

Klonování savčího embrya (2)

Vztahy mezi přeneseným jádrem a ooplasmem

Josef Fulka

Jedním z předpokladů pro zajištění normálního vývoje klonovaného embrya je optimalizace vztahu mezi přeneseným jádrem a novým prostředím — ooplasmem. Nízká efektivita klonování naznačuje, že se tento záměr daří naplňovat jen s velkými obtížemi a výsledky zůstávají stále téměř nepředvídatelné.

Zodpovědnost za selhání vývoje klonovaných embryí byla a stále ještě je připisována nedostatečné či chybné reprogramaci (změně nastavení exprese genů v jádře, viz dále) přeneseného jádra embryonální nebo somatické buňky. Jak již víme, jádra embryonálních a somatických buněk procházejí postupnými změnami, diferencují se a dávají základ pro tvorbu tkání a orgánů. Procesu diferenciace se podle stále narůstajících údajů účastní u člověka zhruba 40 tisíc genů a konečným výsledkem je vznik asi 200 buněčných typů, které dále zahrnují množství specializovaných buněk. Jejich poslání spočívá v přesném plnění tak rozdílných funkcí, jako je řízení metabolismu, obrana proti chorobám, činnost nervového systému, reprodukce a mnoha dalších. Za ideálních podmínek by měl přenos jádra již částečně nebo zcela specializované buňky do ooplazmy (ooplastu) nejen zastavit další diferenciaci této buňky a zrušit nastavení pro expresi stávajících genů, ale i navrátit jádro na úroveň zygoty. Velmi zjednodušeně řečeno, jádro by mělo „zapomenout“ na plnění současného programu a přejít do stadia tzv. pluripotence, která umožňuje bezchybnou expresi genů od samého začátku, stejně jako u embrya vzniklého oplozením.

Rozvoj molekulárních metod vedl k poznání, že aktivace genů a následná diferenciace buňky není podmíněna změnou žádné ze sekvencí jaderné DNA, ale pouze její epigenetickou modifikací. Ta spočívá především v metylaci (navázání $-CH_3$ skupiny) dinukleotidů cytosin-guanin nebo ve vazbě proteinových komplexů na chromatinové struktury. Obě vazby jsou vratné (reverzibilní) a řídí v přísné posloupnosti aktivaci genů během embryonálního a postembryonálního vývoje.

Je třeba také připomenout, že z evolučního pohledu není ooplazma dostatečně vybavena na zvládnutí tak složitého úkolu, jakým je reprogramace jádra. Její primární poslání spočívá v remodelaci transkripčně neaktivního, strukturálně odlišně uspořádaného chromatinu spermie a oocyty a v podpoře tvorby funkčních prvojader. Proto ani nepřekvapuje, že k plně reprogramaci jádra z vysoce specializované somatické buňky dochází zcela náhodně.

O zásahu ooplazmy do životních pochodů embryonálních buněk podaly důkaz již na samém začátku klonování i naše experimenty. Zjistili jsme, že jádra z osmibuněčného embrya skotu, u kterých došlo k aktivaci embryonálního genomu, zastavila po

