

k vývoji embrya do blastocysty, ale i k březosti pokračující téměř do porodu. Podobně se chovalo i rekonstruované embryo s jádrem buvola v bovinním ooplastu. Realnost představ o využití mezidruhového přenosu jader podpořil především experiment, kde za dárce jádra sloužila granulózní buňka uhynulého muflona přenesená do cytoplazmy ovce. Embrya kultivovaná do blastocysty vedla v tomto případě nejen k březosti příjemkyně (ovce), ale i k narození mufloního mláděte (obr. 5).

Zdá se, že klíčovým problémem v těchto případech nejsou jen dárcovské buňky, ale i vhodné oocyty pro jejich reprogramaci a v neposlední řadě volba příjemkyně, která by umožnila pokračování vývoje embrya až do porodu. Pro záchranu ohrožených savců by mohla být zajímavá informace o překvapivé toleranci jádra ke zcela nefyziologickým faktorům, např. zvýšené teplotě, a o jeho schopnosti podporovat další vývoj embrya do narození. Lze předpokládat, že

se podobná tolerance projeví i po vystavení jádra některým dalším fyzikálním a chemickým faktorům.

Z pohledu současných znalostí patří představa o znovuzrození dávno vyhynulých savců pomocí klonování spíše do ne-reálné fantazie. Občas se sice setkáváme s překvapujícími zprávami, k nimž patří i vytvoření blastocyst z jader buněk lidských fibroblastů přenesených do králičích ooplastů (Ying Chen a kol. 2003). Vývoj 10 % rekonstruovaných embryí do stadia blastocysty bez ohledu na stáří dárců jader vyvolal pochopitelný zájem a živou diskusi v odborných kruzích. Ty se soustředily zejména na charakteristiku vlastností vybraných typů buněk, hypoteticky kmenových, izolovaných z embryoplastu, a na chování buněk s lidským jádrem a mitochondriemi králíka a pochopitelně na využití některých typů již diferencovaných buněk perspektivně v humánní medicíně. Výjimečnou pozornost vzbudily i nedávné pokusy o produkci

kmenových buněk z klonovaných blastocyst původem z lidských jader i ooplastů. Jedna z publikovaných prací (Hwang a kol. 2004, 2005) dokonce oznámila ustavení původně jedné a dnes, podle dosud nezveřejněných informací, již několika linií nediferencovaných lidských embryonálních kmenových buněk. Navíc autoři dokázali jejich schopnost vytvářet po navození diferenciace řadu specializovaných buněk přítomných v zárodečných listech (endodermu, mezodermu, ektodermu), dokazujících jejich pluripotenci. Podobné experimenty u ostatních primátů nekončily tak nadějnými výsledky a naznačily, že buď současná technika (zřejmě enukleace), nebo jiné blíže nespecifikované příčiny vedly k poruchám při tvorbě děličího vřeténka a masivní aneuploidii končící zastavením dělení.

V následující části krátce pojednáme o některých problémech provázejících klonování a zmíníme se také o perspektivách, které přenos jader nabízí pro budoucnost.

## Kvasinky a zdraví rostlin

Václav Kúdela, Václav Krejzar, Radka Krejzarová, Iveta Pánková

K úzké vazbě mezi rostlinami a kvasinkami mohlo dojít přibližně před 200 miliony let. Lidé přicházejí do přímého kontaktu s kvasinkami spolu s příjmem rostlinné potravy. Přítomnost kvasinek na rostlinách začal člověk od pradávna využívat, aniž by o jejich existenci něco tušil.

Nejen příznivci pivního moku nebo lahodného vína, ale i širší veřejnost má dnes povědomí o úzkém vztahu mezi dužnatými sladkými plody nebo suchými škrobnatými rostlinnými produkty, kvasinkami, alkoholovým kvašením a kvasnými nápoji. Některé kvasinky mohou být z pohledu člověka považovány za škodlivé. Podílejí se např. na nezhodnocení potravin, a to nejen rostlinného, ale i živočišného původu. Mezi kvasinkami se nacházejí původci onemocnění člověka, která u jedinců s oslabeným imunitním systémem mohou vyvolat závažná narušení zdraví. Jsou např. příčinou systémových, slizničních a kožních onemocnění (kandidózy). Vazba kvasinek s rostlinami je fylogeneticky staršího data než vztah mezi člověkem a kvasinkami, ale až donedávna bylo k dispozici málo přesvědčivých důkazů o schopnosti kvasinek způsobit chorobu rostlin. Fytopatogenita je charakteristická pro viroidy, některé viry a bakterie a mnohé houby.

