

# Genetika rostlin

**doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.**

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity  
Ústav experimentální biologie

Vytvořeno ve spolupráci se Servisním střediskem pro e-learning na MU  
Fakulta informatiky Masarykovy univerzity, Brno 2013

Tiskový výstup publikace vydané na Elportále MU (<http://elportal.cz/>)  
<http://is.muni.cz/elportal/?id=1119341>

© 2013 Masarykova univerzita

# Obsah

1. Struktura rostlinného genomu .....	5
1.1 Jaderný genom.....	6
1.2 Mimojaderná DNA.....	35
2. Genomika rostlin .....	44
2.1 Klíčové projekty studia rostlinných genomů .....	44
2.2 Nástroje studia rostlinných genů .....	45
2.3 Srovnávací genomika .....	51
3. Reprodukční vývoj rostlin – kvetení .....	53
3.1 Geny regulující přechod z vegetativního růstu do generativního .....	54
3.2 Geny podmiňující tvorbu meristémů květenství .....	59
3.3 Geny regulující tvorbu a identitu květních orgánů.....	60
3.4 Geny regulující růst květních orgánů a jejich zrání .....	60
3.5 Geny regulující tvorbu květu u Arabidopsis .....	60
3.6 Regulace genové exprese během vývoje květů, ABC model.....	61
4. Rozmnožování rostlin a jeho genetické důsledky .....	64
4.1 Způsoby rozmnožování rostlin.....	64
5. Inkompabilní systémy vyšších rostlin.....	78
5.1. Gametofytická inkompabilita.....	81
5.2 Molekulární analýza gametofytické inkompability .....	86
5.3 Sporofytická inkompabilita.....	90
5.4 Molekulární analýza sporofytické inkompability .....	96
5.5 Využití inkompability ve šlechtění .....	101
6. Determinace pohlaví u krytosemenných rostlin.....	105

6.1 Typy pohlaví jednotlivých květů.....	105
6.2 Typy pohlaví jednotlivých rostlin .....	105
6.3 Typy pohlaví skupiny rostlin (populace, druhu, odrůdy).....	106
6.4. Determinace pohlaví .....	108
7. Genetika odolnosti rostlin k patogenům.....	119
7.1 Mechanizmy působení rostlinných patogenů .....	120
7.2 Pasivní (konstitutivní) obranné mechanismy .....	122
7.3 Aktivní (indukované) obranné mechanismy .....	124
7.4 Vztah gen proti genu .....	130
7.5 Klasické metody determinace interakcí hostitel – patogen u lnu ( <i>Linum usitatissimum</i> ) .....	132
7.6 Inkompatibilní vztah mezi rostlinou a patogenem .....	134
7.7 Kompatibilní vztah mezi rostlinou a patogenem.....	135
7.8 Charakteristické rysy proteinů kódovaných geny R .....	137
7.9 Obrana před parazity a predátory: antinutriční faktory rostlin.....	143
8. Genetika odolnosti rostlin k abiotickým stresovým faktorům .....	146
8.1 Sucho (vodní deficit).....	147
8.2 Chlad .....	148
8.3 Horko.....	154
8.4 Poranění.....	156
8.5 Nedostatek kyslíku .....	157
8.6 Zasolení půdy .....	158
8.7 Toxické ionty v půdě.....	158
8.8 Stres působený nadbytkem těžkých kovů .....	159
8.9 Nadbytek ozónu.....	159

8.10 Přesvětlení .....	160
8.11 Křížová odpověď na stresy .....	161
9. Geneticky modifikované rostliny .....	162
9.1 Rezistence k herbicidům .....	162
9.2 Rezistence k hmyzím škůdcům .....	167
9.3 Rezistence k virům .....	169
9.4. Rezistence k bakteriálním chorobám .....	170
9.5 Složení zásobních látek .....	171
9.6 Trvanlivost plodů rajčat .....	174
9.7 Pylová sterilita .....	175
9.8 Nové typy rostlin .....	176
9.9 Odolnost vůči stresovým faktorům .....	177
9.10 Tvorba protilátek .....	178
9.11 Rostlinné vakcíny .....	180
9.12 Farmakologicky využitelné vzácné proteiny .....	181
9.13 Tvorba fytáz .....	183
9.14 Tvorba biodegradovatelných polyesterů .....	183
9.15 Fytoremediace .....	184
Literatura .....	186

# 1. Struktura rostlinného genomu

Genetická informace rostlinných buněk je obsažena v molekulách DNA, chromozomech, a je součástí tří různých organel; jádra, chloroplastů a mitochondrií. Struktura chromozomů jednotlivých organel se liší. Jádra rostlinných buněk obsahují lineární molekuly DNA, jejichž počet a délka je u jednotlivých rostlinných druhů odlišná (tab. 1.1). Chloroplasty a mitochondrie také obsahují DNA, ale ve formě kružnicových molekul; organely obsahují více kopií genomu.

Druh	Jednoděložné (J) Dvouděložné (D)	Počet chromozomů (n)	Ploidie	Velikost genomu (bp)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	D	5	2	$1,25 \times 10^8$
<i>Oryza sativa</i>	J	12	2	$4,20 \times 10^8$
<i>Brassica oleracea</i>	D	9	2	$6,00 \times 10^8$
<i>Lycopersicon esculentum</i>	D	12	2	$1,00 \times 10^9$
<i>Brassica napus</i>	D	19	2	$1,23 \times 10^9$
<i>Antirrhinum majus</i>	D	8	2	$1,54 \times 10^9$
<i>Vicia sativa</i>	D	6	2	$1,60 \times 10^9$
<i>Solanum tuberosum</i>	D	12	4	$1,80 \times 10^9$
<i>Zea mays</i>	J	10	2	$2,70 \times 10^9$
<i>Pisum sativum</i>	D	7	2	$4,10 \times 10^9$
<i>Nicotiana tabacum</i>	D	24	4	$4,40 \times 10^9$
<i>Hordeum vulgare</i>	J	7	2	$4,80 \times 10^9$
<i>Secale cereale</i>	J	7	2	$9,50 \times 10^9$
<i>Triticum aestivum</i>	J	21	6	$1,60 \times 10^{10}$
<i>Fritillaria assyriaca</i>	J	12	2	$1,30 \times 10^{11}$

**Tab. 1.1** – Charakteristika jaderných genomů některých druhů rostlin (v bp haploidního genomu, 2 – diploid, 4 – tetraploid, 6 - hexaploid).

## 1.1 Jaderný genom

Velikost celého genomu určitého druhu není závislá na počtu chromozomů. Např. pšenice má v haploidním genomu 21 chromozomů, ale asi 10x více DNA ve srovnání s genomem bramboru, který obsahuje 12 chromozomů. Rozpětí velikostí genomů u vyšších rostlin je uvedeno v tab. 1.1. Široká rozmanitost existuje i u druhů v rámci téhož rodu. Např. *Vicia faba* má asi 10x větší množství jaderné DNA ve srovnání s blízce příbuzným druhem *V. sativa*, přestože tyto dva druhy mají stejný počet chromozomů. Obecně lze říci, že rostlinný genom je mnohem větší v porovnání s genomem živočichů. *V. faba* má téměř 4x větší množství jaderné DNA než je v genomu člověka ( $3,3 \times 10^9$  bp). *Arabidopsis thaliana* má genom porovnatelný s živočišným modelovým druhem *Drosophila melanogaster* ( $1,65 \times 10^8$  bp) a velikost genomu kukuřice ( $2,7 \times 10^9$  bp) je srovnatelná s genomem člověka.

Také hodnota *C* nezreplikovaného haploidního jaderného genomu byla určena u řady kvetoucích rostlin bez ohledu na taxonomickou příbuznost a biologické vlastnosti a rozsah hodnot *C* je u rostlin velmi široký, od 0,2 pg u *A. thaliana* po 127,7 pg u *Fritillaria assyriaca*. Většina druhů má však méně než 10 pg DNA v haploidním genomu.

Jestliže bereme v úvahu druhy blízce příbuzné nebo naopak vzdáleně příbuzné, velikosti jejich genomů nekorelují s biologickou komplexností organismů nebo s počtem genů (tzv. **záhada C-hodnoty DNA**). Rozdílnost ve velikosti genomů je spojena s rozdílností v délce intronů, což jsou nekódující sekvence uvnitř genů. Velikost intronů je v korelaci s nekódujícími sekvencemi mimo geny. Velikost intronů může hrát roli i v regulaci genové aktivity prostřednictvím kondenzace chromatinu. Předpokládá se, že všechny rostlinné druhy potřebují k zajištění svých funkcí přibližně stejný počet genů. Průměrná velikost genu bez intronů je 1,3 kb, s introny 4 kb. Nekódující sekvence na 5' konci genu obvykle obsahují elementy, které mají funkci při regulaci transkripce genů. 3' konec genu obsahuje elementy pro modifikaci mRNA a pro konec transkripce, ale i další regulační elementy. Určení, kde končí 3' ohraničující oblast jednoho genu a kde začíná 5' regulační oblast druhého genu, není jednoduché. Většina DNA rostlin s velkými genomy spadá právě sem a funkce a význam těchto nekódujících sekvencí se stále studují.

Existuje úzká spojitost mezi velikostí genomu a životním cyklem určitého rostlinného druhu. Jednoleté rostliny, především autogamní efemerní druhy, mají malé genomy, zatímco vytrvalé druhy mají genomy větší. To je také spojeno s relativně rychlejším buněčným cyklem u jednoletých druhů ve srovnání s vytrvalými druhy.

### 1.1.1 Struktura DNA

Dvouřetězcovou jadernou DNA lze působením vyšších teplot denaturovat do dvou jednořetězcových molekul. Za vhodných podmínek může nastat opět komplementární párování mezi jednořetězcovými molekulami. Jestliže všechny ostatní parametry zůstanou zachovány, rychlost párování bude záviset na koncentraci komplementárních sekvencí. Genotyp s repetitivní DNA má frakci s vysokým počtem opakování, která bude hybridizovat rychleji než sekvence, které jsou jedinečné a vyskytují se v genotypu pouze jednou. Taková analýza kinetiky renaturace homologické rostlinné jaderné DNA ukázala, že kromě jedinečných sekvencí (genů) je velká část rostlinného genomu tvořena repetitivními sekvencemi.

Protože průměrná velikost kódované oblasti rostlinného genu je asi 1300 bp, 25 tisíc genů by znamenalo  $3,25 \times 10^7$  bp jedinečných sekvencí DNA kódujících produkty genů. U *Arabidopsis* tento předpoklad ponechává určitý minimální prostor pro introny a hraniční regulační oblasti. Avšak u kukuřice se předpokládá, že méně než 1 % genomu tvoří kódující sekvence. Tento hrubý předpoklad se blíží počtu bp, které jsou transkribovány do mRNA u druhu se srovnatelným genomem. U tabáku (*Nicotina*,  $4,40 \times 10^9$  bp) jsou pouze 2 % genomu transkribována do mRNA. Avšak biochemické analýzy ukazují, že až 40 % genomu tabáku je tvořeno jedinečnými sekvencemi DNA. Zřejmě tedy tento genom obsahuje mnoho jedinečných sekvencí, které nejsou transkribovány. U mnoha genomů je skutečně pouze asi 1 % transkribováno a translatováno v průběhu buněčného cyklu. Kódující kapacita rostlinných genomů s odlišnou velikostí je přibližně stejná a genomy kódují přibližně stejný počet genů.

V 80. a 90. letech 20. století byla pozornost věnována podstatě jaderné DNA, která je nezbytná pro identifikaci funkcí rostlinných genů. Hlavní frakce nekódujících sekvencí u rostlin jsou repetice DNA; konkrétní druh může mít v genomu 1 tisíc až 40 tisíc různých rodin repeticí. Tyto elementy jsou složeny asi ze 30 různých sekvencních motivů, které mají délku od 1 bp po více než 10 tisíc bp. Daný motiv může tvořit 5 % ale i 50 % celkové velikosti genomu, jestliže se opakuje v rozsahu  $10^2$ krát až  $10^5$ krát. Existuje pozitivní korelace mezi velikostí genomu a rozsahem repetitivních sekvencí. Repetice jsou v genomu uspořádány jako **tandemové** nebo **rozptýlené**. Význam těchto repeticí je spojen s regulační funkcí při rekombinaci, replikaci a transkripci, rDNA je vhodným nástrojem studia evolučních vztahů mezi druhy určitého rodu i mezi druhy různých rodů, jsou vhodným zdrojem genetických markerů využívaných v základním výzkumu i ve šlechtění.

Repetitivní sekvence je možné rozdělit na:

- málo až středně se opakující sekvence,
- vysoce se opakující sekvence.

Větší rostlinné genomy obsahují více repetitivní DNA. Např. *Pisum sativum* ( $4,10 \times 10^9$  bp) obsahuje až 70 % repetitivní DNA, *Vigna radiata* s menším genomem ( $5,00 \times 10^8$  bp) má

pouze 40 % repeticí. *Hordeum vulgare* má asi 80 % repeticí a *Oryza sativa*, která má nejmenší genom z obilovin, pouze 50 % a genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje pouze asi 14 % repeticí.

Málo- a středně repetitivní sekvence DNA se opakují maximálně několik tisíckrát a jsou často rozptýleny v chromozomech mezi jednokopiovými sekvencemi. Některé z těchto sekvencí mají známou funkci. Např. histonové geny a geny ribozomální RNA (rRNA) 5,8S, 18S a 28S jsou soustředěny na chromozomu do určitého místa, tzv. **organizátoru jadérka**. Tyto typy RNA jsou transkribovány jako jediný prekurzor. Jaderný genom *Vicia faba* má asi 4750 rRNA genů, zatímco *V. sativa* s menším genomem má jen 1875 těchto genů.

Vysoce repetitivní sekvence DNA jsou obvykle krátké sekvence, které jsou přítomny v  $10^5$  až  $10^7$  kopiích na genom. Tento typ DNA často souvisí se strukturou chromozomů (např. centromera). Velké úseky vysoce repetitivních sekvencí mohou také souviset s různou formou kondenzace DNA během buněčného cyklu ve srovnání se zbývající částí genomu, což má za následek různou intenzitu barvení těchto oblastí chromozomu (heterochromatin).

Většina repetitivních sekvencí jsou tandemové repetice, včetně sekvencí spojených se strukturami chromozomů jako jsou centromery a telomery, tzv. satelitní DNA, tvořená heterochromatinem a geneticky inaktivní. Zatímco u většiny živočichů a kvasinek je satelitní DNA bohatá na báze A-T, u rostlin je bohatá na báze G-C. Rozptýlené repetice zahrnují **transpozony a retrotranspozony**.

### *Centromera*

Většina chromozomů eukaryot obsahuje specializovanou oblast tvořenou heterochromatinem – centromeru. Podle její polohy jsou chromozomy klasifikovány na metacentrické, akrocentrické a telocentrické. Tyto primární chromozomové konstriktory jsou důležité při segregaci chromozomů v mitóze a meióze. Během profáze jaderného dělení se vytváří složitá proteinová struktura, tzv. kinetochor. Centromerický chromatin je vysoce kondenzovaný. Centromerická oblast může být 1 Mb např. u *A. thaliana* nebo více než 100 Mb u pšenice. Opakování repetice asi 180 bp a vysoce heterochromatinový stav naznačuje, že tato struktura je potřebná pro aktivitu centromery. Ačkoli je organizace a uspořádání repetic v oblasti centromery vysoce konzervativní, mezi organismy, dokonce mezi příbuznými druhy, je vysoce variabilní.

### *Telomera*

Konce eukaryotických jaderných chromozomů (telomery) jsou nezbytné pro stabilitu chromozomů a chrání je před strukturálními přestavbami a exonukleázovou degradací. U mnoha organismů včetně rostlin jsou telomery tvořeny krátkými jednoduchými repetitivními sekvencemi DNA s vysoce konzervativními sekvencemi  $C_n T_m A_n / T_n A_m G_n$ , kde  $m = 0$  až 1,  $n = 2$  až 4. Například telomery člověka a trypanosom mají telomery tvořeny stejným motivem TTAGGG. Motiv telomer *Arabidopsis* je TTTAGGG. Připojení těchto repeticí



k chromozomové DNA je katalyzováno enzymem terminální telomerovou transferázou (telomerázou). Telomeráza je enzym, který zajišťuje kompletní replikaci chromozomů a kompenzuje tak neúplnou replikaci 5'-konců chromozomů DNA polymerázou. Je to reverzní transkriptáza, která ke 3'-konci telomerového G-řetězce přidává další telomerové repetice. Enzym obsahuje RNA molekulu, která je komplementární s 3'-koncem chromozomové DNA. Telomeráza není schopna prodlužovat tupé konce dvouvláknové DNA, ale jako substrát využívá pouze přesahující jednořetězcové 3'-konce DNA. Zvláštní forma replikace konců lineárních DNA molekul je nezbytná pro připojení DNA polymerázy a její pohyb po templátu ve směru 3' → 5'. Konce DNA molekul jsou pravděpodobně citlivé k exonukleázám. Nereplikující se telomera tvoří komplex s proteinem, který má ochrannou funkci. Telomery mohou navíc obsahovat další oblast repeticí, která je lokalizována proximálně (blíže k centromere) od telomerových repeticí. U žita tvoří tato DNA 12 až 18 % genomu.

### *Mikrosatelity*

Mikrosatelity (STR – angl. short tandem repeats nebo SSR – angl. simple sequence repeats) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů 1 až 6 nukleotidů (např. (A)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>). Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 bp. Mikrosatelity jsou součástí nekódujících sekvencí genomu. Nejvíce informací o mikrosatelitech bylo získáno z živočišné říše, mnohem méně z říše rostlinné. Nejedná se o nadbytečnou DNA, ale DNA, která se podílí na regulaci rekombinace, replikace a transkripce.

Základní mikrosatelitní motiv bývá zastoupen v různém počtu opakování (n). Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na:

- dokonalé,
- nedokonalé,
- složené.

Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislým motivem, např. (AG)<sub>24</sub>, u nedokonalého mikrosatelitu je základní mikrosatelitní motiv přerušen sledem náhodných bazí. Složený mikrosatelit je tvořen několika různými motivy, např. (AG)<sub>14</sub>(AT)<sub>35</sub>. Počet dinukleotidových mikrosatelitů v genomu rostlin je asi desetkrát nižší než v lidském genomu. Odhaduje se, že mikrosatelit delší než 20 bp se v genomu rostlin vyskytuje průměrně na každých 23,3 kb. Nejhojnější jsou dinukleotidové mikrosatelity, nejméně časté jsou mono- a tetranukleotidové mikrosatelity. V rostlinných genomech je nejčastější motiv (AT)<sub>n</sub>. Z trinukleotidových opakování jsou v genomu rostlin nejčastější (AAG/CTT)<sub>n</sub> a (AAT/ATT)<sub>n</sub>. Oligonukleotidy odvozené od GATA- a GACA- mikrosatelitních motivů jsou jedny z nejčastěji používaných pro otisk DNA rostlinných genomů. Postupné poznávání mikrosatelitních sekvencí vedlo k vyvinutí postupů pro rychlou detekci jejich polymorfizmu. Toho lze využít při genetickém mapování.

Kromě chromozomů, které se pravidelně rozdělují do dceřiných buněk během mitotického a meiotického dělení jádra, se u mnoha rostlinných druhů hlavně z čeledě *Poaceae*, *Liliaceae*

a *Asteraceae*, vyskytují tzv. přídavné neboli **B chromozomy**. Během miózy se tyto chromozomy nepárují s chromozomy základní sady, protože s nimi nejsou homologní, nerekombinují. Segregace těchto chromozomů během jaderného dělení je náhodná, uskutečňuje se mechanismem non-disjunkce, a jednotlivé rostliny v populaci druhu mají odlišný počet těchto B chromozomů. Dědičnost B chromozomů je tedy nemendelistická. Jsou tvořeny především heterochromatinem a jejich funkce není zcela objasněna. Neobsahují stejný typ genetické informace jako standardní A chromozomy, ale mají fyziologický efekt, jako je např. u žita lepší zdatnost klíčnicích rostlin ve stresových podmínkách. Větší počet B chromozomů v genomu může negativně ovlivnit fertilitu rostlin. U rostlin byly poprvé identifikovány roku 1982, u kukuřice roku 1986, u žita roku 1993. Pravděpodobně vznikly introdukci cizorodé DNA.

### *Rozptýlené repetice*

Rozptýlené repetice tvoří významnou část genomu. Kopie jednotlivých repeticí jsou rozptýlené po genomu, nevyskytují se pohromadě. Mnohé z nich jsou transpozony a retrotranspozony, a u rostlin tvoří většinu rozptýlených repetic. Například více než 12 transpozonů odvozených od inaktivního transpozonu se vyskytuje v okolí genu *Adh1* u kukuřice.

### *1.1.2 Metylace DNA*

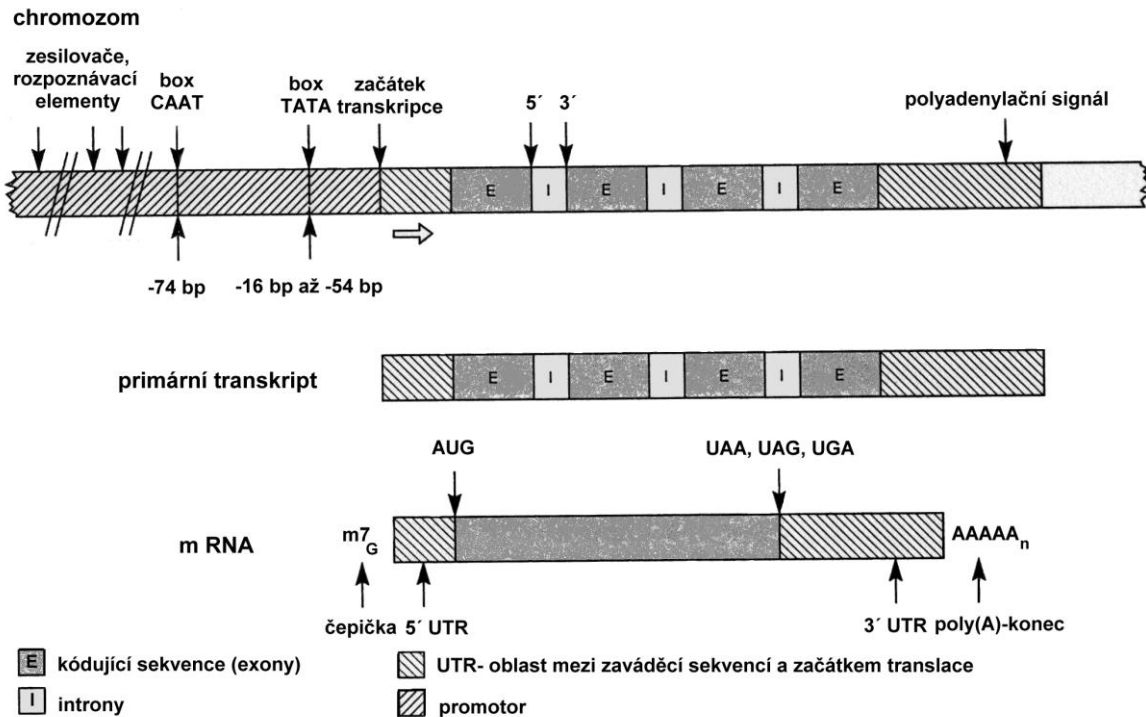
Cytozinová rezidua jaderných chromozomů rostlin jsou silně metylována. V genomu pšenice je asi 30 % všech cytozinových bazí a 82 % CpG dinukleotidů metylováno. Pro porovnání v genomu živočichů je metylováno jen 1 až 7 % C bazí. Na rozdíl od živočichů jsou v rostlinném genomu metylovány kromě CpG dinukleotidů také cytoziny v trinukleotidech CpXpG. Inkorporace 5-metylcytosinu do DNA je postreplikační modifikací. V genomu živočichů je méně CpG dinukleotidů než se teoreticky očekává na základě zjišťování obsahu C+G. DNA *Arabidopsis* má extrémně nízký obsah metylcytosinu; pouze 4,6 % metylcytosinů je metylováno, což je nejnižší obsah známý u rostlin. Metylace DNA u rostlin má za následek modifikaci exprese příslušných genů (epimutace).

### *1.1.3 Struktura jaderných genů*

Genom vyšších rostlin tvoří 25,5 tisíc (*Arabidopsis*) až 50 tisíc genů. Mnoho genů je přítomno v jediné kopii, ale velká část genů je přítomna jako více- a mnohogenové rodiny, které jsou tvořeny skupinami téměř identických genů v genomu. Základní struktura jaderných genů je obdobná jako u jiných eukaryotických organizmů. Obr. 1.1 ukazuje schematicky strukturu jaderného genu chromozomové DNA, primárního transkriptu (pre-mRNA) a mRNA.

Eukaryotický gen se skládá z několika částí: promotoru, zaváděcí sekvence, kódující sekvence a terminační sekvence. Promotor je místo, na které nasedá RNA-polymeráza. Sekvence promotoru nepodléhá transkripci, avšak rozhoduje o tom, kdy bude docházet k transkripci

genu a s jakou intenzitou. Účinnost promotoru silně zvyšuje zesilovač transkripce. Je to regulační oblast, která může sousedit s promotorem, ale většinou bývá od promotoru vzdálená. Zaváděcí sekvence je umístěna za promotorem a je již přepisována do RNA, ale ještě se nepřekládá do struktury polypeptidů. Pak následuje kódující sekvence, která se zpravidla skládá z kódujících úseků (exonů), přerušovaných nekódujícími úseky (introny). Za ní následuje terminační sekvence, která spolurozhoduje o stabilitě mRNA.