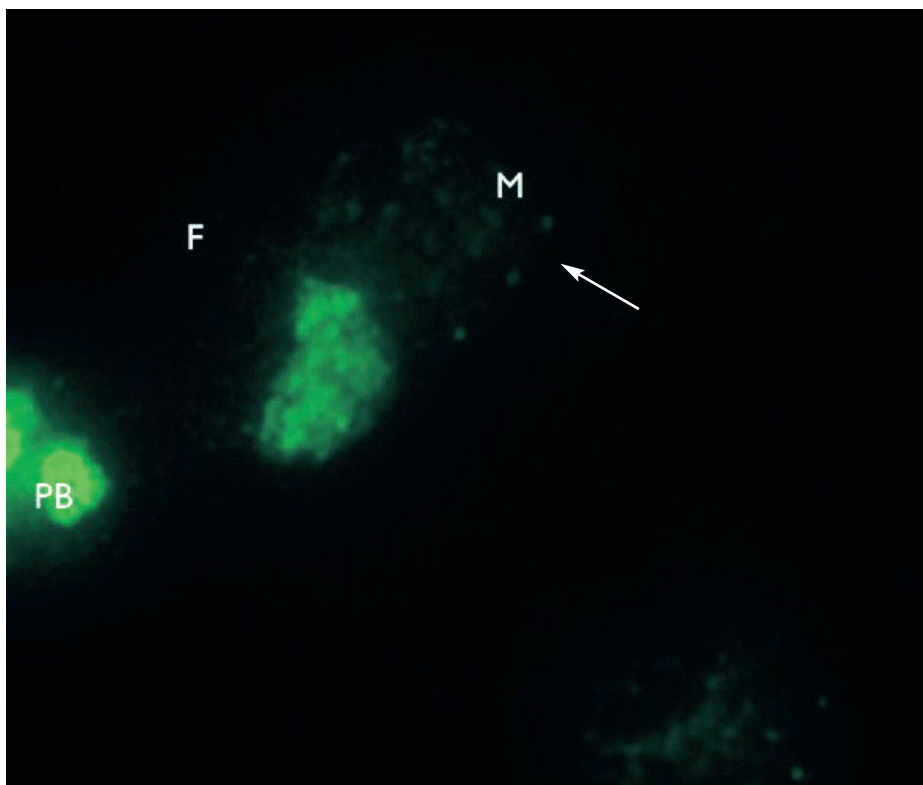
fúzi s ooplasmem další diferenciaci a přerušila dočasně syntézu RNA během dalších tří buněčných cyklů. Teprve po opětovném rozdělení rekonstruovaného embrya do osmi buněk docházelo k obnovení syntézy RNA a pokračování ve vývoji srovnatelně s kontrolou. Podobné experimenty na odlišných modelech se prováděly v řadě dalších laboratoří a bez výjimky potvrdily naše výsledky. O molekulárních mechanismech reprogramace vypovídají však jen velmi málo, ale již tehdy prokázaly možnost zastavit reverzibilně vývoj jádra embryonální buňky v ooplasmu.

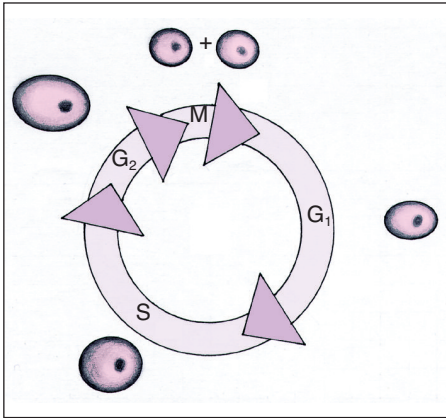
Pro posouzení, v jakém rozsahu reprogramace klonovaných jader proběhla, se tehdy (stejně jako dosud) užívalo převážně mikroskopické hodnocení vývoje do stadia blastocysty. Avšak teprve narození mláďete po přenosu blastocysty do dělohy může sloužit jako přesvědčivý důkaz o více či méně bezchybné reprogramaci. Je proto pochopitelné, že se průběžně hledají objektivnější kritéria, která by dovolila posoudit postup reprogramace a její stav v definovaných fázích vývoje rekonstruovaného embrya.

Jako jedna z možností se začíná uplatňovat srovnávání metylace a demethylace DNA u embryí klonovaných a embryí vzniklých oplozením. Po průniku spermie do cytoplazmy dochází v chromatinu obou typů gamet k radikálním změnám na úrovni metylace (podrobněji viz také Živa 1998, 3: 98). Ke zviditelnění uvedených pochodů se využívá v poslední době myši monoklonální protilátky proti 5-metylcytosinu. U většiny savců byl v průběhu formování prvojader prokázán rychlý pokles metylace samčího chromatinu a pozvolnější u samičího (Wei Shi a kol. 2003). Je tomu podobně u embrya prasete a také u embrya myši, potkana a člověka (obr. 1). Později, v průběhu následného dělení, dochází opět k remethylaci (obr. 3), která pokračuje a ve stadiu blastocysty již nese patrné znaky diferenciace zřejmé z vyšší úrovně metylace u buněk embryoblastu a nižší u buněk trofoblastu (obr. 4).