V tomto příspěvku pojednáváme o úloze kvasinek na povrchu nadzemních rostlinných orgánů, o vztahu mezi kvasinkami a zdravotním stavem rostlin, o tom, zda kvasinky mohou u rostlin vyvolat onemocnění, ovlivnit vznik a průběh infekčních chorob a být využity v biologické ochraně.

### Problémy s klasifikací kvasinek

Kvasinky či kvasinkovité organismy ne tvoří samostatnou taxonomickou jednotku.

Je to obtížně definovatelná, uměle vytvořená heterogenní skupina hub. Za kvasinku se považuje pučivá houba, která se množí nepohlavně, pohlavně nebo oběma způsoby. Většinou se však termín kvasinka vztahuje na jednobuněčné pučivé houby, které se množí pouze nepohlavně. Radí se k houbám vřecokvýtrusým (*Ascomycota*), stopkovýtrusým (*Basidiomycota*) a anamorfním (mitosporickým, konidiálním, „nedokonalým“). Vřecokvýtrusé druhy se někdy označují jako pravé kvasinky.

Společným znakem všech kvasinek je, že rostou jako samostatné buňky, které se nepohlavně dělí na dceřiné buňky buď pučením, nebo (méně často) přehrádečným (příčným) dělením. Tím se liší od většiny hub, které rostou ve formě vláknitých hyf. Avšak absence vláknitých forem není pro kvasinky typickým znakem. Některé z nich jsou totiž dimorfní, tj. v závislosti na vnějších podmínkách mohou střídát kvasinkovitou fázi s fází vláknitou (hyfální). Dceřiné buňky některých pučivých kvasinek se při dělení neoddělují a vznikají řetězky buněk, které vytvářejí tzv. pseudomycelium. Identifikace kvasinek podle mikroskopických morfologických znaků je — na rozdíl od mnohých hub — velmi obtížná. Morfologické znaky mohou být využity nanejvýš k určení na úrovni rodu. Důležitým znakem při identifikaci kvasinek na druhové úrovni je schopnost využívat různé zdroje uhlíku a dusíku, podobně jako se biochemickými metodami určují bakterie.

### Rozvoj mikrobiologie fylosféry

Toto nové odvětví mikrobiologie se začalo rozvíjet od 70. let 20. stol. Zabývá se mikrobiologickými jevy vzdušného prostoru, který obklopuje nadzemní části rostliny (fylosféra). V rámci této disciplíny jsou studovány zejména fyloplanní (epifytické) mikroorganismy, tj. ty, které se vyskytují na povrchu nadzemních částí rostlin, zejména listů. Termín fyloplan se však často vztahuje nejen na povrch listů, jak by se mohlo odvozovat podle řeckého původu tohoto slova, ale i na povrch ostatních nadzemních orgánů. Na mikrobiologickém výzkumu fyloplanní se podílejí bakteriologové, mykologové, ekologové, fytopatologové, molekulární biologové, populační biologové a aerologové.

Fyloplanní organismy využívají jako zdroj výživy látky vylučované hostitelskou rostlinou na její povrch. Děje se tak prostou difuzí, vylučováním sekundárními žlázkami (žláznatými trichomy) nebo hydratodami (vodními skulinami). K metabolickému propojení fyloplanních organismů s hostitelskou rostlinou nedochází. Ve fyloplanní mikroflóře převažují neparazitické mikroorganismy (viz dále), ale mohou v ní být zastoupeny (přechodně či trvaleji) i mikroorganismy parazitické, např. původce bakteriální spály růžovitých rostlin *Erwinia amylovora*.

Celkové množství fyloplanních mikroorganismů i jejich druhové spektrum se mění v závislosti na hostitelské rostlině, stanovišti (biotopu), vegetační době, růstové fázi rostlin a průběhu počasí. Populace mikroorganismů kolonizujících v určitých podmínkách povrch listů určitého druhu rostlin vytvářejí specifickou ekologickou niku, tj. soubor biotických a abiotických faktorů, které v koloběhu látek a toků energie plní specifickou funkci a v souhrně s jinými nikami zabezpečují fungování určitého ekosystému. Obdobné funkce v odlišných ekologických podmínkách plní rozdílné druhy organismů.

### Složení fyloplanní mikroflóry

Hlavní složkou fyloplanní mikroflóry jsou bakterie, kvasinky a vláknité houby. Po většinu vegetace v listovém povrchu dominují kvasinky, které v hmotnosti biomasy převyšují jiné mikroorganismy v poměru 50:1.



