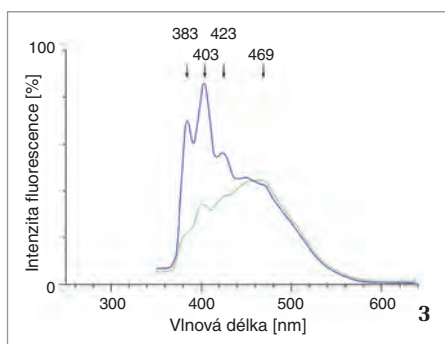


na němž se po grafické úpravě objeví rozmištnění degradačních zón a rovněž případných bakteriálních kolonií (obr. 1).

Ještě citlivější metodou je průkaz mizení pyrenu z lytických zón Petriho misek pomocí fluorescenční spektroskopie. I u této metody se využívá fluorescence pyrenu. Vyříznuté bločky agaru včetně povrchové vrstvy se zhomogenizují a přenesou do křemenných kyvet, které umožňují měřit fluorescenční spektra pyrenu a případně i jeho produktů pomocí fluorometru. Pyren má ve svém emisním spektru tři charakteristická maxima, takže lze prokázat, zda jeho fluorescence po působení aktivních bakterií mizí (obr. 3), což odpovídá rozkladu a odstranění pyrenu v miskovém modelu (obr. 1).

Pomocí těchto metod jsme našli 6 bakteriálních populací (viz dále) s překvapivě vysokou schopností rozkládat pyren. Přítomnost hub nebyla mikroskopicky prokázána. Tak snadnou detekci hledané skupiny bakterií lze připsat značnému znečištění vybraných vzorků polycyklickými uhlovodíky, pocházejícími zejména z použitých motorových olejů a kamenouhelného dehtu. Na druhou stranu ale v řadě vzorků nebyla očekávaná přítomnost rozkladačů PAU patrná – např. u zvětralého olejového nátěru nebo živinové směsi pro silniční povrchy. Schopnost přežívání



bakterií rozkládajících uhlovodíky je značná. Potvrdili jsme degradační aktivitu u referenčního vzorku skladovaného 10 let za stálých podmínek (v chladu, tmě a v rovnováze se vzdušnou vlhkostí).

Nepodařilo se však určit, zda šlo o nalezenných bakteriálních populací o konsorcium, nebo o samostatný bakteriální kmen. Rovněž mechanismus rozkladu pyrenu může být v jednotlivých případech odlišný. Z fluorescenčních fotografií je patrné, že degradační zóna je mnohdy daleko větší než bakteriální kolonie. Tento jev můžeme přičíst schopnosti bakterií rozpouštět a degradovat pyren „na dálku“ pomocí povrchově aktivních látek tvořených bakteriemi (šířka lytické zóny přitom odráží poměr mezi produkcí těchto látek a rychlostí růstu

3 Fluorescenční spektrum – modrá linka představuje emisní spektrum nedegradovaného vzorku agarové půdy. Na křivce jsou zřetelné tři vrcholy charakteristické pro pyren (při vlnových délkách 383 nm, 403 nm a 423 nm). Zelená přerušovaná linka zobrazuje emisní spektrum po degradaci pyrenu působením bakterií. Z průběhu křivky je zřejmý úbytek fluorescence v oblastech charakteristických pro pyren. Orig. všech obr. S. M. Tehrany

kolonie). To může být výhoda v případě, že jde o konsorcium, kde se na degradaci podílí více než jeden bakteriální druh.

Čistý kmen, získaný pasáží v běžných bakteriologických půdách, se stálou degradační aktivitou by měly být taxonomicky určeny a dále charakterizovány. Taxonomické zařazení je velmi důležité, protože v každém z případů může jít o patogenní druh bakterie. Dalším standardním postupem je stanovení účinnosti degradace za řízených podmínek a případně i schopnosti degradovat další PAU. Pokud by se ukázalo, že kmen vyhovuje průmyslovému využití, potom lze vyvinout metodu k odstraňování PAU a tím přispět k obnově zasažených území a zlepšení životního prostředí.