Mezi savci se však v nastupu a průběhu metylace objevují dost podstatné rozdíly, které vylučují vzájemné srovnávání. Dosud získané údaje ale jednoznačně ukazují na rozdíly v úrovni metylace DNA mezi normálními a klonovanými embryi ve stejných vývojových stadiích. Podle očekávání nastupuje po přenosu výrazná demethylace somatického či embryonálního jádra, ale její hladina zřídka dosáhne stavu typického pro zygotu. Povšimnutí si zaslouží také opakovaně potvrzené pozorování o nastupu remethylace, která se u rekonstruovaných embryí objevuje o jeden až dva buněčné cykly dříve než u embryí kontrolních. Lze předpokládat, že právě v této fázi začínají problémy neslučitelné s dalším bezchybným vývojem klonovaných embryí. Na průběhu změn metylace se podílí také remodelace chromatinu — nedávné podrobné studie u ovce popisují výskyt velkého podílu embryí s početnými nepravidelnými shluky intenzivně metylovaného chromatinu se

Obr. 1 Jednobuněčné embryo prasete ve stadiu prvojader. Jen samičí prvojádru (F) zůstává v této fázi intenzivně značené antimetylcytozin protilátkou, jak ukazuje jeho jasné zelené zbarvení. Samčí prvojádru (M a šipka) nacházející se v jeho blízkosti nevykazuje již patrné známky metylace a naznačuje možný nástup transkripce. Intenzivní metylaci se také vyznačuje polární tělísko (PB)





Obr. 2 Fáze buněčného cyklu. V G₁ fázi je buňka diploidní a zvětšuje především objem cytoplazmy. Během S-fáze se replikuje DNA a buňka se mění na tetraploidní. V G₂ fázi tetraploidní buňka vykonává vegetativní funkce a syntetizuje molekuly potřebné k buněčnému dělení. V průběhu M-fáze dochází k dělení jádra i cytoplazmy a vznikají dvě diploidní buňky dceřiné. Vzhledem k délce jednotlivých fází cyklu je značná pravděpodobnost, že dojde k vystavení jádra dárce nevhodné hladině MPF (faktor podporující zrání, blíže v textu) a k poruchám v následném dělení. Podle J. Flégry (2005) kreslil S. Holeček

značně sníženou schopností dalšího dělení. Jen těžko lze nalézt zdůvodnění výskytu takových anomálií u početné populace, kdy všechna embrya vznikala podle identického experimentálního protokolu a měla pro vývoj zdánlivě shodné předpoklady.

Zmínku zaslouží také časový interval, který mají jednotliví savci na reprogramaci vyměřen. Zatímco u myši musí návrat jádra do stavu zygoty proběhnout během jednoho dne, u přežvýkavců jsou to tři až čtyři dny, u člověka či prasete o jeden den méně. Po uplynutí této doby přebírá přenesené jádro bez ohledu na svoji připravenost zodpovědnost za řízení vývoje, který byl až dosud určován proteiny a mRNA přítomnými v ooplasmě.

