, například mikrotubuly iniciační místa v živočišných buňkách (microtubules initiating sites; Porter, 1966), orientační centra v živočišných buňkách (orienting centers; Inoué a Sato, 1967), mikrotubuly nukleační centra (microtubules nucleating centers) v ektodermálních buňkách blastuly ježovky (Tilney a

Goddard, 1970), centra mikrotubulů (mikrotubule centers) v živočišných buňkách (Tilney, 1971), generátory mikrotubulů (mikrotubule generators) v izolovaném ústním aparátu *Tetrahymeny* (Wolfe, 1972). Termín centrum organizující mikrotubuly (MTOC) jako první použil J. D. Pickett-Heaps (Pickett-Heaps, 1969). MTOC rostlinných buněk označil za „difúzní, zřejmě amorfní, osmifilní (barvitelnou oxidem osmičelým) materiál bez jasného obrysu“, ze kterého vyrůstají mikrotubuly.

4. Diverzita center organizujících mikrotubuly

MTOC je buněčná struktura, u které došlo během evoluce k jejímu rozrůznění a vytvoření různých typů u odlišných eukaryotních organismů. Během vývoje těchto organismů a diverzifikace MTOC nedošlo k vytvoření složitějších struktur z jednodušších ale naopak k jejich zjednodušení. Evolučně nejstarší MTOC je bazální tělísko bičíkového aparátu, které bylo pravděpodobně přítomné již u prvních eukaryotních buněk. Strukturně jednodušší MTOC vyšších hub nebo úplná ztráta konkrétního MTOC a jeho transformace na rozptýlené MTOC u vyšších rostlin je odvozený stav (Azimzadeh a Bornens, 2004).

Ačkoliv mají MTOC v různých organismech odlišnou strukturu, jejich funkce jsou víceméně shodné, a to kontrolovat nukleaci a tedy výstavbu mikrotubulárních struktur. Taktéž molekulové složení zůstává spíše konzervované. Hlavní konzervovanou nukleační komponentou všech MTOC je protein γ -tubulin, a proto je jeho lokalizace v buňce důležitým vodítkem pro studium MTOC (detailně viz kap. 6.2.2). Velká diverzita MTOC eukaryotních organismů vychází pravděpodobně z faktu, že mikrotubuly, ač konzervované struktury, jsou uspořádávány a organizovány odlišnými způsoby v různých buňkách a v závislosti na různých funkcích mikrotubulů.

V této kapitole se zaměřím zejména na nejlépe prostudovaná MTOC, tedy na bazální tělíska, spindle pole body a centrozom.

4.1 Bazální tělíska

Bazální tělíska (basal bodies, BB) neboli kinetozomy bičíkového aparátu jsou evolučně nejstarší MTOC. Bazální tělíska a s nimi asociovaný bičík byly pravděpodobně přítomny již v posledním společném předkovi eukaryotických buněk (last eukaryotic common ancestor, LECA; Cavalier-Smith, 1978).

Eukaryotický bičíkový aparát je mikrotubulární systém, nacházející se u většiny eukaryotických organismů, a jeho případná ztráta je sekundární jev. Bičíkový aparát má tři základní funkce: pohyb, buněčné dělení a smyslové vnímání (Azimzadeh a Bornens, 2004).

Bičkový aparát se skládá ze dvou nebo více bazálních tělísek, která ukotvují axonemu, mikrotubulární jádro bičíku či řasinky, a organizují pohyby bičíku nebo řasinky (Andersen a kol., 1991; Yubuki a Leander, 2013). Bičík je stabilní populací mikrotubulů, nepodléhá tedy dynamické přestavbě mikrotubulů. Bazální tělísko kromě mikrotubulů bičíku nebo řasinky organizuje také cytoplazmatické mikrotubuly. Mikrotubuly bičíku nebo řasinky vybíhají z distální části bazálního tělíska, naopak proximální část bazálního tělíska dává vznik kořenům bazálního tělíska, které pokračují dále do buňky jako cytoplazmatické mikrotubuly. Tyto kořeny bazálního tělíska ukotvují bazální tělísko a spolu s ním i bičík v cytoplazmě (Gibbons, 1961).

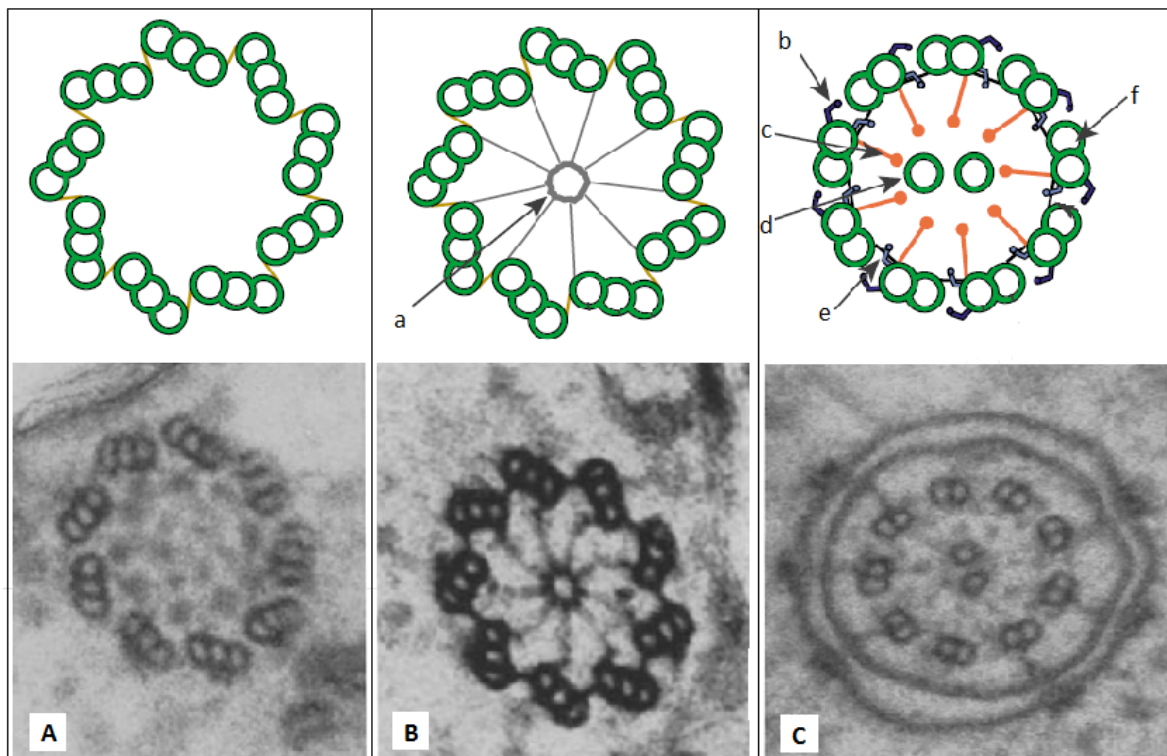
Bazální tělísko je struktura tvořená devíti trojicemi do kruhu uspořádaných mikrotubulů (Obr. 1 A). Dále od báze bičíku se mění struktura bazálního tělíska na strukturu zvanou kolo u vozu (cartwheel), protože její tvar skutečně připomíná osu a paprsky kola (Obr. 1 B). Dále se struktura mění na axonemu bičíku. Axonema je membránou obalený svazek mikrotubulů uvnitř bičíku nebo řasinky, který má strukturu devíti dubletů mikrotubulů napojených na vnější a vnitřní dyneinová ramena, uspořádaných kolem centrálního dubletu mikrotubulů (Carvalho-Santos a kol., 2011; Obr. 1 C). Stejně jako u ostatních MTOC konkrétních i rozptýlených i bazální tělísko je asociováno s γ -tubulinem, který je univerzálním nukleárním proteinem mikrotubulů (Liang a kol., 1996).

Bazální tělíska mají odlišný generační původ. Jedno bazální tělísko, označované jako bazální tělísko 1 (B1) je starší, vzniká během předchozího cyklu buněčného dělení a pochází z mateřské buňky. Druhé tělísko vytvořené během S fáze současného buněčného cyklu, je mladší a označuje se jako bazální tělísko 2 (B2) (shrnut v Yubuki a Leander, 2013).

4.2 Spindle pole body

Polární tělísko vřetenka (spindle pole body, SPB) je centrum organizující mikrotubuly v kvasinkových buňkách. SPB je vícevrstvá cylindrická organela skládající se ze tří vzájemně propojených desek. Vnější deska je orientována k cytoplazmě buňky a je asociována s cytoplazmatickými mikrotubuly. Vnitřní deska, asociovaná s jadernými mikrotubuly, je orientována do nukleoplasmy. Centrální deska ukotvuje SPB pomocí dvou hákovitých výběžků v jaderné membráně. Jedna část centrální desky vybíhá ve strukturu spojenou s oblastí jaderného obalu, nazvanou poloviční můstek (half-bridge, HB). HB je místo tvorby nového SPB během buněčného cyklu (Byers a Goetsch, 1975; Obr. 2). Mezi vnější a centrální deskou se navíc nachází dvě vrstvy nazvané první střední vrstva a druhá střední vrstva. HB je také vícevrstevná struktura sestávající ze dvou na sebe navazujících desek a další vrstvy na

cytoplasmatické straně HB, která je asociována s centrální deskou a druhou střední vrstvou (Jaspersen a Winey, 2004).



Obr. 1 Schematické nákresy struktur bičíku (Dawe a kol., 2007) a k nim odpovídající snímky z elektronového mikroskopu (Gibson a Grimstone, 1960). (A) Na bázi bičíku se nachází bazální tělísko tvořené devíti triplety mikrotubulů. (B) Dále od báze bičíku se nachází struktura zvaná kolo u vozu (cartwheel) tvořená centrální osou a paprsky. (C) Nejdále od báze bičíku se nachází axonema. Axonema je membránou obalený svazek mikrotubulů, který má strukturu devíti dubletů mikrotubulů napojených na vnější a vnitřní dyneinová ramena, uspořádaných kolem centrálního dubletu mikrotubulů. (a) kolo u vozu, (b) vnější dyneinová ramena, (c) radiální paprsek, (d) centrální pár mikrotubulů, (e) vnitřní dyneinová ramena, (f) vnější dublet mikrotubulů.

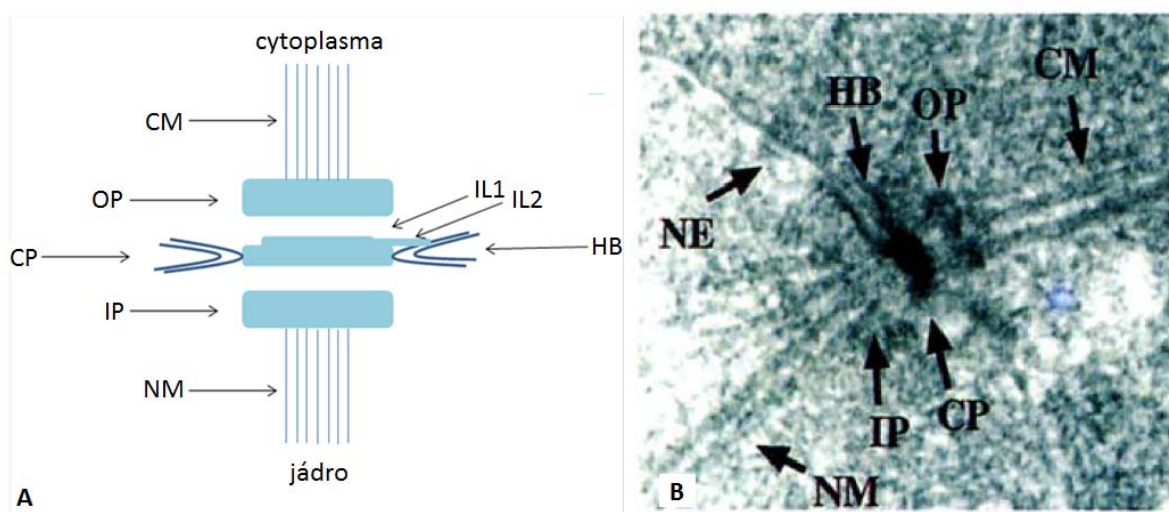
SPB jsou po celou dobu buněčného cyklu kvasinkové buňky uloženy na jaderném obalu, odkud organizují mikrotubuly v buňce. Malé množství SPB je lokalizováno i na plasmatické membráně (Knop a kol., 1999; Jaspersen a Winey, 2004).

Jednou z funkcí SPB je udávat mikrotubulům polaritu tím, že váže minus konec mikrotubulů, zatímco plus konec vybíhá do cytoplasmu nebo nukleoplasmu. SPB organizuje dva druhy mikrotubulů, jaderné a cytoplasmatické. Jaderné mikrotubuly, vybíhající z vnitřní desky SPB, formují během mitózy dělicí vřetenko a segregují chromosomy. Cytoplasmatické mikrotubuly, asociované s vnější deskou a HB, vybíhající ke kortexu buňky, jsou nezbytné pro karyogamii, určení pozice jádra a orientaci dělicího vřetenka (Jaspersen a Winey, 2004).

Hlavní složkou SPB, zodpovědnou za nukleaci mikrotubulů je γ -tubulin (Oakley a kol., 1990; Horio a kol., 1991). SPB stejně jako centrozom obsahuje γ -tubulinové komplexy (γ -tubulin ring complex, γ -TuRC), ovšem na rozdíl od centrozomu nejsou součástí SPB

centrioly (Balczon, 1996). Kromě γ -TuRC obsahují buňky kvasinek i γ -tubulinový malý komplex (γ -tubulin small complex, γ -TuSC). γ -TuSC kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje dva proteiny nukleující mikrotubuly, Spc98 a Spc97 (Jaspersen a Winey, 2004). Tyto dva proteiny mají své ortology i v γ -TuSC nukleujících mikrotubuly v jiných eukaryotních organismech.

Duplikace SPB probíhá před mitózou, během níž slouží SPB jako organizátor mikrotubulů dělicího vřeténka. Během G1 fáze buněčného cyklu dochází k elongaci HB a sestavení satelitu, který je pravděpodobně prekurzorem budoucího dceřiného SPB. Po duplikaci SPB jsou nová SPB stále spojená prostřednictvím dvou polovičních můstek, které se v této fázi nazývají můstek. Můstek je před S fází buněčného cyklu rozdělen na dva poloviční můstky a tím dochází k oddělení mateřského a dceřiného SPB. Mateřské a dceřiné SPB slouží během následující mitózy jako organizátory mikrotubulů na opačných pólech dělicího vřeténka a po cytokinezi se rozdělí do dvou dceřiných buněk (Jaspersen a Winey, 2004; Knop a kol., 1999).



