

Vážení čtenáři,

tak jako v letech minulých i letošní ročník Živy vám bude pravidelně přinášet v rubrice K výuce rozmanitou škálu didakticky zaměřených článků. Po fylogenetice a taxonomii (2016), nových biologických metodách (2017), symbióze (2018) a významných osobnostech české přírodovědné scény (2019) přicházíme s tématy z oboru fyziologie, a to jak rostlinné, tak živočišné, téma uzavřeme člověkem. První číslo ročníku 2020 vás zavede na dosud málo pro-

bádané kolbiště, kde probíhá souboj mezi rostlinou a jejími patogeny, rovněž se můžete dozvědět, jaké fyziologické adaptace pomohly rostlinám úspěšně osídlit souš.

Tak jako v předchozích ročnících bude zvolená problematika vždy představena články v křídlové části a téma bude podrobněji rozpracováno v kulérové příloze. Specifickou přílohou dostupnou na webových stránkách časopisu (v záložce nazvané Pro pedagogy a studenty) jsou pak pečlivě připravené pracovní listy, které je možné

využít při práci nejenom v hodinách biologie ve škole, ale i v rámci zájmové činnosti. Pracovní listy přinášejí širokou škálu možností, od pozorování různých biologických objektů a zajímavých fenoménů, přes krátkodobé i dlouhodobé experimenty až po počítačovou práci s databázemi nebo virtuální realitou. Různé náměty na pokusy, pozorování a experimenty naleznete také v sekci věnované Biologické olympiádě. Naší hlavní snahou je šířit radost z poznávání přírody mezi nové generace. Věříme, že vás zvolené téma letošního roku zaujme – koneckonců popisované pochody můžeme mnohdy pozorovat kolem sebe i na sobě.

Jan Votýpka a redakce Živy

Peter Sabol, Jana Pilátová

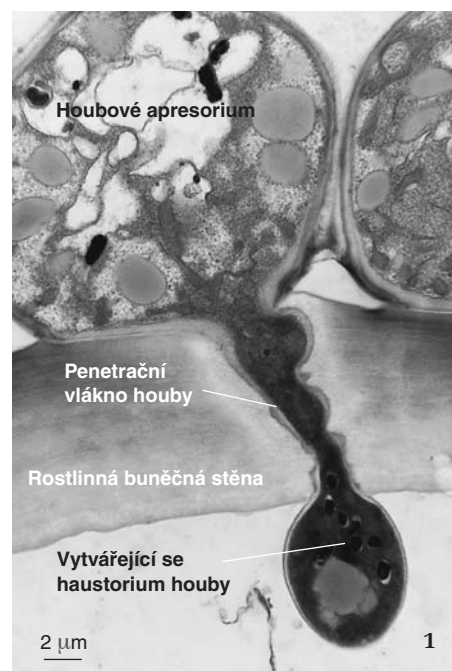
K výuce

Jak funguje imunita u rostlin?

Když se řekne imunita, každému se jistě vybaví armáda bílých krvinek jako z legendárního animovaného seriálu *Byl jednou jeden život*, která neúprosně bojuje proti probíhající chřipce nebo jiné záludné nemoci. Jak si ale ukážeme, obrana proti patogenům a parazitům není výlučnou výsadou člověka nebo obecně živočichů. Konsenzuální definice imunity, jak to už často v případech biologických pojmů bývá, v podstatě neexistuje. Výraz imunita pochází z latinského *immunitas* a znamená „svobodu od něčeho“, původně ve významu zproštění od povinnosti (dnes např. poslanecká imunita). V povědomí se vám jistě vybaví v biologii používaný význam pojmu imunita, rozšířený především na živočišném/lidském modelu, jako schopnost odolávat patogenům či jejich antigenům za pomoci bílých krvinek, protilátek nebo prostřednictvím dalších sloučenin imunitní obrany. Ale bránit se vetřelcům i před nevídanými hosty jsou schopny všechny organismy, i když využívají jiné mechanismy obrany. Svůj imunitní systém mají také rostliny, nebo dokonce i bakterie, jak bylo zjištěno poměrně nedávno v souvislosti s objevem antivirového mechanismu ochrany bakteriální DNA za využití metody CRISPR-Cas9. V následujícím textu bychom vás rádi seznámili s obranou rostlin vůči jejich mikrobiálním patogenům (několik příkladů nejnovějších objevů v tomto oboru pojednává článek na str. 10–11 této Živy).