Mnoho studií bylo věnováno lepšímu pochopení problému reprogramace a hlavně zvýšení její efektivity s použitím různých modifikací při ošetření jádra před přenosem. Patří mezi ně i kultivace buněk v prostředí se sníženým obsahem séra a navození zástavy jejich dělení. Předpokládá se, že v nastalé fázi nazvané GO (klidová) se uvolní vazba proteinů na DNA a zvýší se její interakce s faktory přítomnými v ooplasmě, podobně jako u neaktivní DNA spermie či oocyty po oplození. Výsledky po přenosu blastocyst vzniklých z jader kultivovaných v ochuzeném prostředí však nepotvrzují jednoznačně účinnost této hypoteticky dobře míněné metody. Současně s hledáním vhodných modifikací pro přípravu dárce jádra probíhají také výzkumy zaměřené na identifikaci genů vypovídajících o návratu jádra k totipotenci. Za jedno-

Obr. 3 Dvoubuněčné embryo prasete. V obou blastomerách jsou dobře patrná jádra s poměrně slabým zeleným zbarvením. Úroveň metylace chromatinu může pocházet ze samičího prvojádra po splynutí se samčím demetylovaným genomem, nebo se na ní podílí již nástup opětivé remetylace. Intenzivní reakci s protilátkou si zachovalo podle výrazného zbarvení polární tělísko (šipka)

ho z kandidátů je považován gen pro transkripční faktor Oct 4, který u laboratorní myši slouží jako možný indikátor reprogramace jádra somatické buňky. U jiných savců jsou snahy o využití tohoto genu pro hodnocení přeneseného jádra na samém začátku. Mizivé jsou dosud také znalosti o vlivu faktorů přítomných v ooplasmě a o jejich úloze při reprogramaci. Jednomu z nich, heterochromatinovému proteinu HP1, se připisuje schopnost modifikovat epigenetický stav jádra a měnit metylaci DNA, avšak o podrobných molekulárních mechanismech jeho působení jsou znalosti dosud nedostatečné. O ostatních molekulách s podobnou aktivitou se ví ještě méně, ale předpokládá se jejich různé působení na normální a epigeneticky modifikované geny. Vzhledem k nezastupitelné funkci ve vývoji bude o epigenetických modifikacích (imprintingu, viz Živa 2000, 2: 54; 2000, 3: 103) krátce pojednáno později.

Příprava ooplasmu

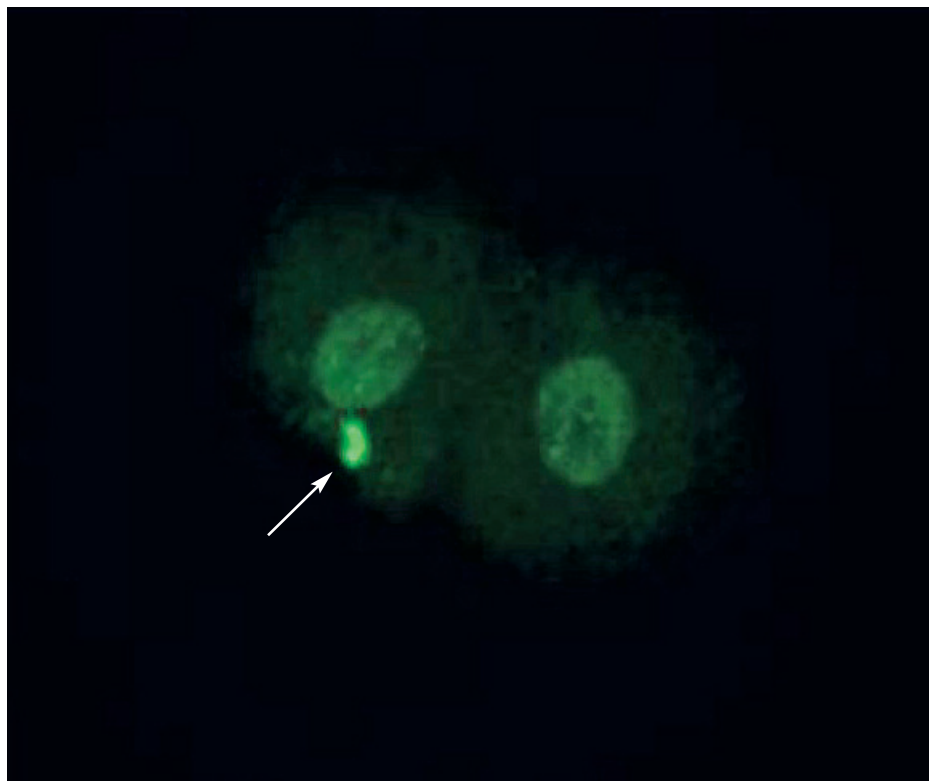
O nezastupitelné úloze ooplasmu pro reprogramaci přeneseného jádra již bylo mnohdy řečeno, a tak by byla užitečná alespoň krátká zmínka o oocytech, které slouží k jeho přípravě. V počátečních experimentech sloužily jako zdroj ovulované oocyty dozrálé v ovariálních folikulech v přirozeném cyklu nebo po hormonální stimulaci. U nich probíhá jaderné i cytoplazmatické zrání v optimálním prostředí a jsou vybaveny vším potřebným pro podporu embryonálního vývoje. Jaderné zrání postoupilo v době ovulace do metafáze II s typickým uspořádáním jedné části kondenzovaných chromozomů na dělicím vřeténku a druhé části vydělené s minimálním podílem cytoplazmy v 1. pólovém tělísku. V této podobě se oocyty získávají výplachem vejcovodů krátce po ovulaci. Množství ovulovaných oocytů ani po eventuální hormonální stimulaci obvykle nepokrývá potřebu pro experimentální účely, a proto se stále častěji využívá bohaté populace oocytů z ovariál-

