

# Co nám přináší výzkum interakce rostlin s patogeny?

Napadení rostlin patogeny významně ovlivňovala a ovlivňují lidstvo. Třeba epidemie oomycety *Phytophthora infestans* na bramboru (plíseň bramborová) v Irsku v polovině 19. století vedla k hladomoru, jenž měl za následek nejméně jeden milion úmrtí a v jehož důsledku další nejméně milion lidí emigroval do zahraničí. Irsko mělo tehdy 8 milionů obyvatel a od té doby této úrovně nikdy nedosáhlo. Dalším příkladem je panamská choroba banánovníků, kterou vyvolává houbový patogen srpovnička špičatovýtrusá (*Fusarium oxysporum*, fusariové vadnutí). Způsobila, že se v 50. letech 20. století prakticky „ze dne na den“ změnila odrůdová skladba banánovníku z exportní odrůdy Gros Michel na odrůdu Cavendish, která byla vůči tomuto patogenu rezistentní. V posledních letech byla však tato choroba pozorována i na odrůdě Cavendish, což může v budoucnu vést v pěstování a produkci banánů k významné krizi. Jako příklad jmenujme i současné odumírání olivovníků v Itálii, způsobené infekcí bakterií *Xylella fastidiosa* a vedoucí k významnému snížení produkce italských oliv.

I v době, kdy jsme schopni ošetřovat lány polí pěstované rostliny účinnými syntetickými pesticidy, způsobují choroby rostlin každoročně celosvětové obrovské ztráty na výnosech zemědělských plodin, a výrazně také snižují jejich kvalitu. Přibližně ztráty u pěti významných plodin jsou u pšenice 10,1–28,1 %, rýže 24,6–40,9 %, kukuřice 19,5–41,1 %, brambor 8,1–21 % a sóji 11–32,4 % (Savary a kol. 2019). A rovněž aplikace chemických postřiků je velmi drahá. V r. 2008 bylo jen v USA použito na 21 vybraných plodin celkové množství pesticidů v hodnotě přibližně 16 miliard Kč a navíc jejich používání přináší různé dopady na životní prostředí.

Interakce mezi rostlinami a mikroorganismy ale nejsou pouze negativní. Existují i symbiotická spojení mezi rostlinami a houbami (např. arbuskulární mykorhiza) nebo rostlinami a hlízkovými bakteriemi (např. rod *Rhizobium*) dodávající dusík či fosfor, za což se jim rostlina odměňuje zdrojem uhlíku. Symbióze se věnovat nebude, ale ukazuje schopnost rostlin rozlišit své „přátele“ a „nepřátele“ (patogeny).

O úspěchu rostliny v obraně zásadně rozhoduje její imunita, resp. mechanismy rezistence. Bychom je byli schopni efektivně využít v zemědělství, je potřeba těmto mechanismům co nejlépe porozumět. Potěšující je, že v posledních 30 letech se výzkumu v této oblasti věnovalo nemalé úsilí, které vedlo k významnému prohloubení našich poznatků, což přináší i praktické aplikace (blíže v závěru článku). Článek v kuléru této Živy (str. XVII–XIX) mechanismy imunity rostlin přehledně shrnuje, skoro bychom se po přečtení mohli ptát, co více chceme ještě objevovat? To by byl velký omyl – jen za poslední rok vyšlo v prestižních časopisech několik prací prohlubujících uvedené znalosti.

## Novinky ze studia imunity rostlin

V dnešní době cik-cak model (viz Jones a Dangl 2006 a obr. v kulérovém článku na str. XVII–XIX) popisuje dvě úrovně imunity rostlin – spuštěnou PAMPs (PTI, PAMP Triggered Immunity, PAMPs znamená molekulové vzory spojené s patogenem, Pathogen-Associated Molecular Patterns), a o imunitu spuštěnou efektoru (ETI, Effector Triggered Immunity).

● Při PTI rostlina rozpoznává pomocí receptorů, nalézajících se na povrchu plazmatické membrány, konzervované mikrobiální molekuly, např. flagelin nebo elongační faktor bakterií. Asi nejprozkoumanější dvojicí PAMP–receptor je motiv flagelinu tvořený 22 aminokyselinami (flg22) a rozpoznávaný v huseničku rolním (*Arabidopsis thaliana*) receptorem FLS2. Těchto 22 aminokyselin je však schováno hluboko ve struktuře flagelinu a dosud jsme nevěděli, jak by se k nim receptor mohl dostávat. V loňském roce vědci identifikovali enzym beta-galaktosidázu 1 (BGAL1) a ukázali, že tato hydroláza skutečně hraje roli v uvolnění flg22. Navíc se potvrdilo, že bakterie uvolnění flg22 potlačují různorodostí navázaných glykanových zbytků na flagelinu, což omezuje katalytické schopnosti BGAL1. Ze studie je dále zřejmé, že objevená hydroláza nebude jediná (Buscail a kol. 2019).