K nejčastěji izolovaným kvasinkám nacházejícím se ve fyloplanu rostlin mírného pásma patří druh *Aureobasidium pullulans* (viz obr.), dále pak tzv. růžové kvasinky (rodů *Sporobolomyces* a *Rhodococcus*) a bílé kvasinky (hlavně druhu r. *Cryptococcus*). Počet těchto organismů kolísá v závislosti na stáří a typu listu a na termínu odběru vzorku. U některých druhů může dosahovat  $10^7$  jednotek vytvářejících kolonie (CFU = colony forming unit) na 1 gram čerstvé hmotnosti listového materiálu (viz obr.).

Příčiny ekologické úspěšnosti kvasinek v porovnání s jinými fyloplanními organismy nejsou zcela objasněny. Spatřují se v morfologické adaptaci na stresy vnějšího prostředí, toleranci k vzdušným polutantům (znečištění) a fytoalexinům (látkám produkovaným rostlinami na ochranu proti fytopatogenům). Obecně se předpokládá, že příčina ekologické úspěšnosti kvasinek ve fyloplanu nespočívá v produkci antimikrobiálních sloučenin, i když některé kmeny určitých druhů kvasinek je vylučují (např. druh *Aureobasidium pullulans*).

#### Kvasinky jako ukazatel kvality ovzduší

Ve fyloplanní mikroflóře jsou velmi početně zastoupeny kvasinky rodu *Sporobolo-*

*Povrch staré kolonie Aureobasidium pullulans, nejčastěji izolované kvasinky z fyloplanu rostlin mírného pásma, nahore. Mladé kolonie jsou bílé až krémově žluté, mají mazlavý a vlhký povrch. Stárnutím se povrch kolonie mění na sametově hnědý až černý, mikroskopicky lze pozorovat přítomnost vláken (hyf) ♦ Plstnatý charakter mycelia houby Botrytis cinerea, dole. V pravém dolním rohu jsou dobře patrná tvrdá klubka hyf, nazývaná sklerocia, sloužící pro přečkávání nepříznivých období (např. přezimování). Snímky M. Kuthana, není-li uvedeno jinak*

*myces* (viz obr.). Vyznačují se tím, že jsou velmi citlivé na znečištění v ovzduší, zejména pak na oxid siřičitý. Jelikož se kvasinky velmi rychle množí, účinek škodlivin se rychle projeví úbytkem kvasinek tohoto rodu v populaci fyloplanní mikroflóry. To vedlo k myšlence využít kvasinky k monitorování krátkodobých změn v kvalitě ovzduší.

Testování je relativně jednoduché. Připraví se Petriho misky se sladinkovým agarem. Na vnitřní stranu víčka Petriho misky se vazelínou upevní disky o průměru 5 mm vyříznuté z listů javoru (nebo jiných druhů). Pokud jsou na listovém disku přítomny kvasinky r. *Sporobolomyces*, vystřelované bazidiospory dopadají na živné médium. Podle četnosti vyrostlých kolonií se usuzuje na přítomnost škodlivin v ovzduší.

#### Kvasinky jako původci chorob rostlin?

Otazník v nadpise má naznačit, že odpověď závisí na tom, které organismy zahrneme pod pojmy kvasinka (viz výše) a rostlina (o jaký druh rostliny půjde a zda budeme rozlišovat rostliny před sklizní od sklizených produktů). Kvasinky mají určitý význam v posklizňové fytopatologii jako příležitostní patogeni skladovaných rostlinných produktů. Při skladování dužnatých plodů v nevhodných podmínkách způsobují měkké vodnaté hniloby doprovázené kyselým kvasničným pachem a někdy i bělavým povlakem na povrchu postižených rostlinných částí (viz obr.).

Na slupce jablek a hrušek se velmi často setkáváme s tzv. rzivostí (viz obr.). Příznak rzivosti se objevuje v reakci na odumření epidermálních a hypodermálních buněk. Na odumření těchto povrchových buněk se podílejí faktory převážně abiotické, ale vliv mohou mít i faktory biotické, mezi něž někteří autoři řadí nověji i kvasinky.