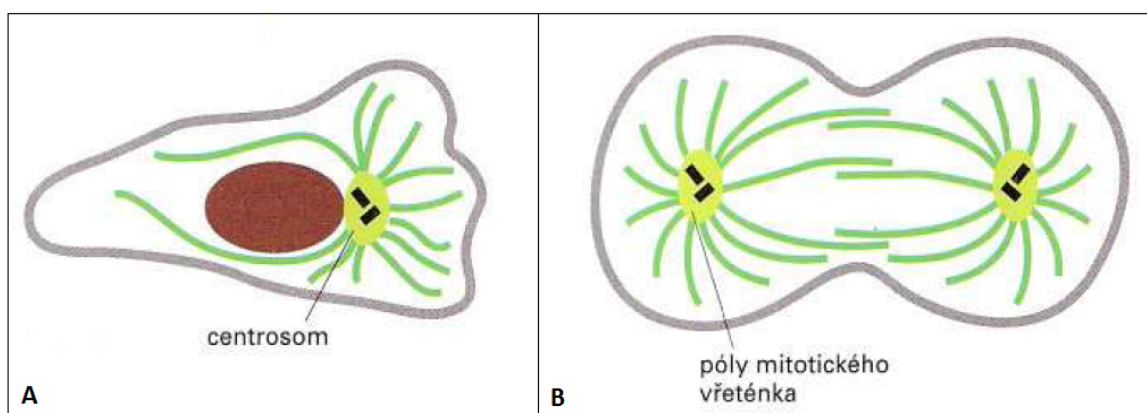
Obr. 2 (A) Schematický náčrt polárního tělíska dělicího vřeténka (spindle pole body, SPB). (B) Snímek z elektronového mikroskopu zachycující SPB a jeho strukturu v kvasinkové buňce. NE (nuclear envelope), jaderný obal; OP (outer plaque), vnější deska; CP (central plaque), centrální deska; IP (inner plaque), vnitřní deska; HB (half bridge), poloviční můstek; NM (nuclear microtubules), jaderné mikrotubuly; CM (cytoplasmic microtubules), cytoplazmatické mikrotubuly; IL1 (inner layer 1), vnitřní vrstva 1; IL2 (inner layer 2), vnitřní vrstva 2. Převzato z Knop a kol. (1999) a Jaspersen a Winey (2004)

4.3 Centrozom

Centrozom je MTOC v živočišných buňkách. Poprvé byl popsán v roce 1876 Edouardem van Benedenem, ovšem slovo centrozom použil německý biolog Theodor Boveri až v roce 1901 (Preble a kol., 2000).

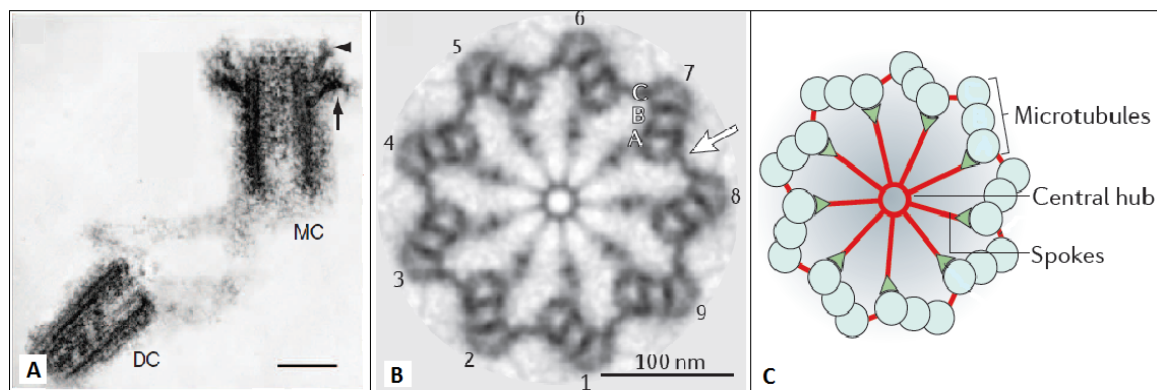
Živočišný centrozom je evolučně odvozen ze struktury bazálního tělíska. Azimzadeh a Bornens navrhuje, že k tomuto odvození mohlo dojít při vzniku mnohobuněčného organismu v koloniálních agregátech. Většina samostatných buněk obsahovala bazální tělíska organizující bičík a kortikální mikrotubulární síť, byla tedy schopná pohybu a smyslového vnímání. Když se kolonie buněk více sjednotila, buňky se staly na sobě vzájemně závislé, některé ztratily bičík a mohlo dojít k jejich specializaci a vytvoření nových struktur a funkcí. Bazální tělíska migrovala do středu buňky, kde se přeměnila na centrioly a dala tak vznik centrozomu, kterému zůstala zachována funkce dělení jádra. Ostatní původní funkce bičíkového aparátu získaly jiné struktury, převážně aktinový cytoskelet. Kortikální mikrotubulární síť se změnila na cytoplazmatickou (Azimzadeh a Bornens, 2004). V evoluci prošel centrozom mnoha různými variacemi, které jsou spojené s osudem axonemy. Když přestane být axonema plně funkční, změní se struktura bazálního tělíska na singletovou nebo dubletovou jako je tomu u některých skupin například členovců a hlístic. Když dojde k úplné ztrátě axonemy, dojde i ke ztrátě bazálního tělíska a vytvoření odlišných centrozomálních struktur, jako je SPB (Bornens, 2012).

Centrozom organizuje dva druhy mikrotubulů, mikrotubuly dělicího vřeténka v mitotických buňkách (Obr. 3 B) a cytoplazmatické mikrotubuly v interfázových buňkách (Obr. 3 A). Funkce centrozomu jakožto organizátoru mikrotubulů dělicího vřeténka je spjata s jeho duplikací, kterou se budu zabývat níže. V interfázi buněčného cyklu se centrozom živočišných buněk nachází v buňce poblíž jádra. Z centrozomu vybíhají směrem do cytoplazmy mikrotubuly, které jsou orientovány svým minus koncem k centrozomu a plus koncem do cytoplazmy buňky. Cytoplazmatické mikrotubuly mají v živočišné buňce mnoho funkcí, mezi které patří transport váčků, udržení tvaru buněk, fagocytóza nebo pohyb buněk.

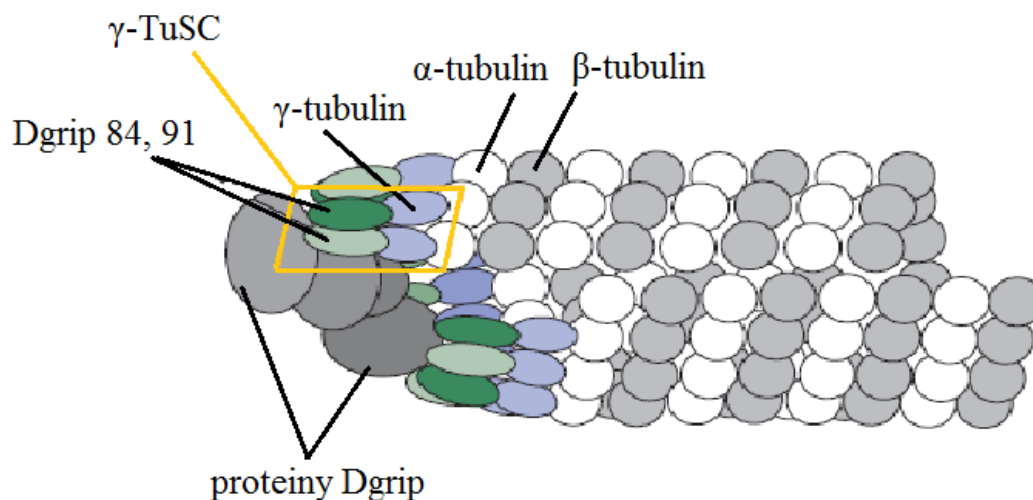


Obr. 3 Schematický náčrt dvou mikrotubulárních struktur organizovaných centrozomem v živočišných buňkách. (A) Buňka v interfázi buněčného cyklu. Centrozom se nachází poblíž jádra a organizuje cytoplazmatické mikrotubuly, které jsou v něm ukotveny svým minus koncem a plus koncem vybíhají do cytoplazmy buňky. (B) Buňka procházející mitózou. Centrozom se duplikoval a organizuje mikrotubuly dělicího vřeténka na opačných pólech buňky. Převzato z Alberts a kol. (2005)

Centrozom obsahuje dvě centrioly (Obr. 4 A) a diferenciovanou cytoplasmu, zvanou pericentriolární materiál (PEM). Centrioly jsou cylindrické struktury, složené z devíti tripletů mikrotubulů, centrální osy a paprsků, podobné struktuře bazálního tělíska nebo vozového kola (Obr. 4 B, C). V živočišných buňkách si centrioly zachovaly schopnost konverze na bazální tělíska a také schopnost být templátem pro tvorbu bičíku nebo řasinky (Azimzadeh a Bornens, 2007). Pericentriolární materiál je organizovaná struktura, není tedy amorfni, jak se dříve myslelo. Hlavními proteinovými složkami PEM je γ -tubulin, pericentrin a ninein. Když byly centrioly a PEM separovány, ukázalo se, že pericentriolární materiál je zodpovědný za nukleaci mikrotubulů (Preble a kol., 2000). Funkce centriol je ovšem nejasná. Je známo, že jsou centrioly schopné konvertovat na bazální tělíska a vytvořit bičík, například ve spermatozoidu rostlin nebo v buňkách zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, při přechodu prvoků z améboidní na bičíkatou fázi i v buňkách hlístice *Caenorhabditis elegans*. Ovšem nukleace mikrotubulů je na centriole nezávislá. Hlavní nukleační komponentou centrozomu je stejně jako u SPB protein γ -tubulin (Stearns a kol., 1991; Zheng a kol., 1991). Mikrotubuly jsou centrozomem nukleovány pomocí γ -TuRC (Obr. 5). γ -TuRC je lokalizován v pericentriolárním materiálu obklopujícím centrioly a ukotvuje tak mikrotubuly v centrozomu jejich minus koncem, zatímco plus konce vybíhá do cytoplazmy buňky (Obr. 6). γ -TuRC kromě několika kopií γ -tubulinu obsahuje i další proteiny a tvoří tak velkou proteinovou strukturu. Například Dgrip84 a Dgrip91 jsou proteiny se schopností nukleovat mikrotubuly obsažené v γ -TuRC octomilky *Drosophila melanogaster*. Tyto dva proteiny jsou ortology kvasinkových proteinů Spc98 a Spc97 (Oegema a kol., 1999). γ -tubulin je přítomen během celého buněčného cyklu v cytoplazmě buňky blízko centriol. Kromě γ -TuRC byl



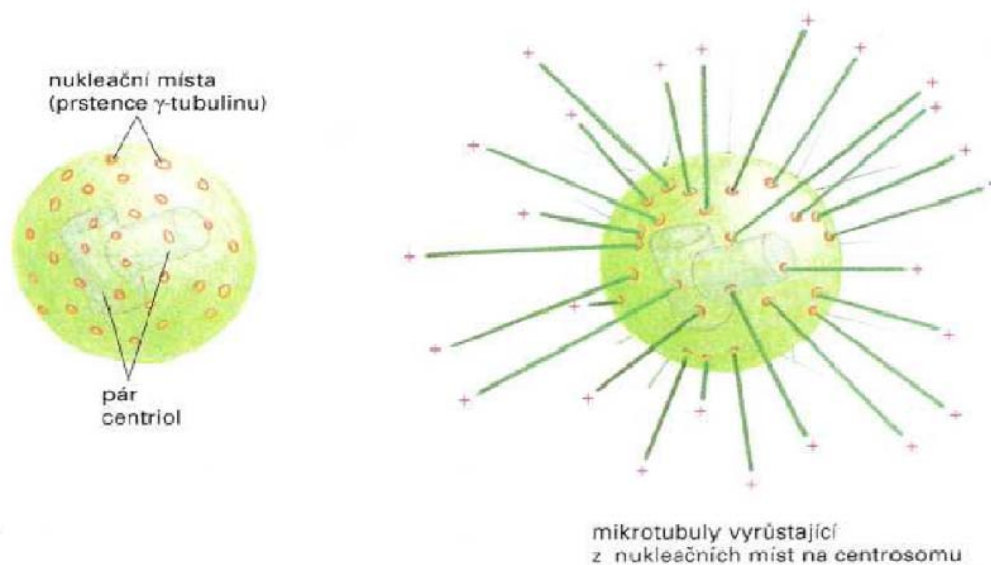
Obr. 4 (A) Centrozom živočišné buňky tvořený dvěma centriolami (Bornens, 2012). Mateřská centriola (MC) odlišující se od dceřiné centrioly (DC) svou velikostí a existencí dvou sad devíti přívěšků mikrotubulů na distálním konci (šipky). (B) Snímek z elektronového mikroskopu zachycující strukturu centrioly (Gönczy, 2012). Na snímku je patrných devět tripletů mikrotubulů, centrální osa i paprsky. (C) Schématický obrázek struktury zralé centrioly (Gönczy, 2012). Struktura je tvořená devíti triplety mikrotubulů (microtubules), centrální osou (central hub) a paprsky (spokes).



Obr. 5 Schematický náčrt γ -tubulinového prstencového komplexu (γ -TuRC), který je zodpovědný za nukleaci mikrotubulů v buňkách živočichů. γ -TuRC se skládá z podjednotky nazvané γ -tubulinový malý komplex (γ -TuSC). γ -TuSC je tvořen γ -tubulinem a proteiny z rodiny Dgrip. Proteiny Dgrip 84 a Dgrip 91 jsou schopné nukleovat mikrotubuly. Převzato z Moritz a kol. (2000)

v kvasinkových buňkách a buňkách *Drosophila melanogaster* objeven i γ -TuSC, který je také schopný nukleovat mikrotubuly a mohl by snad být prekursorem γ -TuRC.

Všechny dceřiné buňky musí od buňky mateřské získat jeden centrozom sestávající ze dvou centriol. K tomu je nezbytná duplikace centrozomu. Tento proces je zahájen na přelomu G1 a S fáze a je kompletně ukončen v G2 fázi, tedy před zahájením mitózy. Duplikace centrozomu probíhá ve třech hlavních krocích: ztráta orientace, elongace a separace. Během duplikace centrozomu musí nejdříve dojít ke ztrátě orientace centriol, tedy ke změně vzájemně kolmého postavení dvou centriol v centrozomu a jejich uvolnění od sebe. To se děje během G1 fáze buněčného cyklu. Na počátku S fáze je iniciováno vytvoření procentriol kolmo na mateřské centrioly. Dále v pozdní S fázi dochází k elongaci procentriol a jejich přeměně na dceřiné centrioly. Posléze dochází k zrání dceřiné centrioly původního centrozomu a vytvoření nové mateřské centrioly. V profázi následující mitózy dovoluje separace dvou nových centrozomů tvorbu bipolárního dělicího vřeténka na opačných pólech buňky (shrnutí v Azimzadeh a Bornens, 2007). Po buněčném dělení obsahují dceřiné buňky jeden centrozom se dvěma odlišnými centriolami. Zralá mateřská centriola je odlišitelná podle dvou sad devíti přívěsků mikrotubulů na svém distálním konci, které ji ukotvují v plazmatické membráně a váží k ní mikrotubuly. Dceřiná centriola, vytvořená během předešlého buněčného dělení, je nezralá a menší než mateřská (Azimzadeh a Bornens, 2007).