Výzkum rostlinné imunity (rezistence, odolnosti), která se poněkud liší od toho, co dosud známe v případě živočichů, je velmi zajímavý a prakticky významný. Týká se to nejen odhalování nových jevů, mechanismů a procesů pro biologii, ale také pro zemědělství, kde mohou být nové poznatky aplikovány v ochraně rostlin vůči chorobám a škůdcům. Obecně rozlišujeme dva typy imunitní odpovědi rostlin – vrozenou (nespecifickou, přirozenou) a adaptivní (specifickou, získanou nebo indukovanou). První zjednodušeně spočívá v obranných bariérách, mechanismech a molekulách, které jsou v rostlinách předpřipraveny – tzv. preformovány (konstituovány) a obecně mohou působit proti širokému spektru patogenů a parazitů. Jako příklad primární obranné bariéry rostlin lze uvést kutikulu, což je voskovitá vrstva na povrchu listů a stonků, dále pak celulózní buněčnou

stěnu pokožkových buněk. Adaptivní imunita *sensu stricto* je doménou výhradně obratlovců, kteří mají ve svém krevním řečišti a specializovaných imunitních orgánech bílé krvinky (B- a T-lymfocyty), jež se mohou „vytrénovat“ na daný patogen a specializovat se na jeho účinné odstranění. Zároveň některé z nich přežívají i dlouho po nákaze a zachovávají tak imunologickou paměť (i když ta je zřejmě i součástí imunity rostlin; viz dále v textu), takže pokud se se stejným patogenem opět setkáme, k jeho potlačení dojde rychleji. U rostlin můžeme hovořit o adaptivní odolnosti ve vztahu např. k indukované rezistenci – odolnosti vyvolané až po kontaktu rostliny s určitým patogenem, jejíž účinek spočívá v aktivaci některých fyziologických, resp. chemických procesů v rostlině. V této souvislosti se rozlišují dva základní mechanismy – systémově indukovaná (získaná)

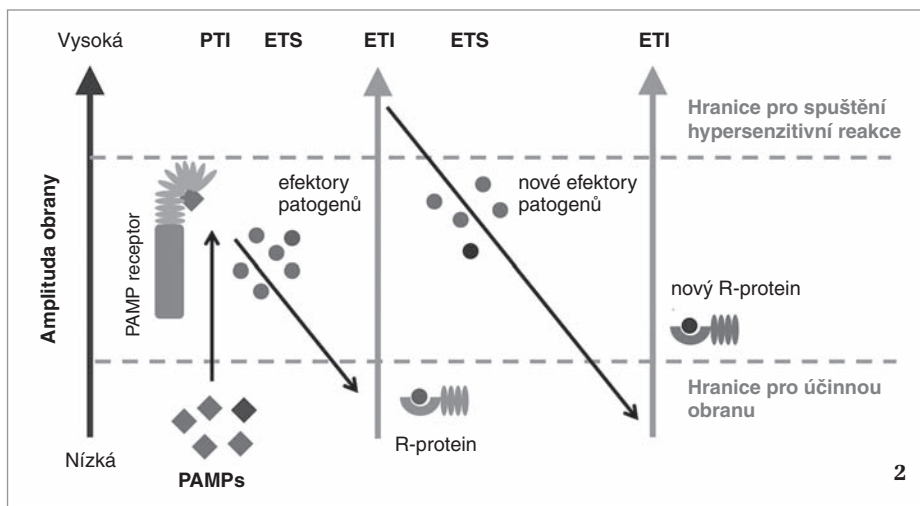


1 Spora patogenní houby *Magnaporthe oryzae* vyklíčila na povrchu listu a vytvořila apresorium (přísavný polštář), který je předpokladem k proniknutí do buňky (pomocí penetračního hrotu), kde se chystá vytvořit haustorium. Struktury houby v rostlinné buňce jsou ohraničené membránami odvozenými od plazmatické membrány hostitelské buňky. Při průniku přes buněčnou stěnu vyvíjí apresorium tlak až 17 MPa, což odpovídá tlaku 25× většímu než v pneumatice autobusu, jak poznamenal náš kolega Ivan Kulich. Snímek z elektronového mikroskopu. Upraveno podle: Y. F. Dagdas a kol. (2012), převzato se svolením American Association for the Advancement of Science (AAAS) a upraveno se svolením autorů

rezistence (Systemic Acquired Resistance, SAR) a lokálně indukovaná rezistence (Localized Acquired Resistance, LAR).