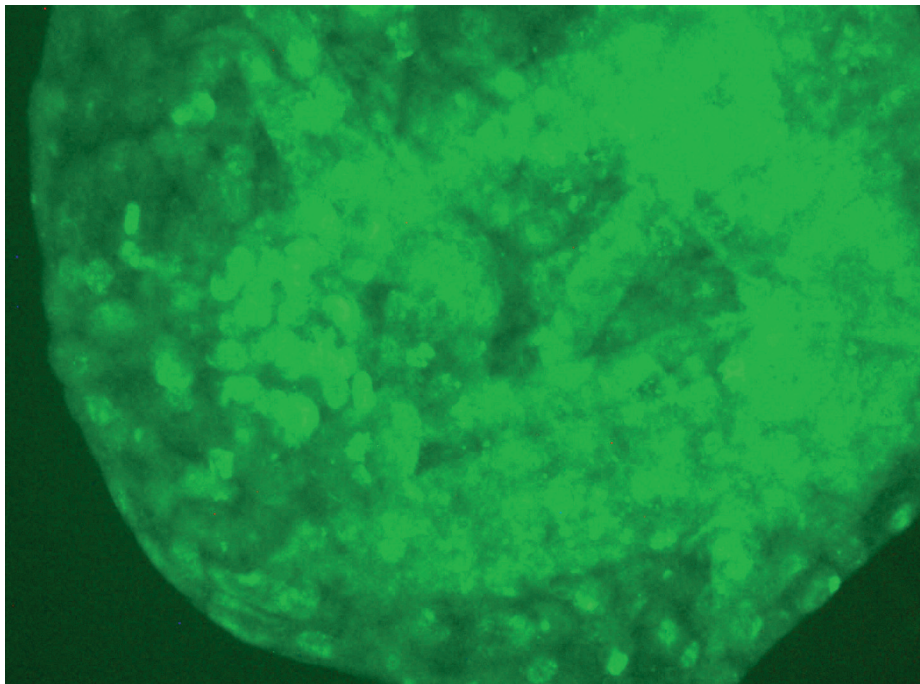
ních folikulů komerčně poražených zvířat, které ve vhodném prostředí dozrávají do II. metafáze, stejně jako přirozeně ovulované oocyty. Předností tohoto přístupu je získ prakticky neomezeného počtu oocytů, za nevýhodu lze považovat variabilitu v jejich kvalitě. Ta pramení z různorodosti výchozí populace a opakovaně byla potvrzena nižší vývojová schopnost embryí pocházejících z tohoto zdroje. Proto i ooplasm z kultivovaných oocytů může mít hypoteticky svůj podíl na selhání vývoje embryí po přenosu jádra.