Obr. 6 Schéma uspořádání γ -TuRC na centrosomu v živočišných buňkách. Centrosom se skládá ze dvou centriol a pericentriolárního materiálu, který obsahuje γ -TuRC. V γ -TuRC jsou ukotveny mikrotubuly svým minus koncem a plus koncem vybíhají do cytoplasmy. Převzato z Alberts a kol. (2005)

5. Centrum organizující mikrotubuly u suchozemských rostlin

Rostlinné cytoplasmatické mikrotubuly jsou singletové mikrotubuly, běžně sestávající z třinácti protofilament. U vyšších rostlin se dubletové a tripletové mikrotubuly, které jsou základní strukturou bazálního tělíska/centrioly a bičíku, většinou nevyskytují, a pokud ano jde o dočasné struktury, které se nedědí, ale vznikají *de novo*. Přejít na fotosyntetický způsob výživy a vytvoření pevné buněčné stěny znamenalo ztrátu bičíkového aparátu, jenž je důležitý pro fagotrofický způsob výživy a motilitu buňky (Azimzadeh a Bornens, 2004). Vyšší rostliny proto nazýváme acentrozomální organismy. Rostlinná morfogeneze je nicméně spjata s velkým množstvím různých mikrotubulárních struktur, které v průběhu buněčného cyklu rostlinná buňka vytváří. Konkrétní MTOC je v buňkách vyšších rostlin nahrazeno existencí mnoha míst se schopností nukleovat mikrotubuly s charakteristickou distribucí v rostlinné buňce, které nazýváme disperzními MTOC (Wasteneys, 2002) neboli (pro účely této práce) rozptýlenými MTOC. Zdá se, že právě ztráta konkrétního MTOC v prvních suchozemských rostlinách byla hlavní událostí, která vedla k migraci γ -tubulinu do různých částí buňky. Tato migrace γ -tubulinu pak vedla k vytvoření více druhů mikrotubulárních struktur v rostlinných buňkách (Brown a Lemmon, 2007).

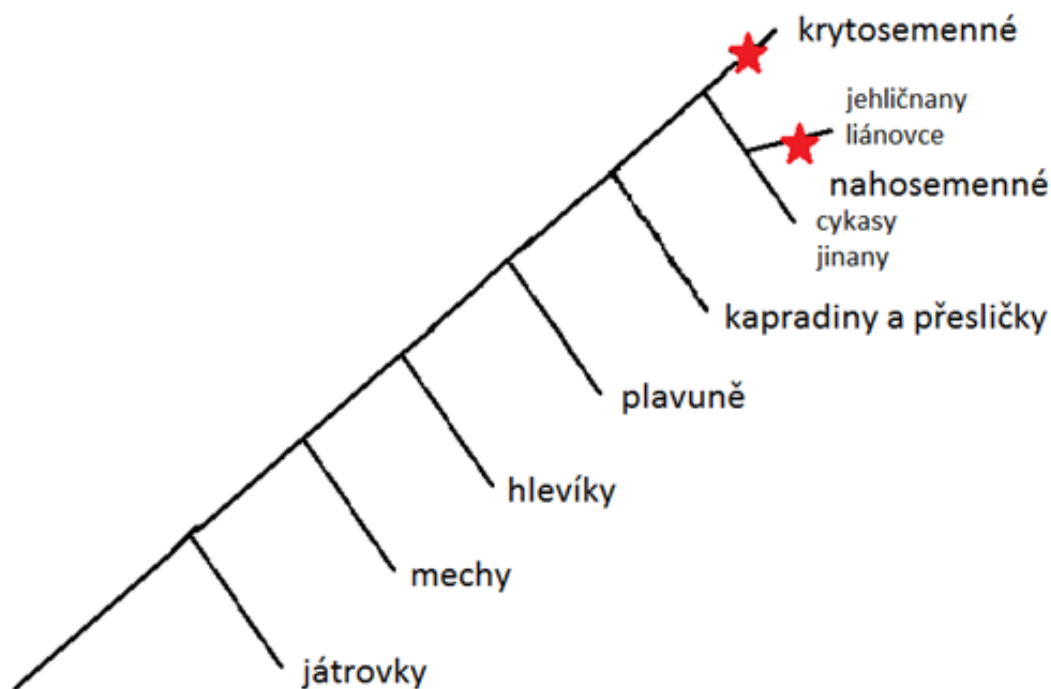
Vzhledem k tomu, že rostlinné MTOC nemají charakter konkrétního místa nebo několika málo míst, kde jsou mikrotubuly nukleovány, a vzhledem k velkému počtu různých mikrotubulárních struktur vyskytujících se v rostlinné buňce byl v minulosti pokrok v poznání rostlinných MTOC pomalý. Velmi důležitý pro výzkum rostlinných MTOC byl objev γ -

tubulinu, konzervované součásti MTOC eukaryotních buněk. Detekce výskytu γ -tubulinu pomohla pochopení principu nukleace mikrotubulů v rostlinných buňkách.

U suchozemských rostlin zahrnujících mechorosty, kaprad'orosty a část nahosemenných rostlin, které k rozmnožování potřebují pohyblivé bičíkaté spermatozoidy, nedošlo k úplné ztrátě konkrétního MTOC. Konkrétní MTOC jsou vytvářena jako přechodné struktury ve specifických fázích života buňky; vegetativní buňky u těchto rostlin postrádají konkrétní MTOC nebo centrioly/BB a mikrotubulární struktury jsou nukleovány z rozptýlených MTOC. Konkrétní MTOC vznikají *de novo* až během posledních buněčných dělení předcházejících formaci spermatozoidů během spermatogeneze, nebo jsou vytvářeny dočasně před mitotickým a/nebo meiotickým dělením (viz dále).

Struktura těchto MTOC u mechorostů, kaprad'orostů a části nahosemenných rostlin je ovšem odlišná například od živočišného centrozomu. MTOC tvořené během spermatogeneze zde obsahují zpravidla velký počet centriol, které se mění na bazální tělíska a organizují bičíky nebo řasinky. Struktura konkrétních MTOC, vytvářených během sporogeneze, ovšem již naznačuje evoluční posun směrem ke ztrátě konkrétního MTOC, neboť meiotické dělicí vřeténko, jež je nukleováno z nukleačních míst majících charakter konkrétních MTOC, neobsahují centriolu (acentriolární MTOC; viz dále).

Existence pohyblivého spermatozoidu je důležitým fylogenetickým ukazatelem. Konkrétní MTOC představované bazálními tělíska, vyvíjejícími se z centriol, se vyskytuje ve spermatozoidech mechorostů a kaprad'orostů, ale také cykasů a jinanů. Nejlepším vysvětlením této fylogenetické distribuce je, že ke ztrátě bičíku u samčí gamety došlo u suchozemských rostlin dvakrát. Jednou v rámci nahosemenných rostlin po oddělení jehličnanů a liánovců od cykasů a jinanů, a podruhé na bázi vzniku krytosemenných rostlin (Bremer a kol., 1987; Obr. 7). Ke třetí nezávislé ztrátě bičíkového aparátu došlo ve skupině zelených řas, konkrétně u *Zygnematales*. Ačkoliv zelené řasy tvoří bičíky, *Zygnematales* nikoliv (Hodges a kol. 2012). Konkrétní MTOC, které dává vznik bičíků spermatozoidů, vymizelo potom se vznikem jehličnanů a krytosemenných rostlin, které mají spermatickou buňku již nepohyblivou a k jejímu dopravení do vajíčka byla vyvinuta pylová láčka (Marc, 1997).



Obr. 7 Fylogeneze suchozemských rostlin a ztráta MTOC. Ke ztrátě MTOC došlo dvakrát nezávisle na sobě (červené hvězdy). Při oddělení jehličnanů a liánovců od cykasů a jinanů a při vzniku krytosemenných rostlin. Převzato a upraveno z Hodges a kol. (2012)

Než se začnu věnovat jednotlivým skupinám rostlin a jejich specifickým v tvorbě konkrétních MTOC, je třeba si definovat různé fáze buněčného a životního cyklu rostlin. Konkrétní MTOC rostlin se může vyskytovat ve třech odlišných typech buněk. Prvním z nich jsou buňky procházející standardní mitózou, dále buňky procházející sporogenezí, kde meiózou dochází ke vzniku nepohyblivých spor a posledním typem buněk jsou buňky procházející spermatogenezí, kdy vzniká samčí pohyblivá gameta.

5.1 Evoluce výskytu centra organizujícího mikrotubuly u suchozemských rostlin

5.1.1 Řasy (*Chlorophyta*, *Charophyta*)

Řasy spolu se suchozemskými rostlinami vytvářejí skupinu zvanou *Viridiplantae*. Do této skupiny patří zelené řasy (*Chlorophyta*), parožnatky (*Charophyta*) a suchozemské rostliny. Parožnatky a suchozemské rostliny tvoří skupinu *Streptophyta*. Podobnost bičíku u parožnatky a suchozemských rostlin přispěla k závěru, že suchozemské rostliny se vyvinuly z předchůdce zelených řas (Hodges a kol. 2012).

Většina zelených řas během životního cyklu vytváří bičík a bazální tělísko se dědí z generace na generaci. *Chlorophyta* zahrnují například rod *Chlamydomonas*, který vytváří v bičíkaté fázi životního cyklu dvoubičíkaté buňky, jejichž bičíky jsou organizovány dvěma bazálními tělísky. Tato bazální tělíska nevznikají *de novo*, ale jsou běžnou součástí buňky (Geimer a Melkonian, 2004).

Mezi parožnatky se řadí například *Coleochaete* či *Chara*. V bičíkatých buňkách těchto řas vznikají bazální tělíska *de novo* ze struktury zvané bicentriola (viz též dále) během procesu spermatogeneze. Bicentriola je tvořená dvěma centriolami k sobě orientovaným a spojenými svými konci, která slouží nejprve jako organizátor dělicího vřeténka a později dává vznik bazálnímu tělísku organizujícímu mikrotubuly bičíku (Hodges a kol., 2012).

5.1.2 Mechorosty

Nejstarší skupinou suchozemských rostlin jsou mechorosty (*Bryophyta*) zahrnující játrovky, hlevíky a mechy.

Životním cyklem mechorostů je rodozměna, kde převládá zelený asimilující gametofyt (haploidní fáze rodozměny). V gametofytu vznikají mitózou gamety (gametogeneze). Samčí gamety jsou představovány pohyblivými spermatozoidy se dvěma bičíky a samičí gamety jsou představovány nepohyblivou vaječnou buňkou. Po splynutí samčí a samičí gamety vzniká sporofyt (diploidní fáze rodozměny), který vyrůstá na gametofytu a je na něm závislý. Sporofyt produkuje spory, které vznikají meiózou, jsou tedy haploidní (sporogeneze). Spory vyklíčí v prvoklíček, který dává vznik novému gametofytu.

Mechorosty vytvářejí pět typických mikrotubulárních struktur jako vyšší rostliny (viz kap. 6.), kromě toho ale také dočasně vytvářejí konkrétní MTOC, které se podílí na organizaci dělicího vřeténka během mitózy i meiózy. Mechorosty obsahují nejvíce variací MTOC, mezi něž patří centriolární dělicí vřeténko v buňkách procházejících spermatogenezí (jev, který lze pozorovat též u kapradin, cykasů a některých nahosemenných), dále povrch jaderné membrány, a pro mechorosty typický povrch plastidů v meiotických buňkách a polární organizátory dělicího vřeténka během mitózy (shrnutí v Shimamura a Brown, 2004; Tab. 1). Mechorosty jako poslední skupina v evoluci vytváří konkrétní MTOC i mimo proces spermatogeneze. Kaprad'orosty, cykasy a jinany již vytváří konkrétní MTOC pouze během spermatogeneze (viz kap. 5.2).

Mitotické vřeténko v mitóze

Játrovky organizují mikrotubuly dělicího vřeténka ve vegetativních buňkách procházejících mitózou z acentriolární sférické struktury označované jako polární organizátor

(PO; Obr. 8 B, D; Brown a Lemmon, 1990). PO není stálou buněčnou strukturou, ale vzniká *de novo* před mitózou na opačných pólech jádra a zaniká po metafázi. PO neobsahuje centrioly, vytváří však astrální strukturu podobnou živočišnému centrozomu (tzv. astrální acentriolární vřeténko). Vytvoření PO na opačných pólech buňky předchází organizaci předprofázového prstence (Brown a Lemmon, 2011) Tento mitotický aparát je považován za přechodný stav mezi zelenými řasami a semennými rostlinami.

Ve vegetativních buňkách **mechů** je MTOC a organizace mitotického dělicího vřeténka spojena s γ -tubulinem asociovaným s jaderným obalem. Během mitózy se zde vytváří anastrální dělicí vřeténko, které je nukleováno z rozptýleného MTOC spojeného s jádrem (Brown a Lemmon, 2013).

Mitóza ve vegetativních buňkách **hlevíků** je asociována s jedním plastidem, který se v těchto buňkách nachází. Povrch plastidu zde slouží jako MTOC a svým dělením dává vznik polárnímu dělicímu vřeténku (Brown a Lemmon, 2013).

Mitotické vřeténko v meióze

K tvorbě spor mechorostů neboli sporogenezi dochází prostřednictvím meiotického dělení. Játrovky vytvářejí v buňkách procházejících sporogenezí nejsložitější systém, který zahrnuje organizaci mikrotubulů skrze tři konkrétní MTOC. V buňkách mechů a hlevíků je organizace mikrotubulů dělicího vřeténka během sporogeneze asociována s plastidem (Tab. 1).

Tvorba spor v buňkách **játrovek** probíhá pomocí meiotického dělení, při kterém může být dělicí vřeténko organizováno plastidem, polárními organizátory i skrze jaderný obal (Brown a Lemmon, 2013). **Mechy a hlevíky** mají pouze jeden chloroplast v mateřské buňce spor, který během buněčného dělení slouží jako MTOC pro vytvoření mikrotubulů dělicího vřeténka (Brown a Lemmon, 1997). Mateřská buňka spor dává během dělení vznik čtyřem sporám, aniž by došlo k postupnému dělení na dvě spory, z mateřské buňky spor tedy vznikají jedním dělením rovnou čtyři spory. Mateřská buňka spor obsahuje jeden plastid, který se během profáze I meiotického dělení rozdělí na čtyři plastidy. Tyto čtyři plastidy se rozmístí do čtyř pólů buňky, kde dávají vznik kvadripolárnímu dělicímu vřeténku (Obr. 8 A, C). Tento systém se nazývá kvadripolární mikrotubulární systém (QMS; Brown a Lemmon, 1997).

Dalším konkrétním MTOC v buňkách mechorostů je bicentriola tvořená během spermatogeneze (detailně viz kap. 5.2).