První obranný val a signalizace napadení

Rostliny spoléhají na svůj vrozený imunitní systém, jenž tvoří dvě rozdílné, i když navzájem propojené, úrovně obrany. Jen zopakujeme, že rostlinné buňky jsou až na výjimky ohraničené pevnou buněčnou stěnou, a tudíž nepohyblivé. Obrana se tak



uskutečňuje přímo v jednotlivých buňkách (případně pletivech), které se musejí umět samy vypořádat s infekcí, a navíc mnohdy signalizují napadení do dalších částí rostliny. První úroveň obrany se spouští poté, co rostlinná buňka na svém povrchu rozpozná pomocí bílkovinných receptorů obecné molekulární vzory spojené s patogenem, tedy jakýsi podpis fytopatogenní bakterie nebo houby, případně své vlastní poškozené struktury (z anglického Pathogen-/Damage-Associated Molecular Patterns, zkráceně pak PAMPs nebo DAMPs), což se označuje jako PAMP immunity, nebo také imunita spuštěná pomocí PAMP (PAMP Triggered Immunity, PTI). V případě PAMPs jde o obecné, konzervované, převážně strukturální molekuly mikrobiálních patogenů, zpravidla nezbytné pro jejich přežití, a tudíž je nelze odstranit přirozeným výběrem. Patří k nim zejména flagelin přítomný v bakteriálních bičících nebo chitin v buněčné stěně hub. Příkladem DAMPs jsou úlomky strukturálních polysacharidů buněčné stěny rostlinné hostitelské buňky (složky celulózy, pektinů, ale třeba také monomeru kutinů), které vznikají jejím chemickým rozkladem působením houbového patogenu a jeho snahou proniknout do buněk (obr. 2). DAMPs však mohou být produkovány i při napadení herbivory a vznikají také při mechanickém poškození pletiva. Někdy se lze setkat se souhrnným pojmem MAMPs, tedy molekulárními vzory spojenými s mikroby. Jak již z názvu vyplývá, tyto molekuly jsou společné i pro „přátelské“ symbiotické organismy. Fungují např. v signalizaci s hlízkovými bakteriemi, které bobovité rostliny (*Fabaceae*) využívají pro fixování vzdušného dusíku přímo na kořenech, a tak pro vlastní „hnojení“, nebo v interakci s mykorrhizními houbami. Po navázání MAMPs na receptory rostlinných buněk se spouští signální dráha, která vede k řadě změn na buněčné úrovni. Především dochází ke změně propustnosti kanálů pro vápenaté ionty (vápníková signalizace), produkci reaktivních forem kyslíku, aktivaci MAP kinázové kaskády, aktivaci transkripčních faktorů a k následnému spuštění přepisu genů do proteinů účinných v odolnosti vůči patogenu. Tato fáze se principem velmi podobá vrozené imunitě u živočichů.

Zajímavou aktivní reakcí rostlin je např. zesílení buněčné stěny nebo alespoň (v případě infekce některými bakteriálními

2 Cik-cak model rostlinné imunity.

Schéma znázorňuje koevoluci mezi molekulami patogenu odpovědnými za virulenci a obrannými mechanismy rostlinné buňky. Po rozpoznání patogenních molekul PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) pomocí receptorů se spouští PTI imunita (PAMP Triggered Immunity). Tu patogeny potlačují pomocí efektorů, což se někdy označuje jako efektořem spuštěná citlivost (Effector Triggered Susceptibility, ETS). Pokud rostliny kódují R-protein schopný rozeznávat efektořy, zahajují ETI (Effector Triggered Immunity), která často směřuje do programované buněčné smrti typu hypersenzitivní reakce (HR). Na to si patogeny vyvíjejí nové efektořy schopné potlačovat tentokrát ETI. Rostliny reagují vývojem nových R-proteinů atd. Upraveno podle: J. D. G. Jones a J. L. Dangl (2006) a M. Alizadeh a H. Askari (2014)