Jiří Libus

Za vším hledej auxin

Jakmile začal život vytvářet mnohobuněčné formy, vystala potřeba komunikace mezi jednotlivými buňkami. Vlastně ta potřeba existovala už dříve. O řadě bakterií je známo, že dokážou reagovat na hustotu své populace. Tu vnímají jako koncentraci signálních látek vylučovaných každou jednotlivou buňkou (tzv. quorum sensing, viz také Živa 2012, 3: 104–106). Jiné molekuly jsou vypouštěny bakteriemi jako signál ve stresu. Čím složitější organismus, tím přesněji musí koordinovat funkci každé buňky. Vznikla proto soustava hormonů. Hormony zásadním způsobem ovlivňují také růst a vývoj rostlin a jsou právem jedním z nosných témat rostlinné biologie. I v Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., jim věnujeme značnou pozornost – ve dvou laboratořích, které patří v rámci ústavu mezi největší a publikačně nejúspěšnější. Proto jsme vybrali jako téma článku vztahujícího se k 50. výročí založení ústavu (viz Živa 2013, 2: XXXV–XXXVI a str. LII kulérové přílohy tohoto čísla) hormon auxin.

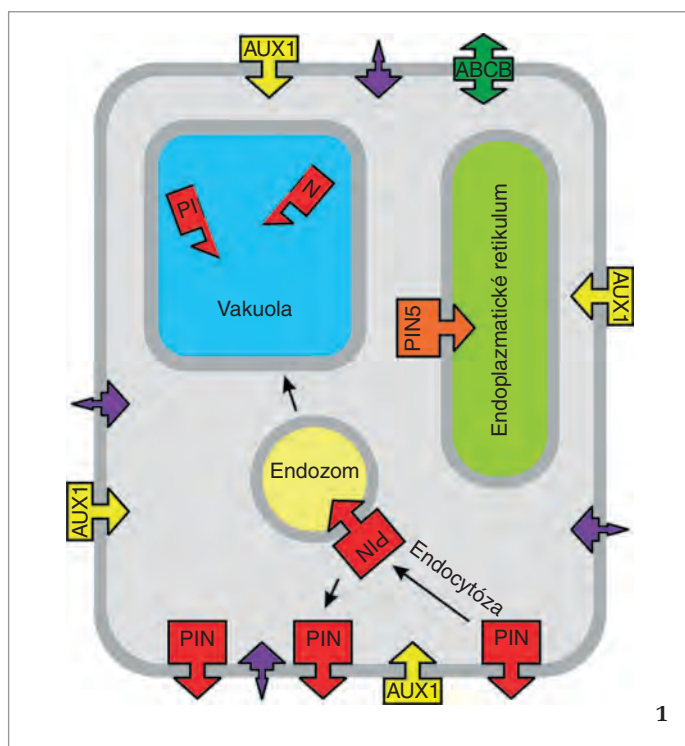
Termínem hormony se obvykle rozumějí chemické látky produkované buňkami, které jsou v nízkých koncentracích vnímány (jinými) buňkami, což vede k fyziologické odpovědi. Hormonální regulace je důležitá zřejmě pro všechny mnohobuněčné organismy. U řady živočichů nemožno chemické signály putující na velkou vzdálenost splnit nároky kladené na rychlost některých reakcí potřebných k přežití. Takové situace vyžadují zapojení nervové soustavy, uváděné jako výsada živočichů

a dodávající jim punc nadřazenosti. Všeobecně se méně ví, že rostliny rovněž používají elektrickou komunikaci na velké vzdálenosti. Mají vlastní soustavu iontových kanálů a dalších struktur potřebných např. pro vznik a šíření akčního potenciálu podél lýkové části cévních svazků. Způsob života rostlin je však velmi odlišný a i rychle rostoucí druhy většinou vystačí ve své odpovědi na životní podmínky s reakční dobou v řádu minut až hodin. Typické cévnaté rostliny jsou připoutány