Až do nedávné doby chyběl doklad o schopnosti určitých druhů nebo kmenů kvasinek proniknout dovnitř hostitelských pletiv a navázat parazitický vztah s celistvou rostlinou v přirozených podmínkách příznivých pro rostlinu, a to i přesto, že všechny fyloplanní kvasinky nebo většina z nich vykazuje kutinolytickou (schopnost rozkládat vnější vrstvu pokožkových buněk — kutikulu), mnohé lipolytickou a některé proteolytickou aktivitu (štěpí lipidy a proteiny). Zřejmě jim však většinou chybějí další nezbytné vlastnosti fytopatogenity.

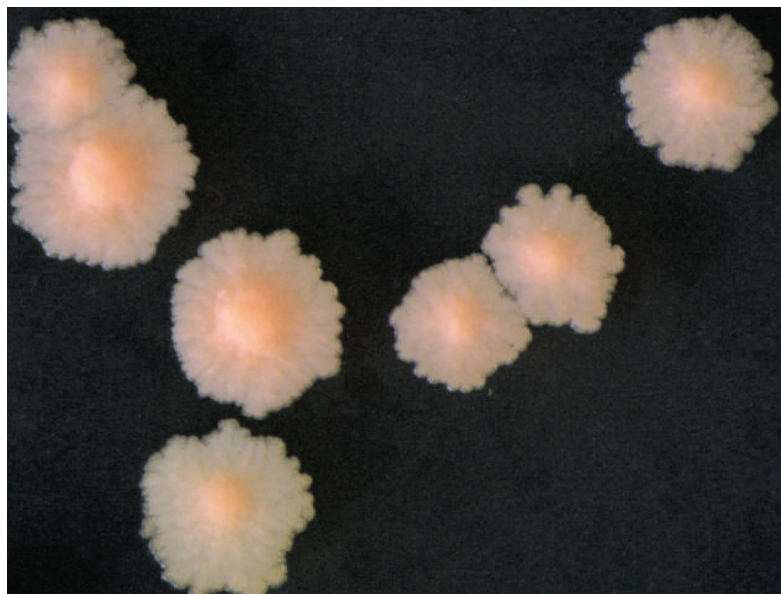
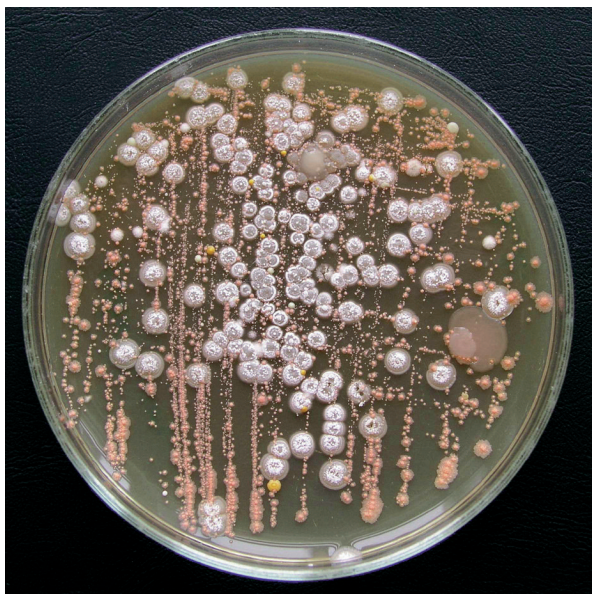
V r. 2001 byla publikována práce (S. Gognies, A. Belarbi, E. A. Barka), která označuje určité kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* za potenciálního patogena révy vinné. Kmeny vykazující pektinolytickou aktivitu způsobily v infekčních pokusech zpomalení růstu, nekrózy a odumírání mladých rostlin. Kromě toho v posledních letech přibývá také dokladů o možné spoluúčasti fyloplanních kvasinek na rzivosti slupky jaderovin projevující se v průběhu vegetace.

#### Reakce fyloplanních kvasinek na ošetření rostlin fungicidy

Ošetření fungicidy proti původcům houbových chorob v polních podmínkách má vliv také na necílové organismy, k nimž patří i kvasinky nacházející se na povrchu rostlin. Širší druhové spektrum kvasinek potlačují fungicidy na bázi ditianonu a dodine. Proti specifickým druhům kvasinek je účinný kaptan a tolylfluand. K neúčinným látkám patří pyrimetanol a bupirimate. Potlačení populace fyloplanních kvasinek běžně používanými fungicidy nabývá na významu v souvislosti s poznatky o jejich roli při redukci některých závažných houbových patogenů rostlin.