**Obr. 1.1** – Obecná struktura rostlinného genu (bp – pár bazí, začátek transkripce – 1 bp; AUG – začátek translace; UAA, UAG, UGA – stop kodony, konec translace; mRNA – vytvořená z primárního transkriptu po odstranění intronů mezi 5' a 3'). (Zdroj: Hughes, 1996)

## Promotor

Promotor je oblast chromozomu ležící ve směru 5' od transkripční oblasti. Je to sekvence DNA, která má schopnost vázat RNA polymerázu, a tím zahajovat přepis genu. Aby mohl promotor plnit svoji regulační funkci, musí mít určitou sekvenční charakteristiku, danou specifickou sekvencí nukleotidů a určitým optimálním poměrem A + T/G + C. Zvláště důležité jsou určité krátké specifické sekvenční úseky (boxy), společné všem promotorům, které byly podle své konvenční sekvence označeny zjednodušeně symboly TATA a CAAT, případně AGGA. Kromě těchto obecně se vyskytujících sekvenčních úseků mají promotory další sekvenční úseky, které rozhodují o specifičnosti transkripce. Všechny tyto důležité sekvenční úseky mají afinitu k regulačním proteinům, které migrují mezi cytoplazmou a jádrem, případně některé se trvale nacházejí v jádře. Tyto regulační proteiny se za určitých podmínek (po své aktivaci) vážou na specifické sekvence promotorů, a tím promotory aktivují

(nebo inaktivují). Promotor se obvykle dělí na dva základní úseky. Nejbližší počátku transkripce je tzv. TATA box, který váže specifický protein, jenž sám váže RNA polymerázu II. Tento úsek leží 16 až 54 bp od počátku transkripce. Pak následuje další úsek, předřazená sekvence (sekvence proti směru exprese genu). Jeho významnou doménou je krátký sekvenční úsek CAAT v poloze – 74 bp od počátku transkripce, který však může chybět. Často se na jeho místě nachází sekvenční úsek označovaný AGGA (obr. 1.1).

### **Zesilovač**

Zesilovač (angl. enhancer element) obsahuje krátké sekvenční úseky, jež svou přítomností zesilují projev genu. Krátké sekvence zesilovačů mohou měnit stupeň projevu genů nezávisle na své orientaci a do vzdálenosti až několika kb od počátku transkripce. Např. u sóje zesilovač exprese genu pro zásobní protein conglycinin tvoří sekvence čtyř opakování A(A/G/C)CCA a zesiluje expresi genu asi 25x.

### **Zaváděcí sekvence**

Zaváděcí sekvence je počáteční úsek struktury mRNA o délce několika desítek párů bází, na níž se uchycují ribozomy a postupují naprázdno až k prvnímu iniciačnímu kodonu.

Sekvence kolem počátku translace, určeného prvním tripletem ATG za promotorem, rozhodují o účinnosti translace a podílejí se tedy na regulaci na úrovni translace. Sekvence počátků translace jsou u jednotlivých genů tzv. genových rodin vysoce konzervativní.

### **Kódující sekvence**

Kódující sekvence rostlinných i ostatních eukaryotických genů (exony) jsou často na jednom nebo více místech přerušeny nekódujícími sekvencemi (introny), které na konci 5' začínají dinukleotidem GT a na konci 3' končí dinukleotidem AG. Sekvence počátků a konců intronů jsou i v delších úsecích u genových rodin značně konzervativní.

### **Terminační sekvence**

10 až 33 bp před ukončením transkripce je obvykle polyadenylační signál, který má velmi konzervativní konvenční sekvenci AATAAA. Většina rostlinných genů má druhý polyadenylační signál blízko stop-kodonu. Nedaleko ve směru 3' od tohoto místa dochází k enzymatickému odstřížení konce molekuly RNA a navázání enzymaticky syntetizovaného úseku polyA (polyadenylace RNA) (obr. 1.2). Doplnění sekvence polyA na 3'-konci je jedním z klíčových kroků projevu většiny eukaryotických genů, která zvyšuje stabilitu mRNA. Některé geny mají na 3'-konci terminační sekvenci, kterou je struktura, schopná tvořit na vlákně DNA vlásenku, tedy převrácené opakování komplementárního úseku DNA. Tato struktura vede k ukončení transkripce.

### **1.1.4 Geny rostlinného genomu**

Experimentální práce zabývající se klonováním rostlinných genů obvykle končí sekvenováním genů. Zpravidla jsou pak k dispozici dva typy sekvencí genů: sekvence klonu cDNA odvozeného od mRNA (odpovídající proteinovému produktu genu) a sekvence klonu z genové knihovny. Klon cDNA je komplementární k mRNA. Ten zahrnuje zaváděcí sekvenci, kódující sekvenci a terminační sekvenci. Nukleotidy jsou obvykle značeny od místa počátku translace ve směru 5'–3' od jednotky a na opačnou stranu od počátku translace se záporným znaménkem.

Úsek odvozený od klonu genu z genové knihovny je delší o promotorovou sekvenci (která není ve směru 5' přesně ohraničena). Na konci 3' přesahuje konec transkripce. Kódující sekvence obsahuje nejen sekvenci exonů, ale také intronů. Číslování takového klonu obvykle začíná od počátku translace. V sekvenování se uvádí to vlákno DNA, které svou sekvencí odpovídá mRNA. Opakující se úseky v sekvenci nebo důležité regulační úseky se označují čarou nad sekvencí.

Základní klasifikace genů může být založena na tom, jakým typem RNA-polymerázy jsou geny transkribovány, protože každý z typů má jiné regulační sekvence (promotor, zaváděcí sekvenci, terminátor transkripce). Geny pro rRNA jsou transkribovány RNA-polymerázou I, geny pro tRNA RNA-polymerázou III. Tento typ genů můžeme zahrnout do společné skupiny jako **geny složek genetického aparátu**. Druhou skupinu tvoří **geny kódující proteiny**, které jsou transkribovány prostřednictvím RNA-polymerázy II.

Některé geny jsou v genomu jedinečné, jiné se vyskytují v rodinách s 20 až 25 členy. Geny však tvoří tandemové repetice, i když mohou být v genetické vazbě. Jedním příkladem je rodina genů pro zein u kukuřice, které kódují zásobní proteiny semen. Rodinu tvoří dvě podjednotky, každá s přibližně 25 členy. Homologie kódujících oblastí v rámci podjednotky je vysoká (více než 90 % identita aminokyselinových sekvencí), ale homologie mezi skupinami je nižší.

#### ***Geny kódující 25S – 18S rRNA***

Eukaryotické ribozomy obsahují čtyři typy rRNA (Tab. 1.2). Z nich tři, a to a) 25 až 28S, b) 5,8S a c) 5S jsou součástí větší (60S) podjednotky ribozomů a d) 17 – 18S rRNA je součástí menší (40S) podjednotky ribozomů. V rostlinném genomu je genová rodina lokalizována obvykle v jediném bloku haploidního genomu jako mnohokrát se opakující série kopií genového bloku pro 18S – 5,8S – 28S rRNA. Tyto typy RNA jsou transkribovány jako jediný prekurzor, jehož posttranslační úpravou vznikají uvedené tři typy rRNA. Část DNA, na základě které se transkribuje tato prekurzorová rRNA (rDNA) je přítomna v genomu jako blok tandemových sérií s počtem opakování řádově  $10^3$  až  $10^4$ krát. Nejmenší počet opakování na haploidní genom je 125 kopií u pomerančovníku a nejvyšší 31 900 u hyacintu. Délka segmentu DNA se pohybuje v rozmezí 7 800 až 185 000 bp. Počet opakování je všeobecně

asi o jeden řád vyšší než u podobných genových rodin v živočišném genomu. Tuto opakující se jednotku rDNA je možno lokalizovat do určitého chromozomu metodou hybridizace *in situ*, do tzv. **organizátoru jadérka** (ang. nucleolar organizer region – NOR).

Genom	Typy rRNA	
	Větší podjednotky ribozomů	Menší podjednotky ribozomů
Bakteriální chromozom	23S, 4,5S, 5S	16S
Chloroplastová DNA	23S, 4,5S, 5S	16S
Mitochondriální DNA	23S, 4,5S, 5S	18S
Jaderná DNA rostlin	25-28S, 5,8S, 5S	17S-18S

**Tab. 1.2** – Typy rRNA různých genomů

Počet kopií základní jednotky rDNA se liší nejen mezi taxony, ale i mezi jednotlivými rostlinami. Diference byly dokonce zjištěny i mezi pletivý jedné rostliny. Mezi rostlinami ječmene (*Hordeum spontaneum*) byly nalezeny až šestinásobné rozdíly a mezi rostlinami bobu (*Vicia faba*) dokonce stonásobné rozdíly. Pletiva téže rostliny bobu se lišila počtem kopií rDNA až dvanáctinásobně. Příčinou rozdílů je **nerovnoměrný somatický crossing-over**.

Místo na chromozomu, v němž jsou geny rRNA lokalizovány, se vyznačuje v mitóze zaškrcením (**sekundární konstrukce**) a současně je v interfázi základem **jadérka**, které obsahuje rRNA transkribovanou z tohoto úseku. Předpokládá se, že existuje regulační protein, který má afinitu k promotorům genů rRNA. Svou vazbou na promotor působí protein jeho aktivaci. Aktivita genů rRNA je spojena s hypometylací cytosinu v úseku promotoru.

### *Geny pro 5S rRNA*

Geny, které kódují ribozomální 5S rRNA, tvoří samostatnou velkou multigenní rodinu. Jsou lokalizované v tandemové repetici na jiném místě genomu než geny pro úsek 18S – 5,8S – 28S rRNA. Transkripce těchto genů se děje prostřednictvím RNA-polymerázy III. Geny existují v ještě větších tandemových repeticích než předchozí skupina (u lnu až 50 000 kopií). Geny jsou podstatně kratší, celková délka nepřesahuje 500 bp. Rozdíly jsou i ve stupni metylace cytozinu.

### *Geny tRNA*

U rostlin byly popsány jednotlivé geny pro některé tRNA u sóji a fazolu. U sóji bylo zjištěno, že na genom připadá asi 400 genů. Tyto geny jsou v zásadě shodné s geny tRNA u prokaryot a ostatních eukaryot. Ve všech genomech je velký počet různých genů tRNA, které kódují téměř všech 61 smysluplných kodonů. V genomu existuje více typů tRNA s mírně odlišnými primárními sekvencemi, které jsou specifické pro stejný triplet. To jsou izoakceptorové tRNA. Kromě toho téměř všechny typy tRNA jsou kódovány malými genovými rodinami. Každá buňka obsahuje 50 až 100 různých typů tRNA. Délka molekul tRNA kolísá v rozmezí

79 až 90 nukleotidů. Geny tRNA jsou transkribovány jako prekurzorové molekuly, které jsou o něco delší než konečná délka tRNA. Transkripce začíná u purinového nukleotidu, obvykle méně než 10 nukleotidů ve směru 5' před sekvencí upravené tRNA a končí u sekvence oligo T, která bývá v krátké vzdálenosti ve směru 3' za délkou upravené tRNA. Úpravy obstarávají specifické nukleázy. Pak následuje přidání terminální sekvence CCA a modifikace specifických bazí.

Geny pro tRNA jsou v genomu obvykle uspořádány rozptýleně, ale jsou známy i tandemové repetice. Jen asi 10 až 20 % genů pro tRNA obsahuje introny, které jsou obvykle extrémně krátké (8 až 60 bp). Nejvýznamnějším rysem genů pro tRNA je, že jejich promotory jsou součástí vlastní sekvence tRNA. V přepisované sekvenci jsou dva promotorové úseky: jeden blízko konce 5', obvykle začínající asi mezi 8. až 12. nukleotidem, druhý poblíž konce 3' s počátkem v poloze asi 53 až 62. Pro úsek blízky konci 5' existuje tato konsensus sekvence: 5' T Pu Pu N N A Pu Py G 3'. Účinek promotorů je modulován úseky DNA přilehlými ke kódující sekvenci. Ty jsou bohaté na páry bazí A a T a obsahují domény, které snižují, a jiné, které aktivují expresi genů tRNA. Geny pro tRNA jsou transkribovány působením RNA-polymerázy III. Jsou schopny tvořit s RNA-polymerázou III stabilní transkripční komplexy, které přetrvávají mnoho cyklů transkripce. Je charakteristický výskyt neaktivních **pseudogenů**. Jde o nepřesnou kopii strukturního genu, která vznikla pravděpodobně nepřesnou duplikací nebo mutací, kterou se původně aktivní gen v genové rodině inaktivoval.

Většina typů tRNA byla odvozena ze společného genu. Specifičnost genu pro tRNA může být změněna *in vitro* pouhou změnou několika nukleotidů. Značný konzervativní charakter existuje také mezi prokaryotickými a eukaryotickými tRNA. Gen, který kóduje tRNA pro tyrozin v genomu *Arabidopsis*, vykazuje vysoký stupeň homologie s mitochondriálním genem fenylalaninové tRNA u kukuřice.

### *Geny pro histony*

Histony jsou proteiny, které jsou hlavní komponentou chromatinových proteinů. Pět genů pro histony je uspořádáno v repeticích s opakováním 10 až 600krát. Kódující oblast genů pro histony je vysoce konzervativní dokonce u různých druhů, ale jejich organizace v rámci repetice je odlišná. Během fáze S buněčného cyklu se obsah histonů zdvojnásobí a tyto histony jsou součástí nově replikované DNA.

### *Geny kódující proteiny*

Geny zásobních proteinů semen a hlíz

Zásobní proteiny semen jsou syntetizovány v poměrně krátkém období několika týdnů po oplození vaječné buňky. V této době v buňkách vyvíjejících se děloh, případně endospermu zrajících semen, mRNA těchto genů tvoří velkou až převažující frakci typů mRNA v pletivech vyvíjejících se semen. To je optimální situace pro izolaci mRNA pro zásobní

proteiny semen, konstrukci kopií cDNA reverzní transkripcí a ke klonování ve vektorových plazmidech *E. coli*.

Studium těchto genů má významnou praktickou aplikaci. U obilovin tvoří zásobní proteiny semen asi 10 % sušiny endospermu obilky, u čeledě *Fabaceae* je obsah proteinů semen 20 až 40 % a u některých rostlinných druhů obsah zásobních proteinů semen činí až 50 % sušiny. Nutriční hodnota zásobních proteinů semen je značně snížena tím, že tyto proteiny nejsou plnohodnotné. Zásobní proteiny obilovin jsou chudé na lysin a threonin, případně lysin a tryptofan (u kukuřice) a zásobní proteiny luskovin jsou chudé na methionin a cystein.

Zásobní proteiny semen se dělí na tyto typy:

- Albuminy rozpustné ve vodě,
- Globuliny rozpustné v 5% solném roztoku,
- Prolaminy rozpustné v 70% alkoholu,
- Gluteliny rozpustné ve slabých kyselinách a hydroxidech.

Albuminy se vyskytují jako minoritní frakce v semenech téměř všech rostlinných druhů. Globuliny tvoří podstatnou část zásobních proteinů semen u čeledě *Fabaceae*, ale vyskytují se i v zásobních proteinech mnoha jiných čeledí. Prolaminy se vyskytují především v semenech obilovin. Jejich název je odvozen od toho, že obsahují velký podíl prolinu a glutaminu. Všeobecně obsahují velmi málo lysinu, threoninu a tryptofanu. Gluteliny se vyskytují rovněž především u obilovin.

Zásobní proteiny semen musí být po své syntéze v buňkách zásobních pletiv uloženy v nerozpustné formě. Jsou ukládány v proteinových tělískách, což jsou modifikované vakuoly. Pro transport do proteinových tělísek mají zásobní proteiny specifický signální peptid. Rostlinný genom obsahuje tyto geny pro zásobní proteiny:

- Geny pro zeiny,
- Geny pro leguminy,
- Geny pro viciliny,
- Geny zásobních proteinů brazilského ořechu.

Dalšími skupinami genů s významnými funkcemi u rostlin jsou:

- Geny pro leghemoglobiny,
- Geny pro enzymy fotosyntézy,
- Geny pro stresové proteiny.

### *Geny pro zeiny*

Geny pro zásobní proteiny kukuřice zeiny byly první rostlinné geny studované metodami genového inženýrství. Zeiny jsou směs prolaminů, z nichž nejhojnější mají Mr 22 kD a 19 kD, ale jsou i zeiny s Mr 15 kD a velmi malou frakci tvoří zeiny s Mr 10kD. Přes rozdíly molekulové hmotnosti je struktura proteinů a jejich primární pořadí aminokyselin u všech



typů v zásadě shodná. V genomu kukuřice je asi 25 až 30 genů kódujících zeiny 22 kD, a stejný počet genů pro zeiny 19kD, dále 2 až 3 kopie genů pro zeiny 15kD a 1 až 23 kopie genů pro zeiny 10 kD. Jednotlivé geny každé skupiny se nepatrně liší svými sekvencemi, vykazují mikroheterogenitu. Podstatně se liší i intenzita jejich transkripce. Jen malý počet genů v každé skupině je transkribován intenzivně a některé geny jsou přepisovány poměrně vzácně nebo nejsou přepisovány vůbec.

Geny pro zeiny se vyskytují v genomu kukuřice v tandemových repeticích, lokalizovaných na třech místech genomu: na krátkém rameni chromozomu 7, na krátkém rameni chromozomu 4 a na chromozomu 10. Geny pro zeiny obsahují krátké sekvenční úseky promotorů obvyklé u promotorů jiných rostlinných genů: úsek TATA v poloze asi  $-35$  a úsek AGGA v poloze asi  $-70$ . Některé geny pro zeiny však jsou zvláštní tím, že mají dva promotory, P1 a P2. Promotor P1 leží 900–100 bp před promotorem P2 ve směru 5' a a promotor P2 leží 40–60 bp před počátkem kódující sekvence. Kódující sekvence genů pro zeiny nemají žádný intron. Na konci 3' jsou dva polyadenylační úseky AATAAA.

K aktivaci genů pro zeiny dochází výhradně v průběhu vývoje obilek zcela specificky: specifická mRNA pro zeiny se objevuje v době 10 až 15 dnů po opylení, s maximem 35 dnů po opylení. K vysokému stupni exprese genů pro zeiny v této době přispívá i zvýšení obsahu DNA v jádrech endospermu. Obsah DNA v jádrech pak tvoří až dvěstě násobek základní jednotkové hodnoty obsahu DNA (C) v haploidním jádře ve fázi buněčného cyklu  $G_1$  na rozdíl od očekávaného trojnásobku. Nedochozí však k selektivní amplifikaci genů pro zeiny.

### *Geny pro leguminy*

Základní formou zásobních proteinů luskovin jsou globuliny. Existují dva typy globulinů, které se vyskytují nejen u čeledě *Fabaceae*. První typ, který je podle základního proteinu nazván vicilinový, má sedimentační konstantu 7S a druhý typ, leguminový, má sedimentační konstantu 11S. Každá proteinová molekula leguminového typu je složena ze dvou tříd podjednotek: acidické  $\alpha$  a bázičké  $\beta$ , které jsou spojeny do dimeru a molekuly leguminu se skládají ze šesti takovýchto dimerů. Podjednotka  $\alpha$  u hrachu má Mr asi 40 kD a podjednotka  $\beta$  asi 20 kD, které obsahují kovalentně vázanou jednu acidickou a jednu bázičkovou podjednotku. K úpravě dochází při průchodu membránou do proteinového tělíska. V místě spojení obou úseků nedochází k úpravě, ale k prostému zlomu. Prekurzor leguminů obsahuje krátký signální peptid, který umožňuje jeho transport do proteinových tělísek. Obě podjednotky jsou kodovány jedním genem. Geny pro leguminy tvoří malou genovou rodinu. K expresi genů dochází výhradně ve vyvíjejících se semenech. Geny byly opakovaně klonovány a sekvenovány.

Existují dva základní typy leguminů: A a B. Oba byly definovány na základě diferencí prekurzorového polypeptidu určených translací *in vitro*. Liší se také obsahem nedostatkové aminokyseliny methioninu. Typ A obsahuje více methioninu, typ B méně nebo žádný. U jednoho z klonovaných genů pro legumin B *Vicia faba* má kódující sekvence délku 1649 bp,

zaváděcí sekvence 57 bp a na konci 3' jsou 4 signální místa pro polyadenylaci. Gen kóduje pre-polypeptid, který má délku 484 aminokyselin a zahrnuje signální peptid délky 22 aminokyselin. Kyselý hydrofilní řetězec má 281 aminokyselin a bázický, poněkud hydrofobní řetězec má délku 181 aminokyselin. Oba úseky na sebe navazují. Každý z obou úseků je přerušen krátkým intronem. Introny mají délky 95 bp a 100 bp. Introny mají vyšší obsah A + T (76 %) než exony (53 %). Gen pro leguminy A sóji a hrachu mají introny ve stejných polohách, ale kromě toho mají ještě třetí intron. Byly také porovnávány promotorové sekvence na konci 5' a bylo zjištěno, že v poloze asi 100 nukleotidů od počátku transkripce mají všechny tři geny konzervativní sekvenci, která má délku nejméně 28 bp a byla nazvána leguminový box. Ten pravděpodobně podmiňuje specifčnost exprese ve vyvíjejících se semenech. Geny pro legumin tvoří malé genové rodiny s počtem méně než 10 genů na haploidní genom.

### *Geny pro viciliny*

Druhou hlavní frakcí zásobních proteinů semen hrachu a vikve jsou viciliny. Jsou v semenech přítomny v množstvích, která odpovídají 25 až 75 % váhového množství leguminů. Viciliny mají molekulovou hmotnost 180 až 200 kD. Skládají se ze tří podjednotek, samostatných polypeptidových řetězců, které mají u hrachu hmotnost 48, 50 a 72 kD a jsou kódovány třemi různými geny. U vicilinů dochází ke dvěma typům modifikací: 1. kotranslační modifikaci (odstranění signálních polypeptidů o Mr menší než 1 kD při transportu do proteinových tělísek) a 2. posttranslační modifikaci, kdy dochází k narušení (nicking) polypeptidových řetězců a k jejich glykozylovanosti. Geny pro viciliny mají 5 intronů a jsou kódovány malou rodinou genů.

### *Geny zásobních proteinů brazilského ořechu*

Paraořech (*Bertholetia excelsa*) obsahuje v pletivech endospermu zásobní proteiny zvláště bohaté na aminokyseliny obsahující síru, methionin a cystein. Ty jsou nedostatkové u luskovin. Uvedené aminokyseliny činí 8,3 až 9,1 % hmotnosti zásobních proteinů. Geny se tedy zdály výhodné pro vnášení do genomu luskovin. Paraořechy jsou však u některých lidí silně alergenní a tento protein patří k proteinům, které mohou způsobovat alergické reakce. Proto gen pro transgenozu u kulturních druhů nelze využít. Klonovaný gen pro zásobní protein je velmi zajímavý. Kódující sekvence má pouze 231 bp. Gen tedy kóduje polypeptid, který má 77 aminokyselin. Z nich je 14x zastoupen methionin a 6x cystein. Gen má značnou sekvenční homologii s jedním z genů pro zásobní proteiny semen skočce (*Ricinus communis*) a s jiným z řepky olejné.

### *Lektiny*

Rostlinné lektiny (aglutininy) jsou proteiny, které mají alespoň jednu nekatalytickou doménu, kterou se specificky váží k určitému mono- nebo oligosacharidu. Jsou to obecně rostlinné obranné proteiny. Různé typy lektinů mohou mít antivirové, antibakteriální, antihoubové, antiinsekticidní nebo antifeedantní účinky. Některé typy lektinů také působí specificky

toxicky pro vyšší živočichy a některé jsou toxické pro všechna eukaryota. Jsou známy např. náhodné otravy lidí syrovými nebo nedostatečně uvařenými fazolemi. Lektin se váže na střevní buňky a dochází k jeho endocytóze. Pak způsobuje zvýšenou metabolickou aktivitu, a to vede k hypoplazii buněk tenkého střeva. Podobné účinky má také lektin akátu a bezu černého. Tyto stromy také nikdy nejsou poškozovány hlodavci a spárkatou zvěří. Některé lektiny působí zvětšení pankreasu a další toxické vlivy.

Lektiny se vyskytují především v semenech, ale na rozdíl od zásobních proteinů semen, mohou se vyskytovat také v jiných částech rostlin. Lektiny kořenů leguminózních rostlin se například účastní interakce rostlinných buněk s buňkami bakterií fixujících dusík.

Lektiny jsou kódovány všeobecně malými genovými rodinami. Tyto malé genové rodiny mají obvykle aktivní i neaktivní geny. U hrachu je například aktivní jen jeden ze čtyř genů, přítomných v genomu.

Lektiny se dělí na:

1. **Merolektiny:** váží se jen na jeden glycid. Nemají schopnost aglutinovat buňky.
2. **Hololektiny:** váží se také výhradně na glycidy, ale mají dvě nebo více vazebných domén, takže mohou podmiňovat aglutinaci.
3. **Chimérolektiny:** fúzní proteiny, které mají karbohydrát vazebnou doménu kombinovanou s enzymatickou doménou (např. chitinázovou). Chovají se jako merolektiny nebo hololektiny, podle toho, kolik mají domén, nebo jsou schopny vázat glykoproteiny. Například typ 2 RIP je schopen štěpit chloroplastové proteiny.
4. **Lektiny typu 2 RIP:** Jsou to lektiny, které mají kromě domény, vážící se na karbohydráty ještě další doménu, která má přesně definovanou enzymatickou aktivitu. Typ 2 RIP má dokonce 2 domény, které se vážou na glykoproteiny. Lektiny typu 2 RIP jsou silně cytotoxické. Jejich řetězec B se váže na glykokonjugátový receptor na buněčném povrchu a dostává se dovnitř buněk. Řetězec A katalyticky inaktivuje ribozómy tím, že štěpí n-glykozidickou vazbu na velké rRNA. Tento protein je vysoce toxický pro všechna eukaryota.