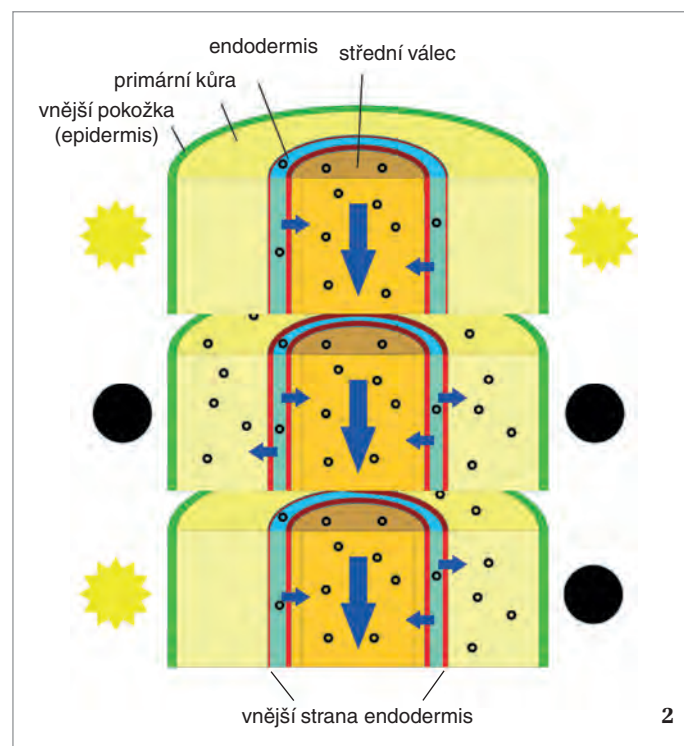
k určitému stanovišti, které nemohou opustit. Společně proto na schopnost upravit stavbu i funkci svého těla podle místních podmínek. Rostlinné hormony (fytohormony) z velké části určují architekturu rostlin – prodlužování a větvení stonku i kořenů (Živa 2001, 6: 249–251), případně přechod do plodné fáze života, nebo „detaily“ jako umístění trichomů a průduchů. Ovládají ale také otevírání průduchů, ohyby stonku i kořene nebo nastavení optimální polohy a natočení listů a květů.

Dokáže auxin mnoho různých věcí, nebo pořád jen tu jednu?

Prvním hormonem, který se podařilo u rostlin objevit, byl auxin (viz Živa 2001, 3: 105–106). A od té doby se ukazují stále další procesy, které auxin ovlivňuje (Živa 2007, 1: 8–12). V učebnicích fyziologie nalezneme seznam dějů, na jejichž průběhu se konkrétní hormon podílí. V případě auxinu by bylo úspornější vyjmenovat, které životní projevy nepostihuje – pokud by se takové vůbec našly. Pro představu zde vybírám několik příkladů, k čemu vede poškození genů souvisejících s auxinem: nefunkční polární transport auxinu zabrání vytvoření hlavní osy souměrnosti zárodku (mutace *gnom*); vývoj embrya bez funkčního receptoru pro auxin se zastaví ještě před založením děloh (*abp1*); zárodek s poškozeným genem pro transkripční faktor Auxin Response Factor 5 (*ARF5*; *monopteros*) vůbec nevytvoří základ kořene; vyřazení přenašeče auxinu PIN1 způsobí, že lodyha normálně nesoucí květenství nezaloží žádné orgány – je holá (*pin-formed*); kořeny mutantů v genech pro další přenašeče auxinu postrádají schopnost udržet růst směrem dolů (*pin2*, *aux1*); nadměrná tvorba auxinu u mutantu *yucca*



1



2

1 Schéma pohybu auxinu v buňce a mezi buňkou a okolím. Fialové šipky znázorňují difuzi, která za fyziologických podmínek (pH cytoplazmy ca 7; pH okolí ca 5,5) probíhá převážně směrem dovnitř. AUX1 – importéry z rodiny AUX1-LAX (Auxin resistant 1/Like AUX1); PIN – exportéry PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 a PIN7; PIN5 – vnitrobuněčný přenašeč; ABCB – některé přenašeče z této rodiny jsou schopny transportovat auxin (přínejmenším ABCB4 oběma směry); znázorněno pouze jednou, ačkoli jejich výskyt není polární.