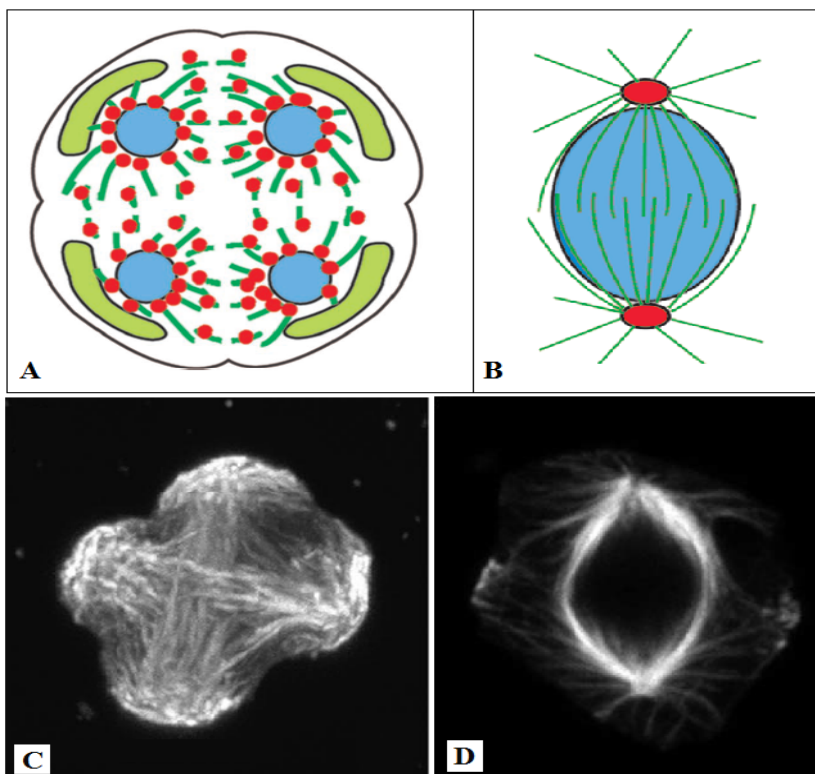
	mitóza	meióza
játrovky	PO	PO, NE, P
mechy	NE	P
hlevíky	P	P

Tab. 1 Druhy MTOC v buňkách procházejících mitózou nebo meiózou u jednotlivých skupin kaprad'orostů. Játrovky mají v mitotických buňkách mikrotubuly organizované polárními organizátory (PO). V meiotických buňkách mohou být mikrotubuly organizovány PO, MTOC asociovaným s jaderným obalem (NE) nebo MTOC představovaným plastidem (P). Mechy organizují mikrotubuly v mitotických buňkách MTOC asociovaným s jaderným obalem, v buňkách meiotických pak MTOC asociovaným s plastidem. Hlevíky během mitózy i meiózy využívají MTOC asociované s plastidem.

5.1.3 Kaprad'orosty (Pteridophyta)

Mezi kaprad'orosty se řadí plavuně, přesličky a kapradiny. Kaprad'orosty tvoří monofyletickou skupinu rostlin, protože plavuně tvoří samostatnou vývojovou linii.

Dělicí vřeténka buněk kapradin nejsou nukleována konkrétními typy MTOC, ale mají



široké póly, jaké jsou známy u všech vyšších rostlin. Např. meiotické dělicí vřeténko kapradiny *Ophioglossum* je anastrálního typu bez konkrétních MTOC na pólech (Brown a Lemmon, 2001). Konkrétní typ MTOC je tedy vytvářen pouze během posledních mitotických dělení, dávajících vznik pohyblivé samčí gametě (viz kap. 5.2)

Obr. 8 (A) Schéma buňky procházející meiózou, kde je MTOC představováno plastidem. Dochází ke vzniku kvadripolárního dělicího vřeténka na čtyřech pólech buňky. (B) Polární organizátory sloužící jako MTOC v mitotických buňkách játrovky. Jádru je značeno modře, plastidy světlezeleně, mikrotubuly tmavozeleně a γ -tubulin červeně. (C) Buňka mechu *Entodon seductrix* v profázi meiotického dělení se značenými mikrotubuly, které vytváří kvadripolární dělicí vřeténko. (D) Buňka játrovky v profázi mitotického dělení se značenými mikrotubuly. Mikrotubuly jsou zde nukleovány polárními organizátory a vytváří astrální acentriolární dělicím vřeténko. (A, B) převzato z Shimamura a kol. (2004), (C, D) převzato z Brown a Lemmon (2011).

5.1.4 Cykasy a jinaný

Cykasy spolu s jediným zástupcem jinanů tvoří bazální skupinu nahosemenných rostlin. Tato skupina stejně jako kaprad'orosty vytváří konkrétní MTOC pouze během spermatogeneze (viz kap. 5.2)

5.2 Spermatogeneze u suchozemských rostlin

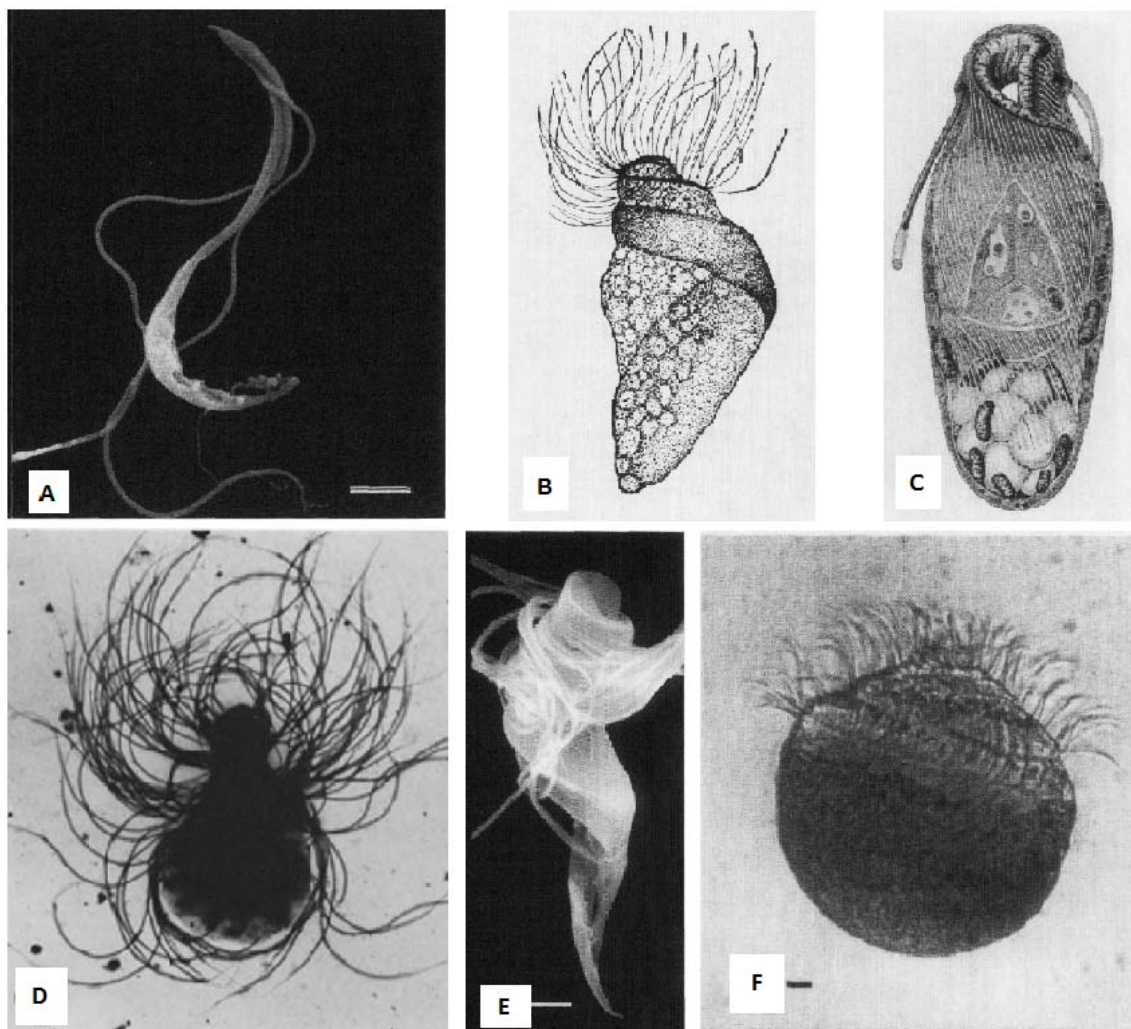
Spermatogeneze je proces, při kterém vznikají samčí pohlavní buňky - gamety. Bičíkaté samčí gamety se nazývají spermatozoidy a jsou vytvářeny mechorosty, kaprad'orosty a primitivními nahosemennými rostlinami. Spermatozoidy těchto rostlin jsou jedinými pohyblivými buňkami v jejich životním cyklu. Pokročilejší nahosemenné rostliny a všechny krytosemenné rostliny postrádají bičíkaté spermatozoidy a vytvářejí nebičíkatou spermatickou buňku, která je nepohyblivá a k jejímu dopravení do vajíčka byla vyvinuta pylová láčka (Marc, 1997). Pouze v bičíkatých spermatozoidech výše uvedených skupin vzniká během spermatogeneze konkrétní MTOC s obsahem centriol, které je schopné organizovat jak mitotické dělicí vřeténko tak mikrotubuly vytvářející bičík.

Spermatozoidy se dělí dle počtu bičíků na dvoubičíkaté a mnohobičíkaté s větším počtem bičíků. Spermatozoidy se dvěma bičíky, nacházející se u řas, části mechorostů a většiny plavuní (Obr. 9 A, C), jsou morfologicky jednodušší než spermatozoidy s více bičíky, nacházející se u kaprad'orostů, cykasů a jinanů. Kapradiny obsahují až sto bičíků (Obr. 9 B, D, E), kolem tisíce bičíků mají spermatozoidy jinanu a nejvíce bičíků je ve spermatozoidech cykasů (Obr. 9 F), kde může jejich počet být až kolem dvaceti pěti tisíc (shrnuto v Duckett a Carothers, 1982). Společným znakem všech spermatozoidů, ať mají dva nebo více bičíků, je jejich spirální tvar, existence bičíků a fakt, že postrádají buněčnou stěnu (Renzaglia a Garbary, 2001).

Proces spermatogeneze začíná v předposledním buněčném dělení, kdy vzniká mateřská buňka spermatid. V této buňce se vytváří elektrondenšní materiál, který dává vznik dvěma strukturám, bicentriole nebo blefaroplastu, v závislosti na počtu bičíků v budoucím spermatozoidu. Tyto struktury jsou vždy v páru, který se během mitózy posledního buněčného dělení před vznikem spermatidy rozděluje a migruje k opačným pólům mateřské buňky spermatid, kde organizuje mikrotubuly dělicího vřeténka. Po ukončení dělení má každá ze dvou spermatid jednu strukturu, jednu bicentriolu nebo jeden blefaroplast z původního páru. Každá z těchto spermatid dozraje a vytvoří se z ní tak plně zralá samčí gameta neboli spermatozoid. Tato přeměna nezralé spermatidy ve zralý spermatozoid je provázána mnoha

změnami v morfologii této buňky. Mezi hlavní změny patří vytvoření lokomočního aparátu ze struktury bicentrioly nebo blefaroplastu (Renzaglia a Garbary, 2001).

Konkrétním MTOC dvoubičíkatých spermatozoidů suchozemských rostlin je struktura zvaná bicentriola. U vícebichíkatých spermatozoidů je touto strukturou blefaroplast. Obě tyto struktury se podílejí na organizaci dělicího vřeténka během buněčných dělení předcházejících vytvoření spermatozoidu a také dávají vznik bazálním tělískům lokomočního aparátu spermatozoidu. Bicentriola i blefaroplast suchozemských rostlin jsou struktury tvořené centriolami, které vznikají *de novo* až během buněčných dělení předcházejících spermatogenezi. Tyto centrioly se, na rozdíl od centriol živočišného centrozomu, nikdy neduplikují a nedědí se do dceřiné buňky. Centrioly tvořící bicentriolu a blefaroplast dávají

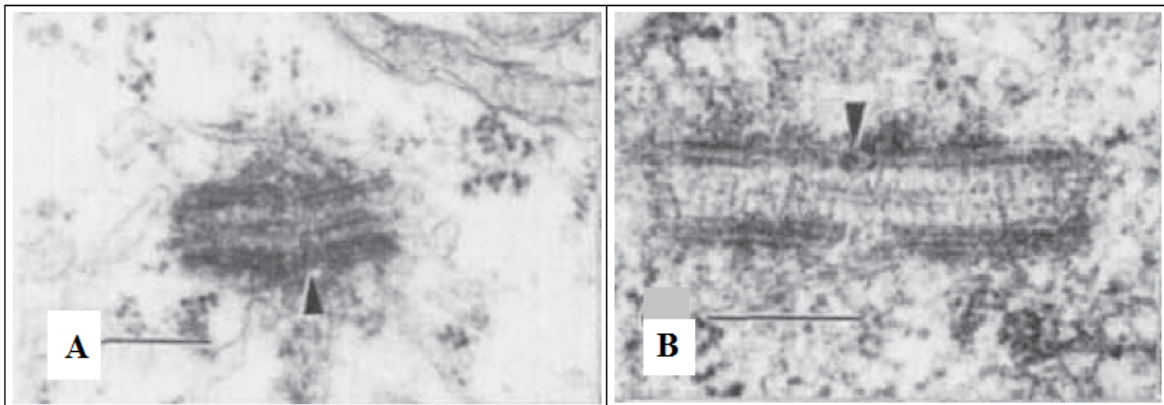


Obr. 9 Bičíkaté spermatozoidy suchozemských rostlin. (A) Spermatozoid mechu *Atrichum angustatum* se dvěma bičíky. (B) Spermatozoid přesličky *Equisetum arvense* s mnoha bičíky. (C) Spermatozoid plavuně *Palhinhaea cernua* se dvěma bičíky. (D) Spermatozoid vodní kapradiny *Marsilea* s velkým počtem bičíků. (E) Spermatozoid kapradiny *Angiopteris evecta* s velkým počtem bičíků. (F) Mnohobičíkatý spermatozoid cykasu *Zamia integrifolia*. (A, B, C, E, F) převzato z Renzaglia a Garbary (2001). (D) převzato z Mizukami a Gall (1966).