Tento lektin obsahuje např. *Ricinus communis* - ricin. Lektin je toxický pro houby, ne pro bakterie, ale překvapivě podmiňuje také odolnost k rostlinným virům.

Z hlediska perspektiv přenosu genů do kulturních rostlin, geny pro lektiny jsou skupinou, se kterou je třeba zacházet velmi obezřetně. Některé lektiny totiž mohou být toxické i pro obratlovce (viz lektin sněženky – *Gallanthus nivalis* lektin GA-lektin nebo ricin).

### *Geny pro leghemoglobiny*

Leghemoglobiny jsou proteiny, které se vyskytují v kořenových hlízkách leguminóz, které fixují vzdušný dusík v symbióze s bakterií rodu *Rhizobium*. Mají zde dvojí funkci: snižují hladinu volného kyslíku, čímž chrání enzym nitrogenázu katalyzující tvorbu amoniaku ze

vzdušného dusíku. Enzym je poškozován již nízkými hladinami kyslíku. Fungují také jako přenašeči kyslíku k místům jeho terminálních akceptorů při dýchání.

Leghemoglobiny jsou tvořeny monomerními polypeptidy. Apoproteinovou složku kóduje rostlina, zatímco hemová složka je determinována genem rizobakterií. Leghemoglobiny jsou proteiny růžové až červené barvy. Tvoří až 30 % rozpustných proteinů kořenových hlízek a jsou lokalizovány v cytoplazmě buněk a způsobují tak načervenalé zbarvení hlízek. Při tvorbě kořenových hlízek jsou leghemoglobiny syntetizovány dříve než nitrogenáza, ale další zvyšování aktivity nitrogenázy je v korelaci se syntézou leghemoglobinů. Exprese genů pro leghemoglobiny v kořenových hlízkách je podmíněna nejen rostlinným genomem, ale i genomem rizobakterií. Primární regulace syntézy leghemoglobinů je na úrovni transkripce. Leghemoglobiny jsou kódovány malou genovou rodinou, která obsahuje také pseudogeny.

Struktura genů pro leghemoglobiny má mnoho společného se strukturou živočišných genů pro globiny. Živočišné globinové geny, které se účastní tvorby krevního barviva, mají jen dva introny, zatímco rostlinné geny pro leghemoglobiny mají tři introny. Lokalizace intronů v živočišných genech pro globiny odpovídá s přesností na nukleotid lokalizaci prvního a třetího intronu leghemoglobinových genů.

Globiny jsou v přírodě všeobecně rozšířeny. Zahrnují tetramerní hemoglobiny vyšších vertebrátů, monomerní hemoglobiny prochordátů, různé další globiny bezobratlých a dimerní globiny v kořenových pletivech neleguminózních rostlin fixujících dusík. Sekvenční shoda živočišných a rostlinných genů pro globiny se původně vysvětlovala tím, že došlo k přenesení živočišného genu do rostlin prostřednictvím neznámého vektoru. Dnes však převažuje názor, podle něhož geny pro globiny jsou přítomny již v rané fylogenezi u primitivních eukaryot a v průběhu fylogeneze se uchovaly, protože mají v rostlinách obecnou funkci. Leghemoglobinové geny byly podrobně studovány zejména u sóji a fazolu. V poslední době je věnována velká pozornost struktuře leghemoglobinových genů tropické rostliny *Sesbania rostrata*, která tvoří hlízky fixující vzdušný dusík nejen na kořenech, ale i na nadzemních částech rostliny. Projev leghemoglobinových genů u druhu *S. rostrata* je tedy odlišný od specifčnosti projevu odpovídajících genů u sóji. Příčinu těchto odlišností je třeba hledat ve struktuře promotorů. Při analýze sekvencí bází dvou leghemoglobinových genů *S. rostrata* a jednoho genu sóji byla shledána sekvenční podobnost od počátku translace až k poloze -240, ale dále byly již sekvence odlišné. Významné promotorové sekvenční úseky TATA a CAAT mají u různých leghemoglobinových genů shodnou polohu, obvyklou i u jiných rostlinných genů. Počátek transkripce v poloze -48 a druhý, méně často využívaný v poloze -44 jsou zvláštností leghemoglobinových genů. Analýza promotorů ukázala přítomnost několika významných krátkých sekvenčních úseků DNA, které se podílejí na regulaci leghemoglobinových genů. Byl zjištěn sekvenční úsek 16 bp, s konsenzus sekvencí NTNAATNNTTTATTTN, který se v úseku promotoru vyskytuje 3x. V buněčných jádrech buněk vyvíjejících se kořenových hlízek se podařilo prokázat protein, který pravděpodobně funguje jako transkripční faktor. To znamená, že se specificky váže na uvedený úsek DNA. Jedná se o regulační protein a jeho Mr je 50 kD. V promotorové oblasti -195 až -157 genu

kódujícího leghemoglobin u *S. rostrata* byly zjištěny dva krátké sekvenční úseky AAAGAT a CTCTT, které jsou vysoce konzervativní u promotorů rostlinných genů, jež se projevují specificky v kořenových hlízkách.

### ***Geny pro enzymy fotosyntézy***

Přestože fotosyntéza probíhá v chloroplastech, celá řada enzymů tohoto procesu je kódována jaderným genomem. K translaci dochází v cytoplasmě a pak jsou proteiny transportovány do chloroplastů. Při transportu dochází k jejich posttranslační úpravě, odštěpení transportního proteinu při průchodu membránou chloroplastů.

Jaderné geny pro enzymy fotosyntézy tvoří malé genové rodiny. Některé z těchto genů patří k nejlépe prostudovaným rostlinným genům z hlediska primární struktury. První závažný výsledek, který byl při studiu fotosyntézy na úrovni genů získán, je zjištění, že celá řada proteinů chloroplastů, účastnících se při fotosyntéze, se skládá z podjednotek, které jsou kódovány chloroplastovou DNA, a jiných, kódovaných jadernými geny. Nejvýznamnějším výsledkem studia genových rodin enzymů fotosyntézy je poznání regulace aktivity genů. Bylo umožněno nejen porovnáním sekvencí bází úseků promotorů, ale také pokusy, v nichž byly různým způsobem modifikované klonované geny přenášeny do jiných genomů.

### ***Geny pro menší podjednotky enzymu Rubisco***

Enzym ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza (Rubisco, rbc, RuBPC) je výchozí enzym fotosyntetické redukce CO<sub>2</sub> a fotorespirační oxidace uhlíku. Katalyzuje karboxylaci a hydrolytické štěpení ribulóza-1,5-bisfosfátu na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Uplatňuje se jak v Calvinově cyklu, tak v C<sub>4</sub> fotosyntetickém cyklu, který je aktivní v buňkách pochev cévních svazků. Také u rostlin s fotosyntetickým cyklem C<sub>3</sub> je tento enzym pletivově specifický. Vyskytuje se především v listech, méně v ostatních zelených pletivech, ale nevyskytuje se v kořenech, pokud nejsou zelené. Aktivní enzym se skládá z osmi jednotek a každá jednotka je složena ze dvou podjednotek: menší, která je kódována jaderným genomem (gen *rbcS*) a má velikost asi 14 kD a větší, která má velikost 53 kD a je kódována chloroplastovým genomem (gen *rbcL*). Uspořádání aktivního enzymu z podjednotek se uskutečňuje v chloroplastech. Prekurzor menší podjednotky má velikost 20 kD a má signální (transportní) část o Mr asi 8 kD, která se odděluje posttranslační úpravou při aktivním transportu do chloroplastů. Tohoto procesu se účastní ATP.

Geny pro menší podjednotku jsou přítomny v genomu jako multigenní rodina, obvykle o 6 až 12 členech. Geny mají jeden, dva nebo tři introny. Aktivita genů pro menší podjednotku je regulována světlem. Uplatňují se při tom na světlo reagující signální proteiny, fytochromy. Ty nepůsobí přímo jako regulační proteiny na promotory, ale jejich působení je zprostředkováno dalšími proteiny. Velikost úseku promotoru, který ovlivňuje expresi při regulaci světlem i orgánovou specifičností v plné intenzitě, je asi 1 kb. Promotor obsahuje proximální krátké specifické sekvenční úseky a distální zesilovače. Aktivita jednotlivých genů genové rodiny se

mění v různých pletivech a během vývoje rostliny. Část genů existuje v tandemových repetitcích a část je jich na dalších místech genomu jednotlivě. Například u rajčete se genová rodina skládá z pěti genů, z nichž dva existují izolovaně na různých místech genomu a tři tvoří tandemovou repetici, jejíž délka na chromozómu činí 10 kb. Srovnání sekvencí bází DNA pro *rbcS* z různých genomů ukázalo vysoký stupeň homologie mezi kódujícími i regulačními sekvencemi všech genů. Geny mají tři, dva nebo jeden intron a poloha intronů je u různých genů stálá.

Geny pro menší i větší podjednotku enzymu byly nalezeny také u některých bakterií a sinic. Původně byly geny pro menší a větší podjednotku na DNA řazeny tandemově. Toto seřazení genů, kde gen pro větší podjednotku (*rbcL*) sousedí ve směru 3' s genem pro menší podjednotku (*rbcS*) a oba dohromady tvoří operon. Tato organizace existuje také u sinic. V průběhu evoluce byly geny pro menší podjednotku enzymu (*rbcS*) přeneseny do jádra a genové produkty pak mohly získat jiné funkce. Především to bylo připojení transportního peptidu pro transport do chloroplastů. Musely vzniknout i nové regulační signály ke koordinaci genů větší a menší podjednotky. To obstarává působení fytochromů.

Dalšími geny podílejícími se svými produkty exprese na fotosyntéze jsou geny pro proteiny světloběrných komplexů (CAB – angl. chlorophyll a/b binding proteins) fotosystému II a fotosystému I. Geny pro všechny typy proteinů CAB jsou kódovány malými genovými rodinami, které se obvykle skládají ze 7 až 16 členů. Další komponentou jsou geny pro fosfoenolpyruvátkarboxylázu.

### ***Geny pro stresové proteiny***

Existuje několik skupin stresových proteinů kódovaných geny, jejichž promotory jsou aktivovány při různých typech stresů. Většina těchto genů je přítomna v genových rodinách, ale některé jsou zastoupeny jen dvakrát, popř. jsou jedinečné. Podle typu stresového faktoru, můžeme geny rozdělit na následující typy:

- Geny proteinů aktivovaných patogeny,
- Geny proteinů aktivovaných nízkými teplotami,
- Geny proteinů tepelného šoku,
- Geny proteinů aktivovaných nedostatkem kyslíku při zaplavení,
- Geny proteinů aktivovaných poraněním.

### ***1.1.5 Regulace genové exprese***

Naskytá se otázka, jak vznikají rozdíly mezi různými typy buněk, když každé jádro mnohobuněčného organismu obsahuje kompletní genetickou informaci (totipotence). Odpověď je jednoduchá; ne všechny geny jsou stále aktivní ve všech buňkách. Exprese genů je regulována vývojovými signály a signály z prostředí, které jsou detekovány regulačními oblastmi genů a podle toho dochází k aktivaci nebo supresi exprese genů. Exprese genů rostlin a syntéza enzymů a bílkovin je regulována v několika různých stupních:

- konformace chromatinu,
- kontrola transkripce,
- kontrola úprav transkriptu a transport,
- stabilita mRNA,
- kontrola translace,
- kontrola posttranslačních procesů, jako je fosforylace proteinů,
- transport bílkovin.

Budou popsány elementy DNA regulující transkripci RNA a diskutováno, jak geny detekují a odpovídají na signály aktivující transkripci.

### *Orgánově a buněčně specifická regulace*

Buňky, které jsou součástí jednotlivých pletiv a orgánů, mají aktivovány různé skupiny genů pro regulační proteiny (trans-aktivační faktory). Ty působí na soubor genů a genových rodin se společnými krátkými promotorovými sekvenčními úseky. Orgánově specifickou regulaci genových aktivit nelze oddělit od ontogeneze rostliny. Velké skupiny genů, které jsou aktivní během embryonálního vývoje a raných fází vývoje semen, jsou zapínány a vypínány současně a s pokračujícím vývojem se jejich aktivace mění. Stejně rozdíly jsou i mezi orgány, pletivy orgánů a buňkami pletiv a spektrum právě aktivovaných genů se mění v průběhu vývoje rostliny. Současně se mění kvalita i kvantita regulačních signálů i stupeň odpovědi na tyto signály.

Polyzómy všech rostlinných orgánů transkribují tisíce až desetitisíce typů mRNA; část je společných, ale každý orgán má specifické jinde se nevyskytující typy mRNA. Například u embryí bavlníku se transkribuje asi 30 tisíc různých sekvencí mRNA.

Dobře charakterizovaný gen kukuřice, který má důležitou funkci v determinaci průběhu buněčného dělení, je *Knotted1* (*Kn1*). Tento gen je nezbytný při zachování meristému výhonu a dochází-li k jeho expresi v listech, kde je normálně inaktivní, stimuluje proliferaci cévních buněk, které tvoří „hrbolky“ pletiva, protože buňky se dělí mimo plochu listu. Toto abnormální buněčné dělení se vyskytuje poté, co proliferace buněčného dělení by se měla zastavit u čepele plně diferencovaného listu. *Knotted1* je označován za **dominantní** nebo **aktivační mutaci** (angl. gain of function), protože fenotyp vzniká na základě exprese genu spíše než na základě ztráty exprese. Geny podobné tomuto byly identifikovány i u jiných druhů – *KNAT1* u *Arabidopsis*, a vždy mají funkci v morfologii a vývoji listů.

Vnitřními signály genové regulace jsou rostlinné hormony – auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová (ABA) a etylén, které působí na regulaci různých genů rostlinného genomu přímo na úrovni transkripce, ale současně i na dalších úrovních. Toto působení se děje modifikačním vlivem na regulační proteiny. **Auxiny** regulují buněčné dělení, prodlužování a diferenciaci buněk. Byla pozorována jak pozitivní tak negativní regulace auxinem. **Cytokininy** působí na mnoha úrovních. Aktivují buněčné dělení, stimulují růst

buněk, snižují apikální dominanci rostliny, oddalují stárnutí buněk, aktivují chloroplastový aparát, způsobují otevření průduchů, mají ochranný vliv vůči nepříznivým faktorům prostředí. **Gibereliny** výrazně ovlivňují růst rostlin, významně se uplatňují při regulaci klíčení semen a kvetení. Klasickým příkladem vlivu giberelinů na transkripční úrovni je indukce aktivity amyláz v počátečních fázích klíčení obilí ječmene. **Kyselina abscisová** reguluje mnoho významných vývojových procesů jako je vývoj a klíčení semen, funkci průduchů, odpověď rostliny na vodní deficit. Je antagonistou giberelinu. ABA inhibuje předčasné klíčení semen, ale stimuluje normální embryogenezi. **Etylén** ovlivňuje klíčení semen, růst klíčících rostlin, odpověď na poranění a jiná stresová působení a také zrání plodů.

### *Regulace podněty z prostředí*

Vnější prostředí rostliny vysílá směrem k rostlině řadu podnětů, které fungují jako signály pro aktivaci transkripce genů. Takovými hlavními podněty jsou světlo, délka dne, denní (cirkadiální) rytmy, patogeni, poranění a jiné stresy, které se často překrývají. Například sucho způsobuje stres vlivem nedostatku vody pro kořeny a indukuje aktivaci genů pro syntézu rostlinného hormonu ABA. ABA potom iniciuje kaskádu procesů končících ztrátou iontů z ochranných buněk, tím zavírání průduchů s cílem minimální transpirace a ztráty vody.

### *Regulační elementy promotoru*

Většina regulačních elementů genů je umístěna proti směru (5') transkripce, jako promotor. Regulační elementy umístěné na stejném řetězci DNA jako kódující oblast genu, se nazývají **cis-elementy**. Je to především **TATA box**, který je u většiny eukaryotických genů, v pozici -30 (tj. 30 nukleotidů od začátku transkripce). Vedle něj je lokalizován další cis-element – **CAAT box**. TATA je místem vazby RNA polymerázy II. Inducibilní geny obvykle obsahují TATA box a alespoň dva další cis elementy, které mají významnou funkci v konečných fázích přenosu signálu z prostředí.

Regulační elementy jsou často i dále od TATA boxu proti směru transkripce, i ve směru transkripce, v netranslatované oblasti a dokonce i v intronech. Tyto elementy obvykle fungují jako **zesilovače** a přispívají k efektivnosti RNA polymerázy II při aktivaci transkripce genu.

Sekvence zesilovače často tvoří stovky bp a mohou obsahovat kazety repetice, z nichž každá může fungovat nezávisle jako cis-element. Zesilovače mohou fungovat v obou směrech i ve značné vzdálenosti od kódující oblasti genu. Působí-li jako cis-elementy, musí být na stejném řetězci DNA jako oblast genu, který ovlivňují. Zesilovače mohou také regulovat specifitu exprese, kdy je určitý gen exprimován jen v určitém pletivu nebo orgánu. Tato funkce je zachována i v případě, že je zesilovač odstraněn z obvyklého místa a umístěn v jiném genu, kde aktivuje tkáňově specifickou expresi nového hostitelského genu. Strukturálně podobné **umlčovače** fungují proti regulaci exprese genu.

Zesilovače je možné v rostlinném genomu identifikovat prostřednictvím systému **pastí na zesilovače**, který souvisí s aktivitou transpozónů. Ac element je modifikován, takže nedochází



k jeho transpozici, a kódující sekvence transponázy jsou pod kontrolou promotoru 35S CaMV. Jde tedy o *Ds* element obsahující bezpromotorový gen pro  $\beta$ -glukuronidázu (*GUS*). Jestliže se konstrukt *Ds/GUS* transponuje před promotor v blízkosti vhodného zesilovače, buňka exprimuje enzym GUS, což lze detekovat kalorimetricky.

Rostlinné geny s podobnou funkcí mají elementy promotoru podobné. Například řada genů aktivovaných signály z vnějšího prostředí má konzervativní cis-element nazývaný **G-box** (5'-TCCACGTGGC-3'), který rozpoznává tento typ signálů. Deleční a mutační analýzy promotorů citlivých ke světlu, UV záření, ABA, kumarové kyselině (fenolická látka), chladu a dehydrataci ukazují, že změna G-boxu ovlivňuje schopnost promotoru reagovat na konkrétní signál. Významným rysem všech těchto promotorů je nezbytná přítomnost ještě jednoho cis-elementu kromě G-boxu, aby transkripce genu byla dostatečná. Jeden z nich je ABA-responzivní element ABRE v promotorech několika genů, které jsou aktivovány ABA. Mutační a deleční analýza s promotory obsahujícími ABRE element ukazuje, že ačkoli je G-box nezbytný pro funkci genů s ABRE elementem, přítomnost G-boxu není dostačující pro rozpoznání signálu zprostředkovaného ABA. G-box asi plní funkci při vazbě nějakého obecného transkripčního faktoru, který funguje v kombinaci se specifickými regulačními proteiny při aktivaci RNA polymerázy II.

### *Transkripční faktory*

Cis-elementy promotorů fungují ve spojitosti s proteiny (transkripční faktory, **trans-elementy**), které se vážou na DNA, a umožňují navázání RNA polymerázy II. Transkripční faktory mají alespoň dvě domény; jedna funguje při rozpoznání a navázání k cis-elementu a druhá při vazbě s dalšími proteiny, které se účastní aktivace transkripce. Transkripční faktory jsou kódovány rodinami genů vždy pro populaci příbuzných proteinů.

Transkripce genů je řízena multifaktoriálním nukleoproteinovým transkripčním komplexem. Modelová situace je uvedena na obr. 1.2. Aktivita RNA polymerázy II vyžaduje spolupráci řady základních transkripčních faktorů, bílkovin, které se vážou na TATA box (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIID) spolu s TATA vazebným proteinem (TFIID). Kromě toho je do transkripce RNA polymerázou II zahrnut specifický transkripční faktor (aktivátor), který se váže na distální promotorové elementy. Tyto transkripční faktory určují typ exprese určitého genu.

Protein	Druh	Motiv	Regulační funkce	DNA-vazebné místo
Cl	<i>Zea mays</i>	Myb	Syntéza antokyanu	-
P	<i>Zea mays</i>	Myb	Syntéza antokyanu	-
Kn1	<i>Zea mays</i>	Homeo- doména	Vývoj listů	-
DEFA	<i>Antirrhinum majus</i>	SRF	Vývoj květů	-
AG	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SRF	Vývoj květů	-
G11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Myb	Vývoj trichomů	-

TGA1b	Nicotiana tabacum	bZIP	Histonové geny	TGACGT
HBP-1a	Triticum aestivum	bZIP	Histonové geny	ACGTA
EmBP-1	Triticum aestivum	bZIP	Indukce ABA	GTACGTGG
GT-1	Nicotiana tabacum	-	Regulace světlem	GTGTGGTTAATATG
	Myb		transkripční faktor kvasinek, živočichů i rostlin	
	SRF		savčí transkripční faktor	
	bZIP		transkripční faktor	
	-		neurčeno	

**Tab. 1.3** – Transkripční faktory rostlin a jejich regulační funkce.

Sekvence distálních promotorových elementů byla identifikována u řady genů:

Box leguminu TCCATAGCCATGCAAGCTGCAGAATGTC determinuje regulaci genů pro tvorbu leguminu během vývoje semen.

1. Element ABRE (angl. abscisic acid-responsive element) CGAGCAGGC byl zjištěn v promotorových oblastech několika genů, které jsou regulovány rostlinným hormonem kyselinou abscisovou.
2. Element LRE (angl. light-responsive element) s boxem GATAAG, s boxem II – GTGTGGTTAATATG a boxem III – ATCATTTTCACT byl zjištěn u některých genů kódujících fotosyntézu, které jsou regulovány světlem.
3. Element ARE (angl. anaerobic responsive element)

Specializované transkripční faktory, které se mohou vázat na distální promotorové elementy, byly izolovány u některých rostlinných druhů. Byl klonován transkripční faktor EmBP-1 pšenice. Interaguje specificky s elementem ABRE. Některé transkripční faktory a vazebná místa promotorů jsou uvedena v tab. 1.3.

Proteiny s homeodomény jsou kódovány geny s tzv. homeoboxy, což jsou sekvence dlouhé 180 bp. Tyto proteiny fungují jako transkripční faktory při regulaci různých vývojových stadií rostlin a specifitě mnoha orgánů a pletiv. Geny s homeoboxy byly poprvé identifikovány u *Drosophila*. Mutace těchto genů mají za následek značné vývojové defekty, jako je tvorba jiných orgánů. U kukuřice jsou takovými geny *Knotted1* a *ZMH1/ZMH2*. *Knotted1* byl prvním takovým genem identifikovaným u rostlin.

### *Funkce chromatinu*

Hlavním kritériem pro aktivní transkripci genu RNA polymerázou II je dostupnost DNA, která je naopak determinována konformací chromatinu.

Histony pomáhají regulovat transkripci prostřednictvím stupně kondenzace DNA. Specifické enzymy jako je **histonová acetyl transferáza** mohou modifikovat histony a tak inhibovat kondenzaci a tím vytvořit oblast genomu přístupnou pro transkripční faktory. Odstranění

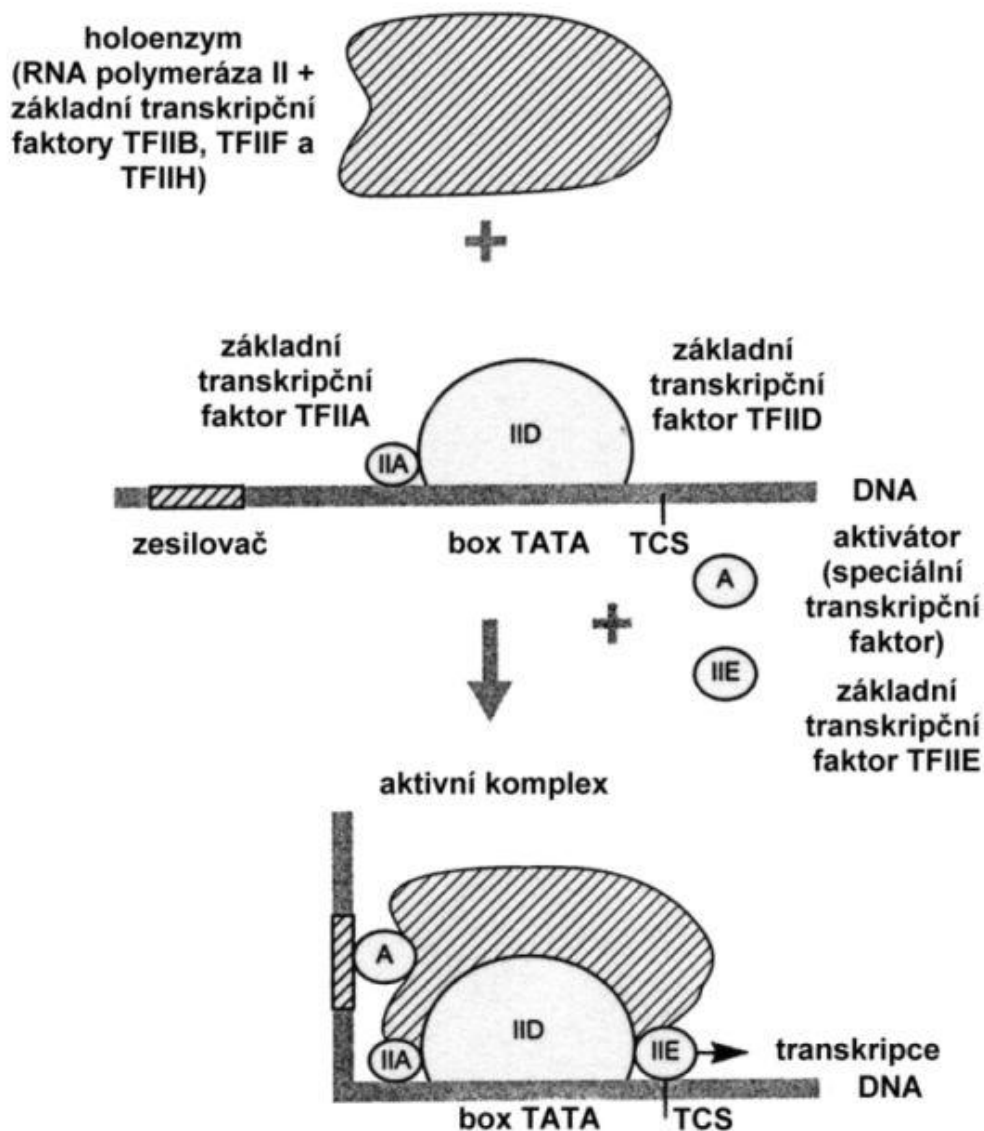
acetylových skupin z histonů prostřednictvím **deacetylázy** zvyšuje kompaktnost chromatinu a způsobuje, že geny jsou méně přístupné pro RNA polymerázu.