2 Auxin se podílí na růstu stonku (hypokotylu) v závislosti na osvětlení. Během růstu na světle (●) proudí většina auxinu (černé kroužky) ve středním válci od vrcholu prýtu ke kořenu. Za tmy (●) dochází k přesunu části přenašeče PIN3 (znázorněného červenou linkou) z vnitřní strany buněk endodermis (nejvnitřnější vrstvy kůry) na vnější. Endodermis tak propouští auxin do kůry, což vyvolává prodloužení stonku. Při osvětlení z jedné strany (●●) se stejným mechanismem prodlužuje stinná, ale nikoli osvětlená strana stonku. Tím dochází k ohybu ke světlu. Upraveno podle: Z. Ding a kol. 2011

vyžene jinak drobný huseníček rolní (*Ara-bidopsis thaliana*) do výše pasu, ale pouze tehdy, když vytáhlé a málo větvené lodyže poskytnete oporu.

Skutečnost, že auxin zasahuje tak široce do růstu a vývoje rostliny, je dána tím, že působí velmi obecně, jeho vliv se však liší podle části rostliny. Klasickým příkladem je opačný vliv auxinu na růst kořene a stonku. Zatímco stonek reaguje na přidání auxin prodloužením růstem a utlumením aktivity postranních pupenů (posílením apikální dominance), rychlost prodloužování kořene se snižuje a dochází k podpoře jeho větvení. Záleží také na dávce hormonu. Když je koncentrace auxinu v médiu příliš vysoká, kořen jako by se snažil větvit

se ve všech možných místech najednou. To ale vede jen k zastavení růstu celého kořene.

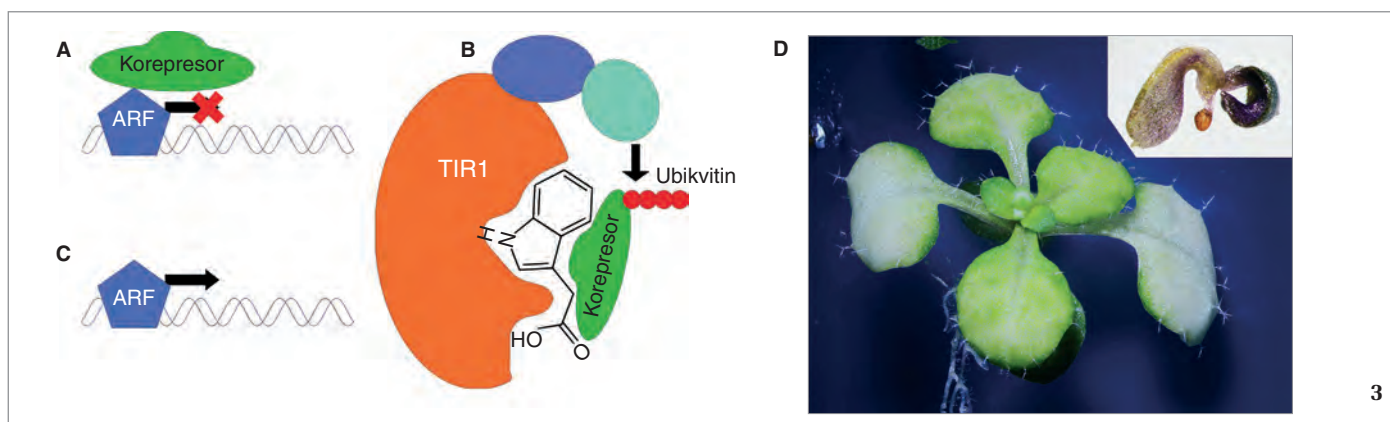
Auxin tvoří klíčovou součást přepínače mezi různými možnými osudy každé konkrétní buňky. Dokáže změnit osud „základní“ na „alternativní“. Jaké osudy má buňka na výběr, záleží na její historii. Původně skoro rovnocenné buňky meristému se postupně diferencují do různých buněčných typů, čímž se průběžně mění jejich vyhlídky do budoucna. Protože rostlinné buňky nejsou pohyblivé, jejich diferenciace je obvykle dána jejich polohou. Např. většina buněk povrchové vrstvy dělivého pletiva ve vzrostném vrcholu prýtu se stane pokožkou. Jednou za čas se však vyskytne (původně zcela stejná) buňka určená, aby se stala základem nového listu. Klíčovým signálem je auxin, čemuž odpovídá postižení mutanta *pin*, popsáné výše.