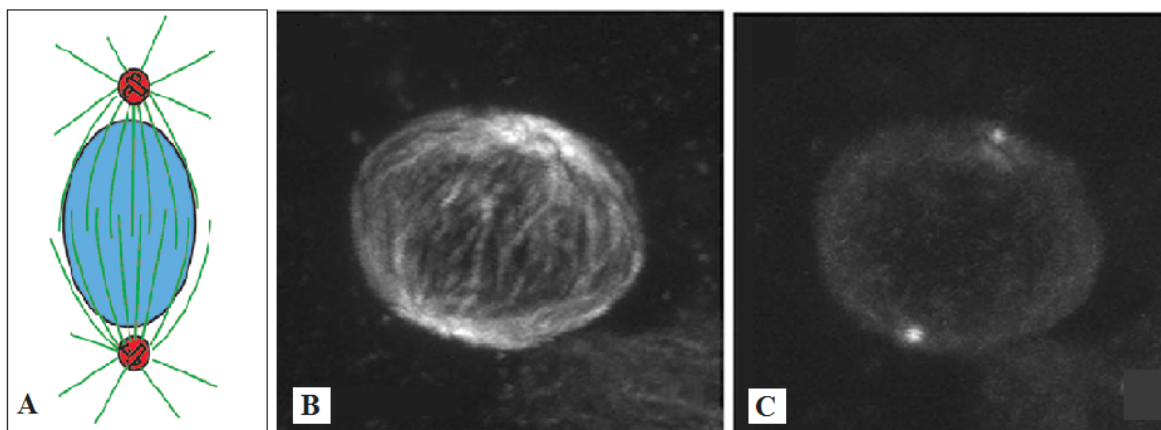
vznik bazálními tělískům, jedna centriola vždy jednomu bazálnímu tělísku. Jedno bazální tělísko organizuje jeden bičík, je tedy patrné, že počet centriol v bicentriole nebo blefaroplastu se rovná počtu bičíků zralého spermatozoidu.

5.2.1 Bicentriola

Bicentriola je struktura tvořená dvěma centriolami, které jsou na sebe orientovány svými konci a jsou spojené centrálním vláknitým jádrem (Obr. 10). Struktura centriol je podobná struktuře běžné centrioly v eukaryotních buňkách. Bicentriola vzniká *de novo* během posledních buněčných dělení před vytvořením spermatozoidu z elektronodenního materiálu asociovaného s jádrem. Na rozdíl od zelených řas (*Chlorophyta*), které vytvářejí dva bičíky organizované dvěma bazálními tělísky, jež jsou běžnou součástí buňky a duplikují se během buněčného dělení (viz kap. 5.1.1), řasy patřící do skupiny *Charophyta* již vytvářejí bazální tělíska *de novo* a to pomocí bicentrioly (Hodges a kol., 2012). Pár bicentriol vzniká během spermatogeneze játrovek, mechů a plavuní v mateřských buňkách spermatid, tedy během předposledního buněčného dělení před vznikem spermatozoidů. U hlevíků vzniká pár bicentriol již před tímto předposledním dělením a ještě před vznikem mateřské buňky spermatid. V obou případech se pár bicentriol dělí a migruje na opačné póly buňky, kde organizuje mikrotubuly dělicího vřetenka (Obr. 11). Po ukončení mitózy získává každá dceřiná spermatida jednu bicentriolu (Shimamura a kol., 2004).



Obr. 10 Snímky z elektronového mikroskopu zachycující strukturu bicentrioly. (A) Bicentriola v mateřské buňce spermatid mechu *Aulacomnium palustre* procházející profází buněčného dělení. Podélný řez bicentriolou tvořenou dvěma centriolami, které jsou spojené centrálním vláknitým jádrem (šipka). (B) Výrazně delší bicentriola v mateřské buňce spermatid plavuně *Selaginella kraussiana* během profáze buněčného cyklu. Šipka označuje spojení dvou centriol prostřednictvím centrálního vláknitého jádra (Renzaglia a Garbary, 2001).



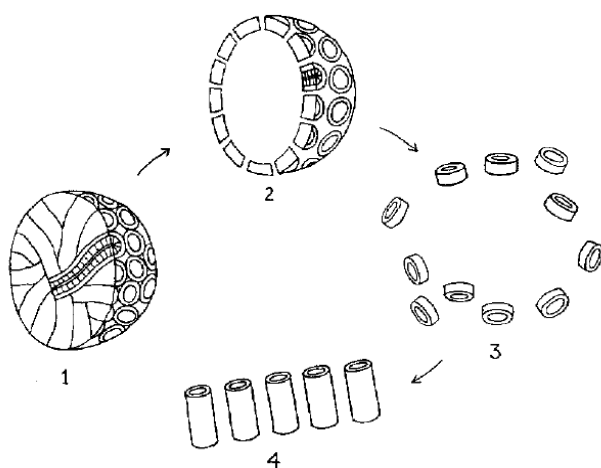
Obr. 11 Konkrétní MTOC mateřské buňky spermatid se dvěma bičíky. (A) Schématický náčrt dělicího vřeténka, jehož póly jsou tvořené dvěma centriolami. Pravoúhlé uspořádání centriol je typické pro zelené řasy; suchozemské rostliny vytvářejí bicentriolu s centriolami spojenými svými konci. (B,C) Snímek z fluorescenčního mikroskopu zachycující buňku v profázi posledního buněčného dělení před vytvořením spermatid játrovky *Makinoa crispate*. (B) Značené mikrotubuly vybíhající z pólů buňky, kde je lokalizováno konkrétní MTOC představované bicentriolami. (C) Značený γ -tubulin ukazuje lokalizaci MTOC na pólech dělicího vřeténka (Shimamura a kol., 2004).

5.2.2 Blefaroplast

Během spermatogeneze části mechorostů, kapradin, přesliček a některých nahosemenných rostlin, kdy se vytváří mnohobičíkaté spermatozoidy, vzniká velmi složitá sférická struktura nazývaná blefaroplast. Blefaroplast byl poprvé popsán v roce 1901 Webberem v pylových láčkách cykasu *Zamia* jako struktura, podílející se na vytvoření bičíku (citováno v Mizukami a Gall, 1966). Blefaroplast vzniká *de novo* během posledních dvou dělení před vznikem spermatozoidu a dává vznik bazálnímu tělísku a bičíku, který je přítomný pouze v této fázi rostlinného vývoje. Jak je patrné, blefaroplast není ve skutečnosti bazální tělísko, i když je tak někdy v literatuře označován. Blefaroplast stejně jako bicentriola vzniká v páru v mateřské buňce spermatid. Pokud blefaroplast některých kapradin vznikne ještě před vytvořením mateřské buňky spermatid, tedy ještě před předposledním buněčným dělením, zaniká po rozdělení jádra a znovu se vytváří až před závěrečnou mitózou (Renzaglia a Garbary, 2001).

Blefaroplast ve spermatogenních buňkách kapradiny *Marsilea* je plná struktura v průměru dosahující 1 mikrometru proděravělá mnoha „kanály“ (Obr. 12 A), které mají shodný průměr jako struktura vozového kola v procentriole. Mizukami a Gall (1966) vypočítali, že počet těchto „kanálů“ (kolem 100–150) je shodný s počtem bičíků ve zralých spermatozoidech. Blefaroplast této vodní kapradiny umožňuje *de novo* vznik procentriol, které mají strukturu podobnou ne však shodnou se strukturou centriol. Tyto procentrioly měří v průměru méně než běžné centrioly a není zde patrné typické uspořádání devíti tripletů, ačkoliv jsou tyto procentrioly rozděleny na devět podjednotek (Mizukami a Gall, 1966).

Blefaroplast kapradiny *Marsilea* se během závěrečných dvou dělení dvakrát duplikuje (Hepler, 1976). V mateřské buňce spermatid se nachází zpravidla dva blefaroplasty, které se v metafázi posledního buněčného dělení před vytvořením zralých spermatozoidů mění v duté struktury, tvořené radiálně uspořádanými procentriolami. Dva blefaroplasty se přesouvají na póly dělicího vřeténka, kde plní funkci MTOC. Po posledním buněčném dělení se blefaroplast rozpadá na samostatné procentrioly. Ty se poblíž jaderného obalu vyrovnávají do řady, prodlužují se a následně dozrají v centrioly, které se přesunou k periferii buňky, přemění se v bazální tělíska a dají tak vznik bičíku (Obr. 13). Vytvoření centriol v mladých spermatidách kapradiny *Marsilea* je dáno přidáním singletových nebo dubletových mikrotubulů ke struktuře procentrioly, která je tvořena singletovými mikrotubuly (Myles a Hepler, 1977; Mizukami a Gall, 1966).



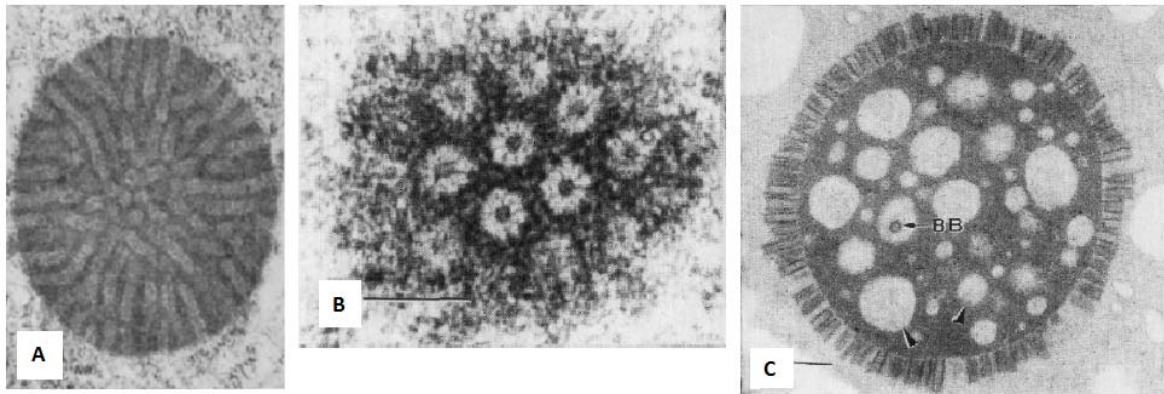
Obr. 13 Schéma fází přeměny blefaroplastu kapradiny *Marsilea* na bazální tělíska. Fáze 1 je představována plným blefaroplastem. Ve fázi 2 je blefaroplast dutý a tvořený radiálně uspořádanými procentriolami. Fáze 3 je typická rozpadem blefaroplastu na více procentriol. Ve fázi 4 dochází k vyrovnání procentriol do řady, jejich elongaci a vytvoření centriol, které se přemění na bazální tělíska a dají tak vznik bičíkům. Převzato z Mizukami a Gall (1966).

Ve spermatozoidech kapradiny *Ceratopteris* vzniká blefaroplast (Obr. 12 B) *de novo* během posledních dvou buněčných dělení před vytvořením spermatozoidů. V těchto dvou děleních organizuje interfázové mikrotubuly a dělicí vřeténko. Před každým z těchto dělení se blefaroplast duplikuje, putuje na póly vřeténka a slouží zde jako místo organizace mikrotubulů vřeténka. Po vytvoření spermatozoidů blefaroplast kapradiny *Ceratopteris*, stejně jako blefaroplast vodní kapradiny

Marsilea, dává vznik bazálním tělískům, která organizují mikrotubuly bičíků (Vaughn a Bowling, 2008).

Pro spermatogenesi cykasů je typický obrovský blefaroplast v průměru velký několik desítek mikrometrů, který dává vznik až několika tisícům bičíků, jejichž počet je nejvyšší v celé rostlinné říši. Blefaroplast mateřské buňky spermatid organizuje mikrotubuly dělicího vřeténka v buněčných děleních před vznikem spermatidy. Po vzniku spermatidy a během jejího zrání dává vznik centriolám, které se mění na bazální tělíska, která organizují bičíky. Blefaroplast cykasu *Zamia* je v průměru velký 10 mikrometrů. (Mizukami a Gall, 1966).

Jinan dvouláločný (*Ginkgo biloba*) je posledním zástupcem jinanů, skupiny rostlin, které dosáhly svého vrcholu v křídě. Jinan stejně jako kaprad'orosty a cykasy během spermatogeneze vytváří strukturu zvanou blefaroplast (Obr. 12 C). V prvních fázích spermatogeneze vzniká dvojitý blefaroplast rozdělený na dvě polokoule centrální deskou. Tyto dvě polokoule se oddělí, putují k pólům dělicího vřetenka a zvětší se na velikost kolem 4 mikrometrů (Gifford a Larson, 1980). Na periferii těchto struktur je uspořádáno okolo tisíc procentriol, každá s centrální strukturou kola u vozu a tvořená singletovými, dubletovými nebo tripletovými mikrotubuly. Blefaroplast se rozdělí rovnoměrně do každé spermatidy (Gifford a Larson, 1980). U cykasů ani jinanu nebyly nalezeny „kanály“ ve struktuře blefaroplastu, jak je tomu u kaprad'orostů (Duckett a Carothers, 1982).



Obr. 12 Snímky z elektronového mikroskopu zachycující blefaroplasty suchozemských rostlin. Blefaroplast, konkrétní MTOC organizující mikrotubuly dělicího vřetenka a dávající vznik bazálním tělískům lokomočního aparátu, se vyskytuje v buňkách procházejících spermatogenezí. Tato struktura dává vznik centriolám a může v různých druzích dosahovat různých velikostí. (A) Blefaroplast vodní kapradiny *Marsilea* tvořený mnoha procentriolami, jejichž počet se stejně jako u ostatních druhů rovná počtu budoucích bičíků zralého spermatozoidu. (B) Blefaroplast kapradiny *Ceratopteris richardii* má dobře patrné vznikající procentrioly. (C) Blefaroplast jinanu *Ginkgo biloba*, jehož centrioly uspořádané na povrchu blefaroplastu dávají vznik bazálním tělískům organizujícím několik tisíc bičíků. Světla místa značená šipkami představují specifická místa pro nukleaci mikrotubulů. V těchto místech se již může ojediněle nacházet zralé bazální tělísko (BB). (A) převzato z Mizukami a Gall (1966). (B a C) převzato z Renzaglia a Garbary (2001).

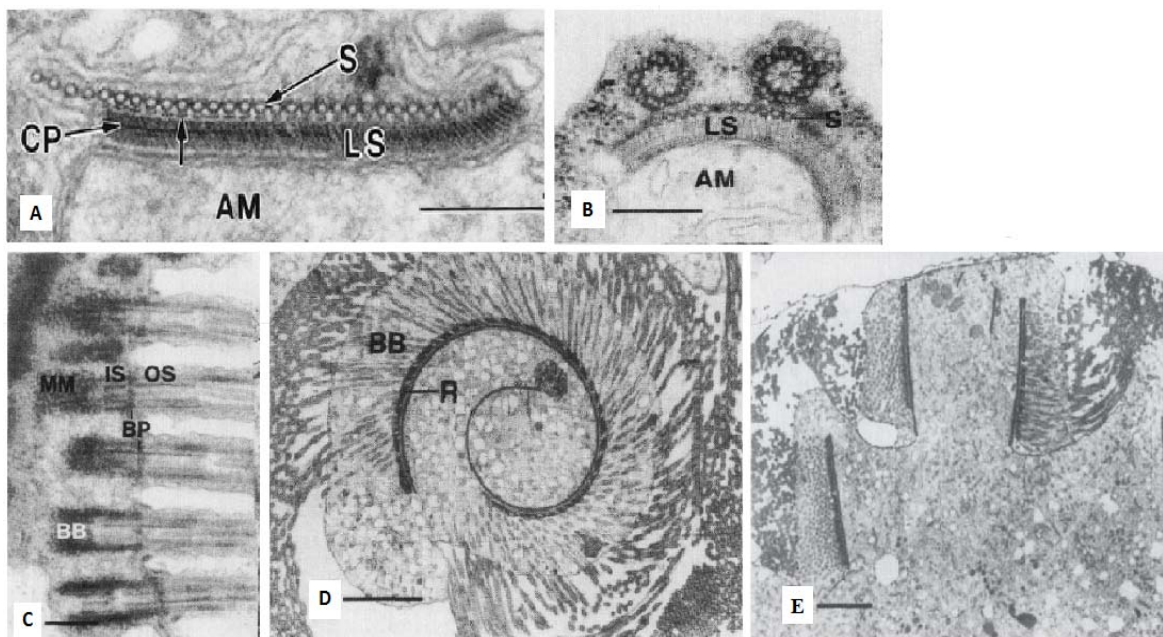
5.2.3 Lokomoční aparát

Poté, co dojde k vytvoření spermatid z mateřské buňky spermatid, je nutné vytvořit lokomoční aparát budoucího zralého spermatozoidu. Lokomoční aparát spermatozoidů suchozemských rostlin se skládá z tzv. vícevrstevné struktury (multilayered structure, MLS), bazálních tělísek a bičíků, jejichž mikrotubuly organizují. Jako konkrétní MTOC struktury tedy ve zralém spermatozoidu slouží bazální tělíska a část MLS zvaná lamelární pásek (viz dále).