Genomy vyšších eukaryot jsou pravděpodobně organizovány do smyčkových domén chromatinu prostřednictvím připojení k jaderné síti (angl. scaffold). Smyčky, které jsou v rozsahu 5 až 200 kb, jsou zde připojeny v místech MAR (angl. matrix attachment region). MAR jsou bohaté na motiv DNA AT a jsou dlouhé 200 až 1000 bp. MAR plní funkci ve strukturní organizaci genomu a mohou usnadňovat transkripci genů nebo skupin genů prostřednictvím tvorby méně kondenzované struktury chromatinu. Chromatinové vlákno je k oblasti MAR připojeno proteinem MAR. Oblasti MAR obklopují kódující oblasti genů a často jsou spojeny s regulačními elementy. MAR byly charakterizovány u genů sóje, tabáku, hrachu a kukuřice. Také gen pro  $\beta$ -fazeolin u fazolu je ohraničen takovou sekvencí MAR na 5' konci a při transkripci funguje společně se zesilovačem genu. Také bylo zjištěno, že tato oblast genu má zvýšenou citlivost k DNáze I.

### *Epigenetické mechanizmy genové regulace*

Exprese genů může být ovlivněna epigenetickými změnami v genomu, které jsou dědičné a reverzibilní.

- Imprinting
- Paramutace
- Kosuprese
- Metylace



**Obr. 1.2** – Vytvoření aktivního transkripčního komplexu (TCS – začátek transkripce). (Zdroj: Hughes, 1996)

### 1.1.6 Transpozony

Transpozony jsou sekvence DNA, které mají schopnost měnit svoji lokalizaci v genomu **transpozicí**, kterou umožňují produkty genů, které jsou součástí daného nebo příbuzného elementu. Transpozony mohou být rychle a poměrně stabilně fixovány v populaci, přestože snižují zdatnost rostlin a mají mutagenní účinek.

Podobně jako u jiných eukaryot, také u rostlin byly objeveny transpozony. Transpozony tak odlišných organismů jako je *Drosophila*, kvasinky a kukuřice mají značně konzervativní způsob transpozice. Vlastnímu objevu transpozonů předcházely neobvyklé výsledky hybridizačních analýz u kukuřice. V roce 1938 analyzoval Marcus Rhoades neobvyklé

výsledky po samosprášení mexické kukuřice. Linie, která se vyznačovala zbarvenými obilkami, dala po samosprášení rostliny se zbarvenými, skvrnitými a bezbarvými obilkami v palici v modifikovaném mendelovském dihybridním štěpném poměru 12 : 3 : 1. Analýza ukázala, že se jednalo o mutace ve dvou genech, genu pro zbarvení (tvorba pigmentu)  $A_1/a_1$  a genu podmiňujícího skvrnitost  $Dt/dt$ . Formální genetické vysvětlení tohoto štěpného poměru bylo založeno na tom, že původní linie byla genotypu  $A_1A_1 dt dt$  a mutacemi se změnila na dihybridní  $A_1a_1 Dt dt$ , kde alela  $A_1$  podmiňuje zbarvení obilek a alela  $Dt$  skvrnitost. Barevné skvrny se však mohou fenotypově projevit pouze na pozadí jinak nezbarvených obilek. Po samosprášení dihybridního genotypu vzniklo potomstvo: 9/16  $A_1- Dt-$  a 3/16  $A_1- dt dt$  se zbarvenými obilkami, 3/16  $a_1a_1 Dt-$  se skvrnitými obilkami a 1/16  $a_1a_1 dt dt$  s obilkami bezbarvými.

Rhoades předpokládal, že skvrnitost by mohla být zapříčiněna reverzními mutacemi alely  $a_1$  na  $A_1$  v somatických buňkách, avšak velký počet skvrn na obilkách by zároveň znamenal extrémně vysokou rychlost reverze. Různým křížením nakonec prokázal, že alela  $a_1$  je opravdu nestabilní mutantní alelou, u které s vysokou četností dochází k reverzním mutacím. Tato nestabilita je však závislá na přítomnosti alely  $Dt$  jiného nevázaného genu.

Podobné pokusy u kukuřice prováděla v padesátých letech i Barbara McClintock, jejíž výsledky vedly k objevu transpozonů u kukuřice.

B. McClintock (nar. v r. 1902) se zabývala v laboratořích Cold Spring Harbor v USA cytogenetikou kukuřice. Prováděla velká množství křížení, při kterých zjistila i projevy různé genetické nestability. V těchto případech zjistila chromozomové zlomy a tvorbu skvrn v somatickém pletivu kukuřičného zrna. Tyto své výsledky zveřejnila v roce 1951 formou přednášky a poté v r. 1953 je publikovala. Avšak její genetické analýze jevu, který, jak dnes víme, byl podmíněn chováním transpozonů, bylo obtížné porozumět, a proto se její práce nesetkala s odezvou ve vědecké komunitě (dostala pouze dvě žádosti o separát své publikace z r. 1953). McClintock objevila autonomní a neautonomní transpozony u kukuřice (slovo transpozice použila poprvé v r. 1949). Našla genetický faktor  $Ds$  (disociátor), který podmiňuje vysokou náchylnost k chromozomovým zlomům v místě, kde se nachází. Tyto zlomy mohou být lokalizovány buď cytologicky, nebo geneticky (obr. 1.3). Navíc se zjistilo, že tato nestabilita je závislá na přítomnosti nevázaného genu  $Ac$  (aktivátoru), podobně jako nestabilita  $a_1$  byla závislá na přítomnosti  $Dt$ .

Když se McClintock pokusila lokalizovat gen  $Ac$  na chromozom, zjistila, že to není možné, neboť se u rostlin téže linie nacházel v různých místech. Také lokus  $Dt$  měnil svou polohu na rameni chromozomu, jak se zjistilo podle exprese různých recesivních fenotypů projevujících pseudodominanci (obr. 1.3). Na základě dalších pokusů bylo zjištěno, že se u kukuřice vyskytují mobilní elementy, které se mohou přemisťovat v jaderném genomu a způsobovat nestabilní mutace genu, do nichž se začlení. Její práce byla přijata až za deset let, kdy byly transpozony objeveny u bakterií.

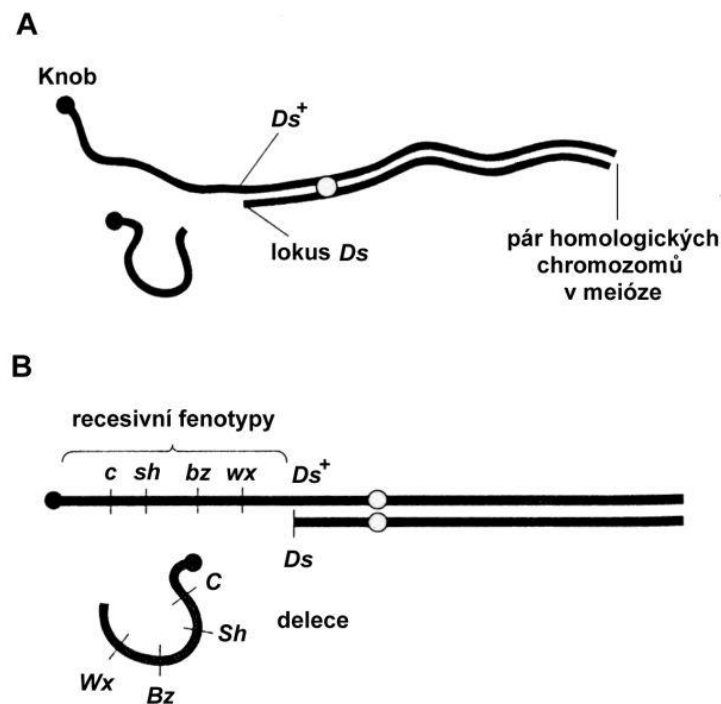
Teprve molekulární analýza potvrdila pozorování a vysvětlení tohoto jevu a třicet let po publikování svých výsledků dostala B. McClintock za svou práci Nobelovu cenu (1983).

### Obecná charakteristika transpozonů

Transpozony či mobilní elementy jsou části DNA, které se mohou přemísťovat (transponovat) v jaderném genomu.

U kukuřice bylo nalezeno několik systémů podobných *a<sub>1</sub>/Dt* a *Ds/Ac*. Jejich působení je obdobné – mají cílový gen, který je inaktivován inzercí nějakého receptorového elementu do jeho struktury, a samotný regulátorový gen udržující mutační nestabilitu. Například mobilní element *Ds* se může začlenit do genu *waxy*, který podmiňuje charakter endospermu (škrobový či voskový) a způsobit za přítomnosti *Ac* jeho nestabilitu. Uvedené příklady jsou příkladem neautonomního transpozonu, který pro svou transpozici vyžaduje přítomnost jiného mobilního elementu v genomu. Autonomní transpozony se naopak mohou přemísťovat v genomu nezávisle na jakémkoli jiném elementu.

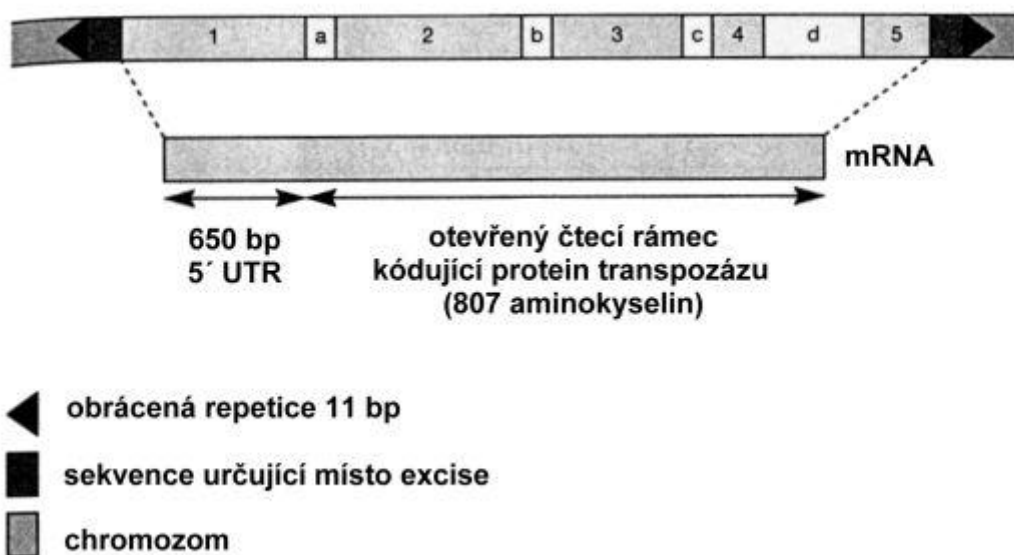
Transpozony často způsobují inserční mutace tím, že se začlení do funkčních genů a poruší tak jejich integritu. Následné vyčlenění transpozonu z mutantního genu (a tedy obnova funkce genu) způsobí somatické reverzní mutace v příslušných buňkách. Tyto mutace se často projeví jako skvrnitost nebo variegace barvy nebo struktury pletiva, které vzniklo dělením buněk, v nichž byl příslušný gen aktivován. Na rozdíl od variegace způsobené virovými chorobami, chimérickým stavem nebo chloroplastovými mutacemi, jeví mutace způsobené transpozony mendelistickou dědičností.



**Obr. 1.3** – Detekce chromozomových zlomů u kukuřice vlivem genetického faktoru *Ds* A/ cytologicky a B/ geneticky, podle recesivních fenotypů - *c* (bezbarvý), *sh* (svraštělý), *bz* (bronzový), *wx* (voskový).

### Struktura mobilních elementů *Ac* a *Ds* kukuřice

Element *Ac* je dlouhý 4563 bp s koncovými 11 bp dlouhými obrácenými repeticemi. Transpozon kóduje transkript o 3,5 kb a výsledný protein s 807 aminokyselinami s transponázovou aktivitou. Gen pro transponázu je rozdělen na exony, jak ukazuje schematický obrázek 1.4. V genomu je přítomna vždy jedna jeho kopie. Při větším počtu kopií by docházelo k jejich vzájemné inaktivaci. Elementů *Ds* může být až 10 kopií v genomu.



**Obr. 1.4** – Struktura autonomního transpozonu *Ac* kukuřice (1 – 5 exony, a – d introny).  
(Zdroj: Hughes, 1996)

Struktura *Ds* elementů vykazuje rozsáhlou homologii s *Ac*; tyto elementy jsou však kratší a zjevně vznikly delecí vnitřní části čtecího rámce *Ac*. Poněvadž *Ds* elementy nemají úplný čtecí rámec, nemohou produkovat aktivní transponázu, a proto se nemohou samy autonomně transponovat. Mobilizace jejich transpozice je možná pouze za přítomnosti transponázy produkované elementy *Ac*. Ne všechny elementy *Ds* kukuřice vykazují delecí ve srovnání s *Ac*. Byly nalezeny i jiné s velmi malou homologií s *Ac*, např. *Ds2* nebo *Ds5933*. Celkem bylo identifikováno asi 20 členů rodiny *Ds*.

U kukuřice byly popsány i další systémy působení mobilních elementů a jejich struktura, například systém *En/Spm* (angl. enhancer/supresor mutator).

Strukturně podobný jako *Ac* je mobilní element *Tam3* objevený u hledíku (*Antirrhinum majus*); má však 12 bp dlouhé invertované repetice a obsahuje čtecí rámeček bez intronů. Produkovaný protein vykazuje asi 60% identitu aminokyselin s transponázou *Ac*. Oba srovnávané elementy mají 8 bp dlouhé cílové místo pro včlenění do DNA. Srovnání *Tam1* hledíku s *Spm* kukuřice odhalil téměř identickou sekvenci terminálních repetitiv i exonů obou elementů. Tyto elementy při začleňování do DNA vytváří 3 bp dlouhé duplikace. Při sekvenování DNA se podle těchto duplikací odhalí místo, ve kterém byl transpozon začleněn. Duplikace a neúplné duplikace jsou způsobeny při transpozici nepřesným štěpením DNA a tvorbou jednovláknových zlomů působením transponázy. V místech transpozice tak dojde k posunutí o určitý počet nukleotidů (3 až 12). Při reparačním procesu je struktura rostlinné DNA uzavřena dosyntetizováním jednovláknových úseků a ligací obou konců vláken DNA.

Transpozice elementů *Tam* je silně ovlivňována prostředím. Při množení rostlin hledíku při 15°C se frekvence transpozice zvyšuje až 1000krát ve srovnání s množením při 25°C. Transpozony se začleňují do genů *pallida* a *nivea*, které podmiňují syntézu antokyanu. Inaktivace těchto genů se projeví fenotypově různě pigmentovanými a skvrnitými květy.

Při klonování genu *Rugosus (R/r) Pisum sativum* byla identifikována duplikace dlouhá 12 bp, která je homologní s terminálními sekvencemi elementu *Ac* kukuřice. Svědčí to o minulé přítomnosti transpozonu. Gen tvoří enzym SBEI (angl. starch branching enzyme) zodpovědný za větvení molekuly škrobu. Při inaktivaci genu transpozicí dochází k akumulaci sacharózy, zvýšení obsahu vody a změnám v osmotickém tlaku. Při zrání semen genotypu *rr* tato ztrácí více vody než semena genotypu *R-* a v důsledku toho se vytváří charakteristický svraštělý fenotyp.

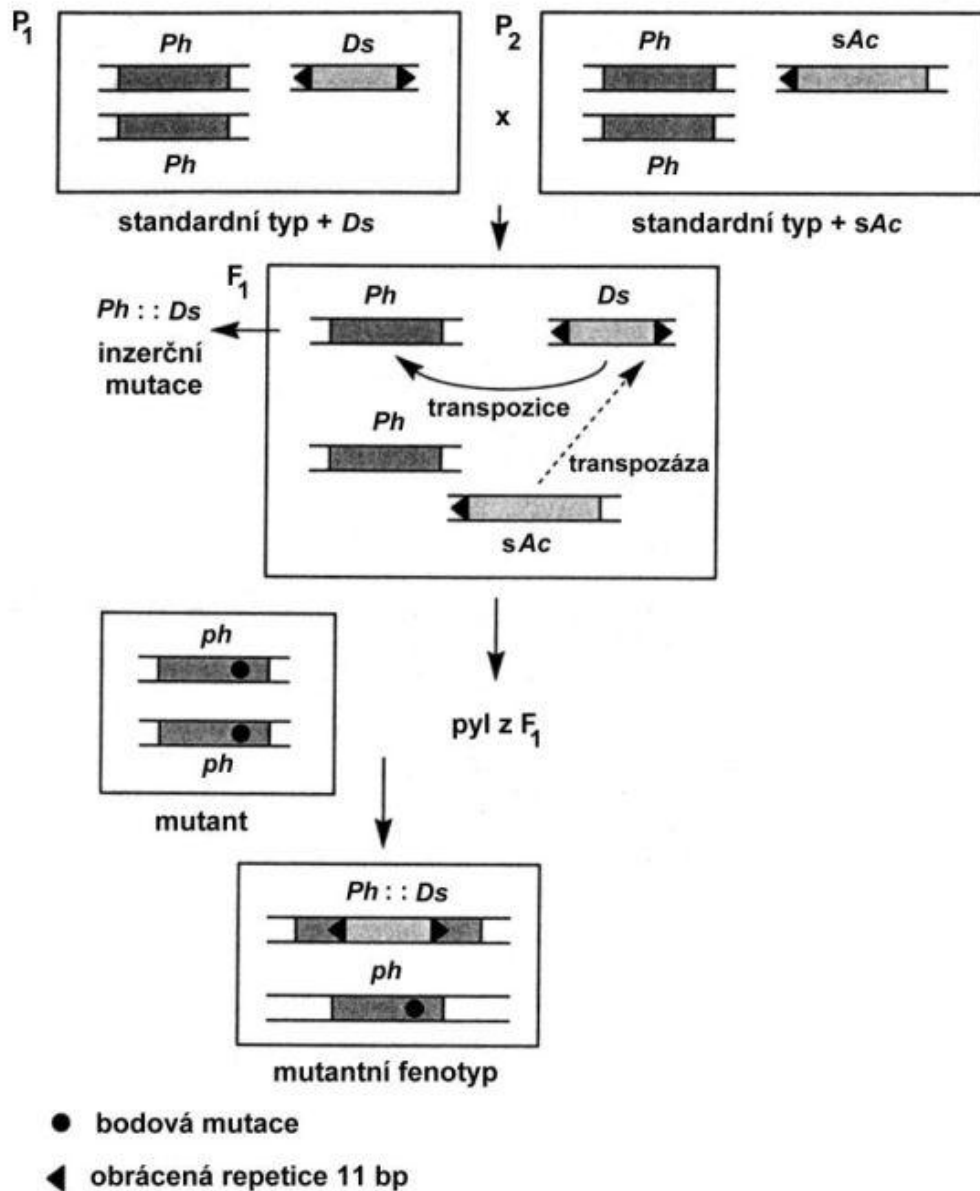
### *Transpozonové mutace (transpozon tagging)*

Sekvence transpozonů lze využít jako sondy při klonování transpozonů stejného typu a izolaci mutantních genů.

Mobilní element *Ac*, který byl nalezen u jednoděložné rostliny, je schopen transpozice i do genomu různých dvouděložných druhů rostlin (**heterologní transpozice**) jako je *Arabidopsis*, tabák, rajče, sója nebo brambor. To otevřelo možnost použít tyto elementy pro získávání nových mutací. Byly navrženy postupy efektivního vyhledávání a izolace **inzerčních transpozonových mutací**. Schéma tohoto postupu je na obr. 1.5. Element *Ds* a stabilizovaný element *Ac* (*sAc*) byly vneseny zvláště do genomu jednotlivých rostlin standardního typu. Tyto rostliny se následně mezi sebou kříží. Poněvadž rostliny  $F_1$  obsahují oba typy elementů, bude *Ds* mobilizován transponázou produkovanou elementem *Ac*. Mobilizovaný *Ds* se může náhodně začlenit do příslušného žádoucího genu (*Ph*) za vzniku inzerční mutace *Ph::Ds*. Vznikne-li začleněním elementu mutace recesivního typu, je možno ji detekovat křížením  $F_1$  s rostlinami homozygotně recesivními pro tento gen (*ph ph*). Většina potomstva z tohoto křížení bude heterozygotní (*Ph ph*) a standardního fenotypu, avšak budou zde i rostliny, které zdědily od jedinců  $F_1$  alelu s transpozonem a ty budou mutantní, genotypu *Ph::Ds ph*.



Jinou možností indukce transpozonové inzerční mutace je využití autonomního elementu *Ac*. Ten je součástí konstruktu vytvořeného z T-DNA *Agrobacterium tumefaciens* (v zaváděcí sekvenci markerového genu pod řízením promotu 35S). Po transformaci rostlin tímto konstruktem může dojít k excizi *Ac* a aktivaci markerového genu. Expresi tohoto genu je možné detekovat jen v určitých pletivech, tedy v potomstvech buněk, u nichž došlo k excizi. Po excizi se může *Ac* začlenit do sousedního genu a způsobit jeho inaktivaci.



**Obr. 1.5** – Indukce transpozonové mutace. Postup využití klonovaného neautonomního transpozonu *Ds* při inzerční mutagenезi a klonování genu *Ph*. (Zdroj: Hughes, 1996)

### 1.1.7 Retrotranspozony

U vyšších rostlin, jako například u *Arabidopsis* nebo *Nicotiana*, byly objeveny částice strukturálně podobné retrovirům a byly nazvané retrotranspozony. Jsou to úseky DNA schopné vkládat své vlastní kopie do nových pozic v genomu. Jsou virového původu a jako retroviry mají gen kódující reverzní transkriptázu, která umožňuje přepis RNA (vzniká transkripce retrotranspozonu) do komplementární DNA. Tato DNA je přesnou kopií původního retrotranspozonu a je vložena do nového místa v genomu (**retropozice**). Příмым důsledkem transpozice retrotranspozonů je zvyšování jejich počtu. Genom kukuřice je jimi tvořen až z 50 %. V oblasti genu *Adh1* je několik kopií retrotranspozonu *Opie*. U bobu představují elementy typu *Ty1-copia* kolem 40 % genomu. Konkrétní retrotranspozon se může vyskytovat i v několika desítkách kopií, například *Tnt1* se vyskytuje v genomu tabáku v několika stovkách kopií. V genomu ječmene je přítomen element *bis1*, který tvoří několik procent celkové genomové DNA.

Délka retroelementů je v rozmezí 1 až 13 kb. Těmto rostlinným retrotranspozonům však chybí sekvence homologní s oblastí *env* kódující strukturální bílkovinu plášťového obalu, která je nezbytná pro pohyb mezi buňkami. To znamená, že retrotranspozony nemohou tvořit částice podobné virům. Strukturální podobnost mezi retroviry a retrotranspozony je pravděpodobně výrazem jejich evoluční příbuznosti. Pro retroelementy jsou typické sekvence: gen *gag* kódující strukturální protein, gen *prot* (proteáza), gen pro reverzní transkriptázu, RNázu H a integrázu. V současné době se studuje jejich schopnost retropozice do různých rostlinných genomů. Podobně jako transpozony mohou sloužit jako nástroje k cílenému vnášení požadovaných genů do různých genomů, jsou zdrojem rozmanitosti vlivem své schopnosti inaktivace genu po svém začlenění retropozicí.

Retrotranspozon kukuřice *Mu* (*Mutátor*) transponuje tak často, že dochází až k 50krát vyšší četnosti mutací než v genomu bez tohoto elementu a mutace jsou většinou nestabilní. V genomu se vyskytuje 20 až 40 kopií. Při křížení kukuřice s *Mu1* s kukuřicí bez něj, dojde k retropozici *Mu1* a integraci do nových míst genomu, přičemž počet kopií se doplní na původní počet. V hostitelském genomu tvoří *Mu* 9 bp dlouhou repetici. Od konce 70. let minulého století, kdy byl *Mu* objeven, byla pomocí něho získána u kukuřice řada mutací.