Některé vývojové efekty auxinu nejsou tolik závislé na celkové dávce hormonu jako na poměru jeho místního množství ke koncentraci v okolních buňkách. Nejčastěji je rozhodující, ve které buňce je auxinu více než v okolí – lokální koncentrační maximum. Právě kvůli působení podél gradientu koncentrace považují někteří autoři auxin spíše za morfogen než hormon. Morfogeny jsou látky vytvářející „morfogenní pole“, kde jejich koncentrace klesá se vzdáleností od centra. Buňky s různou koncentrací morfogenu (a tím i různě daleko) se mohou vydat odlišnými cestami diferenciace – tak se zakládá řada orgánů v embryích živočichů. Auxinové gradienty často opravdu řídí vznik nových struktur. K založení nových orgánů, např. listů, ve vzrostném vrcholu prýtu dochází v buňkách s nejvyšší koncentrací auxinu. I postranní kořen vzniká z jediné buňky pericyklu (vnější vrstvy středního válce), která nahromadí dostatek auxinu. Vyvíjející se list tvoří auxin a buňky se v místech jeho hromadění diferencují v základ cévních svazků a odesílají ho směrem ke stonku.

Cesta auxinu: odkud, kam a jak

Auxin vzniká převážně v mladých listech nebo květech na vzrostném vrcholu nadzemní části rostliny. Odtud putuje z buňky do buňky, až se dostane do floému, lýkové části cévních svazků. Floém dopraví většinu auxinu na velké vzdálenosti, část paralelně putuje pomalejší cestou kambiem. Tato cesta je obdobná transportu mezi buňkami ostatních pletiv – představuje aktivní proces za pomoci specifických bílkovinných přenašečů. Díky tomu lze řídit směr a intenzitu této složky toku auxinu. Podle směru přenosu přes plazmatickou membránu jde o dva druhy přenašečů: importéry a exportéry (obr. 1). Importující bílkoviny vychytávají auxin z okolí buňky a zvyšují jeho koncentraci v cytoplazmě. Exportní přenašeče fungují opačně. Jaký to má smysl? Exportéry (na rozdíl od importérů) jsou na povrchu většiny buněk přítomny jen na jedné straně (polárně) a vypouštějí molekuly auxinu pouze jedním směrem. Tento směr bývá společný pro buňky určitého pletiva, což vede k orientovanému (polárnímu) toku auxinu pletivem. Směr a intenzitu polárního transportu dokáže rostlina regulovat podle vnějších podmínek a potřeb růstu a vývoje. Největší podíl na polárním transportu auxinu mají jeho exportéry z rodiny PIN. Byly objeveny v modelovém pokusném druhu rostlinných biologů, huseníčku rolním, dnes jsou ale známy z mnoha dalších rostlin, počínaje mechem čepenkou odstálou (*Physcomitrella patens*) přes vranečky (*Selaginella*) a jehličnany až po zřejmě všechny krytosemenné. Zdá se tedy, že obdobný systém přenosu auxinu stál u zrodu cévnatých rostlin. Pro exkurzi do ještě dávnější evoluční historie rostlin však musíme počkat na poznatky o genomech mnohobuněčných zelených řas.