Množství známých PAMPs a jejich receptorů se stále zvyšuje. Většinu zaujmají proteinové PAMPs. V r. 2015 (Ranf a kol.) byl popsán receptor LORE (Lipooligosaccharide-specific Reduced Elicitation) rozpoznávající lipopolysacharidy. Nyní se ukázalo, že ligandy rozeznávané LORE jsou středně dlouhé (C10)3-hydroxymastné kyseliny (tedy s 10 uhlíky a hydroxyskupinou vázanou na C v pozici 3). Tyto výsledky ukazují, že i rostliny mohou od-

halit mikrobiální „návštěvníky“ rozpoznáním málo komplexních mikrobiálních metabolitů (Kutschera a kol. 2019).

● ETI je odvozena od obranných mechanismů proti molekulám, které mikroorganismy vylučují do hostitelské rostliny s cílem potlačit její imunitní reakci. Takto striktně byla dlouho vnímána role efektorů, ale díky posledním objevům se podařilo prokázat, že jejich pole působnosti spočívá nejen na přímém potlačení reakcí rostlin, především pak PTI, ale současně jsou mezi efektoru řazeny i sekretované molekuly, které vylepšují mikroorganismu podmínky k životu. Co si pod tím představí? Tak např. bakteriální patogeny potřebují dostatek vody v mezibuněčném prostoru (apoplastu) – bakterie *Pseudomonas syringae* vykazuje výrazně úspěšnější infekci, když je apoplast nasycenější vodou. Aby bakterie získala více vody do apoplastu, sekretuje minimálně dva efektoru (HopM1 a AvrE1). Pokud dojde u rostliny ke spuštění ETI, jednou z následných událostí je snížení „zahuštění“ apoplastu – rostlina má zakódováno, že příliš vody v apoplastu může být nebezpečné (Xin a kol. 2016). S tímto poznatkem souvisí jiný zajímavý objev, který ukázal, že pokud rostlina rozpozná napadení bakterií, snaží se snížit v apoplastu hladinu cukrů, které bakterie nezbytně potřebuje k životu a k reprodukci. Pro jejich odčerpávání byl dokonce u huseničku nalezen transportér STP13, po jehož zablokování se huseniček stal náchylnějším k napadení bakteriemi (Yamada a kol. 2016). Výsledky jsou i podpořeny daty získanými při práci s bakterií *Xanthomonas oryzae* napadající rýži, u které byly navrženy dva efektoru zvyšující expresi transportního proteinu SWEET, odpovědného za přenos sacharózy mimo prostor buňky (Baker a kol. 2012, Naseem a kol. 2017).

V rámci nových objevů týkajících se ETI, a možná imunity rostlin vůbec, asi nejvíce rozvířily diskuze v r. 2019 dva články publikované současně v časopise Science. Byla v nich detailně popsána struktura jednoho z R-proteinů. Jde o proteiny kódované tzv. R-geny zodpovídající za rozpoznání efektorů a spuštění ETI. Jejich významnou skupinou jsou NLR proteiny (Nod-like receptor), obsahující doménu vázající nukleotidy a doménu bohatou na leuciny. Mezi ně se řadí i ZAR1, u něhož byla struktura popsána a který rozpoznává efektor AvrAC sekretovaný bakterií *X. campestris*. Při rozpoznání efektoru dochází ke značným konformačním změnám a tvorbě pentameru, který ve své konečné struktuře připomíná živočišné inflamasomy. Pro rostliny byl zatím přijat název rezistosom (Mermigka a kol. 2019). Jeho struktura/konformace napovídá, že přímo aktivovaný protein by mohl být schopen vytvářet otvory v plazmatické membráně, a tím ji poškodit, čímž by došlo ke kolapsu až odumření buňky (Wang a kol. 2019a, b).

Více než 30 let se fytopatologové snaží objasnit kompletní mechanismus i jeho komponenty zodpovědné za tzv. hypersenzitivní reakci, jejímž výsledkem je odumření infikované buňky. K hypersenzitivní reakci nezářídka dochází při ETI. Žádná z mnoha detailních studií nevedla k jednoznačnému závěru. Nyní se ukazuje, že mezi



**1** V Ugandě a Keni se pěstují rostliny bramboru (*Solanum tuberosum*) obsahující R-proteiny účinné proti napadení oomycetou *Phytophthora infestans* (a). Rajče (*S. lycopersicum*, b), do něhož byl vnesen receptor EFR zvyšující rezistenci vůči bakterii *Ralstonia solanacearum*. Tomelo (c), odrůda rajčete s upraveným genomem (genu *mlo*), odolnější vůči padlí (*Oidium neolyopersici*). Vnesená zvýšená exprese genů *Hrap* a *Pflp* pocházejících z papriky roční (*Capsicum annuum*) poskytuje větší rezistenci banánovníkům vůči bakterii rodu *Xanthomonas* (d). Nadprodukce virového obalového proteinu zvyšuje rezistenci papáje (*Carica papaya*) vůči potyvirové skvrnitosti papáje na Havaji (e). Nalevo kontrolní rostlina, modifikovaná vpravo. Blíže v textu. Převzato z publikace H. P. van Esse a kol. (2020), s laskavým svolením vydavatele