#### Využití kvasinek v ochraně rostlin a rostlinných produktů

Posklizňové hniloby broskví, jablek a jiných plodů způsobované houbami rodu *Penicillium*, *Botrytis* (viz obr.) aj. mohou být výrazně potlačeny aplikací saprofytických kvasinek. Epifytické kvasinky brání klíčení konidií těchto hub na principu kompetice o živiny. Suspenze kvasinek (inokulum) se aplikuje před sklizní v různých fázích vývoje plodů nebo se do inokula



Nárůst kvasinek, aktinomycet a bakterií na živné půdě po roztěru suspenze získané smyvem (třepáním vzorku ve vodě po určitou dobu) z listů orchideje poskytuje představu o složení fyloplanní mikroflóry, nahoře. Foto V. Krejzar ♦ Příznak rzivosti na slupce jablek, dole. K faktorům, které se podílejí na vzniku rzivosti, se mimo jiné řadí i kvasinky. Foto V. Kúdela a M. Novák

ponoří sklizené plody. Druh kvasinky *Candida oleophila* je součástí komerčního preparátu používaného k zmírnění posklizňových hnilob citrusových plodů a jablek.

#### Kvasinky vyvolávají u rostlin systémovou rezistenci

Získaná systémová rezistence je nedědičná odolnost k určitému patogenu, která se vyvolá u normálně náchylné hostitelské rostliny po ošetření určitým elicitorem. Tím může být určitý druh nebo kmen viru, houby, bakterie či chemikálie. Elicitor se aplikuje na rostlinu preventivně, před napadením patogenem. Získanou systémovou rezistenci rostlin můžeme přirovnat k imunitě u živočichů a člověka, která se navodí překonáním infekční choroby nebo preventivním očkováním.

Několik výzkumných týmů se v současnosti zaměřilo na studium některých pří-

rozen se vyskytujících elicitorů, včetně kvasinek, které jsou dostupné ve velkých množstvích jako produkt potravinářského a pivovarnického průmyslu. Slibné jsou výsledky polních pokusů, v nichž ošetření kvasinkami (případně extrakty z jejich buněčných stěn) výrazně snížilo napadení ječmene padlím (*Erysiphe graminis* f.sp. *borderi*).

#### Shrnutí

Na rozdíl od humánního a veterinárního lékařství se v minulosti ve fytopatologii věnovala kvasinkám jen okrajová pozornost. Předmětem zájmu byl zejména druh *Aureobasidium pullulans* (známý spíše pod rodovým názvem *Pullularia*), a to jako saprofytická černě, která je častá (spolu s dalšími černěmi) na povrchu zdravých rostlin (listech a plodech) na cukerných látkách (medovicí), které vylučují jednak samotné rostliny, jednak mšice, mery, puklice, červci a jiný savý hmyz. Postižené plody jsou znehodnoceny sazovitými povlaky, které nezasahují do vnitřních pletiv. K hlubšímu poznání úlohy kvasinek v epifytické mikroflóře došlo zejména v 60. a 70. letech 20. stol. V té době se začaly projevovat negativní účinky intenzivní chemické ochrany a pátralo se po příčinách. Ukázalo se, že

Nahoře kultura kvasinky r. *Sporobolomyces*. Fyloplanní druhy tohoto rodu lze využít k monitorování znečištěného ovzduší. Foto V. Krejzar ♦ Napadení plodu citrusu askomycetovou kvasinkou *Galactomyces geotrichum* (jejíž nepoblatní stadium — anamorfa se nazývá *Geotrichum candidum*), dole. Foto V. Holubová–Jechová

některé fungicidní látky výrazně potlačují epifytické kvasinky. Obdobný účinek mají rovněž některé složky znečištěného ovzduší. Z těchto poznatků vyplynula potřeba bližšího poznání úlohy epifytických kvasinek pro zdraví rostlin.

V současnosti se fytopatologický výzkum soustřeďuje na vyhledávání účinných kmenů kvasinek, které by byly použitelné v biologické ochraně. Zároveň se studuje mechanismus tohoto účinku. Závazný je poznatek, že potlačení škodlivosti patogena není vždy projevem antagonismu, nýbrž schopnosti vyvolat systémovou rezistenci. Získaná systémová rezistence je fenomén, který se donedávna u rostlin nepřipouštěl. Aplikace způsobu ochrany rostlin na principu získané rezistence by mohla vyústit ve snížení spotřeby fungicidů. Při povolování nových fungicidů k používání v praxi by mělo být samozřejmostí, aby se přihlíželo i k tomu, zda nepotlačují necílové organismy, jako jsou např. epifytické kvasinky.