Ooplasm je při klonování zajímavý i z jiného pohledu, který zřejmě nemá se životností rekonstruovaného embrya mnoho společného. Vnáší do něho svoje mitochondrie a s nimi i nepatrný podíl mitochondriální DNA. I když osud těchto struktur v rekonstruovaném embryu není jednoznačně objasněn, objeví se občas úvahy, zda použitý ooplasm nenarušuje absolutní identitu klonu.

Vzhledem k tomu, že se ooplasm získává z oocyty v metafázi II, může být jádro po přenosu často vystaveno prostředí, které nemusí být pro vývoj rekonstruovaného embrya příznivé. Při zrání vzniká v cytoplasmě oocyty, stejně jako ve všech somatických buňkách, specifická aktivita, která rozhoduje o struktuře chromatinu a nazývá se MPF (Maturation Promoting Factor — faktor podporující zrání). Jeho hladina dosahuje maximální úrovně právě v metafázi II a jádro přenesené buňky na ni bezprostředně reaguje okamžitou kondenzací chromatinu. Na stadiu buněčného cyklu jádra (obr. 2) pak záleží, jak se s touto aktivitou vyrovná. Pokud se jádro nachází v mitóze nebo pozdní G₂ fázi, nepřináší setkání s vysokou hladinou MPF vážné problémy a buněčný cyklus může pokračovat bez narušení.

Zcela jiná situace nastává u jádra v S-fázi s neukončenou replikací DNA, kdy po vyvolané kondenzaci chromatinu dochází ke vzniku buněk s abnormálním počtem chromozomů a k zastavení dalšího dělení. Nepřekvapily proto ani úvahy, zda by chybám v syntéze DNA nebylo možné předcházet umělým snížením hladiny MPF v ooplasmě





Obr. 4 Blastocysta prasete složená ze dvou populací embryonálních buněk. Skupina metylovovaných jader (intenzivně zelená) svědčí o přítomnosti buněk embryoblastu, které dají základ budoucímu plodu. Jádra buněk trofoblastu, budoucí extraembryonální tkáň (plodových obalů), se vyznačují nižší metylací a jsou tedy méně zbarvená (blíže viz text). V této fázi dochází k diferenciaci embryonálních buněk a výskytu dvou buněčných linií. Snímky z pracoviště J. Fulky, pokud není uvedeno jinak

před jeho fúzí s dárceovskou buňkou. Za takových podmínek by ooplast, nazývaný také univerzální, výrazněji nezasahoval do buněčného cyklu a přenášené jádro se tak lépe vyrovnalo s novým prostředím. Srovnávací práce skutečně prokázaly zvýšení podílu klonovaných blastocyst, ale v počtu narozených mláďat se zlepšení výrazněji neprojevilo. Nedávné výsledky také potvrdily vyšší toleranci jader embryonálních buněk k rozdílné hladině MPE, než mají jádra buněk somatických. Není proto vyloučeno, že lepší schopnost jader embryonálních buněk vyrovnávat se s prostředím nedosahujícím optima patří k faktorům, které přispívají k vyššímu podílu narozených klonovaných mláďat.

Pro lepší představu by bylo vhodné popsat stručně přípravu ooplastu a způsoby odstranění chromozomů uspořádaných v druhé metafázi. V oocyttech s transparentní ooplazmou jsou chromozomy pod mikroskopem dobře viditelné a zavedení mikropipety a odsátí vřeténka je možné

s dostatečnou spolehlivostí kontrolovat (Živa 2005, 4: 146–149). K savcům s takovou cytoplazmou patří především myš. U oocytů většiny zástupců ostatních savců nelze však pro naprostou neprůhlednost ooplazmy stanovit umístění chromozomů a jejich bezchybné odstranění tak představuje vážný problém. Jako vodítko určující polohu vřeténka slouží 1. pólové tělíčko a aspirace části cytoplazmy v jeho blízkosti dává hrubou záruku o úspěšném provedení zákroku. K usnadnění orientace se užívá také centrifugace oocytů, kdy vřeténko s chromozomy zůstává v průhledné frakci. V poslední době se často chromozomy značí a kontrolují fluorescenčními barvivy.