Poměrně komplikovaný dynamický systém, který udržuje vhodnou koncentraci auxinu v buňkách a současně jeho tok pletivem, se nabízí jako téma pro matematické modelování. Matematický popis



není samoučelný. Model, který dokáže předpovědět výsledky teprve chystaného pokusu, nám může pomoci vybrat správné experimentální podmínky. Ještě podstatnější je ale jeho kontrolní funkce. Pokud předpovědi vytvořené modelem vycházejí, je pravděpodobné, že jsme správně pochopili, jak popsany jev funguje. Klára Hoyerová z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., a Petr Hošek z Českého vysokého učení technického nedávno testovali svůj model pohybu auxinu mezi buňkou a okolím. Při porovnání předpovězených a naměřených hodnot objevili nesrovnalosti. Analýzou modelu zjistili, že by odchylky vysvětlila přeměna části sledovaného hormonu na jinou látku, což se podařilo ověřit pokusem. Mohli tak provést korekci svého modelu, ale posunuli i stav našeho poznání této problematiky.

Velká pozornost badatelů se soustřeďuje na proces řízení polárního transportu auxinu. Je samozřejmě důležité, kolik bílkovinných přenašečů jednotlivá buňka obsahuje. Záleží ale i na tom, který gen z rodiny PIN slouží jako vzor pro výrobu jednotlivých přenašečů. Tyto geny totiž rozdílně reagují na nejrůznější podněty, např. na množství hormonů (včetně auxinu) v okolí, nebo na míru osvětlení. Přenašeče plní svou transportní funkci na cytoplazmatické membráně, jejich poloha však není neměnná. Membrána včetně molekul PIN vytváří váčky, které cestují dovnitř cytoplazmy (endocytóza). Obvykle po čase zase doputují na buněčný povrch. Tento proces umožňuje přenést exportéry auxinu na libovolnou stranu buňky, a tím udržovat, nebo měnit směr toku auxinu. Využívá se také jako zdržovací taktika – čím více času PIN stráví uvnitř buňky, tím méně práce vykoná. Je přitom snadné povolat přenašeče zpět, např. když stoupne koncentrace auxinu v buňce. Endocytóza přenašečů se využívá i pro trvalejší snížení transportní kapacity. Některé váčky pak nejsou recyklovány, ale nasměrovány do vakuoly, kde dojde k odbourání obsahu.

Velice zajímavou kapitolou je přesměrování toku auxinu v případech, kdy se vytvářejí nové gradienty koncentrace. Už mnoho let víme, že ohyb stonku směrem ke světlu je spojen s vyšší koncentrací auxinu na stinné straně (obr. 2). Podobně při ohybu stonku směrem vzhůru, kde se auxin hromadí na spodní straně.

V posledních letech se ukazuje, že regulovatelný přenašeč auxinu přes membránu je nástrojem se širším využitím, než se donedávna zdálo. Dva členové rodiny PIN

zůstávají na membráně endoplazmatického retikula (ER), které se s jejich pomocí stává místem ukládání, možná i odbourávání auxinu. Biochemická analýza naznačuje, že PIN5 transportuje auxin do ER, což spustí jeho chemickou přeměnu na zřejmě neaktivní látku (Mravec a kol. 2009). Zatím nevíme, jestli jde o vratný proces, ale podobný přenašeč PIN8 působí proti PIN5.

Příjem auxinového signálu

Hladina auxinu je vnímána přinejmenším třemi druhy receptorů. Jeden z nich máme dnes už detailně prozkoumaný. Ve své obvyklé podobě propojuje příjem auxinového signálu a spuštění příslušných genů. Aktivace těchto genů závisí na transkripčních faktorech z rodiny ARF (viz výše). Ty jsou však blokovány vazbou korepresoru (bílkoviny, která tlumí transkripci, ale na DNA se sama neváže, k tomu využívá jiný protein – v tomto případě ARF). Pouze pokud koncentrace auxinu v buňce dosáhne dostatečně vysoké úrovně, korepresor je označen k degradaci a odbourán. Tím se mohou zapnout geny potřebné pro odpověď buňky na auxin. Týmu amerických vědců (Tan a kol. 2007) se podařilo metodou rentgenové krystalografie zachytit okamžik rozpoznání korepresoru těsně před jeho odbouráním. Získali obrázek jednotlivých atomů všech zúčastněných molekul. Ukázalo se, že tvar korepresoru a receptoru TIR1 není komplementární. Štěrbinu mezi nimi však dokáže vyplnit molekula auxinu a působí tak vlastně jako lepidlo (obr. 3). TIR1 pak doručí korepresor k označení ubiquitinem a následnému odbourání v proteazomu. Od každé ze tří součástí systému (receptor TIR1, korepresor i transkripční faktor ARF) existuje rodina genů, které se liší svými vlastnostmi. Konkrétní pletivo nebo typ buňky používá pouze některé z těchto variant, proto můžeme pozorovat rozdílné odpovědi na auxinový signál u různých pletiv.