a houbovými patogeny) tvorba kalózové papily – lokálního uložení polysacharidu kalózy (β -1,3-glukan) v buněčné stěně v místě průniku patogenu. Přitom dochází k celkové změně polaritě buňky, projevující se mimo jiné orientováním cytoskeletu k místu napadení a přemístěním jádra a organel sekretorické dráhy do oblasti papily. Rostlinná buňka pak sekretuje ven antimikrobiální sloučeniny. Další častou odpovědí je uzavření průduchů, přes které by se mikroorganismy mohly nadále dostávat dovnitř listů, a syntéza antimikrobiálních sloučenin. Mezi významné antimikrobiální indukované sloučeniny patří fytoalexiny – chemicky různorodé látky s obecně antimikrobiálními nebo antioxidačními vlastnostmi. Další skupinou jsou tzv. PR obranné proteiny (Pathogenesis-Related), k nimž patří např. enzymy rozkládající buněčnou stěnu hub. V tomto případě jde vlastně o indukovanou obrannou reakci vůči patogenu. V souvislosti s infekčním procesem je třeba si uvědomit, že zatímco některé houbové patogeny (např. padlí) a řasovky (např. *Peronospora*) prostupují často přes epidermis a buněčnou stěnu, není to nikdy přímo do cytoplazmy – vyvíjejí tlak na cytoplazmatickou membránu (ta zůstává celistvá) a dochází tak k jejímu vchlípení do nitra buňky (obr. 1). Naopak bakteriální patogeny zpravidla zůstávají vně buňky v mezibuněčném prostoru, kde se i produkují.

Zde se ještě pozastavíme u spektra životních, resp. nutričních strategií, které rostlinné patogeny při interakci s hostitelem využívají. Biotrofní patogeny (třeba zmíněné padlí) potřebují k realizaci životního a infekčního cyklu živá pletiva hostitele. Naopak nekrotrofové (např. plíseň šedá – *Botrytis cinerea*) primárně buňku po penetraci usmrcují (většinou pomocí toxinů a hydrolytických enzymů štěpících složky buněčné stěny) a jsou pak schopny získávat živiny a růst na odumřelém pletivu. Jistý kompromis v životních strategiích představují hemibiotrofní patogeny (např. bakterie *Pseudomonas syringae*), které se v první fázi svého vývoje chovají jako biotrofové, posléze ale hostitelskou buňku usmrtí a přecházejí tak do nekrotrofního módu. Zvláštní skupinu tvoří fakultativní patogeny, které jsou schopny přežít mimo rostlinu a za určitých podmínek také hostitelskou rostlinu napadají (k nim patří i *Agrobacterium tumefaciens*, hojně využívané v transgenozí rostlin). V rostlině tak různé skupiny patogenů vyvolávají často rozdílné až opačné odpovědi. V případě překonání PTI biotrofním patogenem často pomůže, když v místě napadení několik buněk cíleně odumře a patogen je tak odříznut od zdroje živin, u nekrotrofního patogenu logicky nikoli. Tato forma programované buněčné smrti se označuje termínem hypersenzitivní reakce (HR), v podstatě rychlé odumření buňky po penetraci patogenu. Také hormonální signalizace se v případě napadení biotrofním nebo nekrotrofním patogenem liší. Známý je vzájemný antagonismus signálních drah kyseliny salicylové, působící v odpovědi na biotrofní patogeny, a kyseliny jasmonové a etylenu, které hrají roli v obraně proti nekrotrofům a také herbivorům. Detailní popis jednotlivých událostí je ale komplikovaný a nad rámec tohoto základního textu.

Imunita spuštěná efektořy a geny rezistence

Tyto interakce rostlin a mikroorganismů jsou však daleko komplikovanější. Z výše zmíněného je zjevné, že mutualistické (vzájemně si prospěšné) organismy musejí být pro vytvoření symbiotického vztahu schopny potlačit obrannou odpověď vyvolanou MAMPs a zároveň nastartovat procesy pro ustavení symbiocy (to dělají třeba Nod faktory – Nodulation factors, hlízkových bakterií, jde o molekuly lipochitoooligosacharidů). Může však rostlinná buňka rozpoznat i při interakci s patogenem, že je PTI imunita neúspěšná? Mikrobiální patogeny, ale třeba také hádátka, nezřídka produkují efektořy – specifické bílkoviny, kterými potlačují PTI. Děje se tak na různých úrovních, třeba přerušením signalizace z receptorů, nebo potlačováním sekrece antimikrobiálních látek do buněčné stěny. Rostliny si v odpovědi na efektořy vyvinuly receptorové proteiny (R-proteiny, dříve známé jako geny rezistence). Dokážou rozpoznat buď přímo efektořy, nebo monitorují jejich cíl a po detekci spouštějí druhou úroveň obrany – imunitu spuštěnou efektořy (Effector Triggered Immunity, ETI). ETI často končí rychlou programovanou buněčnou smrtí. Výjimkou je však interakce s nekrotrofním patogenem, při níž se rostlinná buňka snaží buněčnou smrti za-