### *Další elementy kódující transponázy*

První skupina obsahuje elementy s charakteristickou obrácenou terminální sekvencí, které se pohybují po chromozomu prostřednictvím mnohonásobných zlomů a ligací. Jsou to např. elementy *TphI* u petúnie a *TagI* u huseníčku. K transpozici dochází převážně do genů na témže chromozomu.

Byly identifikovány dvě další rodiny mobilních elementů této skupiny. Alespoň u některých druhů rostlin se vyskytují ve velkém počtu kopií. Elementy trav *Tourist* se často vyskytují u kukuřice (přibližně na každých 30 kb genomu) ve více než 10 tisících kopiích. Element *Stowaway* je široce rozšířen u jednoděložných i dvouděložných druhů. Jsou malé, mají konzervativní terminální obrácenou repetici a začleňují se do sekvencí TA.

## **1.2 Mimojaderná DNA**

Jedním z hlavních rysů eukaryotických buněk, ve srovnání s prokaryotickými, je přítomnost různých vnitrobuněčných organel. Organely jako jsou mitochondrie a chloroplasty mají svůj původ v symbióze s primitivními buňkami a na rozdíl od dalších organel mají vlastní genetickou informaci. Během evoluce eukaryot byla řada jejich genů přenesena do jaderných genomů. Dlouhé úseky organelové DNA byly přeneseny do jaderných chromozomů až později během evoluce. Tyto sektory jsou snadno detekovatelné prostřednictvím hybridizace s klonovanou chloroplastovou DNA. Důsledkem původu plastidů a mitochondrií jsou shodné znaky s prokaryotickými organizmy, jako je např. organizace jejich genomů do operonů nebo charakter ribozomální RNA.

Existence chloroplastové a mitochondriální DNA byla objevena před 40 lety a výzkum směřuje ke studiu struktury a funkce těchto genomů. Funkce genů jednotlivých organel je silně regulována jadernými geny a dochází ke koordinaci exprese jaderných, chloroplastových a mitochondriálních genů. Některé sekvence jaderné, chloroplastové a mitochondriální DNA jsou homologní. To dokazuje existenci mechanismů, které umožňují přenos (výměnu) genetického materiálu mezi organelami. Dědičnost organel a tím i jejich genomů je u vyšších rostlin většinou uniparentální.

### **1.2.1 Chloroplastová DNA**

Chloroplasty jsou organely, které se diferencují na světle z cytoplazmatických organel nazvaných proplastidy přítomných v meristematických buňkách. Chloroplasty jsou 5 až 10  $\mu\text{m}$  velké čočkovité struktury obklopené dvojitou membránou. Buňky listového mezofylu obsahují až 100 chloroplastů.

Dvojitá membrána chloroplastu obklopuje vlastní tělo chloroplastu, které obsahuje enzymy pro fixaci oxidu uhličitého, biosyntézu aminokyselin a metabolismus lipidů. Uvnitř těla je systém thylakoid, který obsahuje proteiny pro světelnou reakci fotosyntézy. Chloroplasty jsou organely, které mají schopnost množit se a obsahují mnoho kopií dvouřetězcového kružnicového chromozomu, který je tvořen DNA. Jednotlivé buňky se liší počtem jeho kopií v každém chloroplastu. Buňky mezofylu mladých listů jich obsahují až 100, zatímco chloroplasty starých listů mají jen 20 až 30 kopií. Počet kopií chloroplastového chromozomu v jednotlivých buňkách listu se tak pohybuje kolem 500 až 10 000 a tvoří 10 až 30 % DNA přítomné v buňkách listů.

Chloroplastové chromozomy se nacházejí uvnitř těla chloroplastu a některými rysy své struktury se podobají prokaryotickým chromozomům. Jsou to kružnicové molekuly DNA, které na rozdíl od jaderných chromozomů netvoří komplex s histony. Replikace chloroplastové DNA (cpDNA) a její distribuce mezi dceřinými proplastidy je komplexním procesem. U většiny rostlin je cpDNA dlouhá 120 až 160 kb. Celý chloroplastový chromozom druhů *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Marchantia polymorpha* (porostnice

mnohotvárná), ale i *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Pinus thumbergii*, *Spinacia oleracea*, *Medicago truncatula* a *Lotus japonicus* byl již sekvenován. Jsou známy kompletní sekvence chloroplastových genomů více než 100 druhů rostlin.

Chromozom tvoří obvykle čtyři segmenty: velká a malá oblast s jednokopiovými geny, a dvě kopie invertovaných repetice, které tyto dvě oblasti oddělují. Chloroplastové genomy byly klasifikovány do tří typů. První skupinu tvoří čeled' *Pinaceae* a leguminózy (včetně hrachu a fazolu), které mají chloroplastové chromozomy bez obrácené repetice. Chloroplastové chromozomy ostatních vyšších rostlin mají velkou (6 až 76 kb) obrácenou repetici. Do třetí skupiny patří řasa *Euglena gracilis* s pěti tandemovými repeticemi.

### **Organizace chloroplastového genomu**

Chloroplastové genomy obsahují 120 až 140 genů. Poznatky o těchto genech byly získány genetickou analýzou, studiem syntézy proteinů u izolovaných chloroplastů, RNA-DNA hybridizací (která umožnila identifikovat některé geny pro rRNA a tRNA) a klonováním společně se sekvenací analýzou. Další geny kódují některé proteiny ribozomů, podjednotky RNA polymerázy a některé procesy fotosyntézy.

#### **Syntéza proteinů**

Chloroplastový genom obsahuje většinu genetické informace pro syntézu chloroplastem kódovaných proteinů a 4 geny rRNA, které jsou součástí velké obrácené repetice (u druhů s touto obrácenou repeticí). Další geny determinující chloroplastové proteiny zahrnují geny pro ribozomové proteiny, geny asi pro 30 tRNA a geny pro RNA polymerázu a elongační faktory.

Syntéza chloroplastových proteinů má podobný mechanismus jako u prokaryot. Chloroplastové ribozomy (70S) jsou menší než eukaryotické cytoplazmatické ribozomy (80S) a na rozdíl od nich jsou inhibovány antibiotikem chloramfenikolem. V tab. 1.4 jsou uvedeny rRNA chloroplastových ribozomů kukuřice. Molekuly 23S a 16S jsou podobné ekvivalentním molekulám prokaryotických ribozomů. Molekula 5S je přítomna ve všech ribozomech kromě ribozomů hub a živočichů, ale molekula 4,5S rRNA se vyskytuje pouze u chloroplastů. Chloroplastové ribozomy obsahují asi 60 různých proteinů a asi jedna třetina z nich je pravděpodobně kódována chloroplastovou DNA. Podobné uspořádání genů chloroplastového operonu *rpl23* tabáku a homologních genů *spc* a  $\alpha$  operonu *E. coli* S10 naznačuje, že geny *E. coli* a tabáku mohou pocházet od společného předka.

#### **Introny**

Chloroplastové ribozomové geny tabáku *rpl2* a *rpl16* obsahují intron stejně jako několik dalších chloroplastových genů. Většina těchto genů obsahuje jediný intron. Ne všechny chloroplastové genomy mají stejnou strukturu.

U chloroplastových genomů byl zjištěn způsob trans sestřihu stejně jako u mitochondrií (kap. 1.2.2).

	rRNA	Počet nukleotidů	Pozn.
Velká podjednotka	23S	2860	Podobné prokaryotickým ribozomům U všech ribozomů kromě mitochondrií hub a živočichů
	5S	122	
Malá podjednotka	4,5S	95	Pouze u chloroplastů vyšších rostlin
	16S	1450	Podobné prokaryotickým ribozomům

**Tab 1.4:** Chloroplastová ribozomální RNA u *Zea mays*.

### Dědičnost chloroplastových genů

Chloroplasty se dědí po mateřské linii, nemohou tedy být přenášeny samčími gametami. Tento způsob dědičnosti byl poprvé dokázán roku 1909 Corrensem u *Mirabilis jalapa*. Odrůda albomaculata tohoto druhu má žlutobílé skvrny. Rostliny obsahují dva typy chloroplastů; normální zelené chloroplasty, které obsahují chlorofyl, a chloroplasty, které jsou v důsledku mutace v chloroplastovém genu bezbarvé. Buňky listových primordií obsahují směs těchto dvou typů chloroplastů. Příležitostně mohou být výhony tvořeny meristematičnými buňkami, které neobsahují chlorofyl, takže celý výhon je žlutobílý. Naopak jsou zde i výhony vzniklé z meristematičných buněk obsahujících pouze normální chloroplasty, takže tyto výhony jsou zelené.

Květy těchto jednobarevných výhonů lze využít při kontrolních kříženích ke studiu dědičnosti zbarvení listů a tedy i typu chloroplastů. Z různých kombinací křížení vznikne potomstvo vždy pouze jednoho typu, a to mateřského rodiče (tzv. maternální dědičnost). Fenotyp výhonů nesoucí květy, které byly použity jako zdroj pylu, se u potomstva neprojeví. Tato chloroplastová mutace je letální a žlutobílé klíčící rostliny se dále nevyvíjejí.

### Replikace cpDNA

Každý chloroplast obsahuje mnoho kopií jednoho chromozomu, často až 150. Vysoký počet molekul DNA v chloroplastech odráží vysoké nároky na expresi proteinů aktivních při fotosyntéze. Podstatně menší množství molekul DNA bylo zjištěno v **amyloplastech** a dalších nefotosyntetizujících plastidech. Poznání replikace cpDNA není úplné, ale je známo, že replikace DNA v organelách je většinou nezávislá na replikaci DNA v jádře. Replikace DNA je regulována četností **iniciace replikace** DNA, buď v synchronizaci s buněčným cyklem

u rychle se dělících buněk, nebo mechanismem nezávislým na buněčném cyklu během diferenciaci buněk.

Mechanismy replikace cpDNA jsou podobné mechanismům replikace u *E. coli*. V dlouhé obrácené repetici je lokalizován začátek replikace a místa specifická pro rekombinaci. U tabáku začíná replikace ve specifickém počátku replikace blízko genu pro 16S rRNA. U hrachu, i když nemá obrácenou repetici, je počátek replikace také blízko genu pro rRNA. Plastidové genomy mohou obsahovat ještě další replikační začátky než ty spojené s rRNA operonem.

Všechny enzymy a regulační proteiny nezbytné pro replikaci cpDNA jsou kódovány jaderným genomem. V plastidech rostlin byly detekovány specifické enzymy, jako jsou DNA polymerázy, primázy, topoizomerázy a helikázy. Jejich funkce v procesu replikace se studuje.

### *Kontrola exprese chloroplastových genů*

#### **Kontrola transkripce**

Studium promotorů šesti chloroplastových genů odhalilo podobné motivy jako u promotorů *E. coli*. Jsou to pozice kolem nukleotidu -35 (konvenční sekvence TTGACA) a pozice kolem nukleotidu -10 (konvenční sekvence TATACT). Sekvence podobná jadernému TATA boxu leží mezi těmito dvěma prokaryotickými promotorovými motivy.

Většina chloroplastových genů je transkribována jako polycistron podobně jako geny prokaryot, takže více než 120 genů je seskupeno asi do 50 transkripčních jednotek. Na rozdíl od prokaryot tyto jednotky obsahují i funkčně odlišné geny.

Rostlinné chloroplasty mají dva typy RNA polymeráz. Prvním typem je RNA polymeráza podobná prokaryotické RNA polymeráze *E. coli*. Její podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\beta'$  jsou determinovány chloroplastovými geny, gen pro podjednotku  $\delta$  je jaderný a slouží jako další důkaz kooperace obou genomů a regulace chloroplastové transkripce. Plastidová RNA polymeráza rozpoznává chloroplastové promotory obsahující -10 a -35 prokaryotické konsenzuální sekvence. Poslední poznatky naznačují, že chloroplastové geny mohou být transkribovány také RNA polymerázou sestávající z jedné podjednotky. Tato polymeráza je podobná polymeráze bakteriofága T3 a T7 a je determinována jaderným genomem. Tento typ RNA polymerázy chloroplastů nahrazuje funkci RNA polymerázy prvního typu, jestliže nějaký inhibitor zablokuje translaci v chloroplastech a nevznikají podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\beta'$ . Jaderným genomem kódovaná polymeráza pokračuje v transkripci chloroplastových genů. Promotorové sekvence pro pro tento druhý typ RNA polymerázy nejsou známy.

#### **Post-transkripční kontrola**

Některé chloroplastové geny jsou konstitutivně transkribovány, ačkoli se transkripční úroveň mění. To naznačuje, že post-transkripční zpracování primárních transkriptů je důležitým krokem v kontrole chloroplastových genů.

Akumulace transkriptů genů během vývoje chloroplastů byla sledována u řady rostlinných druhů.

#### Prokaryotické charakteristiky chloroplastového genomu

- (1) Kružnicová dvouřetězcová molekula DNA.
- (2) DNA netvoří komplex s histony.
- (3) Obsah bazí G/C je podobný jako u bakterií (36–40 %).
- (4) Žádné metylcytosiny.
- (5) Prokaryotické motivy promotorů.
- (6) Polycistronová mRNA.
- (7) 70S ribozomy.
- (8) Syntéza proteinů je inhibovaná antibiotikem chloramfenikolem.
- (9) Syntéza proteinů začíná A-formylmethioninem.
- (10) Chloroplastová mRNA není modifikována na 5'konci a na 3'konci tvoří typickou vlásenku.

#### *Interakce mezi chloroplastovou a jadernou DNA*

Chloroplastový genom není dostatečně velký, aby kódoval všechny proteiny přítomné v této organelle. Všechny hlavní proteinové komplexy thylakoidních membrán, které jsou součástí fotosyntézy, obsahují proteiny kódované jadernými geny. Komplex ATP syntetázy, fotosystém I, fotosystém II a komplex cytochromu *blf* obsahuje komponenty kódované jak chloroplastovým tak jaderným genomem. Jaderné geny tvoří malé genové rodiny (1 až 5 genů), zatímco chloroplastové geny jsou přítomny až v 10 000 kopiích na buňku. Z toho vyplývá, že musí existovat přísná kontrola funkcí jaderných i chloroplastových genů, aby byla zajištěna koordinovaná souhra všech struktur. Kontrola exprese jaderných genů vlivem světla je důležitou komponentou této interakce.

Dalším rysem chloroplastových proteinů kódovaných jadernými geny je nutnost jejich transportu z cytoplazmy do chloroplastů. Tyto proteiny jsou syntetizovány jako prekurzorový protein, který je delší než vlastní zralý protein. Např. vazebný protein ferredoxin PS1-2 reakčního centra fotosystému I je syntetizován jako polypeptid sestávající z 212 aminokyselin, avšak zralý protein lokalizovaný v periferní thylakoidní membráně je dlouhý pouze 162 aminokyselin. Vysvětlením tohoto rozdílu je, že první A-terminální aminokyseliny vznikajícího PS1-2 polypeptidu tvoří **signální místo** pro přesnou lokalizaci tohoto proteinu uvnitř buňky. Tyto aminokyseliny jsou vyštěpeny z proteinu při transportu chloroplastovými membránami. **Signální protein** způsobuje jednak třídění proteinů do chloroplastů a také transport přes chloroplastovou membránu. Transportní peptid se váže nejdříve na lipidy a

proteiny vnější membrány chloroplastu a pak je uchopen transportním aparátem, který tvoří proteinový pór. Tento aparát se skládá z proteinů vnější membrány TOC159, TOC75 a TOC34 (TOC – angl. translocon of the outer membrane of the chloroplast), a proteiny vnitřní membrány, TIC110 a jeden neznámý protein (TIC – angl. translocon of the inner membrane of the chloroplast). Složení tohoto komplexu je dynamické a mění se během procesu translokace. Po přenosu proteinu dovnitř chloroplastu, existují tři různá místa určení:

- Proteiny, které zůstávají ve stromatu (např. Rubisco) ztrácejí svoje transportní peptidy a jsou skládány do funkčních proteinů procesem vyžadujícím ATP a velký chaperon Hsp60.
- Proteiny, které fungují v thylakoidní membráně jsou rozpoznány a uchopeny chloroplastovou signální rozpoznávací částicí SRP a přítomného GTP.
- Proteiny určené do lumenu thylakoidů (vnitřní prostor mezi thylakoidními membránami). Tyto proteiny mají dva signální peptidy. První je odstraněn při transportu přes chloroplastovou obalovou membránu stromatovou peptidázou. Druhý signální peptid je nyní na A-signálním konci polypeptidu. Umožňuje lokalizaci proteinu na thylakoidní membráně a je odstraněn při transportu do prostoru thylakoidní membrány thylakoidní peptidázou. V závislosti na proteinu, který je transportován, tento proces přenosu vyžaduje pouze rozdílné pH a ATP.

Kromě těchto tří kompartment může být cílovým místem proteinu transportovaného z cytoplazmy vnitřní i vnější membrána chloroplastu.

Enzym Rubisko (ribulózo-1,5-bifosfát karboxyláza) pro fixaci CO<sub>2</sub>, je multiproteinový komplex s podjednotkami dvou typů. Gen pro menší podjednotku (*rbcS*) je lokalizován v jádře, gen pro větší podjednotku (*rbcL*) je v cpDNA. Podjednotka enzymu determinovaná jaderným genem je transportována z cytoplazmy do chloroplastu, malé podjednotky enzymu jsou ve stromatu. Protein se skládá z osmi malých a osmi velkých podjednotek ve formě dimerů a má tvar krychle. Rubisco je jeden z nejčastějších proteinů na Zemi, tvoří až polovinu proteinů ve stromatu chloroplastů. Tvorba tohoto proteinu vyžaduje koordinaci tří subbuněčných kompartmentů, jádra, cytosolu a chloroplastu.

## **1.2.2 Mitochondriální DNA**

### *Organizace mitochondriálního genomu*

Mitochondrie, stejně jako chloroplasty, obsahují vlastní chromozom, mtDNA. Mitochondriální genomy rostlin jsou větší než mitochondriální genomy savců nebo kvasinek. Existují však značné rozdíly i mezi jednotlivými druhy rostlin. Např. *Brassica campestris* má mitochondriální genom 218 kb, zatímco *Cucumis melo* 2 400 kb. MtDNA *A. thaliana* má asi 366 kb a obsahuje 57 genů. MtDNA některých druhů rostlin byla kompletně sekvenována (*A. thaliana*, *Oryza sativa* a *Beta vulgaris*).



Rozdíly ve velikosti mitochondriálního genomu nelze vysvětlit rozdíly v množství repetitivních sekvencí. Ty tvoří většinou jen 10 % genomu. Větší velikost genomu nelze vysvětlit ani větším počtem mitochondriálních genů, neboť studium syntézy proteinů izolovanými mitochondriemi ukázalo podobný počet mitochondriálních polypeptidů, a to i u rostlinných druhů, které mají velice rozdílné genomy. Velikost a struktura mitochondriálních genů také nezpůsobuje tuto variabilitu, i když mitochondriální geny mohou obsahovat introny. MtDNA neobsahuje větší množství cpDNA, i když určité množství zde bylo zjištěno (u kukuřice asi 4 až 5 %). V mitochondriích některých linií kukuřice s cytoplazmatickou samčí sterilitou jsou kromě mtDNA přítomny i plazmidy. Jsou to malé kružnicové nebo lineární útvary, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1,4 do 7,4 kb, a jejich hlavní význam je spojen s pylovou sterilitou. Hlavní typy jsou označeny S, R a D. Plazmidy S mohou zůstat extrachromozomální nebo se mohou integrovat do mtDNA. Rostliny kukuřice s cytoplazmatickou samčí sterilitou a s cytoplazmou *cms-S* mají mitochondriální plazmidy S-1 a S-2. Tyto plazmidy se začlenily do mtDNA. Kromě mitochondriálních plazmidů mohou mitochondrie rostlin obsahovat i 1- a 2-řetězcovou plazmidovou RNA dlouhou až 18 kb. Kompletní sekvence plazmidů mitochondrií jsou známy u *Zea mays*, *Beta vulgaris*, *O. sativa* a *Vicia faba*.

Analyzovat strukturu rostlinných mitochondriálních genomů je obtížné částečně proto, že se jejich struktura rychle mění. Malé kružnicové molekuly mtDNA v živočišných buňkách (asi 16 kb) mohou být vizualizovány elektronovou mikroskopií. U rostlinných buněk se elektronovou mikroskopií nedaří kružnicové molekuly mtDNA identifikovat. Byly identifikovány pouze kružnicové struktury, které však byly příliš malé, než aby šlo o celý mitochondriální genom. Předpokládá se, že mtDNA existuje v buňkách ve formě několika subgenomových kružnicových struktur, které vznikají častými rekombinacemi v oblastech s malými repeticemi.

Mitochondriální genom kukuřice má 570 kb, z toho je 540 kb jedinečných sekvencí. V genomu je 7 velkých repeticí větších než 700 bp a mnoho krátkých repeticí. Velké repetice mohly vzniknout jako důsledek rekombinace mezi malými repeticemi a ty mohly vzniknout reverzní transkripcí „nefunkčních“ částí mitochondriálních transkriptů.

Sekvenování mtDNA odhalilo, že mtDNA obsahuje i sekvence homologní s cpDNA. Navíc také tyto sekvence byly zjištěny v jaderném genomu. To odhalilo možnost přenosu DNA mezi organelami a jádrem a r. 1982 vzniklo označení **promiskuitní DNA** pro sekvence, které byly nalezeny ve více než jednom ze tří genetických systémů – jádro, mitochondrie, chloroplast, jako relikty extenzivního přenosu DNA mezi organelami.

MtDNA obsahuje geny pro enzymy, které se podílejí na oxidativní respiraci, syntéze ATP a mitochondriální translaci.

### *Exprese mitochondriálních genů*

#### **Úprava transkriptů**

Proteinové produkty mitochondriálních genů nelze odvodit ze sekvencí mtDNA přesně, protože RNA je modifikována posttranskripčními úpravami (angl. RNA editing). Ty zahrnují záměny C bází genomu za U báze v mRNA, mění se 5' netranslatované oblasti (zkr. UTR), 3' UTR a také introny a exony.

Některé mitochondriální geny obsahují introny. U řady intronů byly identifikovány sekvence homologní s virovou reverzní transkriptázou. Funkční význam této homologie nebyl objasněn.

### **Translace**

Mitochondriální genom kóduje část proteinů mitochondrií, které se podílejí na translaci. Ne všechny potřebné tRNA geny jsou přítomny v mtDNA vyšších rostlin, a proto další tRNA musí být transportovány do mitochondrií z cytoplazmy. Ribozomy mitochondrií jsou strukturálně více podobné prokaryotickým ribozomům. Mají sedimentační koeficient 77 až 78S a na rozdíl od cytoplazmatických ribozomů (80S) jsou inhibovány antibiotiky chloramfenikolem a tetracyklinem. Rostlinné mitochondriální ribozomy mají také podjednotky 5S rRNA, které nejsou u jiných eukaryotických mitochondriálních ribozomů. Jak rRNA tak tRNA mitochondrií rostlin jsou více podobné rRNA a tRNA z chloroplastů a eubakterií než těmto molekulám vyskytujícím se u živočichů a kvasinek.

Stejně jako chloroplastové mRNA ani mitochondriální mRNA nemají 5' konec krytý čepičkou a obvykle nemají ani 3' poly(A) konec. Mitochondrie mají poněkud odlišný genetický kód. Např. kodon CUA kóduje aminokyselinu leucin u jaderných genů, ale threonin u mitochondrií (kvasinky), jaderný stop kodon UGA kóduje u mitochondrií aminokyselinu tryptofan.

### ***Interakce mezi mitochondriální a jadernou DNA***

Protein syntetizovaný v cytoplazmě musí opět nést signální sekvenci, úsek na molekule, který umožňuje jeho rozpoznání jako proteinu určeného pro transport do mitochondrií. Je jím krátký úsek na začátku řetězce, uspořádaný do šroubovice tak, že jedna její strana je po délce hydrofobní, druhá kladně nabitá.

Takto označené proteiny jsou uchopeny systémem chaperoninů (Hsp) a dalších pomocných proteinů a dopraveny k vnější mitochondriální membráně, kde se systém naváže na multiproteinový pór označovaný jako TOM (angl. translocase of the outer membrane). Protože molekula ve tvaru klubíčka se přes TOM nedostane, je nutno ji rozbalit a jako jednorozměrný řetězec přesunout přes vnitřní mitochondriální membránu.

Jestliže je protein určen pro mitochondriální matrix, musí překonat ještě vnitřní mitochondriální membránu. V té se nachází pórový komplex TIM (angl. translocase of the inner membrane) složením odlišný od TOM. Obě membrány k sobě přilnou a protein prochází

komplexem TOM/TIM. Zavedení do TIM vyžaduje přítomnost membránového potenciálu na vnitřní membráně, tj. mitochondrie musí být energeticky nabitě.

Z vnitřní strany je protein uchopen opět chaperoninem (Hsp70), pomocí proteinázy je odštěpena signální sekvence a působením dalšího chaperoninu získá konečné uspořádání.

## 2. Genomika rostlin

Koncem roku 1980 se objevuje pojem **genomika**; bylo to v době počátků sekvenování prvních genomů a jejich mapování. V oblasti mikroorganismů postupuje sekvenování genomů rychle. V současné době je již osekvenováno 421 genomů bakteriálních, 3 virové a 31 genomů archeí (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). Z eukaryot je osekvenováno 65 genomů, z toho jsou genomy vyšších rostlin – *Arabidopsis thaliana* r. 2000, *Oryza sativa* r. 2002, *Populus trichocarpa* r. 2006, *Vitis vinifera* r. 2007, *Carica papaya* r. 2008, *Lotus japonicus* r. 2008, *Vigna radiata* r. 2009, *Glycine max* r. 2009, *Sorghum bicolor* r. 2009, *Zea mays* r. 2009, *Medicago truncatula* r. 2009, *Brachypodium distachyon* r. 2010. Roku 1997 se vedle strukturní genomiky začala rozvíjet funkční genomika. **Strukturní genomika** se zabývá analýzou genomu výlučně s cílem získat úplné sekvence DNA určitého druhu. **Funkční genomika** vzniká jako systematická funkční analýza genomu určitého druhu a jejím úkolem je přiřazení funkce jednotlivým genům.