Vznik lokomočního aparátu je synchronizovaný s přeměnou centriol bicentrioly nebo blefaroplastu na bazální tělíska. Ve dvoubičíkatých spermatozoidech se dvě centrioly tvořící

bicentriolu separují a v mladé spermatidě rotují, dokud se neusadí paralelně vedle sebe ve formě dvou bazálních tělísek. Ve vícebičíkatých spermatozoidech dochází k rozpadu blefaroplastu na jednotlivé centrioly, ty se vyrovnají do řady a přemění na bazální tělíska. Bazální tělíska se uspořádávají do řady podél MLS, jejíž tvorba je synchronizována s tvorbou bazálních tělísek, a také zánikem blefaroplastu či bicentriol, z jejichž materiálu pravděpodobně vzniká. Bazální tělíska ukotvená v MLS mohou být k sobě orientována paralelně nebo protistojně, tím je pak dána i orientace bičíků spermatozoidu (Renzaglia a Garbary, 2001).

MLS je struktura, která se nachází u charofytních řas i suchozemských rostlin, které během spermatogeneze vytváří bičíkaté spermatozoidy. Organizace jednotlivých složek MLS je specifická pro jednotlivé skupiny rostlin, proto slouží jako výborný znak pro určování jednotlivých taxonů. MLS je odvozena ze struktury bicentrioly nebo z blefaroplastu a podílí se na organizaci bičíkového aparátu. MLS se skládá z horní vrstvy svazku mikrotubulů nazývané „spline“ neboli v překladu mikrotubuly zakřivení (pro slovo „spline“ jsem nenalezla v žádné literatuře český ekvivalent) a spodní části vertikálně diferencovaných desek, tzv. lamelárního pásku (lamellar strip, LS), který je rozdělen centrální deskou (central plate, CP) (Obr. 14 A, B). Mikrotubuly zakřivení jsou nukleovány pomocí LS, jenž slouží jako konkrétní MTOC, a ve své délce LS často přesahují a pod plazmatickou membránou mohou obkružovat buňku. LS je tvořen destičkami z centrinu, proteinu asociovaného s MTOC živočichů, hub i rostlin. Tvar MLS vždy kopíruje charakteristický spirálovitý tvar spermatozoidů suchozemských rostlin (jak je patrné např. u spermatozoidu cykasů; Obr.14 D, E). Mezi hlavní funkce MLS patří ukotvení bazálních tělísek bičíků v buňce (Obr. 14 C) a udávání tvaru spermatozoidu. Mikrotubuly zakřivení a LS pravděpodobně dále zpevňují buňku spermatozoidu a udávají mu tvar, neboť spermatozoidy postrádají buněčnou stěnu (Renzaglia a Garbary, 2001).

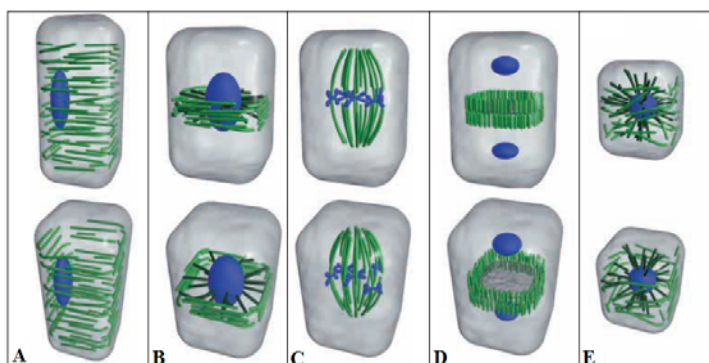


Obr. 14 Lokomoční aparát spermatozoidů suchozemských rostlin se skládá z vícevrstevné struktury (MLS), bazálních tělísek (BB) a bičíků. (A) Snímek z elektronového mikroskopu zachycující příčný řez vícevrstevnou strukturou (MLS) ve spermatozoidu kapradiny *Psilotum nudum*. MLS je tvořena svazkem mikrotubulů zvaným mikrotubuly zakřivení (angl. spline, S), pod kterým se nachází lamelární pásek (LS). Lamelární pásek je prořat centrální deskou (CP), která ho rozděluje na dvě části. MLS je vždy v blízkosti tzv. přední mitochondrie (AM). (B) MLS ve spermatozoidu hlevíku *Phaeoceros laevis* tvořený mikrotubuly zakřivení (S) a lamelárním páskem (LS). Pod MLS se nachází tzv. přední mitochondrie (AM), nad MLS leží paralelně vedle sebe bazální tělíska. (C) Bazální tělíska (BB) organizující bičíky spermatozoidu plavuně *Phylloglossum drummondii*. (D) Spermatozoid cykasu *Zamia integrifolia* s dobře patrným lokomočním aparátem, sestávajícím z MLS a elongovaných bazálních tělísek (BB). (E) Podélný řez spermatozoidem cykasu *Zamia integrifolia*, kde je spirální struktura lokomočního aparátu zachycená v příčném řezu. (A) převzato z Renzaglia a kol. (2001). (B-E) převzato z Renzaglia a Garbary (2001).

6. Nukleace mikrotubulárních struktur u vyšších rostlin

U vyšších rostlin existuje pět typických mikrotubulárních systémů, které se střídají během buněčného cyklu buňky (Hepler a kol., 1993; Lambert, 1993). Během interfáze jsou hlavní mikrotubulární strukturou **kortikální mikrotubuly** (Obr. 15 A). Další strukturou, vznikajícím během G2 fáze buněčného cyklu je **předprofázový prstenec** (Obr. 15 B), který zaniká rozpadem jaderné obálky v profázi. V profázi se začínají formovat mikrotubuly do podoby **dělicího vřeténka** (Obr. 15 C), které je přítomno do ukončení segregace chromosomů. Dělicí vřeténko vyšších rostlin je na rozdíl od dělicího vřeténka v buňkách obsahujících centrozom, typicky nekoncentrované na pólech, je však striktně bipolární i bez přítomnosti konkrétního MTOC. Po vzniku dceřiných jader se vytvoří mezi těmito jádry **fragmoplast** (Obr. 15 D) a dává vznik nové buněčné stěně, která jádra oddělí. Poslední mikrotubulární strukturou jsou **radiální mikrotubuly** (RMS), které jsou nukleovány

z jaderné obálky směrem k periférii buňky (Obr. 15 E) a objevují se ve chvíli, kdy je buňka připravená ukončit cytokinezi.



Obr. 15 Mikrotubulární systémy během buněčného dělení v buňkách vyšších rostlin. (A) Buňka v interfázi obsahuje systém kortikálních mikrotubulů (cMT). (B) Preprofáze buněčného dělení je charakteristická preprofázovým prstencem (PPB). (C) Polární struktura dělicího vřeténka přetrvávajícího v buňce od jeho vytvoření v profázi do ukončení segregace chromosomů. (D) Vytvoření fragmoplastu v telofázi a vznik nové buněčné desky. (E) Radiální mikrotubuly se šíří z jaderné obálky k periférii buňky. Převzato a upraveno z Wasteneys (2002).

Mazia (1984) navrhl hypotézu, že přesun materiálu nukleujícího mikrotubuly během buněčného cyklu a tedy existence pěti odlišných mikrotubulárních struktur v rostlinných buňkách může být vysvětlen pomocí flexibilního centrozomu. Po objevu rostlinného γ -tubulinu (Liu a kol., 1993), konzervované součásti MTOC, bylo prokázáno, že jeho lokalizace se mění v průběhu buněčného cyklu, a že rostlinný γ -tubulin se váže podél

celých mikrotubulů (Panteris a kol., 2000). Brown a Lemmon (2007), podobně jako Mazia (1984) navrhují koncepci rostlinných MTOC jako pleomorfní a migrující entity.

6.1 Mikrotubulární struktury rostlinné buňky

6.1.1 Kortikální mikrotubuly

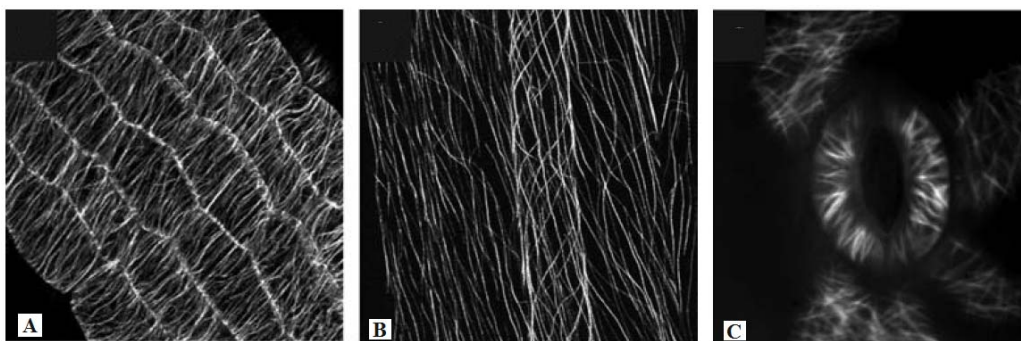
Kortikální mikrotubuly (cortical microtubules, cMT) je struktura přítomná v interfázových rostlinných buňkách včetně buněk zelených řas. Kortikální mikrotubuly poprvé popsali Ledbetter a Porter v roce 1963 (Ledbetter a Porter, 1963) jako unikátní strukturu nacházející se pouze v buňkách rostlin.

Kortikální mikrotubuly jsou svazky mikrotubulů lokalizované pod plazmatickou membránou a regulace funkce kortikálních mikrotubulů byla studována především u suchozemských rostlin. Jejich orientace v buňce se liší podle typů buněk (Obr. 16). V rychle rostoucích buňkách kořenů a etiolovaných hypokotylech, u nichž dochází k rychlé elongaci buněk, jsou kortikální mikrotubuly orientovány paralelně na sebe a příčně na hlavní osu buněčného dělení. Naopak v pokožkových buňkách listu jsou kortikální mikrotubuly uspořádány víceméně náhodně, nikoliv paralelně (Smith, 2003). Orientace kortikálních mikrotubulů souvisí s jejich funkcí v orientaci syntézy celulósových mikrofibril. Celulósově

mikrofibrily jsou základní složkou buněčné stěny rostlinných buněk a jsou to pevné provazce tvořené celulózu neschopné se natahovat. Proto je jejich orientace zásadním faktorem určujícím směr růstu buněk, neboť tento růst je možný pouze prostřednictvím oddalování mikrofibril od sebe ne jejich natahování. Celulózové mikrofibrily jsou syntetizovány na plazmatické membráně pomocí proteinového komplexu celulóza syntázy, která se skládá z rozet. Rozety se pohybují podél kortikálních mikrotubulů a tím udávají orientaci celulózových mikrofibril. Tento proces pohybu celulóza syntázových rozet podél mikrotubulů byl poprvé pozorován v buňkách řasy *Closterium* (Giddings a Staehelin, 1988). Vztah depozice buněčné stěny a orientace mikrotubulů byl zkoumán také v buňkách vyšších rostlin, kde bylo prokázáno, že mikrotubuly jsou schopné kontrolovat orientaci celulózy v buněčné stěně (Hasezawa a Nozaki, 1999; Paredez a kol., 2006; DeBolt a kol., 2007; Desprez a kol., 2007; Gutierrez a kol., 2009).

Kortikální mikrotubuly jsou dynamická struktura. V epidermálních buňkách *Arabidopsis thaliana* mikrotubuly migrují podél kortexu buňky pomocí mechanismu běžícího pásu (treadmilling mechanism). Tento pohyb je dán pomalou přerušovanou depolymerací kortikálních mikrotubulů na jejich minus konci a polymerační nestabilitou na plus konci mikrotubulů (Shaw a kol., 2003). Z toho vyplývá, že dynamická nestabilita mikrotubulů v interfázových buňkách *Arabidopsis thaliana* je hlavním mechanismem dynamického uspořádání kortikálních mikrotubulů.

γ -tubulin je během interfáze lokalizován v cytoplasmě a v kortexu buňky. Byla navržena myšlenka, že γ -tubulin mění svou lokalizaci a migruje z cytoplasmy na periferii buňky (Erhardt a kol., 2002). V kortexu buňky se γ -tubulin váže na existující kortikální mikrotubuly, nukleuje růst dalších mikrotubulů a umožňuje tak jejich větvení. Tento mechanismus nukleace mikrotubuly závislý na mikrotubulech je převládajícím způsobem nukleace mikrotubulů pod plasmatickou membránou (Murata a kol., 2005).



Obr. 16 Kortikální mikrotubuly v odlišných buňkách *Arabidopsis thaliana*. (A) Příčně uspořádané mikrotubuly v rychle se prodlužujících buňkách epidermis hypocotylu. (B) Podélná orientace mikrotubulů v epidermálních buňkách hypocotylu, který ukončil svůj růst. (C) Paralelní a příčné uspořádání kortikálních mikrotubulů ve svěřacích buňkách průduchu. Převzato z Ehrhardt a Shaw (2006).