Za zmínku stojí také snahy o destrukci chromozomů laserovými paprsky. U myši se daří odstranit jádro (enukleaci) zdánlivě elegantní chemickou cestou, která se však ukázala u jiných savců málo spolehlivá. A tak příprava cytoplasmu zůstává nadále omezena na pracně mechanické postupy a je vedena snahou po minimální redukci ooplazmy

a dokonalém odstranění chromozomů při zachování zbylé struktury v nepoškozeném stavu. Napomáhá volba nástrojů (mikropipet) a zručnost pracovníků, která je nepostradatelná pro všechny úkony během manipulací s oocyty, embryi, blastomerami a somatickými buňkami *in vitro*. I zdánlivě malá poškození bývají neslučitelná s dalším vývojem a mohou přispívat k zavádějícím závěrům při interpretaci různých experimentálních zásahů.

Mezidruhový přenos jader

Za příjemce jádra sloužil v počátečních experimentech zcela výlučně ooplast vlastního druhu, o němž se logicky předpokládalo, že zajistí nejvhodnější prostředí pro reprogramaci jádra a vývoj rekonstruovaného embrya. Teprve když se ukázalo, že značná část klonovaných embryí se nedělí vůbec nebo jen omezeně, objevily se občasně spekulace o použití heterologního (jiného druhu) ooplastu jako případné efektivní náhrady. Takové poněkud kuriózní záměry nacházely naopak plně pochopení zejména u řešitelů projektů usilujících o záchranu ohrožených savčích druhů. Postupně se počaly objevovat výsledky experimentů o použití fylogeneticky blízkých a nezřídka i velmi vzdálených savců, které prokázaly, že po fúzi jádra s cizím ooplasmem dochází skutečně ve většině případů ke změnám ve struktuře jádra, a to v závislosti na užitých kombinacích. V bovinní (domácího skotu) ooplasmě se zcela odlišně chovají jádra somatických buněk ovce, prasete, opice a krysy již krátce po přenosu. V některých případech dojde jen k charakteristickému zvětšení jejich objemu, v jiných se část rekonstruovaných embryí dále dělí a výjimečně (v případě ovce) končí tvorbou blastocysty. Z pokusů dále vyplynulo, že rychlost dělení a vznik blastocysty jsou řízeny druhovou příslušností jádra, nikoli ooplastu. Za zmínku stojí také experimenty s přenosem jádra lidské somatické buňky do bovinního ooplastu, kdy z 56 embryí jen 6 dosáhlo stadia 4–16 buněk. Naopak mnohem vyšší podíl embryí se dělil po přenosu králičího jádra do bovinní ooplazmy, ale žádné nedosáhlo stadia blastocysty. Dosud získaná pozorování ani vzdáleně nenaznačují, že by heterologní ooplazma fylogeneticky vzdálených savců našla uplatnění při navození reprogramace jádra u ekonomicky zajímavých druhů.

Nadějnější výsledky naopak přinesly experimenty, kde jádro a ooplast pocházely od fylogeneticky blízkých savců. Přenosem jádra somatické buňky gaura (*Bos gaurus* — jeden z druhů divokých asijských turů) do bovinního oocytu došlo nejen



Obr. 5 Mláďě muflona narozené z jádra granulární buňky uhynulého dárce přeneseného do ovčího oocytu. Vývoj ze stadia blastocysty do narození proběhl v děložce ovce. Foto J. Fulka Jr.

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 překvapivě 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.