### 2.1 Klíčové projekty studia rostlinných genomů

Velikost genomu byla rozhodujícím důvodem pro zahájení sekvenování genomu *Arabidopsis thaliana*, po bakteriálních genomech a genomech prvních eukaryot (r. 1996 *Saccharomyces cerevisiae*, r. 1998 *Caenorhabditis elegans*) prvního rostlinného. Její genom je asi 25krát větší než genom bakterie *E. coli*, 10krát větší než genom kvasinky *S. cerevisiae*, porovnatelný s genomem živočišného modelového objektu octomilky *D. melanogaster* a asi 26krát menší než genom člověka.

V roce 1992 byla zahájena práce na projektu nazvaném „Long-Range Plan for the Multinational Cooperation *Arabidopsis thaliana* Genome Research Project“. Jeho cílem bylo prostřednictvím studia mutací, genových interakcí, klonování a sekvenování porozumět fyziologii, biochemii a procesům růstu a vývoje *A. thaliana* jako představitele kvetoucích rostlin. Vlastní sekvenování bylo zahájeno roku 1994 a koncem roku 2000 bylo dokončeno („The *Arabidopsis* Genome Initiative“). Na výzkumu se v rámci projektu podílelo čtyřicet světových laboratoří z Evropy, Japonska a USA. Podle výsledků tohoto projektu genom *Arabidopsis* obsahuje celkem 25 498 genů, které kódují 11 601 typů proteinů, z nichž 35 % je jedinečných. U produktů mnoha genů lze předpokládat určitou homologii s proteiny člověka a s proteiny *C. elegans*. Asi 20 % z těchto předpokládaných proteinů, pro které jsou k dispozici kompletní sekvence, vykazuje signifikantní homologii s proteiny jiných eukaryotických organismů, což poukazuje na důležitou skutečnost zachování buněčných funkcí u eukaryot. Byla tak získána první kolekce všech genů kvetoucích rostlin.

Roku 2000 byl zahájen druhý klíčový projekt „The *Arabidopsis* 2010 program“ a společně s projektem „The plant genomics“ byl experimentálně zahájen přechod od strukturní genomiky rostlin ke genomice funkční a s přibývajícími poznatky u řady dalších rostlinných

druhů byl vytvořen předpoklad pro rozvoj srovnávací genomiky rostlin. Základním nástrojem funkční genomiky se stala mutagenese. Při určování funkcí jednotlivých genů se využívají dva základní genetické přístupy, a to **přístupy přímé a reverzní genetiky**, po indukci mutací jak klasickými (chemomutageny, fyzikální) tak biologickými mutageny. Byly vytvořeny velké kolekce inzerčních i klasických mutantů.

Klíčovým projektem z hlediska poznání rostlinných genomů je i projekt „International Rice Genome Sequencing Project“ zabývající se sekvenováním genomu rýže, první jednoděložné rostliny a první obiloviny. Genom kulturní rýže představují dva ekotypy, *japonica* a *indica*; koncem roku 2002 byl genom ekotypu *japonica* odrůdy Nipponbare osekvenován ve vysoké kvalitě.

## 2.2 Nástroje studia rostlinných genů

### 2.2.1 Mutagenese

#### Klasická mutagenese

Herman Muller poprvé indukoval pomocí paprsků X mutaci u *D. melanogaster* roku 1927 a již v roce 1928 byla poprvé indukována mutace u rostlinného druhu *Zea mays* L. Lewisem Stadlerem. Mutace jako dědičné změny v primární struktuře DNA mohou být indukovány chemomutageny nebo fyzikálními mutageny a mutagenese patří k základním nástrojům studia funkcí genů.

U rostlin bylo publikováno poměrně málo mutací získaných **fyzikálními mutageny**. Je nutné využít takový druh ionizačního záření, který proniká do dostatečné hloubky. Hloubka pronikání do rostlinných pletiv je vysoká u paprsků  $\gamma$ , dále následuje rentgenové záření (paprsky X), neutrony a částice  $\alpha$ , nejnižší je u částic  $\beta$ . V minulosti byla testována mutagenní schopnost více než tisíce sloučenin (**chemomutageny**). Pro praktické účely indukce mutací a mutačního šlechtění u rostlin je však jejich počet omezen. Nejúčinnější z nich je EMS (etylmetansulfonát), MNG (1-metyl-3-nitro-1-nitrózoguanidin), ENU (1-etyl-1-nitrózomočovina), MNU (1-metyl-1-nitrózomočovina), EI (etylenimin) a dES (dietylsulfát). Tyto látky alkylují DNA, způsobují tranzice párů bazí, obvykle GC za AT, vzhledem k chybnému párování O<sup>6</sup>-alkyl-G s T. Podobně O<sup>4</sup>-etyl-T má za následek tranzici TA za GC. Z hlediska indukce vysoké četnosti mutací u rostlin jsou z alkylačních činidel nejúčinnější N-nitrózosloučeniny. EMS u rostlin způsobuje primárně bodové mutace na různých místech genu, úplnou ztrátu genové funkce, změny v načasování exprese mRNA nebo změny v aktivitě proteinů. Metylnitrózomočovina má za následek plastidové, ale i jaderné mutace.

I při klasické mutagenesi, konkrétně chemomutagenesi, se od roku 2000 začal využívat přístup molekulární neboli reverzní genetiky prostřednictvím metodiky **TILLING** (angl. Targeting Induced Local Lesions In Genome), kdy je možné detekovat specifické záměny

bazí na úrovni DNA a metoda je určena k identifikaci bodových mutací v konkrétních genech, ale i ke zjištění polymorfizmu mezi jednotlivými přírodními populacemi (tzv. **Eco-TILLING**). Metoda je založena na specifické amplifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce a tvorbě heteroduplexů v místě polymorfizmu. Cílová místa heteroduplexu s chybným párováním bazí v důsledku jednonukleotidových polymorfizmů jsou štěpena endonuklázou *CelI* (izolovaná z celeru r. 1998) a jednotlivé fragmenty odpovídají místům polymorfizmu mezi sledovanými jedinci. Metoda vypracovaná pro *A. thaliana* je uplatňována i u kulturních druhů jako je kukuřice, pšenice a ječmen.

### *Inzerční mutagenese*

Rozvoj identifikace funkcí rostlinných genů akceleroval po zavedení metodik inzerční mutagenese, kdy se k indukci mutací využívají tzv. biologické mutageny, což jsou sekvence cizorodé DNA, a to převážně T-DNA *A. tumefaciens* a transpozony. Cizí DNA je do genomu rostliny vnášena jako součást vektorů.

Základem byly **odzbrojené vektory**, tj. T-DNA, ze které jsou zachovány jen krajní sekvence 25 bp nezbytné pro začlenění do rostlinného genomu. Do nich se začleňují **geny selektovatelné** (*NPT* – kóduje enzym neomycin fosfotransferázu a rezistenci k antibiotiku kanamycinu, *HPT* – kóduje enzym hygromycin fosfotransferázu a rezistenci k antibiotiku hygromycinu, *BAR* – kóduje odolnost k herbicidu typu fosfotricinu, např. Basta) pro identifikaci transgenních rostlin a **geny signální** (*GUS* – kóduje enzym  $\beta$ -glukuronidázu, *GFP* – kóduje zelený fluorescenční protein, který přeměňuje dopadající modré světlo UV spektra ve světlo zelené), jejichž expresi je možné studovat. Nejvíce využívaný **binární vektorový systém** je způsob, při němž geny virulence Ti plazmidu a sekvence T-DNA jsou odděleny na samostatných plazmidech, protože bylo zjištěno, že úsek virulence a T-DNA nemusí být společně na jednom plazmidu. Tzv. mini Ti plazmid s hraničními sekvencemi T-DNA je díky své velikosti snadným objektem pro genetické manipulace. Klasický typ binárního vektoru je vhodný pro přenos několika málo genů současně. Velikost T-DNA vektoru je omezena asi na 10 kb. Pro přenos větších úseků DNA byl vytvořen nový typ **binárního vektoru BIBAC** (angl. binary BAC), umělý bakteriální chromozom, jehož součástí jsou selekční markery. Umožňuje přenos až 300 kb cizorodé DNA a využívá se při genetických modifikacích, kdy je potřeba do rostlinného genomu vnést více genů nebo při vnášení genů odolnosti k patogenům nebo abiotickým stresům vzhledem ke komplexnosti výsledného znaku. Jeho využití je také při komplementaci, kdy je potřeba vnést do genomu rostliny větší úsek DNA z genomové knihovny. Např. ke komplementaci genu *FILAMENTOUS FLOWER* u *Arabidopsis* byl využit vektor TAC.

V systému binárních vektorů část Ti plazmidu obsahující oblast *vir* produkuje faktory potřebné pro přenos T-DNA. Produkt genu *virG* je pozitivním transkripčním faktorem, který aktivuje expresi ostatních genů *vir*. Geny *virD1* a *virD3* (v komplexu s proteinem VirD2) svými produkty umožňují vytvoření zářezu v jednom řetězci T-DNA a na její volný 5' konec se váže protein VirD2. Dalším genem, jehož funkce byla objasněna, je gen *virE2*. Protein

VirE2 se váže na jednořetězcovou DNA, která je přenášena do rostlinné buňky, a stabilizuje ji. Geny operonu *virB* kódují membránové proteiny, které umožňují transport z bakteriální do rostlinné buňky. Gen *virF* určuje specifitu hostitele.

Menší část původního Ti plazmidu nesoucí T-DNA, je schopna replikace jak v agrobakteriu, tak i v *E. coli*. Geny T-DNA mohou být nahrazovány rostlinnými selekčními markery, reportérovými geny a dalšími DNA elementy při použití *E. coli* jako hostitele. Takto vytvořený binární vektor je transformací nebo konjugací přenesen do agrobakteriálního kmene. Zatím jsou jen částečně známy procesy, které se uplatňují při integraci mezi buňkami bakteriálními a rostlinnými; pouze částečně je znám mechanismus řídicí začlenění T-DNA, a do ní začleněného genu, do rostlinné akceptorové buňky.

Již od konce 80. a začátku 90. let začaly být vytvářeny velké kolekce linií *Arabidopsis* transformované prostřednictvím *A. tumefaciens* a zpočátku byly vyhledávány mutantní fenotypy ve specifické dráze a sekvence začleněné T-DNA byla využita pro získání okolních rostlinných sekvencí, tedy sekvencí genu. Zpočátku se uplatňoval přístup přímé genetiky, tedy identifikace genů a funkční charakterizace začínající od identifikovaného mutantního fenotypu. Výsledkem prvních prací byla izolace genů kontrolujících tvorbu rostlinných hormonů, vývoj květů, ukládání vosku, vývoj trichomů nebo dobu do kvetení.

Po osekvenování genomu *Arabidopsis* byly velké kolekce inzerčních mutantů skrínovány s cílem identifikace zasažených genů, ale východiskem byly známé sekvence genů, což je typické pro přístup reverzní genetiky. První transformační protokoly zavedli Feldmann a Marks r. 1987; jednalo se o transformaci semen bakterií *A. tumefaciens*, kdy součástí protokolu byly explantátové kultury a regenerace rostlin *in vitro*. Efektivnější protokol transformace zavedli Bechtold a spolupracovníci r. 1993 a vypracovali metodu vakuové infiltrace, *in planta* transformace. Pletiva rostlin v začátku kvetení byla infiltrována kulturou agrobakteria, k selekci transformovaných rostlin byl nově využit gen pro resistenci k herbicidu Basta. K výhodám této metody patřila vyšší četnost transformace (1 až 4%) a vyloučení fáze kultivace a regenerace rostlin *in vitro*, což mohlo být zdrojem somaklonální variability. Zjistili, že samičí gametofyt je cílový pro začlenění inzertu během transformace (pravděpodobně i v práci Feldmanna a Markse z roku 1987 při transformaci semen).

V současné době se rozvíjí především reverzní skríníng zahrnující tvorbu směsných vzorků DNA velkého počtu inzerčních mutantů pro identifikaci cílové sekvence genu polymerázovou řetězovou reakcí prostřednictvím specifických primerů. Nezbytným předpokladem pro široké využití a rozvoj tohoto přístupu byla tvorba velkých kolekcí T-DNA inzerčních mutantů. K největším patří kolekce SIGnAL (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) vytvořená na pozadí ekotypu Columbia. Semena inzerčních mutantů v generaci T<sub>3</sub> jsou k dispozici v semenné bance ABRC. Největší databáze SALK obsahuje asi 150 tisíc inzerčních linií na genetickém pozadí ekotypu Columbia průměrně po 1,5 inzertu na linii, to je celkem 225 tisíc inzercí. Pro 88 tisíc inzercí byla určena lokalizace v příslušném genu. Teoreticky je potřeba 180 tisíc nezávislých inzercí s 95% pravděpodobností detekce určité specifické inaktivované

alely genu o velikosti 2,1 kb. Ale některé mutace jsou letální nebo vedou ke sterilitě v homozygotní konstituci. Proto je tato pravděpodobnost jen 80%. Doposud nebylo asi 2 200 genů zasaženo žádnou inzercí.

Pokrok byl zaznamenán i ve využívání různých typů konstruktů. První vektory byly **nespecializované** s vlastními promotory jednotlivých genů, které byly součástí vektorů. Později byly konstruovány vektory **specializované**, které umožnily detailnější zkoumání mutovaných genů. **Pasivní** vektory obsahovaly markerové geny bez promotorů nebo s minimálními promotory bez sekvencí umožňující normální vývojově regulovanou expresi, ale schopnými iniciovat transkripci. Pomocí těchto vektorů je možné sledovat **fúze genů, transkripční i translační**.

**Past na geny** – součástí konstruktů je reportérový gen bez promotoru, s intronem v zaváděcí sekvenci. Při začlenění do intronu rostlinného genu dojde k transkripční fúzi vlivem sestřihu.

**Past na promotory** – součástí konstruktů je bezpromotorový reportérový gen. Po začlenění inzertu do exonu rostlinného genu dojde k transkripční fúzi a aktivaci reportérové genu ze specifického promotoru. Expresi reportérového genu lze pozorovat ve specifických buňkách a pletivech (cévní svazky, svěrací buňky průduchů, endoplazmatické retikulum aj.).

**Past na zesilovače** – součástí konstruktů je reportérový gen s minimálním promotorem CaMV 35S. Funkce promotoru je zesílena v případě začlenění v blízkosti zesilovače a tím je zvýšena exprese reportérového genu na detekovatelnou úroveň. Při velké vzdálenosti mezi zesilovačem a inzertem zesilovač neidentifikujeme.

Určení funkce genu prostřednictvím inzerční mutagenese je často neúspěšné vzhledem k přítomnosti vícečlenných genových rodin a nepříbuzným proteinům s překrývajícími se funkcemi. Takové multigenní rodiny, přítomné jako kopie genů v klastrech nebo rozptýlené, jsou v genomu *Arabidopsis* četné. Proto byly konstruovány aktivní vektory s cílem **aktivační mutagenese** a indukce dominantních mutací. Těmito vektory bylo doposud získáno u *Arabidopsis* kolem 40 tisíc linií a plně charakterizováno asi 30 dominantních mutací.

Vektory pro **homologní rekombinaci (gene targeting)** umožňují takovou strategii inzerční mutagenese, při které jsou sledovány integrace transgenu nikoliv do libovolného genu, ale do genu, který je s ním homologický. K inaktivaci cílového genu dochází po homologní rekombinaci s vnášenou sekvencí konstruktů. U rostlin se tento přístup inzerční mutagenese využívá v menším rozsahu.

Součástí snah o saturaci celého rostlinného genomu inzercemi DNA je i tvorba **linií RNAi** a technik založených na umlčování specifických genů prostřednictvím **RNA interference**. Hlavním objektem je *A. thaliana* v rámci projektu AGRİKOLA (*Arabidopsis* Genomic RNA Interference Knock-Out Line Analysis). Základem projektu je kolekce 25 tisíc genově specifických sekvencí (GST, ang. Gene Specific tag) vytvořených konsorciem CATMA (Complete *Arabidopsis* Transcriptome Micro Array) pro *A. thaliana*. Jejich velikost je 150 až



500 bp a většinou jsou vytvořena pro cílové a jedinečné konzervativní sekvence exonů. Pomocí těchto GST bylo připraveno více než 20 tisíc specifických konstruktů a vloženo do vektoru navrženého pro posttranskripční umlčování genů mechanismem RNAi. Sekvence GST je do konstruktů vkládána ve formě invertované repetice oddělené intronem.

Od poloviny 90. let začaly být při inzerční mutagenезi využívány **transpozony** kukuřice *Ac* a *Ds*, které mají větší tendenci pro transpozici do určitých cílových míst. Postupně byly získávány linie s integrací transpozonů do kódujících a regulačních sekvencí *Arabidopsis* a využívány při identifikaci funkcí genů. Obtížnější bylo získání inzerce rovnoměrně po celém genomu, ale to bylo odstraněno pomocí T-DNA agrobakteria, které vnáší transpozon. Jestliže se transpozon začlení v okolí cílového genu, dochází k saturaci oblasti inzerce *Ac/Ds*. První gen izolovaný transpozonovou inzerční mutagenезí byl gen kukuřice *bronze*, klíčový enzym biosyntézy antokyanu.

Kromě systému transpozonů *Ac/Ds* jsou využívány při inzerční mutagenезi i další, jako je *En* a *Spm* (*Enhancer* a *Supresor/Mutator*, pro které je charakteristický větší rozsah sekundárních inzerce; z 5 původních inzerce dochází k postupné saturaci genomu inzerce během 6 až 12 generací samosprašení rostlin po původní transformaci. Tak se získají linie s 5 až 20 inzerce. Pro získání inzerce ve všech genech (průměr 6 nezávislých inzerce na linii) by bylo potřeba celkem 16 tisíc linií.

**Transpozonová inzerční mutagenезe** nezůstala omezena jen na druhy, u nichž se transpozony přirozeně vyskytují, ale využívá se i u druhů jako je tabák, rajče, *Arabidopsis*, petúnie, len, mrkev, brambor, sója nebo rýže. Inzerční mutagenезe a přístupy reverzní genetiky byly výrazně urychleny klonováním rostlinných genů, především u *Arabidopsis*, jejíž genom byl jako první osekvenován. Do roku 2003 bylo klonováno 620 genů cestou inaktivace genů a v současné době je úplná funkční analýza provedena u 10 % genů *Arabidopsis*. Spektrum mutací získaných inzerční mutagenезí je velmi široké. Jedním z nejčastějších typů mutací jsou embryonálně letální mutace (*emb*).

### *Funkční genomika a kulturní druhy*

Pro současný výzkum rostlinných genomů je charakteristické prolínání základního a aplikovaného výzkumu. Úkolem základního výzkumu je identifikace funkcí všech rostlinných genů. Tyto poznatky se promítají do aplikovaného výzkumu snahou o jejich využití při zlepšování kulturních druhů.

Až osekvenováním genomu rýže byl vytvořen předpoklad pro aplikaci reverzní genetiky u tohoto druhu. Do té doby byly geny identifikovány především přístupem přímé genetiky. Předpokladem pro aplikaci metod přímé genetiky je existence populací segregujících ve sledovaném znaku, dostatečný počet DNA markerů, existence genomových knihoven nebo znalosti sekvencí pro kandidátní genomovou oblast a vhodný transformační systém. U rýže je k dispozici řada mutantů vzniklých spontánně i indukovaných paprsky  $\gamma$  a chemomutageny.

Je známo 463 charakterizovaných mutací, z nichž 185 bylo lokalizováno na chromozomy pomocí morfologických markerů, později dalších 95 bylo mapováno DNA markery.

Pro přístupy reverzní genetiky jsou u rýže využívány tři biologické mutageny, a to transpozony kukuřice *Ac/Ds*, T-DNA *A. tumefaciens* a retrotranspozon *Tos17*. Existuje již přes tisíc linií rýže s elementem *Ds*, který je do jejího genomu vnášen prostřednictvím T-DNA. Jeon r. 2000 vytvořil 18 358 inzerčních linií T-DNA, což představuje celkem 25 tisíc zasažených genů. Endogenní retrotranspozon *Tos17* byl původně přítomen ve dvou kopiích v genomu rýže odrůdy *Nipponbare*. K transpozici dochází ve stresových podmínkách, jakými je explantátová kultura nebo virová infekce, a to mělo za následek vytvoření 5 až 30 kopií během 3 až 5 týdnů kalusové fáze. Transpozice jsou udržovány v jednotlivých regenerovaných rostlinách a u potomstva jsou stabilní.

Kukuřice je dalším druhem, u kterého se rozvíjí funkční genomika. Co do velikosti genomu patří k druhům se středními genomy. U tohoto druhu se využívá transpozonová inzerční mutagenese se třemi typy transpozonů - *Ac/Ds*, *En/I* (synonymum *Spm/dSpm*) a *Mu*. V genomu kukuřice se vyskytují i čtyři rodiny retrotranspozonů - *Huck*, *Ji*, *Opie* a *Zeon*.

### **2.2.2 Genetické mapování a identifikace genů**

Koncept genetických markerů založených na sekvencích DNA byl skutečně revolučním průlomem v možnostech konstrukce genetických map u jednotlivých rostlinných druhů, především kulturních, a stal se dalším významným nástrojem při studiu rostlinných genomů. Úplné nebo částečné sekvence genomů umožňují tvorbu obrovského počtu DNA markerů založených především na specifické amplifikaci známých sekvencí. Počty genetických markerů tak dosahují desítek tisíc. První genetická mapa RFLP markerů byla zkonstruována pro kukuřici a rajče roku 1986. Do roku 1990 byly ročně zkonstruovány tři mapy, od roku 1993 se počet zkonstruovaných map zvýšil na 30 ročně díky praktické aplikaci polymerázové řetězové reakce při tvorbě DNA markerů. V současné době jsou k dispozici genetické mapy DNA markerů pro více než 70 různých druhů. Ke druhům s nejvíce vysycenými mapami kromě *Arabidopsis*, rýže seté, rajčete jedlého, kukuřice seté a třtiny cukrové patří i ječmen, u něhož se v současné době podařilo sestavit integrovanou mapu se třemi tisíci genetických markerů.

Detekce DNA markerů v těsné vazbě s geny, které mají praktický význam ve šlechtění, umožňuje jejich využití při identifikaci genotypů s konkrétními alelami významných genů a tím i selekci rostlin na znaky determinovanými těmito geny. Navíc u řady významných kulturních druhů je v současné době přínosným a ověřeným způsobem identifikace nových rostlinných genů genetické mapování cílené na klonování genů na základě mapové pozice.

První klonovaný gen determinující rezistenci k patogenu byl v roce 1992 gen *Hm1* kukuřice, který podmiňuje rezistenci k houbovému patogenu *Cochliobolus carbonum*, jeho rase 1. Gen kóduje NADPH-dependentní reduktázu, která inaktivuje potenciální rostlinný toxin produkovaný tímto kmenem patogena. Jako další byl klonován gen *Pto* rajčete, který

podmiňuje rezistenci vůči *Pseudomonas syringae* pathovar tomato s genem avirulence *avrPto*. Rostlinný gen kóduje proteinkinázu serin-threoninového typu. Jiné klonované geny rezistence kódují proteiny, které obsahují motivy z repeticí bohatých na leucin (leucine rich repeat, LRR) a řadu dalších oligopeptidových domén, které se často vyskytují v R-proteinech.

## 2.3 Srovnávací genomika

Dvě hlavní skupiny kvetoucích rostlin – jednoděložné a dvouděložné se oddělily od společného předka asi před 135 až 200 miliony lety. Některé funkční a morfologické podobnosti zůstaly zřejmé i mezi odlišnými taxony. Již Vavilov r. 1922 poukázal v zákonu o homologních řadách na základní podobnosti různých rostlinných druhů na fenotypové úrovni. Lze očekávat, že i jejich genomy budou do určité míry podobné, samozřejmě s podstatnými vývojovými a metabolickými odlišnostmi. Za posledních 20 let nám molekulární genetika poskytla nástroje nezbytné pro studium podobností a odlišností na úrovni genetické informace u různých taxonů.

Molekulární markery jsou ve významném rozsahu využívány ke konstrukci genetických map jednotlivých rostlinných druhů. Tyto mapy podstatně rozšiřují naše poznatky o struktuře genomů i jejich evoluci. Porovnáním map příbuzných druhů můžeme vyhodnotit druh genomových změn, které doprovázejí vznik daného druhu. Úroveň konzervativního charakteru těchto map se značně liší u jednotlivých druhů. Studium uspořádání genů a lokusů na chromozomech se stalo náplní **srovnávací genomiky** rostlin u pěti čeledí – *Brassicaceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae* a *Solanaceae*. Nebyly vybrány náhodou, ale protože zahrnují ekonomicky nejvýznamnější druhy jako je brukev zelná *Brassica oleracea* L., řepka ladní *B. rapa* L., černochočice setá *B. nigra* (L.) Koch a jejich hybridy brukev hořčičná *B. juncea* (L.) Czern., řepka setá *B. napus* L. a chočice habešská *B. carinata* A. Braun. (*Brassicaceae*); kukuřice setá *Zea mays* L., pšenice setá *Triticum aestivum* L., rýže setá *Oryza sativa* L. (*Poaceae*); sója luštinatá *Glycine max* (L.) Merrill, čočka kuchyňská *Lens esculenta* Moench, fazol obecný *Phaseolus vulgaris* L., hrách setý *Pisum sativum* L., vojtěška setá *Medicago sativa* L. (*Fabaceae*); bavlník *Gossypium hirsutum* L. (*Malvaceae*); rajče jedlé *Lycopersicon esculentum* Mill., brambor obecný *Solanum tuberosum* L., tabák virginský *Nicotiana tabacum* L., paprika roční *Capsicum annuum* L. (*Solanaceae*). Dostáváme se tak k poznání genomů významných plodin, ale i k možnosti využití konkrétních rostlinných genů při zlepšení jejich znaků a vlastností prostřednictvím genetických modifikací.