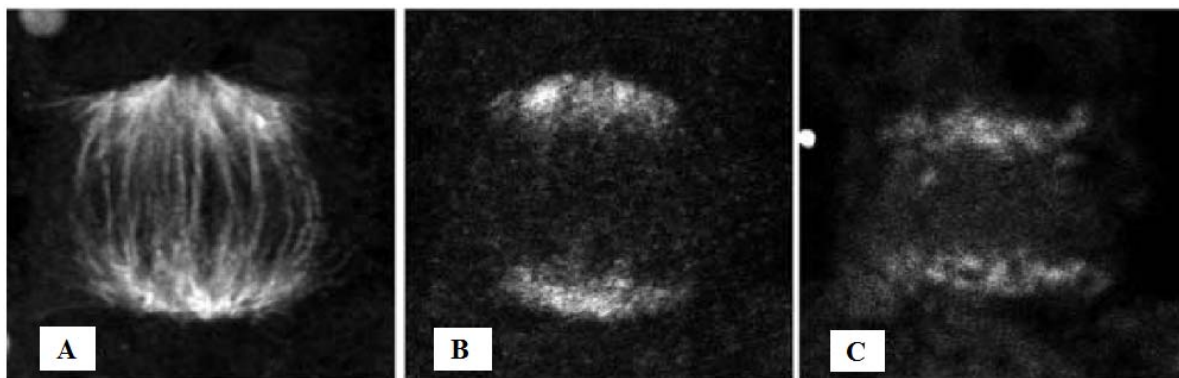
6.1.2 Předprofázový prstenec

Jak buňka přechází z interfáze do mitózy, jsou kortikální mikrotubuly nahrazeny předprofázovým prstencem (preprophase band, PPB). PPB vzniká i zaniká před zahájením mitózy a jeho funkcí je označení místa vzniku budoucí buněčné stěny. Toto označení vzniku budoucí buněčné stěny probíhá s pomocí proteinu TANGLED (TAN). Tento protein se během vzniku PPB nachází v kortikální části budoucího místa dělení, kde kolokalizuje s PPB a v tomto místě zůstává i po zániku PPB. TAN označuje toto místo vzniku budoucí buněčné stěny a přetrvává zde až do konce buněčného cyklu (Walker a kol., 2007).

6.1.3 Dělicí vřeténko

V profázi jaderného dělení v somatických buňkách je předprofázový prstenec nahrazen dělicím vřeténkem. Acentriolární dělicí vřeténko vyšších rostlin ovšem na rozdíl od dělicího vřeténka centrozomálního nevytváří astrální strukturu, jde tedy o acentriolární anastrální dělicí vřeténko. Póly vřeténka jsou široké, tvořené mikrotubuly organizovanými z více míst (Obr. 17) (Baskin a Cande, 1990). Během profáze je γ -tubulin soustředěn na jaderném obalu. Postupně se ovšem přesouvá na opačné póly, kde vytvoří polární čepičky. Po rozpadu jaderné obálky následuje vznik profázového dělicího vřeténka z polárních čepiček. V této fázi je γ -tubulin silně lokalizován v oblasti kinetochorů, méně je ho na polárních mikrotubulech vybíhajících k ekvatoriální rovině buňky (Liu a kol., 1993).

Pro úplnost zde ještě uvádím, že astrální acentriolární dělicí vřeténko s póly tvořenými konkrétním typem MTOC - polárním organizátorem - vytvářejí během profáze mitózy a meiózy játrovky (kap. 5.2). Centriolární dělicí vřeténko může být potom vytvářeno během posledního mitotického dělení před vznikem spermatozoidu u mechorostů, kaprad'orostů, cykasorostů a jinanů (kap. 5.2).



Obr. 17 Acentriolární dělicí vřeténko s širokými póly v buňkách endospermu *Coronopus didymus*. (A) Vizualizace mikrotubulů dělicího vřeténka v telofázi jaderného dělení. (B) Lokalizace γ -tubulinu na pólech vřeténka. (C) Chromosomy v telofázi jaderného dělení (Brown a Lemmon, 2007).

6.1.4 Fragmoplast

Fragmoplast se v ekvatoriální rovině buňky skládá ze dvou sad vzájemně propojených antiparalelních mikrotubulů, jejichž plus konce směřují k buněčné desce. Fragmoplast je tvořen nejprve tyčovitou strukturou, která je následně nahrazena prstencovou strukturou. Prstenec fragmoplastu roste centrifugálně, tedy od středu k periférii buňky. Lokalizace γ -tubulinu se mění spolu s rozšiřováním fragmoplastu. Fragmoplast může vznikat nejen mezi sesterskými jádry ale i mezi dvěma nesesterskými jádry. S fragmoplastem je asociováno velké množství váčků, které jsou po mikrotubulech dopravovány do středu fragmoplastu, kde z jejich obsahu vzniká nová buněčná stěna (Goddard a kol., 1994).

6.1.5 Radiální mikrotubuly

Radiální mikrotubulární systém (RMS) se objevuje v rostlinné buňce krátce poté, co byla dokončena cytokineze a nové dceřiné buňky v pletivu znovu vytvořily kortikální síť mikrotubulů pod plasmatickou membránou. Radiální mikrotubuly vybíhají z jádra směrem do cytoplasmy a jsou nukleovány na jaderné membráně. RMS je kromě toho také hlavním uspořádáním mikrotubulů u buněk, jež nejsou součástí propojených buněk v pletivu, jako jsou sporogenní a syncytiální buňky (Brown a Lemmon, 2007).

Například u mechorostů je vytvářen v meiotických buňkách procházejících sporogenezi, kde se podílí na správném průběhu cytokineze, zajišťující rovnoměrné rozmístění cytoplasmy a správnou tvorbu fragmoplastu (Brown a Lemmon, 1988). Mateřská buňka spor se dělí jedním buněčným dělením rovnou na čtyři spory. V jedné buňce tedy dochází k vytvoření čtyř jader, která od sebe musí být oddělena buněčnou stěnou. Depozice buněčné stěny je ovšem v tomto neobvyklém případě složitou záležitostí. V telofázi II buněčného dělení proto vzniká RMS, jehož mikrotubuly vybíhající z jádra směrem do buňky ustavují hranice budoucích čtyř spor. Tam kde se stýkají RMS sousedních jader budoucích spor vzniká fragmoplast a dále nová buněčná stěna (Shimamura a kol., 2004).

6.2 Nukleace mikrotubulů v rostlinné buňce

Většina semenných rostlin postrádá konkrétní MTOC. Vystává proto otázka, jak jsou mikrotubuly v buňkách těchto rostlin nukleovány.

6.2.1 Jaderný obal

Již v prvních studiích zkoumajících rostlinné mikrotubuly se objevuje myšlenka, že hlavním nukleačním místem mikrotubulů je jaderný obal. V těchto studiích byla pomocí

imunofluorescenčních nebo elektronových mikroskopů vizualizována distribuce tubulinu, potažmo tedy i mikrotubulů, v rostlinných buňkách. Jednou z metod bylo využití lidských protilátek, rozpoznávajících pericentriolární materiál, hlavní nukleární komponentu centrozomu. Epitopy rozeznávané těmito protilátkami byly nalezeny na periférii jádra a na pólech dělicího vřeténka (Clayton a kol., 1985). V dalších studiích zabývajících se problematikou nepřítomnosti konkrétního MTOC u rostlin byly využity heterologní protilátky rozeznávající živočišný γ -tubulin jako důkaz mikrotubuly nukleární aktivity jádra v buňkách vyšších rostlin (Lambert, 1980; Vantard a kol., 1990; Zhang a kol., 1990). Lambertová (1993) považovala samotný jaderný obal za centrum organizující mikrotubuly (Lambert, 1993), ale dnes je známé, že schopnost nukleace mikrotubulů mají proteiny tvořící γ -tubulinové komplexy lokalizované na jaderném obalu (Stoppin a kol., 1994).

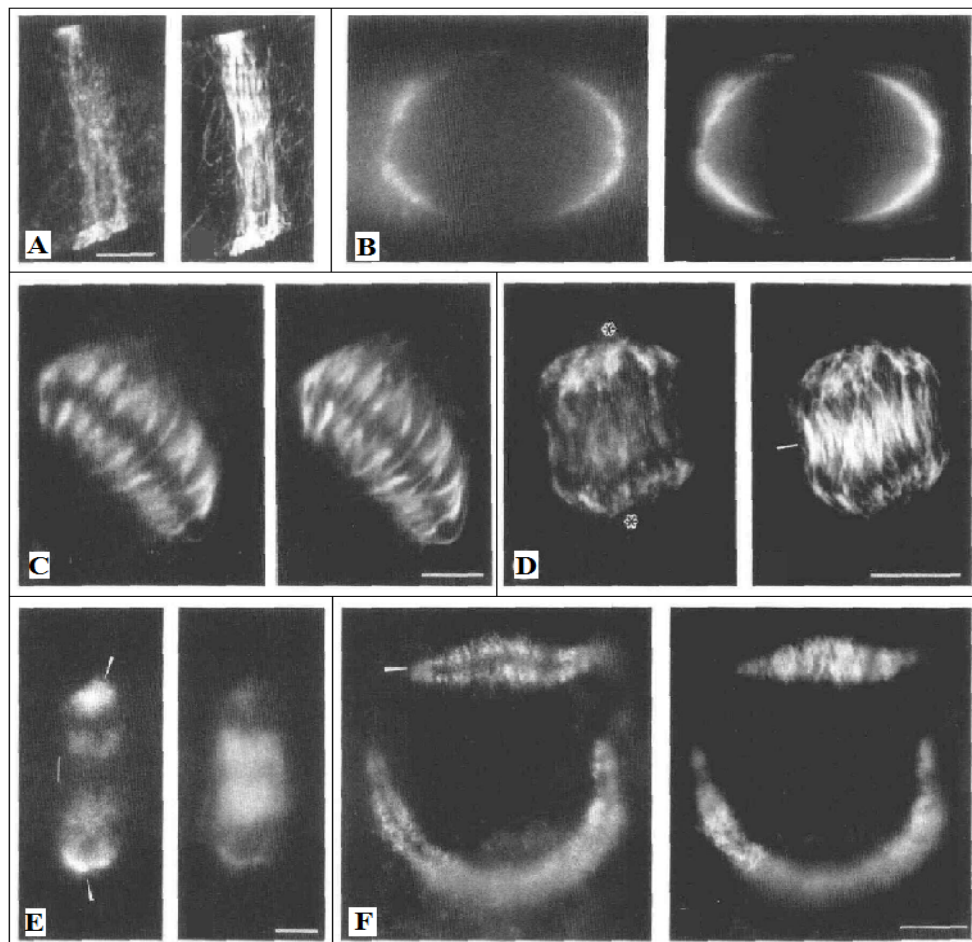
Stejně jako v buňkách živočichů a hub i v rostlinných buňkách je hlavní komponentou MTOC γ -tubulin. Zatímco u živočišných buněk je lokalizován v centrozomu, u rostlinných buněk je γ -tubulin disperzně rozmístěn podél mikrotubulů (Liu a kol., 1994, 1993). Homologní protein proteinu Spc98, který je jednou ze složek γ -tubulinového prstencového komplexu v buňkách živočichů a hub, byl lokalizován i na jaderném povrchu buněk tabáku (Erhardt a kol., 2002). Tento objev naznačuje, že jaderný obal má obdobné vlastnosti jako centrozom.

6.2.2 γ -tubulin

Protein γ -tubulin byl objeven a identifikován jako třetí člen rodiny tubulinů v buňkách vřeckovýtrusné houby *Aspergillus nidulans* (Oakley a Oakley, 1989). Další práce prokázaly, že je γ -tubulin lokalizován v MTOC živočichů (Stearns a kol., 1991; Zheng a kol., 1991) i hub (Horio a kol., 1991; Oakley a kol., 1990). Vzhledem k tomu, že byla potvrzena asociace γ -tubulinu s MTOC a zároveň s ostatními tubuliny, byla navržena myšlenka, že je γ -tubulin schopný nukleace mikrotubulů a ukotvení jejich minus konce v MTOC (Oakley a kol., 1990). Liu a kol. (1993) s využitím γ -tubulinových protilátek v buňkách cibule, sóji, tabáku a huseničku potvrdili, že se γ -tubulin nachází i v rozptýleném MTOC rostlin a to ve všech fázích rostlinného buněčného cyklu, i když se jeho lokalizace v buňce mění (Liu a kol., 1993, 1994). Ve výzkumu rostlinného rozptýleného MTOC se objev γ -tubulinu stal důležitým mezníkem, neboť je tento protein hlavním markerem MTOC, které je v rostlinných buňkách díky svému rozptýlenému charakteru těžko lokalizovatelné. Protilátky pro γ -tubulin usnadnily vizualizaci rozptýlených MTOC v rostlinných buňkách.

Je patrné, že protein γ -tubulin je univerzálním proteinem schopným nukleovat mikrotubuly, neboť se nachází v eukaryotních MTOC rozptýlených i konkrétních. γ -tubulin je přítomný v bazálních těliscích bičíkového aparátu (Liang a kol., 1996), SPB kvasinkových buněk (Horio a kol., 1991; Oakley a kol., 1990), centrozomu živočišných buněk (Stearns a kol., 1991; Zheng a kol., 1991), ve všech mikrotubulárních strukturách nižších i vyšších rostlin jako jsou QMS, polární organizátory, centriolární i acentriolární dělicí vřetenko, RMS (shrnutí v Shimamura a kol., 2004), elektrondenční materiál blefaroplastu (Vaughn a Bowling, 2008), kortikální mikrotubuly, PPB a fragmoplast (Liu a kol., 1993, 1994).

γ -tubulin je v buňkách rostlin lokalizován podél mikrotubulů a ve všech mikrotubulárních strukturách (Obr. 18). Ovšem jen málo γ -tubulinu je volně v cytosolu, většina je vázaná na membrány organel, na plasmatickou membránu nebo na jaderný obal (Stoppin-Mellet a kol., 2000).



Obr. 18 Lokalizace γ -tubulinu a β -tubulinu ve všech mikrotubulárních strukturách buněk vyšších rostlin. (A) Mikrotubuly PPB v profázi jaderného dělení. (B) Polární čepičky vznikajícího dělicího vřetenka. (C) γ -tubulin je v metafázi jaderného dělení lokalizován na kinetochorech. (D) Pozdní anafáze jaderného dělení. (E) Lokalizace γ -tubulinu ve vznikajícím fragmoplastu. (F) Pozdní fragmoplast. Převzato z Liu a kol. (1994)

V rostlinných buňkách jsou mikrotubuly nukleovány pomocí komplexu obsahujícího γ -tubulin (Stoppin a kol., 1994; Binarova a kol., 2006; Murata a Hasebe, 2007), který je obdobný γ -TuSC kvasinek a živočichů. Tento komplex je dán interakcemi mezi γ -tubulinem a proteiny gamma-tubulinového komplexu (gamma-tubulin complex proteins, GCP). Mezi GCP patří dva proteiny, které jsou schopné vázat γ -tubulin a jsou ortologní ke kvasinkovým proteinům Spc98 a Spc97. Těmito proteiny jsou *AtGCP3* ortologní protein Spc98 (Erhardt a kol., 2002) a *AtGCP2* ortologní protein Spc97. *AtGCP3* byl v rostlinných buňkách lokalizován na jaderném obalu (Erhardt a kol., 2002) i v kortexu buňky (Schmit a kol., 2003), což naznačuje jeho roli nukleace radiálních mikrotubulů i kortikálních mikrotubulů. V *AtGCP3* i *AtGCP2* byla nalezena sekvence pro cílení těchto proteinů na jaderný obal (NE targeting sequence) (Seltzer a kol., 2007), což by naznačovalo, jak probíhá proces přesunu komplexu obsahujícího γ -tubulin na jádro, odkud nukleuje radiální mikrotubuly.