ABP1 (Auxin Binding Protein 1) byl objeven už v 70. letech 20. stol. Podařilo se shromáždit důkazy o mnoha jevech spojených s auxinem, na kterých se ABP1 podílí. Co se stále nedaří, je objasnit mechanismus fungování této bílkoviny. Na rozdíl od receptoru TIR1 pracuje ABP1 přímo na buněčném povrchu – nepotřebuje čekat na vypnutí či zapnutí genů. Tím získává na rychlosti. Během minut po obdržení auxinového signálu už jsou pozorovatelné např. změny v růstu buněk. ABP1 podporuje endocytózu exportérů auxinu, čímž

3 Nejlépe prozkoumaným receptorem auxinu je TIR1. Geny, které se aktivují auxinem, většinou využívají transkripční faktory ARF (Auxin Response Factor). Ty ale bývají zablokovány korepresorem z rodiny AUX-IAA (A). V přítomnosti auxinu je korepresor rozpoznán proteinem TIR1 a označen ubiquitinem k odbourání (B). To vede k uvolnění proteinu ARF a spuštění transkripce příslušných genů (C). Pokud je poškozen jeden z transkripčních faktorů ARF – ARF5, vyvine se postižená rostlina bez kořene a s narušeným vývojem cévních svazků (D, menší obr.). Během tří týdnů vývoje vytvořil zobrazený jedinec pouze jednu dělohu a jeden rudimentární list. Pro srovnání je přiložena stejně stará normálně vyvinutá rostlina. Všechny obr. z archivu autora

je odstraněn z cytoplazmatické membrány a snižuje množství auxinu vylučovaného z buňky. Po navázání molekuly auxinu na ABP1 však tato aktivita ustává. Vyšší koncentrace auxinu tak vede ke zrychlení jeho polárního transportu. ABP1 ovlivňuje mimo jiné i aktivitu řady genů, nebylo však dosud zjištěno jakou cestou.

Nejnovejším přírůstkem mezi receptory auxinu je SKP2A (S-phase Kinase-associated Protein 2A). Podobně jako TIR1 odpovídá za výběr proteinů k odbourání. Zdá se, že je specialistou na bílkoviny významné pro buněčný cyklus a ovlivňuje dělení buněk.

Samostatnou kapitolu fyziologie hormonálních regulací u rostlin představuje vzájemný vliv mezi signály zprostředkovanými různými hormony. I jevy, které byly považovány za typický projev odpovědi na auxin, etylen nebo kterýkoli jiný hormon, bývají ovlivněny dalšími signály. Navíc výčet látek, jež lze považovat za fytohormony, se stále prodlužuje. Za posledních několik let přibýly strigolaktony (nezávisle objevené japonskými a převážně francouzskými vědci; Umehara a kol. 2008, Gomez-Roldan a kol. 2008) a rostoucí řada peptidových hormonů. Tím se síť interakcí mezi hormony dále zaplétá.

Ačkoli od objevu auxinu uplynulo mnoho času a naše znalosti o jeho účincích jsou rozsáhlé, rozhodně nejde o vyčerpávanou problematiku. Stále dochází k novým objevům i u huseničky rolního. Překvapení se dají očekávat při zkoumání dalších organismů využívajících auxin, možná dokonce i mimo říši rostlin.

Seznam použité literatury je na webu Živý.