bránit. Nekrotrofní patogen poškozením pletiva způsobuje jeho nekrózu (viz výše; nezaměňovat s HR). Důležité je správně regulovat produkci reaktivních forem kyslíku – jejich zvýšená koncentrace zpravidla vede k hypersenzitivní reakci. Patogeny si na oplátku vyvíjejí nové efektoři, které jsou následně rozpoznány u rostlin s odpovídajícím R-proteinem. Na tyto rostlinné jedince je v přítomnosti patogenu vyvíjen velký selekční tlak, a alela pro R gen se proto v populaci rychle rozšíří. Na druhou stranu je ale vyvíjen tlak i na patogen a dochází k maskování efektorů a zvyšování virulence. Koevoluce mezi patogenním „zbrojním arzenálem“ a rostlinnými receptory pro jeho rozpoznání a obrannou reakci lze znázornit cik-cak schématem koevoluce (obr. 2), které zobrazuje „závody ve zbrojení“, oblíbený koncept evoluční biologie. Na konkrétním příkladu to lze ilustrovat třeba efektoři patogenních hub, jimiž štěpí buněčnou stěnu rostliny, např. enzymem celulázou štěpí celulózu. Rostlina detekuje naštěpené zbytky svých polysacharidů (DAMPs), podobně jako hlavní složku buněčných stěn hub chitin (PAMPs). Na to reaguje sledem událostí – vyvolá v buňce poplach (vznikají kyslíkové radikály, uvolňují se vápenaté ionty aj.), začne produkovat chitinázu a tím napadat buněčnou stěnu houby. Protože její vlastní celulóza je štěpena, začne produkovat druhý nejčastější stavební polymer – lignin, čímž se zvýší mechanická odolnost, navíc pouze některé druhy hub dokážou lignin rozštěpit.

Imunitu spouštěnou efektoři můžeme popsat i z pohledu konceptu známého jako

„gen proti genu“. Pokud rostlina disponuje R-proteinem schopným rozpoznat patogenní efektor, v tomto případě označeným jako avirulentní faktor, obvykle je k danému kmenu patogenu odolná. Ale v rostlině, které odpovídající R-protein chybí, se takový efektor chová jako virulentní faktor a nakonec umožní překonat obranu a rostlinu infikovat. Takový izolát (kmen) patogenu se označuje jako virulentní (schopný infekce), v opačném případě avirulentní.

Co mají rostlinná a živočišná imunita společného?

Je nutné dodat, že podle současných poznatků se rozdíl mezi PTI a ETI pomalu stírají a při výuce tak má větší význam zdůraznit obecné obranné mechanismy založené na receptorech, a hlavně vzájemnou koevoluci mezi rostlinou a patogenem.

Není také bez zajímavosti, že bílkovinné receptory pro PAMP, ale i R-proteiny v ETI, pracují na podobném principu u živočichů i rostlin a vyvinuly se ze společného předka. Z místa napadení se signály šíří i do neinfikovaných částí rostliny, kde se aktivuje exprese obranných genů. Důležitou úlohu v tomto procesu sehrává kyselina salicylová. Tato obrana se označuje jako systémově získaná rezistence (viz výše). S ní souvisí jev tzv. primingu (nabuzení rostliny), kdy je po setkání s patogenem lépe připravena odolávat další podobné infekci. Pro uchování takového přizpůsobení dochází někdy k epigenetickým změnám, tedy dědičným změnám, které nemění primární strukturu DNA, ale odrážejí se např. v tom, jak jsou které geny za da-

ných podmínek zapnuty a naopak. Ty se mohou přenést i do další generace. Nezná to, i když trochu vzdáleně, jako adaptivní imunita známá u obratlovců?

Důležitým aspektem imunity je schopnost rozpoznávání – vlastní versus cizí – a v rámci cizích struktur rozlišování patogenních od těch neškodných, nebo dokonce užitečných. Mimochodem rostliny nemají zábrany v přijímání podobných pletiv, i když mohou pocházet z jiných druhů. To umožňuje roubovat nebo očkovat mnohdy nepříbuzné druhy a kultivary na jednu podnož. Zde si dovolueme poslední srovnání s fyziologií člověka, které se týká transplantací orgánů a jejich kompatibility s příjemcem. U pacientů s transplantovanými orgány musí být vrozená imunita utlumená farmaky a jsou doživotně sledováni, zda jim štěp slouží a tělo se ho nerozhodlo odmítnout. A etymologická vsuvka – slovo transplantace pocházející z latiny odkazuje zpátky k rostlinám – trans (přes) a planta (sazenice), dohromady „přesazení“.