R-proteinem rozeznávajícím efektor a úvodním spouštěčem hypersenzitivní reakce možná nemusí být žádná signalizace a že navázání efektoru na R-protein změní jeho konformaci tak, že povede až k odumření buňky, které by mohlo sloužit jako signál pro další buňky k vyvolání buněčné smrti přes dosud známé mechanismy.

Proteinové efekторы nejsou jedinou strategií, kterou se patogen snaží potlačit imunitu rostliny. V r. 2013 Arne Weiberg se spolupracovníky prokázali, že houba *Botrytis cinerea* (původce plísňě šedé) produkuje cíleně malé RNA (sRNA) v pletivech hostitele k potlačení transkripce genů důležitých pro rostlinnou obranu. Zároveň i *Bo-*

*trytis* je ovlivňována sRNA, což má aplikační potenciál – rostliny ošetřené postřikem sRNA jsou po jistou dobu vůči tomuto patogenu odolnější (Wang a kol. 2016).

Je známo, že významným faktorem v interakci rostliny s patogenem je také prostředí, abiotické vlivy, ve kterých k interakci dochází. Tuto komplexnost ilustruje tzv. trojúhelník choroby (disease triangle, viz obr. na webu Živy). Naše práce k tomu přispěla prokázáním, že vysoká teplota potlačuje signalizaci založenou na kyselině salicylové, fytohormonu tvořícím důležitou součást obranných dějů rostlin. Zvýšená teplota tedy může přispívat i ke zvýšené náchylnosti k patogenům (Janda a kol. 2019). Není snadné zkoumat interakce v celé šíři: rostliny, patogeny a ještě faktory prostředí. V současnosti se tímto směrem ubírá nemalé úsilí vědců, jistě motivované i rychlými klimatickými změnami na lokální i globální úrovni.

#### A k čemu jsou takové poznatky dobré?

Jako příklad využití PTI zmiňme vnesení receptoru (EFR) rozpoznávajícího konzervovanou sekvenci elongačního faktoru z huseníčku do rostliny rajčete (*Solanum lycopersicum*). Tento receptor je přítomen u brukvovitých (*Brassicaceae*), u rajčete (lilkovitě – *Solanaceae*) se nevyskytuje. Jeho přítomnost vedla k dramatickému zvýšení odolnosti vůči hnědé hnilobě způsobené bakterií *Ralstonia solanacearum* (Lacombe a kol. 2010). Příkladem pro ETI je vnesení tří různých R-proteinů z plané rostoucího bramboru do konvenční zemědělské odrůdy, vedoucí k významnému

zvýšení odolnosti vůči *Phytophthora infestans* (Ghislain a kol. 2019). Výběr dalších úspěchů najdete v článku H. Petera van Esse a kol. (2020, obr. 1). Nelze zde nezmínit, co přináší nová metoda editace DNA – CRISPR-Cas. Díky ní můžeme rychle vytvořit rostliny se zablokovaným nebo vneseným genem, a tím zkrátit proces přenesení určitého znaku, jeho využití ve šlechtění a v praxi. Metoda dosud přispěla k vytvoření rezistentnějších plodin – např. rajčat, banánů, grepů, jablek, papáje, okurky nebo citronů (Wang a kol. 2019c). Přístup založený na CRISPR-Cas je v tuto chvíli vnímán kontroverzně, zejména v legislativě Evropské unie, kde byl zařazen mezi tradiční techniky geneticky modifikovaných organismů (GMO) a jeho využití je v rámci EU v podstatě nemožné. Ve zbytku světa převažuje pohled jiný, ne-li opačný. Je více než pravděpodobné, že se využívání plodin upravených touto technikou ve velké míře dočkáme již v blízké budoucnosti.

Studium interakcí rostlin s patogeny je stejně důležité jako studium interakcí živočichů, tedy i člověka, a jejich patogenů. Neustále se objevují nové poznatky, které mají potenciál být již v relativně krátkém čase převedeny do praxe.

Použitá literatura uvedena na webu Živy. Více také v Živě 2016, 6: 279–280 a 2017, 2: 70–72 a XLVII–XLIX.

Tato práce vznikla za podpory projektů GA ČR 17-05151S a CHEMFELLS4UCTP (CZ.02.2.69/0.0/0.0/17\_050/0008485).