7. Závěr

Vyšší rostliny, které během celého životního cyklu postrádají konkrétní MTOC, jenž je u nich nahrazeno rozptýleným MTOC, jsou nazývány acentrozomálními organismy. Ztráta konkrétního MTOC v buňkách vyšších rostlin souvisí s přechodem na fotosyntetický způsob výživy a existencí buněčné stěny. Právě buněčná stěna je hlavním faktorem, který vedl ke vzniku nových mikrotubulárních struktur, které jsou zodpovědné za její organizaci.

Ztráta konkrétního MTOC ovšem neproběhla u všech rostlin a ve všech fázích jejich životního cyklu. Některé suchozemské rostliny vytváří během určitých fází životního cyklu konkrétní MTOC, které je představované mnoha morfologicky odlišnými strukturami, které jsou však shodné svou funkcí. V rámci mechorostů existuje největší variabilita výskytu konkrétního MTOC, neboť mitotická a meiotická dělicí vřeténka jsou v některých fázích života organizována konkrétním MTOC (astrální acentriolární vřeténka). Nejlépe prostudovaným příkladem tvorby konkrétního MTOC u suchozemských rostlin je však tvorba bičíkatého spermatozoidu v buňkách procházejících spermatogenezí. Lokomoční aparát u těchto buněk se vytváří během zrání spermatidy na základě konkrétních MTOC, vzniklých *de novo* během posledních dělení před vznikem spermatidy. Tato konkrétní MTOC vymizela se vznikem pylové láčky.

Studium fascinujících struktur *de novo* a dočasně vytvářených konkrétních MTOC u vyšších rostlin poskytuje důležité informace o evoluci nejen nukleace mikrotubulů, ale i o funkci mikrotubulů samotných. Komplikovaná struktura lokomočního aparátu pohyblivých

gamet, jež je dobře popsána na ultrastrukturální úrovni, stále čeká na podrobný popis na úrovni molekulárního složení a regulace vývoje a funkce celého aparátu.

8. Použitá literatura

- Andersen, R.A., Barr, D.J.S., Lynn, D.H., Melkonian, M., Moestrup, Ø., Sleight, M.A.** (1991). Terminology and nomenclature of the cytoskeletal elements associated with the flagellar/ciliary apparatus in protists. *Protoplasma* 164: 1–8.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.,** (2005). *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání, Espero Publishing.
- Azimzadeh, J. a Bornens, M.** (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.* 120: 2139–42.
- Azimzadeh, J. a Bornens, M.** (2004). The centrosome in evolution. In *Centrosomes in Development and Disease*: 93-122.
- Balczon, R.** (1996). The centrosome in animal cells and its functional homologs in plant and yeast cells. *Int. Rev. Cytol.* 169: 25–82.
- Baskin, T. a Cande, W.** (1990). The Structure and Function of the Mitotic Spindle in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 277–315.
- Binarova, P., Vrlík, M., Cenklova, V., Prochazkova, J., Doskocilova, A., Volc, J., Bogre, L.** (2006). Gamma-Tubulin Is Essential for Acentrosomal Microtubule Nucleation and Coordination of Late Mitotic Events in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 18: 1199–1212.
- Bremer, K., Humphries, C.J., Mishler, B.D., Churchill, S.P.** (1987). On cladistic relationships in green plants. *Taxon* 36: 339–349.
- Bornens, M.** (2012). The centrosome in cells and organisms. *Science* 335: 422–6.
- Brown, R.C. a Lemmon, B.E.** (1988). Cytokinesis occurs at boundaries of domains delimited by nuclear-based microtubules in sporocytes of *Conocephalum conicum* (Bryophyta). *Cell Motil. Cytoskeleton* 11: 139–146.
- Brown, R.C. a Lemmon, B.E.** (2011). Dividing without centrioles: innovative plant microtubule organizing centres organize mitotic spindles in bryophytes, the earliest extant lineages of land plants. *AoB Plants*: 1–9.
- Brown, R.C., a Lemmon, B.E.** (1990). Polar organizers mark division axis prior to preprophase band formation in mitosis of the hepatic *Reboulia hemisphaerica* (Bryophyta). *Protoplasma* 156: 74–81.
- Brown, R.C. a Lemmon, B.E.** (2013). Sporogenesis in Bryophytes: Patterns and Diversity in Meiosis. *Bot. Rev.* 79: 178–280.
- Brown, R.C. a Lemmon, B.E.** (2001). Sporogenesis in Eusporangiate Ferns: I. Monoplastidic Meiosis in Angiopteris (Marattiales). *J. Plant Res.* 114: 223–235.

- Brown, R.C. a Lemmon, B.E.** (2007). The Pleiomorphic Plant MTOC: An Evolutionary Perspective. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 1142–1153.
- Brown, R.C. a Lemmon, B.E.** (1997). The quadripolar microtubule system in lower land plants. *J. Plant Res.* 110: 93–106.
- Byers, B. a Goetsch, L.** (1975). Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 124: 511–23.
- Cavalier-Smith, T.** (1978). Eukaryotic kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14: 461–481.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J.B., Bettencourt-Dias, M.** (2011). Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* 194: 165–75.
- Clayton, L., Black, C.M., Lloyd, C.W.** (1985). Microtubule nucleating sites in higher plant cells identified by an auto-antibody against pericentriolar material. *J. Cell Biol.* 101: 319–24.
- Dawe, H.R., Farr, H., Gull, K.** (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell Sci.* 120: 7–15.
- DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W., Melo, C. V, Ross, L., Cutler, S.R., Somerville, C., Bonetta, D.** (2007). Morlin, an inhibitor of cortical microtubule dynamics and cellulose synthase movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 5854–9.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H., Gonneau, M., Vernhettes, S.** (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 15572–7.
- Duckett, J.G. a Carothers, Z.B.** (1982). The assembly of flagella during spermatogenesis in land plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 35: 533–61.
- Ehrhardt, D. a Shaw, S.** (2006). Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 859–875.
- Erhardt, M., Stoppin-Mellet, V., Campagne, S., Canaday, J., Mutterer, J., Fabian, T., Sauter, M., Muller, T., Peter, C., Lambert, A.-M., Schmit, A.-C.** (2002). The plant Spc98p homologue colocalizes with gamma-tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *J. Cell Sci.* 115: 2423–31.
- Geimer, S. a Melkonian, M.** (2004). The ultrastructure of the *Chlamydomonas reinhardtii* basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J. Cell Sci.* 117: 2663–74.
- Gibbons, I.** (1961). The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 179–205.
- Gibson, I.R. a Grimstone, A.V.** (1960). On flagellar structure in certain flagellates. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 697–716.
- Giddings, T.H. a Staehelin, L.A.** (1988). Spatial relationship between microtubules and plasma-membrane rosettes during the deposition of primary wall microfibrils in *Closterium* sp. *Planta* 173: 22–30.

- Gifford, E. a Larson, S.** (1980). Developmental features of the spermatogenous cell in *Ginkgo biloba*. *Am. J. Bot.*: 119–124.
- Goddard, R.H., Wick, S.M., Silflow, C.D., a Snustad, D.P.** (1994). Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. *Plant Physiol.* 104: 1–6.
- Gönczy, P.** (2012). Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 425–35.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J.J., Paredes, A.R., Emons, A.M.C., Ehrhardt, D.W.** (2009). Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat. Cell Biol.* 11: 797–806.
- Hasezawa, S. a Nozaki, H.** (1999). Role of cortical microtubules in the orientation of cellulose microfibril deposition in higher-plant cells. *Protoplasma* 209: 98–104.
- Hepler, P., Cleary, A., Gunning, B., Wadsworth, P., Wasteneys, G., Zhang, D.** (1993). Cytoskeletal dynamics in living plant cells. *Cell Biol.* 17: 127–142.
- Hepler, P.K.** (1976). The blepharoplast of *Marsilea*: its de novo formation and spindle association. *J. Cell Sci.* 21: 361–90.
- Hodges, M., Wickstead, B., Gull, K., Langdale, J.** (2012). The evolution of land plant cilia. *New Phytol.* 195: 526–540.
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M.K., Oakley, B.R., Tanaka, K., Yanagida, M.** (1991). The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J. Cell Sci.* 99: 693–700.
- Inoué, S. a Sato, H.** (1967). Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J. Gen. Physiol.* 50: 259–92.
- Jaspersen, S.L. a Winey, M.** (2004). The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 1–28.
- Knop, M., Pereira, G., Schiebel, E.** (1999). Microtubule organization by the budding yeast spindle pole body. *Biol. Cell* 91: 291–304.
- Lambert, A.M.** (1993). Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 116–22.
- Lambert, A.M.** (1980). The role of chromosomes in anaphase trigger and nuclear envelope activity in spindle formation. *Chromosoma* 76: 295-308.
- Ledbetter, M. a Porter, K.** (1963). A“ microtubule” in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.*: 239–250.
- Liang, A., Ruiz, F., Heckmann, K., Klotz, C., Tollon, Y., Beisson, J., Wright, M.** (1996). Gamma-tubulin is permanently associated with basal bodies in ciliates. *Eur. J. Cell Biol.* 70: 331–8.
- Liu, B., Joshi, H.C., Wilson, T.J., Silflow, C.D., Palevitz, B.A., Snustad, D.P.** (1994). Gamma-Tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* 6: 303–14.

- Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C., Palevitz, B.** (1993). A gamma-tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 4: 1217–28.
- Marc, J.** (1997). Microtubule-organizing centres in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 223–230.
- Mizukami, I. a Gall, J.** (1966). Centriole replication. II. Sperm formation in the fern, *Marsilea*, and the cycad, *Zamia*. *J. Cell Biol.* 29: 97–111.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Guénebaut, V., Heuser, J., Agard, D.A.** (2000). Structure of the [gamma]-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 2: 365–370.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., Agard, D.A.** (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378: 638–40.
- Murata, T. a Hasebe, M.** (2007). Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. *J. Plant Res.* 120: 73–8.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., Hasebe, M.** (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* 7: 961–8.
- Myles, D.G. a Hepler, P.K.** (1977). Spermatogenesis in the fern *Marsilea*: microtubules, nuclear shaping, and cytomorphogenesis. *J. Cell Sci.* 23: 57–83.
- Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., Jung, M.K.** (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289–301.
- Oakley, C.E. a Oakley, B.R.** (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338: 662–4.
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O.C., Milligan, R.A., Iwamatsu, A., Mitchison, T.J., Zheng, Y.** (1999). Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell Biol.* 144: 721–33.
- Panteris, E., Apostolakis, P., Gräf, R., Galatis, B.** (2000). Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetative cells of higher plants. *Protoplasma*: 179–187.
- Paredez, A.R., Somerville, C.R., Ehrhardt, D.W.** (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312: 1491–5.
- Pickett-Heaps, J.D.** (1969). The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative cytology in dividing plant cells. *Cytobios* 1:257–280
- Porter, K.R.** (1966). Cytoplasmic microtubules and their functions. *Ciba foundation symposium on principles of biomolecular organization*: 308–345.
- Preble, A.M., Giddings, T.M., Dutcher, S.K.** (2000). Basal bodies and centrioles: their function and structure. *Curr. Top. Dev. Biol.* 49: 207–33.

- Renzaglia, K., Johnson, T., Gates, H., Whittier, D.** (2001). Architecture of the sperm cell of *Psilotum*. *Am. J. of Bot.* 88: 1151–1163.
- Renzaglia, K.S. a Garbary, D.J.** (2001). Motile Gametes of Land Plants: Diversity, Development, and Evolution. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 20: 107–213.
- De Robertis, E. a Franchi, C.M.** (1953). The submicroscopic organization of axon material isolated from myelin nerve fibers. *J. Exp. Med.* 98: 269–76.
- Seltzer, V., Janski, N., Canaday, J., Herzog, E., Erhardt, M., Evrard, J.-L., Schmit, A.-C.** (2007). *Arabidopsis* GCP2 and GCP3 are part of a soluble gamma-tubulin complex and have nuclear envelope targeting domains. *Plant J.* 52: 322–31.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., Ehrhardt, D.W.** (2003). Sustained Microtubule Treadmilling in *Arabidopsis* Cortical Arrays. *Science* 300: 1715–1719.
- Shimamura, M., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Akashi, T., Mizuno, K., Nishihara, N., Tomizawa, K.-I., Yoshimoto, K., Deguchi, H., Hosoya, H., Horio, T., Mineyuki, Y.** (2004). Gamma-tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell* 16: 45–59.
- Schmit, A.C., Canaday, J., Herzog, E., Campagne, S, Seltzer, V., Campagne, S., Evrard, J.L. Lambert, A.M.** (2003) Molecular Mechanisms of Microtubule Nucleation in Synchronized Tobacco BY-2 Cells. Berlin: Springer Verlag 53: 66-80.
- Smith, L.G.** (2003). Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 63–73.
- Stearns, T., Evans, L., Kirschner, M.** (1991). Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65: 825–36.
- Stoppin, V., Vantard, M., Schmit, A.C., Lambert, A.M.** (1994). Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity. *Plant Cell* 6: 1099–1106.
- Stoppin-Mellet, V., Peter, C., Lambert, A.M.** (2000). Distribution of γ -Tubulin in Higher Plant Cells: Cytosolic γ -Tubulin is Part of High Molecular Weight Complexes. *Plant Biol.* 2: 290–296.
- Tilney L.G.** (1971). Origin and continuity of microtubules. In *Origin and Continuity of Cell Organelles*: 222-260.
- Tilney, L.G. a Goddard, J.** (1970). Nucleated sites for the assembly of cytoplasmic microtubules in the ectodermal cells of blastulae of *Arbacia punctulata*. *J. Cell Biol.* 46: 564–75.
- Vantard, M., Levilliers, N., Hill, A.M., Adoutte, A., Lambert, A.M.** (1990). Incorporation of *Paramecium* axonemal tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 8825–9.
- Vaughn, K.C. a Bowling, A.J.** (2008). Recovery of microtubules on the blepharoplast of *Ceratopteris* spermatogenous cells after oryzalin treatment. *Protoplasma* 233: 231–40.

- Walker, K., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, D., Smith, L.** (2007). Arabidopsis TANGLED Identifies the Division Plane throughout Mitosis and Cytokinesis. *Curr. Biol.* 17: 1827–1836.
- Wasteneys, G.O.** (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell Sci.* 115: 1345–54.
- Wolfe, J.** (1972). Basal body fine structure and chemistry. *Adv. Cell. Mol. Biol.* 2: 151-92.
- Yubuki, N. a Leander, B.S.** (2013). Evolution of microtubule organizing centers across the tree of eukaryotes. *Plant J.* 75: 230–44.
- Zhang, D., Wadsworth, P., Hepler, P.K.** (1990). Microtubule dynamics in living dividing plant cells: confocal imaging of microinjected fluorescent brain tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 8820–4.
- Zheng, Y., Jung, M.K., Oakley, B.R.** (1991). Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65: 817–23.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., Mitchison, T.** (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578–83.