Množství nově popisovaných typů receptorů, obranných molekul a signálních drah, vedoucích k neznámým mechanismům rostlinné imunity, dělají z jejího výzkumu fascinující pole poznání, s užitečnou aplikací v zemědělství, včetně zkvalitnění rostlinné výroby. Uvedli jsme pouze dílčí příklady, jež mají ilustrovat obecnější principy a mechanismy. Mohou zpestit výuku, ale i prohloubit schopnost uvažování na úrovni komplexních systémů, k nimž interakce rostlin s patogeny bezesporu patří.

Použitá literatura uvedena na webu Živý.

Anna Vosolsobě

Hrátky s droždím

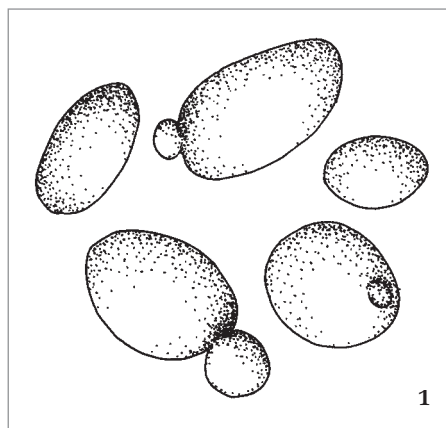


Úloha Hrátky s droždím byla připravena ve školním roce 2014/2015 pro školní kola Biologické olympiády kategorie B. Navazovala na téma přípravného textu pro soutěžící s názvem Země živitelka aneb Příroda ve službách člověka (kolektiv autorů, editor Karel Kodejš). Celý tento text je pro zájemce ke stažení na internetových stránkách biologickaolympiada.czu.cz pod záložkou Dokumenty a informace, Starší studijní materiály.

Úloha je zaměřena především na kvasinku pekařskou (*Saccharomyces cerevisiae*), tedy na organismus tvořící droždí. Kvasinka byla vybrána pro její velmi snadnou dostupnost, droždí jako materiál pro praktickou část úlohy není problém získat, stejně jako několik dalších potřebných pomůcek. Dá se říci, že kvasinky jsou „ochočeným mikroorganizmem“. Člověk je tradičně využívá při výrobě mnohých potravin, kvasné procesy byly známy již v mladší době kamenné. Nejstarším důkazem o využívání kvašení je nalezená kvasná nádoba na víno, o něco mladší jsou pak důkazy o přípravě nápoje podobného dnešnímu pivu. Nepostradatelné jsou

kvasinky samozřejmě i při kynutí těsta pro pečení.

Praktická část úlohy je zaměřena na pozorování droždí po přidání vlažné vody, tedy na kvašení. Droždí společně s vodou je umístěno do láhve uzavřené obyčejným nafukovacím balonkem, na němž se dá dobře pozorovat vznik oxidu uhličitého během kvašení (balonek se nafukuje). Jako pokračování úlohy je možné obsah láhve



využít pro mikroskopování buněk kvasinek. Stačí ho kápnout na podložní sklíčko, přikrýt krycím sklíčkem a pozorovat. Dalším případným rozšířením může být pokus s „divokými“ kvasinkami, které se přirozeně vyskytují na povrchu plodů ovoce, např. hroznového vína.

V úloze je také zmiňováno taxonomické zařazení kvasinky. Jde o jednobuněčného zástupce vřeckovýtvarných hub (Ascomycota), tedy skupiny, kam patří i mnohobuněčné organismy, jako např. dobře známé druhy smrž obecný (*Morchella esculenta*) nebo lanýž letní (*Tuber aestivum*). Kromě toho, že se kvasinky staly nepostradatelnými pomocníky v kuchyni, slouží člověku i jinde jako modelový organismus pro studium eukaryotní buňky, buněčného cyklu, stárnutí buněk nebo např. i lidských chorob. Jejich krátký životní cyklus, rychlé množení a snadná kultivace jsou jedněmi z předpokladů, které musí správný modelový organismus splňovat. I o tom se úloha zmiňuje. A nabízí se zde další rozšíření směrem k jiným modelovým organismům – třeba k trepce velké (*Paramecium caudatum*), kterou lze napěstovat v seném nálevu a následně pozorovat pod světelným mikroskopem.

Úlohu a její řešení najdete na webové stránce Živý.

1 Buňky kvasinky pekařské, ze kterých je složeno např. droždí. Orig. A. Vosolsobě