Srovnávací genetické mapování a sekvenování genomů různých druhů odhalilo kolineární oblasti genomů a lze předpokládat, že i u vzdáleně příbuzných druhů může být konzervativní uspořádání genů zachováno. Je proto snaha využít poznatky o genomu jednoho druhu i u druhu jiného, blízkého nebo i vzdáleně příbuzného, s méně prozkoumaným genomem. Důsledkem společných evolučních základů je **makrokolinearita**, tedy konzervativní uspořádání genů v určitých oblastech chromozomů v rozsahu mnoha Mb. Srovnávací mapování je založeno na analýze **ortologních lokusů** u různých rostlinných druhů. Ortologní

lokusy jsou odvozeny přímo od společného (ancestrálního) předka. Srovnávací mapování je založeno na klonovaných sekvencích DNA, které se vyskytují na jednom nebo několika málo místech odpovídajících genomů sledovaných taxonů. Klasická metoda RFLP byla vhodná pro takové srovnávací mapování u rostlin. Pro získávání komparativních dat u rostlin významně napomohlo sestavování fyzických map rostlinných chromozomů pomocí **knihoven DNA** založených na umělých kvasinkových chromozomech (**YAC**) a především na umělých bakteriálních chromozomech (**BAC**).

Srovnáním genomů *B. oleracea* a *A. thaliana* bylo identifikováno 57 % shodných lokusů. Genomy žita a pšenice se liší 13 chromozomálními aberacemi, ke kterým došlo během 6 milionů let v průběhu jejich divergence. Srovnávací mapování odhalilo blízké příbuzenské vztahy mezi čirokem a cukrovou třtinou. Genomy rajčete a bramboru se liší pouze pěti chromozomálními aberacemi typu paracentrických inverzí. Naopak genomy rajčete a papriky se liší ve větším rozsahu, a to alespoň 15 chromozomovými aberacemi. Srovnávací mapování se tak stalo zdrojem informací také o evolučních a příbuzenských vztazích. U papriky lze tak předpokládat odlišný evoluční původ v porovnání s ostatními druhy čeledě *Solanaceae*. Další příklady ukazují na možnost konzervativního uspořádání genů i mezi vzdáleně příbuznými taxony. V genomech jednoděložných a dvouděložných druhů zůstává 43 až 58 % úseků dlouhých 3 cM, které jsou kolineární. Takový typ kolinearity v rozsahu 5 až 10 cM nazýváme **mikrokolinearita**. Pro potvrzení tohoto zjištění byly použity stejné sondy DNA při mapování huseníčku, čiroku, bavlníku a brukve. Geny, které byly těsně vázané u huseníčku a brukve, byly také ve vazbě u čiroku a bavlníku.

### 3. Reprodukční vývoj rostlin – kvetení

Pohlavní rozmnožování rostlin zajišťují květy, které jsou charakteristickým znakem krytosemenných rostlin. Typický oboupohlavný (hermafroditní) květ krytosemenných rostlin tvoří sterilní květní obaly a reprodukční orgány. Tyto orgány jsou organizovány do kruhů. Obr. 3.3 ukazuje uspořádání květních orgánů do čtyř kruhů u *A. thaliana*. Vnější orgány (perianth) u rostlin tvoří lístky okvětní nebo rozlišené lístky kališní (sepala) a korunní (petala). K reprodukčním orgánům patří tyčinky (stamen), které zajišťují tvorbu samčích mikrospor a plodolisty (carpel) s vajíčky, která obsahují samičí megasporu.

Vegetativní meristém stonku tvoří dvě až tři vrstvy buněk. Buňky vrstvy L1 se dělí antiklinálně a jsou základem epidermálních struktur. Buňky vrstvy L2 popř. L3 jsou základem vnitřních pletiv. Různé endogenní faktory i signály z vnějšího prostředí (teplota, délka dne) spouští přechod z nedeterminovaného vegetativního růstu stonku na determinovaný generativní růst. Jednotlivé orgány květu jsou odvozeny z buněk vegetativního apikálního meristému po jeho přeměně v meristém květenství. Již v raných fázích je květní meristém schopen založit všechny květní orgány a skupiny buněk neboli primordia se diferencují v jednotlivé květní orgány (obr. 3.1).

Proces tvorby květů lze rozdělit do čtyř etap:

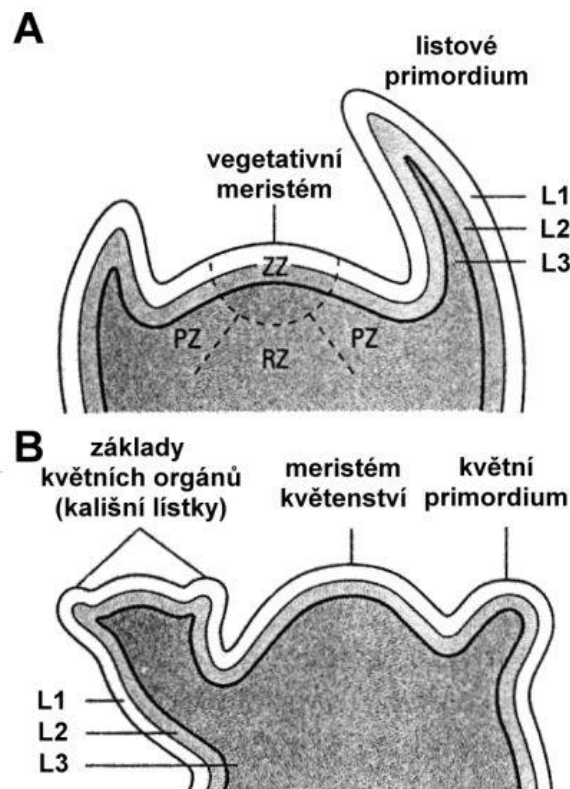
- Indukce kvetení, tj. přepnutí z neorganizovaného vegetativního růstu do fáze organizovaného generativního růstu.
- Přeměna vegetativního meristému v meristém květenství. S tím souvisí pozdější tvorba květních primordií, laterálních orgánů a lodyžních lístků.
- Vlastní tvorba květu. Přeměna meristému květenství v meristém květní a s tím související tvorba prekurzorů květních orgánů a jejich další diference.
- Funkční fáze kvetení začíná tehdy, jestliže jsou květní orgány funkční, tzn. mají-li odpovídající strukturu. Dochází ke zrání reprodukčních orgánů, k opylení a oplození.

Geny determinující tyto čtyři fáze vývoje květu lze rozdělit do odpovídajících skupin:

- geny regulující přechod z vegetativního růstu do generativního,
- geny podmiňující tvorbu meristému květenství,
- geny regulující tvorbu a identitu květních orgánů,
- geny regulující růst květních orgánů a jejich funkčnost.

Rozlišujeme dva typy květenství:

- květenství nedeterminované (racemózní) – „otevřené“, u něhož se na konci osy nevytváří terminální květ, protože terminální meristém květenství zůstává zachován a pokračuje ve tvorbě determinovaných květních meristémů a také primordií laterálních výhonů a lodyžních listů. Př. *Arabidopsis*, *Antirrhinum*.
- květenství determinované (cymózní) – „zavřené“, které tvoří pouze jeden květ na konci osy (terminální květ). Př. tabák, petúnie.



**Obr. 3.1** – A/ Průřez vegetativním vrcholem stonku. B/ Přeměna vegetativního meristému v květní meristém (L1, L2, L3 – jednotlivé meristemické vrstvy). (Zdroj: Westhoff et al., 1998)

### 3.1 Geny regulující přechod z vegetativního růstu do generativního

Přechod rostlin do fáze generativního růstu je podmíněn geneticky, ale významnou úlohu hrají i vlivy vnějšího prostředí, jako je délka dne nebo chladové působení a působení giberelinů. Fotoperiodická kontrola kvetení je zprostředkována interakcí fotoreceptorů a endogenními cirkadiálními rytmy. Rostliny mají podle osvětlení dva základní morfogenetické programy:

1. fotomorfogeneze – morfogeneze na světle,
2. skotomorfogeneze – morfogeneze ve tmě.

**Fotomorfozeneze** je složitý proces, který zahrnuje více **fotoreceptorů** a cest přenosu signálu. U *A. thaliana* byly popsány mutace řady genů, které se účastní různých složek tohoto procesu. Jsou to především dvě základní skupiny mutací, které se vyznačují ve tmě obdobnou morfogenezi jako na světle: *det* – *de/ethiolated* a *cop* – *constitutive photomorphogenesis*. Každá z těchto typů mutací se vyskytuje v několika různých lokusech.

Tyto geny kódují proteiny, které se účastní přenosu signálu a jejich recesivní neaktivní mutace působí v homozygotním stavu změny exprese mnoha genů.

Jedním z charakteristických znaků morfogeneze klíčických rostlin ve tmě (skotomorfozeneze) je prodloužení hypokotylu. U některých specifických typů mutací *A. thaliana* dochází k prodloužení hypokotylu i na světle. Takovéto mutace jsou označovány *hy*. Mutace ve třech lokusech, *hy1*, *hy2* a *hy6* jsou mutace syntézy chromoforu fytochromů. Mutace *hy3* je mutace genu pro apoprotein fytochromu B a mutace *hy8* je mutace genu pro apoprotein fytochromu A. Změny se týkají světlo-labilních i světlo-stabilních proteinů a mohou být reparovány dodáváním prekursoru chromoforu.

### **3.1.1 Základní představa přenosu světelného morforegulačního signálu**

Světelný signál působí přes změnu konformace fytochromů (fotoreceptorů) a dalších světlo-senzitivních proteinů. Tyto proteiny pak působí změny konformace dalších proteinů. Jedná se o kaskádu několika typů proteinů. Kaskáda zahrnuje také nízkomolekulární signální látky, které umožňují přenos signálu do dalších buněk a pletiv rostliny. Je tedy třeba se zabývat těmito otázkami:

1. Biochemickou analýzou fotoreceptorů.
2. Identifikací sekvencí DNA, působících v *cis* a *trans*-aktivačních faktorech, které řídí aktivitu podřízených genů regulovaných světlem.
3. Genetickou analýzou drah působení fytohormonů a cest přenosu signálu, které ovládají vývoj chloroplastů.

Vývoj chloroplastů zahrnuje časově řízenou biosyntézu jejich komponent a vyžaduje koordinovanou expresi jaderných a chloroplastových genů. K počátečním stádiím vývoje chloroplastů z proplastidů dochází v průběhu tvorby mezofylových buněk z nediferencovaných meristemických buněk. K iniciaci tohoto procesu jsou nutné signály červeného nebo modrého světla. Pro další fáze je nutný silný tok bílého světla. Rozeznáváme čtyři stadia vývoje chloroplastů:

1. Na konci prvního stadia vývoje chloroplastů v dělicích se buňkách v průběhu vývoje listů je současně skončena většina dělení mezofylových buněk.
2. Ve druhém stadiu, stadiu "výstavby" chloroplastů, dochází ke zvyšování počtu chloroplastů v buňce a ke zvyšování objemu chloroplastů. Pokračuje růst listů, ale spočívá většinou ve zvyšování objemu buněk. Dochází k vysokému stupni exprese chloroplastových genů.

3. Třetí fáze vývoje chloroplastů je udržovací fáze. Fotosyntetická kapacita je udržována na stálé úrovni, která je určena světlem. Dochází ke střednímu stupni exprese genů kódovaných světlem.
4. Poslední fází je senescence. Počet i objem chloroplastů klesá a exprese genů regulovaných světlem klesá jen asi na 10 % maxima.

Jiný je vývoj chloroplastů ve tmě, skotomorfogeneze. Jestliže dochází k vývoji ve tmě, proplastidy kotyledonů začínají vývoj v chloroplasty, ale vývoj skončí o etioplastů, pro které je charakteristický nepravidelný tvar a centrální parakrystalické prolamelární tělísko. Nedochází k žádné nebo dochází jen k velmi nízké expresi genů regulovaných světlem. Jestliže jsou etiolované rostliny přeneseny na světlo, z etioplastů se vyvíjejí chloroplasty.

Rostliny mají akceptorové proteiny (**receptory**), které procházejí dvěma konformačními stavy a tyto stavy se mění na základě přijetí kvant světelného záření určité vlnové délky. Byly prokázány čtyři hlavní typy fotoreceptorů:

1. Citlivé na červené/dlouhé červené záření (600–700 nm), **fytochromy** (PHY),
2. Citlivé na modré, případně modré/UV záření (400–500 nm), **krytochromy** (CRY),
3. Citlivé na modré a UV-A záření, **fototropiny** (PHOT),
4. Citlivé na UV-B záření, dosud neidentifikované fotoreceptory.

Primárním receptorem červeného a dlouhého červeného záření jsou nejlépe prostudované fytochromy. Jsou to rozpustné **chromoproteiny**, které tvoří dimery, skládající se ze dvou stejných polypeptidů 120-127kD, z nichž každý je kovalentně připojen k tetrapyrrolovému chromoforu. Tento pigmentproteinový komplex může procházet reverzibilně, na základě fotoindukce, dvěma stavy a má dvě možné formy:

1. Formu absorbující červené světlo, Pr ( $A_{\max}$  666–668 nm),
2. Formu absorbující dlouhé červené záření, Pfr ( $A_{\max}$  730–734 nm).

Pfr je fyziologicky aktivní forma a již nízké intenzity červeného světla mění Pr na Pfr a aktivuje odpověď.

První typ apoproteinů, který se označuje jako typ A, je kódován genem označovaným u *A. thaliana* genem *PHYA*. Fytochrom se hromadí ve tmě a na světle se rychle rozkládá. Kromě toho na světle dochází i k rychlému odbourání již syntetizované odpovídající mRNA a poklesu další transkripce. Odlišným typem fytochromu je typ B, který je světlostabilní a ani jeho biosyntéza není regulována světlem. Jeho apoprotein je kódován genem *PHYB*. Tento fytochrom řídí především odpovědi na konec dne, jako je stimulace prodloužení stonku dlouhým červeným zářením.

U *A. thaliana* byly klonovány geny pro další tři apoproteiny fytochromů, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*, ale jejich biologická funkce zatím není prostudována. Celkem tedy bylo identifikováno pět genů pro fytochromy.



Primární mechanismus změny konformace fytochromů není znám, ale podílí se na něm fosforylace. Existují proteinkinázy, které jsou v komplexu s fytochromy. Aktivované fytochromy jsou translokovány z cytoplazmy do jádra. Zde interagují s transkripčními faktory a tak regulují světlem indukovanou transkripci dalších genů: PHYA je v cytoplazmě autofosforylován a funguje jako kináza, která fosforyluje Phytochrom Kinase Substrat1 (PKS1). PHYA může interagovat s proteinovou fosfatázou (FyPP). FyPP defosforyluje PHYA prostřednictvím konformačních změn a aktivovaný PHYA je v této formě translokován do jádra. V jádře PHYA a PHYB interagují s transkripčním faktorem PIF3 (Phytochrome Interacting Factor3), který umožňuje vazbu na promotory genů regulovaných světlem. Tyto promotory obsahují motivy LRE umožňující tuto vazbu. Kináza CKII zprostředkovává fosforylaci transkripčního faktoru HY5 (Elongated hypocotyl in light5), který je další klíčovou složkou fytochromové signalizační kaskády.

Co se týče druhých posílů, předpokládá se, že hlavními z nich jsou heterotrimerické G-proteiny, i když definitivně to zatím prokázáno nebylo. Další prvky, které navazují v této regulační kaskádě, jsou již vidlicovitě rozvětvené. Je to jednak systém  $Ca^{++}$  - kalmodulin a jednak cGMP. Systém vápníku způsobuje především stimulaci vývoje chloroplastů. Systém cGMP se uplatňuje především při aktivaci enzymu chalkonsyntázy a drah syntézy fotoprotektivních flavonoidů a antokyanů, ale současně s prvním systémem se také podílí na regulaci vývoje chloroplastů. Obě dráhy druhých posílů mají v prvních fázích vývoje klíčích rostlin vztah vzájemné inhibice. Je důležité, aby se nahromadil dostatek fotoprotektivních látek dříve, než bude zahájena intenzivní fotosyntéza. Jakmile však došlo k akumulaci fotoprotektivních látek a fotosyntéza běží, jejich další rychlá syntéza již není třeba. Po kroku aktivace heterotrimerických G-proteinů dochází nejprve k aktivaci cGMP a je krátkodobě inhibována aktivace Ca-kalmodulinového systému, pak se rovnováha přesune směrem k Ca-kalmodulinovému systému a ve třetí fázi jsou obě dráhy aktivovány rovnoměrně.

Cesta mezi aktivací druhých posílů a uvedených cílových genů má ještě své mezistupně. Těmito mezistupni jsou aktivace genů skupiny *DET* a *COP*.

### ***3.1.2 Geny pro negativní regulaci fotomorfogeneze***

Morfogeneze ve tmě – skotomorfogeneze se u klíčích rostlin liší v několika zásadních skutečnostech od morfogeneze na světle. Ve tmě dochází k silnému prodlužování hypokotylu, děložní lístky předčasně ukončují svůj vývoj, nedochází k vývoji pravých listů a nedochází k přeměně proplastidů na chloroplasty. Na genetické úrovni dochází k represí četných genů a genetických systémů. Tato represe musí být podmíněna aktivitou některých regulačních genů, jejichž produkty se připojují na specifické promotorové sekvence dalších genů a brání jejich aktivaci. Jestliže je skotomorfogeneze podmíněna aktivitou určitých genů, musí existovat mutace, u kterých došlo k inaktivaci těchto genů a které se budou ve tmě fenotypově projevovat fotomorfogenetickým vývojem. Byly skutečně zjištěny mutace takovýchto genů. Jeden z nich byl nazván *COP* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENETIC*). Recesivní mutanty tohoto genu podmiňují normální růst a vývoj děložních lístků ve tmě. Později bylo

zjištěno, že mutace s obdobným fenotypovým projevem vznikají u genů na různých lokusech genomu. V takovýchto genů bylo popsáno v různých laboratořích původně 11 (*COP1*, *COP2*, *COP3*, *COP4*, *COP8*, *COP9*, *COP10* a *COP11*), ale o některých z nich bylo zjištěno, že jsou vzájemně alelické. V současné době je známo 8 různých lokusů. Například gen *COP1* je lokalizován na 2. chromozómu, v poloze asi 27 cM. Jsou popsány jeho různé mutované alely, jako *cop1-1*, *cop1-2*, *cop1-3* a *cop1-4*.

Poněkud jiný fenotypový vliv mají mutace lokusů *DET1*, *DET2* a *DET3* (*DE/ETHIOLATED*). U těchto mutantů dochází ve tmě nejen k normálnímu vývoji kotyledonů, ale také k vývoji chloroplastů a pletiv listového mesofylu. Na světle jsou však tyto rostliny světle zelené a mají sníženou apikální dominanci. Zvláště byl studován lokus *DET1* a zdá se, že právě ten řídí syntézu hlavního regulačního proteinu, který podmiňuje negativní regulaci fotomorfogeneze. Tento protein je lokalizován v jádře, ale neváže se přímo na DNA. Jeho potlačující funkce na transkripci genů aktivovaných světlem však může být obecnější povahy a může spočívat například ve vlivu na nukleozomovou strukturu chromatinu.

Na negativní regulaci fotomorfogeneze se podílejí také geny skupiny *FSC* – *FUSCA* (fuscus znamená purpurově červený), jejichž recesivní mutace podmiňují červené, anthokyanové zbarvení embryí a klíčnicích rostlin, které brzy ustávají ve vývoji. Podrobnou genetickou analýzou bylo zjištěno, že některé z dříve popsaných lokusů *COP* a *DET* jsou identické s lokusy *FSC*. V současné době se proto hovoří o regulačním komplexu *COP/DET/FUS*. Protein *COP9* v buňkách existuje jako velký komplex monomerů, jehož tvorba a stabilita vyžadují spoluúčast proteinů *COP8* a *COP11*. Protein *COP1* má vysoký stupeň homologie s faktorem TAFII80 drozofily, který je součástí komplexu TFIID, a ten podmiňuje iniciaci transkripce u drozofily. *COP1* je jaderný protein, který zřejmě podmiňuje represu transkripce genů aktivovaných světlem. Gen *COP1* je aktivní ve tmě, zatímco na světle je jeho aktivita potlačena.

Na aktivaci těchto genů se kromě fytochromů podílejí ještě receptory modrého světla. Jejich existence je nepochybná z hlediska biologických účinků, ale zatím nebyly izolovány. Sekundární poslové mění nějakým způsobem komplex proteinů, který je kódován geny *COP8*, *COP9* a *COP11*. Tento komplex pak působí aktivaci genů *DET1* a *COP1* a tyto geny působí jako faktory, které vyvolávají další aktivace genů, které se podílejí na syntéze fotoprotektivních látek a na vývoji chloroplastů. Tento regulační řetězec má v sobě ještě řadu neznámých prvků a teprve v průběhu dalších let bude upřesněn a potvrzen.

Konečným vlivem těchto negativních regulátorů transkripce je potlačení aktivity velké řady genů, podílejících se na fotosyntéze, syntéze fotoprotektivních látek a morfogenetickém vývoji typickém pro rostliny na světle. Promotory takovýchto genů mají jednak specifické sekvenční úseky (boxy) pro pozitivní regulaci světlem a negativní regulaci tmou. Signály negativní regulace tmou jsou zřejmě součástmi popsaného systému regulačních genů a jejich mutací.

Co se týče signálů **pozitivní regulace světlem** jsou zatím dobře známy specifické promotorové úseky označené LRE (Light Regulatory Elements). Byly popsány u genů genových rodin kódujících například menší podjednotku enzymu fotosyntézy ribulózabifosfátkarboxylázy (geny *rbcS*) nebo geny pro proteiny světlosběrného komplexu *cab* – *chlorophyll a/b binding*. Tato pozitivní regulace světlem je pravděpodobně zprostředkována dalšími, zatím neidentifikovanými geny tohoto komplexu.

### **3.1.3 Geny autonomní a vernalizační dráhy regulující přechod z vegetativního do generativního růstu**

Bylo identifikováno více než 80 lokusů tzv. autonomní dráhy, které řídí dobu do kvetení. Příkladem jsou geny *FLC* a *FRI* determinující pozdní kvetení. Ke genům pro rané kvetení patří gen *FCA*. Další geny regulující přechod z vegetativního do generativního růstu lze rozdělit do tří skupin: geny kódující biosyntézu giberelinů, geny fytochromů a geny kódující vernalizační reakci. Kyselina giberelová udržuje homeostazi ve vývoji květů v různých podmínkách vnějšího prostředí. Gen *FLC* může blokovat účinek kyseliny giberelové v apexu buď regulací exprese genů biosyntézy kyseliny giberelové, nebo ovlivněním genů přenosu signálu. Fytochromy kontrolují kvetení prostřednictvím délky dne.

U *A. thaliana* je přechod z vegetativní do generativní fáze charakterizován ukončením tvorby listů v listové růžici a rychlou tvorbou květních primordií. Standardní genotypy mají v podmínkách dlouhého dne růžici s 9 listy a vykvétají za 23 dní. Mutantní rostliny s pozdním kvetením (*fca*) vykvétou za 47 dní a listová růžice má 29 listů. U některých genotypů je možné kvetení iniciovat vernalizací, tzn. vystavením semen (po vysetí) nízkým teplotám 4°C po dobu 8 týdnů. Mutantní rostliny *fca* po vernalizaci vykvétou za 16 dní a mají 8 listů v růžici. Tento pokus dokazuje, že exprese genu *FCA* je ovlivňována vernalizací. Produkty genů *VRN1* a *VRN2* blokují expresi genu pro pozdní kvetení *FLC*.

### **3.2 Geny podmiňující tvorbu meristémů květenství**

U homozygotních mutantů *tfl1* (*terminal flower1*) se meristém květenství přeměňuje v květní meristém a květy se tvoří předčasně. Gen *TFL1* kóduje zachování meristému květenství.

Gen *LEAFY* (*LFY*) plní důležitou funkci při zakládání květních meristémů a při regulaci exprese genů kvetení. Mutace *lfy* determinuje zpoždění ve tvorbě květních meristémů a homozygotní mutanti často vytvářejí místo květů listy. Produktem tohoto genu je transkripční faktor.

U homozygotních mutantů *pin* (*pin formed*) se netvoří květní pupeny nebo se tvoří deformované květy.

### 3.3 Geny regulující tvorbu a identitu květních orgánů

Homeotické mutace způsobují přeměnu jednoho květního orgánu v jiný a tento odlišný fenotyp je kódován geny kontrolujícími funkci květních orgánů. Většina genů této skupiny byla identifikována prostřednictvím homeotických mutací.

Gen *APETALA1* (*AP1*) má dvojí funkci: kóduje přeměnu meristému květenství v květní meristém a tvorbu primordií kališních lístků. K dalším homeotickým genům patří geny *AP3* (*APETALA3*), *AG* (*AGAMOUS*), *PI* (*PISTILLATA*) a *SUP* (*SUPERMAN*) (tab. 3.1). Na obr. 3.2 je znázorněná časová a prostorová regulace exprese genů této skupiny.

### 3.4 Geny regulující růst květních orgánů a jejich zrání

Geny poslední fáze vývoje květů zajišťují tvorbu samčího a samičího gametofytu, tvorbu gamet a přípravu na oplození. Některé geny této skupiny (*AT*, *APT*, *SIN1*) jsou uvedeny v tab. 3.1.

### 3.5 Geny regulující tvorbu květu u *Arabidopsis*

*A. thaliana* a *Antirrhinum majus* mají řadu genů homologních. Některé geny byly již klonovány a na základě vydedukované sekvence aminokyselin a proteinů, které jsou těmito geny kódovány, byla u některých určena i jejich předpokládaná funkce. Sledováním mutantního fenotypu, jak u jednoduchých, tak u vícenásobných mutantů, byly získány informace o interakcích těchto genů. Všechny tyto studie vedou k pochopení genetické kontroly tvorby a vývoje květu u dvouděložných rostlin. V tab. 3.1 jsou uvedeny některé mutace *A. thaliana* ovlivňující tvorbu květu.

Gen <i>A. thaliana</i>	Mutantní fenotyp	Předpokládaná funkce na molekulární úrovni
Geny regulující přechod z vegetativního do generativního růstu		
FLOWERING TIME (FCA)	Pozdní kvetení	Neurčeno
GIBBERELLIN1 (GA1)	Pozdní kvetení	Poruchy v biosyntéze giberelinu
PHYTOCHROME A (PHYA)	Dlouhý hypokotyl	Apoprotein fytochromu A
LONG HYPOCOTYL3 (HY3, PHYB)	Rané kvetení, dlouhý hypokotyl	Apoprotein fytochromu B
LONG HYPOCOTYL2 (HY2)	Rané kvetení, dlouhý hypokotyl	Biosyntéza fytochromu chromoforu
Geny podmiňující tvorbu meristémů květenství		
TERMINAL FLOWER (TFL)	Přeměna meristému květenství v květní meristém	Negativní regulace <i>lfy</i> , <i>ap1</i> , <i>ap2</i>

LEAFY (LFY)	Částečná přeměna meristému květenství v květní meristém	Transkripční faktor
APETALA1 (AP1)	Tvorba axilárních květů, homeotická přeměna kališních lístků v listy	Transkripční faktor, box MADS
APETALA2 (AP2)	Homeotická přeměna kališních lístků v listy a korunních lístků v tyčinky	Negativní regulace <i>ag</i>
PIN FORMED (PIN)	Netvoří se květní pupeny nebo deformované květy	Složka transportního systému auxinů
Geny regulující tvorbu a identitu květních orgánů		
APETALA3 (AP3)	Homeotická přeměna korunních lístků na kališní lístky a tyčinek v plodolisty	Transkripční faktor, box MADS
AGAMOUS (AG)	Homeotická přeměna tyčinek v korunní lístky, plodolistů v kališní lístky, nedeterminovaný květní meristém	Transkripční faktor, box MADS
PISTILLATA (PI)	Homeotická přeměna korunních lístků v kališní a tyčinek v plodolisty	Transkripční faktor, box MADS
SUPERMAN (SUP)	Větší počet tyčinek, malý pestík	Regulace exprese <i>pi</i> a <i>ap3</i>
Geny regulující růst květních orgánů a jejich zrání		
ANTHERLESS (AT)	Tyčinky bez prašníků	Neurčeno
ADENINE PHOSPHORIBOSYL-TRANSFERASE (APT)	Tvorba nefunkčního pylu	Adenin fosforibosyl transferáza
SHORT INTEGUMENTS (SIN1)	Abortující vajíčka	Neurčeno

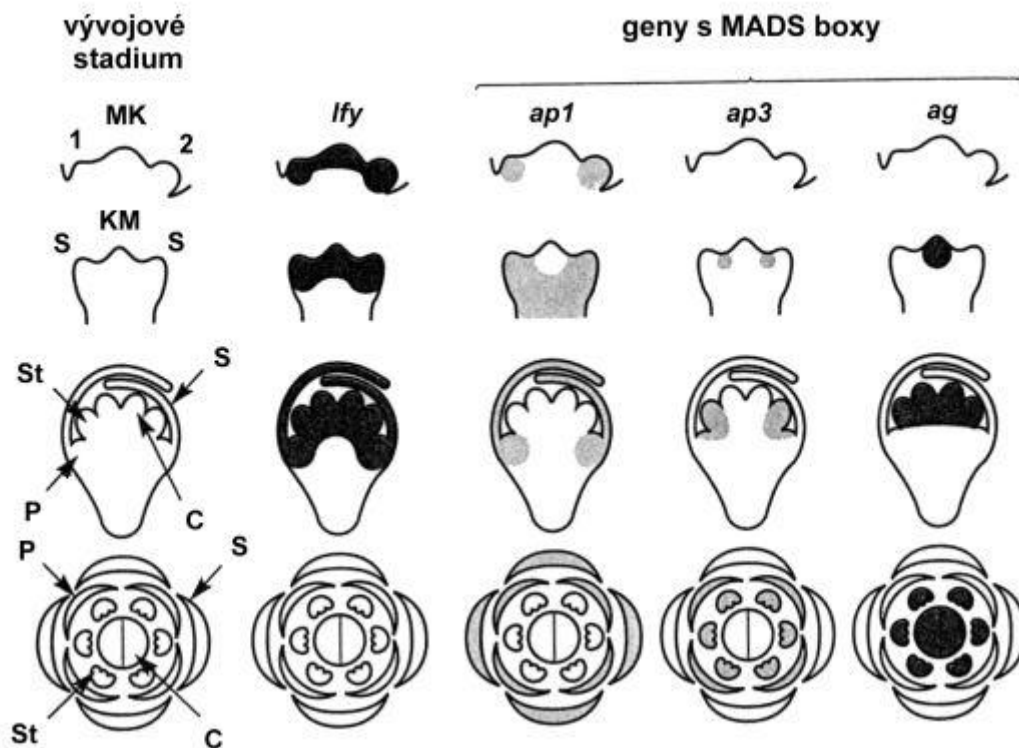
**Tab. 3.1** – Geny regulující tvorbu květu u *Arabidopsis thaliana*.

### ***3.6 Regulace genové exprese během vývoje květů, ABC model***

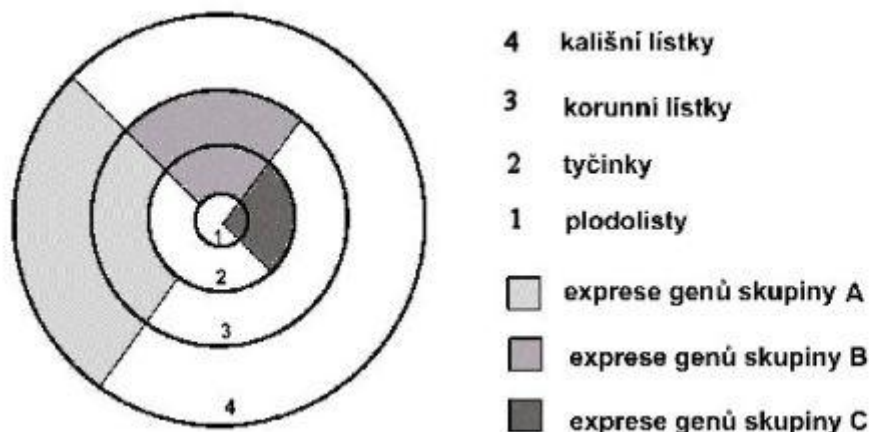
U *Arabidopsis* a *Antirrhinum* bylo doposud získáno mnoho homeotických mutantů. U většiny z nich jsou mutací ovlivněny vždy dva sousední kruhy květních orgánů (obr. 3.3). To vedlo k domněnce, že existují 3 skupiny genů, které kódují květní orgánovou identitu (skupina A, B, C). Funkce genů skupiny A ovlivňuje vnější části květů, tj. kruh tvořící kališní a korunní lístky. Geny skupiny B regulují vytváření střední části květů (kruh tvořící korunní lístky

a tyčinky). Geny skupiny C regulují vytváření vnitřní části květu (kruh tvořený tyčinkami a plodolisty). Na základě těchto poznatků byl vytvořen tzv. ABC model, který je znázorněn na obr. 3.3.

Ztráta funkce genů skupiny A má za následek tvorbu plodolistů místo kališních lístků v kruhu 1 a tvorbu tyčinek místo korunních lístků v kruhu 2. To je př. mutace *apetala1* a *apetala2* u *A. thaliana*. Ztráta funkce genů skupiny B má za následek náhradu korunních lístků za kališní a náhradu tyčinek za plodolisty. Příkladem jsou mutace *apetala3* a *pistillata* u *A. thaliana*. Při ztrátě funkce genů skupiny C se tvoří korunní lístky místo tyčinek a lístky kališní místo plodolistů. Př. je mutace *agamous* *A. thaliana*.



**Obr. 3.2** – Časová a prostorová regulace tvorby květního meristému a exprese genů orgánové identity u *Arabidopsis thaliana* (MK – meristém květenství, KM – květní meristém, S – sepala, kališní lístky, P – petala, korunní lístky, St – tyčinky, C – plodolist, *lfy* – leafy, *ap1* – *apetala1*, *ap3* – *apetala3*, *ag* – *agamous*). (Zdroj: Hughes, 1996)



**Obr. 3.3** – ABC model stavby květu objasňující expresi homeotických genů tří skupin.

Genetická analýza dvojnásobných mutantů potvrdila, že exprese genů skupiny B je nezávislá na genech A a C. To neplatí pro geny skupin A a C. Fenotypy mutantů bez funkčních genů C mají zvýšenou funkci genů A a naopak. Geny skupiny A a C fungují antagonisticky.

Další revizí modelu ABC je zahrnutí negativního regulátoru SUP funkce genů B (*PI* a *AP3*). SUP je zahrnut do negativní regulace genů skupiny B, epigenetické regulace a reguluje komunikaci mezi kruhy (spojení mezi kruhy 3 a 4).

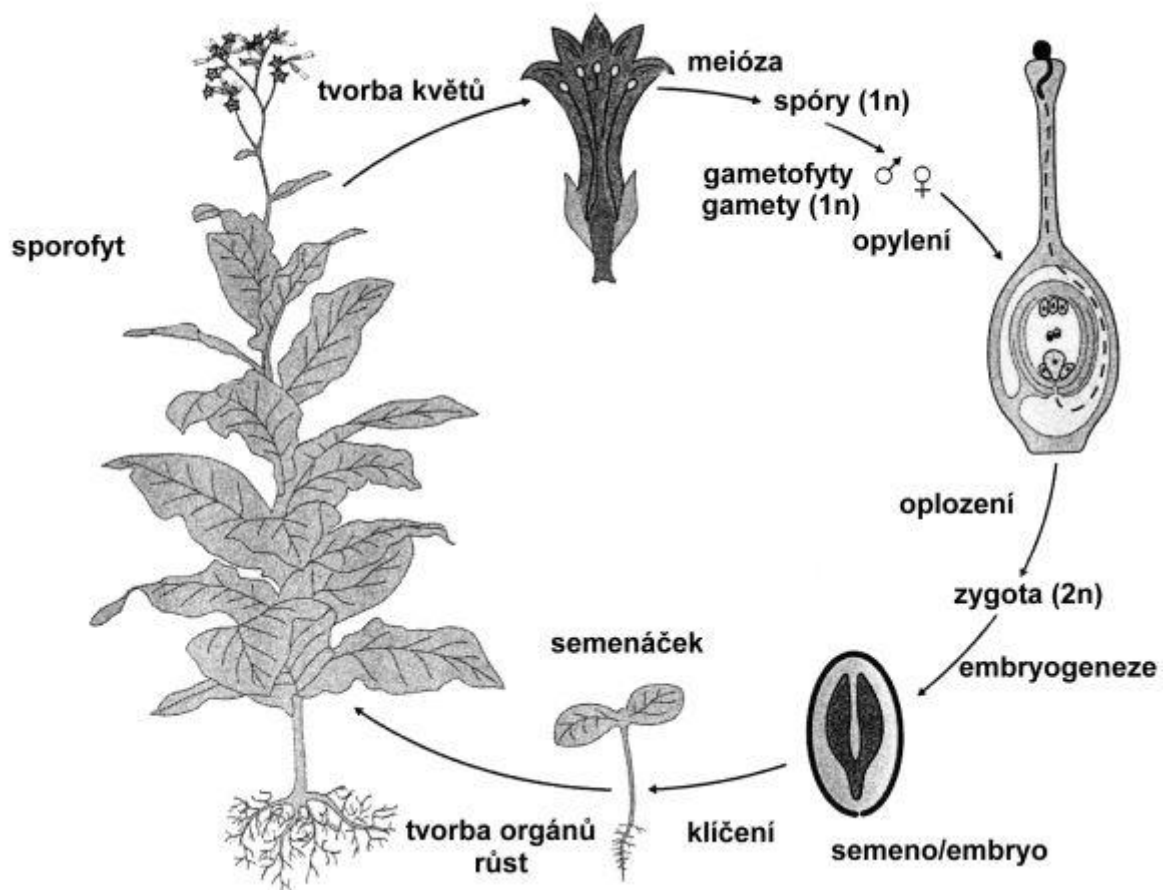
Sekvenční podobnost květních proteinů s transkripčními faktory živočichů a hub umožňuje učinit určité závěry o jejich funkcích. MCM1 kvasinek a savčí SRF interagují s podobnými vazebnými oblastmi určitých promotorů. Rostlinné faktory MADS boxů (*MCM1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS*, *SRF*) se také váží s těmito sekvencemi.

# 4. Rozmnožování rostlin a jeho genetické důsledky

## 4.1 Způsoby rozmnožování rostlin

Pro zachování jakéhokoli rostlinného organismu je nutné střídání generací, které je umožněno rozmnožováním (obr. 4.1). U rostlin rozeznáváme tři základní způsoby rozmnožování:

1. nepohlavní, amixie (amixis),
2. pohlavní, amfimixie (amfimixis),
3. apomiktické, apomixie (apomixis).



**Obr. 4.1** – Schéma životního cyklu dvouděložné rostliny *Nicotiana tabacum*. (Zdroj: Westhoff et al., 1998)



### 4.1.1 Amixis

Amiktické, nepohlavní rozmnožování je nejprimitivnějším způsobem rozmnožování, při němž není organizmus schopen pohlavní diferenciaci. Tento způsob rozmnožování je typický pro nejnižší organizmy, u vyšších rostlin se však může vyskytovat souběžně s rozmnožováním generativním (pohlavním).

Při nepohlavním rozmnožování vzniká jedna rostlina z jednoho rozmnožovacího základu, a to buď z rozmnožovací buňky, nebo ze složitější části mateřského těla. Po oddělení od mateřské rostliny vyrůstají z tohoto rozmnožovacího základu přímo noví samostatní jedinci, kteří vznikli pouze mitotickým dělením buněk. U rostlin se tento způsob rozmnožování nazývá **vegetativní**. Velká regenerační schopnost rostlin, kdy oddělená část vytváří za vhodných podmínek postupně všechny orgány, byla pozorována a využívána už dávno. Z genetického hlediska je zajímavé, že tato regenerační schopnost je často zachována i u vysoce specializovaných orgánů, jako např. u listů. Mnoho rostlin vytváří speciálně diferencované orgány, které částečně nebo zcela slouží k nepohlavnímu rozmnožování. Jsou to např. kořenové hlízy (*Dahlia variabilis*, *Ipomea batata*, *Ficaria verna*), oddenky jako metamorfózy stonku (*Convalaria*, *Agropyron*, *Agrostis*), stonkové hlízy oddenkové (*Solanum tuberosum*, *Helianthus tuberosus*) a bazální (*Gladiolus*, *Colchicum*, *Crocus*, *Cyclamen*), cibule a cibulky jako metamorfózy listů (*Allium cepa*, *Lilium*) aj.

Vegetativní potomstvo jedné rostliny se nazývá **klon**. Klon jako základní jednotku amikticky se množících rostlin můžeme definovat jako genotypově shodné jedince, kteří vznikli vegetativně z jediného původního organismu. Vegetativní cestou tedy můžeme získat velké množství geneticky identických rostlin neohledně na genetickou konstituci výchozí formy.

Stálost klonů však není absolutní. Nezřídka dochází ke genotypovým a fenotypovým změnám, jež jsou výsledkem spontánní mutace v určitém sektoru pletiva nebo v určité buňce. Tyto změny byly již Darwinem označeny jako **pupenové variace** neboli sporty. Vznikají tedy **somatickou mutací** (spontánně či indukovaně) v jedné nebo více iniciálách pupenu. Výhon, který se vyvíjí z takového pupenu, ponese mutantní znak pouze pokud byl příslušný gen heterozygotní. Fakta o pupenových variacích, jak se s nimi setkávali praktičtí šlechtitelé v minulosti, shrnul poprvé velmi podrobně právě Darwin, který zdůrazňoval, že pupenové variace nejsou zvláštním znakem některých rostlinných forem, nýbrž jsou vlastní nejrozličnějším představitelům kulturních i planých forem druhů. Dnes známe mnoho odrůd ovocných stromů, okrasných rostlin a zelenin, které vznikly cestou pupenových variací. Jsou to především stovky odrůd chryzantém, růží a brambor a většina odrůd citrusových stromů. Tyto somatické mutace se mohou týkat znaků a vlastností morfologických (tvar, barva, velikost orgánů apod.) i fyziologických (ranost, rezistence k chorobám a škůdcům, obsah určitých látek apod.).

Velké regenerační schopnosti rostlin se využívá v širokém měřítku v zemědělské praxi a v zahradnictví. Takto nepohlavně lze množit vysoce heterozygotní odrůdy, které by se při rozmnožování pohlavní cestou rozpadly na množství různých genotypů. Týká se to především ovocných dřevin a růží, u kterých se uplatňuje technika roubování nebo očkování. V podstatě jde o transplantaci větší části rostliny s několika pupeny (roub) nebo pouze jednoho pupenu (očko) na vhodnou podnož. Vegetativně se množí také okrasné stromy a keře, chmel, cukrová třtina, brambory, cibule, česnek, jahodník a mnohé rostliny okrasné květem.

Vegetativní rozmnožování se ve šlechtitelské praxi používá jako následná metoda pohlavního rozmnožování k udržení heterozygotnosti a hybridní zdatnosti. Někdy může sloužit i ke zvýšení podílu rostlin jednoho pohlaví v populacích (jako např. namnožení samčích rostlin u palmy datlové) nebo k udržení autoinkompatibilních rostlin (avokádo). Vegetativní rozmnožování je možné využít k získání klonů bez patogenů technikou explantátových kultur *in vitro* (např. meristémové kultury a embryokultury).

Předností nepohlavního rozmnožování vzhledem k zachování druhu je tedy potenciálně neomezená možnost zvýšení početnosti geneticky identických potomků jednoho jedince, tj. vytvoření tzv. klonu.

#### **4.1.2 Amfimixis**

Amfimixie je pohlavní rozmnožování, které představuje evolučně progresivnější reprodukci potomstva. Jeho předností je zajištění genetické rozmanitosti zabezpečující přizpůsobení organizmů vnějšímu prostředí.

Pro tento způsob rozmnožování je typická tvorba diferencovaných reprodukčních orgánů a střídání pohlavní haploidní generace (**gametofytu**), produkující gamety, s nepohlavní diploidní generací (**sporofytem**). U nižších rostlin převažuje fáze gametofytu nad sporofytem, zatímco u vyšších rostlin je tomu naopak.

U krytosemenných rostlin jsou generativní orgány součástí specifické části rostliny – květu. Samičím pohlavním orgánem je pestík (pistillum) vznikající srůstem jednoho nebo více plodolistů (megasporofylů). Pestík je obvykle rozlišen na semeník (ovarium), čnělku (stylus) a bliznu (stigma).

#### **Makrosporogeneze a makrogametogeneze**

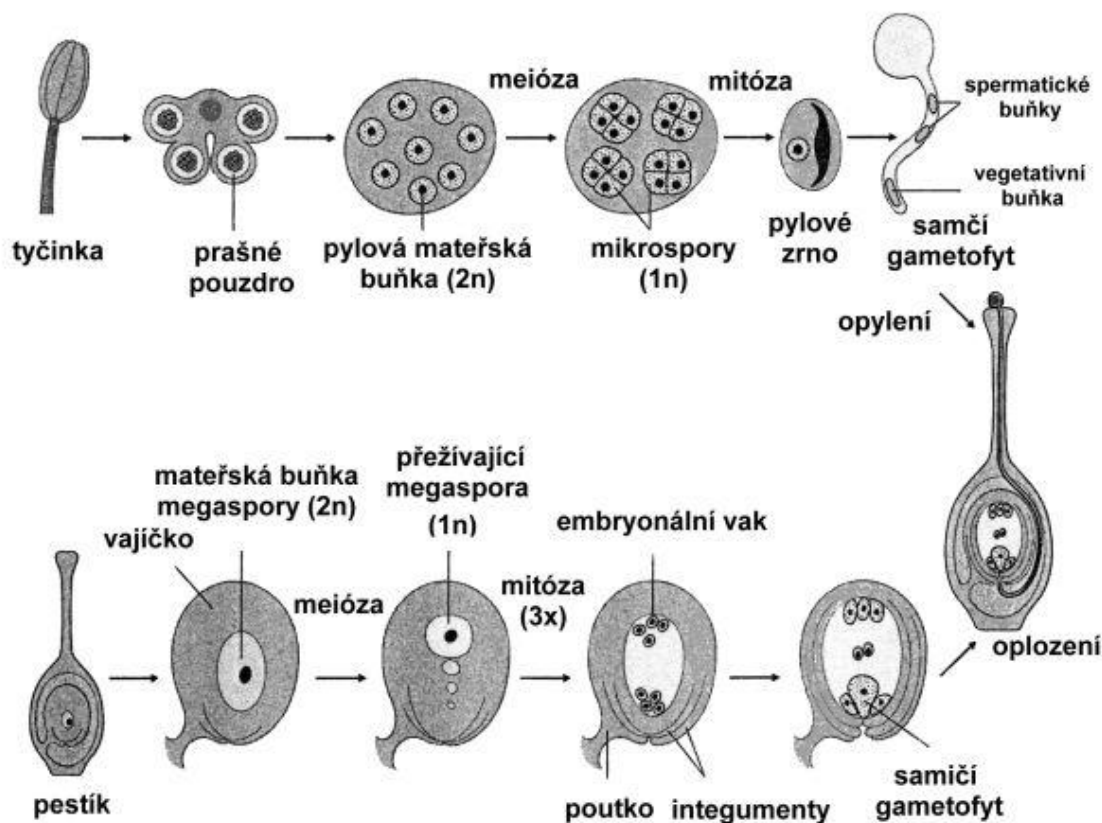
Uvnitř semeníku se vyvíjí vajíčko (nebo vajíčka). Základem pro vznik samičího gametofytu je diploidní tzv. **archesporová buňka**, ze které vznikne dělením mateřská buňka megaspory. Redukčním dělením vzniká v procesu **megasporogeneze** samičí výtrus (**megaspóra** neboli **primární zárodečný vak**). V dalším procesu se megaspóra přetváří na **zralý zárodečný vak** se samičí pohlavní buňkou (oosférou). Vznik samičí gamety se označuje jako megagametogeneze. V zárodečném vaku se vyvíjí kromě vaječné buňky ještě dvě pomocné buňky (synergidy), které s ní společně tvoří tzv. vaječný aparát. Proti nim se formují tři

buňky, tzv. protistojné (antipody). Uvnitř zárodečného vaku se nachází ještě centrální jádro zárodečného vaku (obr. 4.2).

Dlouho chyběla molekulární analýza samičího gametofytu. Hlavním důvodem byly problémy se získáním proteinů v dostatečné koncentraci. Možnost řešit tento problém umožnila metoda RT-PCR (amplifikace vycházející z cDNA po reverzní transkripci mRNA). Pro tuto metodu je dostatečné malé množství výchozího materiálu (RNA), a je proto vhodná pro analýzu samičího gametofytu a objasnění funkcí specifických genových produktů. Důležitá zjištění byla uskutečněna i pomocí květních mutantů, které se vyznačují samičí sterilitou. Do této skupiny patří řada mutantů *A. thaliana* s defekty ve vývoji integumentů, vajíček nebo embryonálního vaku: *sin1* (*short integuments-1*), *ovm2*, *ovm3* (*ovule mutant-2*, *ovule mutant-3*), *bell* (*bell*), *ats* (*aberrant testa shape*). Další mutací s defektním vývojem vajíčka u *A. thaliana* je *ant* (*aintegumenta*). Gen *ANT* byl klonován. Produkt genu vykazuje vysokou sekvenční shodu s produktem genu *AP2* v tzv. *AP2* doméně. To naznačuje, že oba proteiny jsou příbuzné transkripční faktory. Všechny výše uvedené mutace jsou sporofytické. Vzácně existují i gametofytické mutace, např. u kukuřice *ig* (*indeterminate gametophyte*) a u huseníčku *gf*.

### *Mikrosporogeneze a mikrogametogeneze*

Samčím pohlavním orgánem v květu je tyčinka (mikrosporofyl) tvořená nitkou (filamentum) a prašníkem (anthera). Prašník se skládá ze dvou prašných váčků, z nichž každý obsahuje dvě prašná pouzdra. Uvnitř prašných pouzder vznikají ze sporogenních buněk mitotickým dělením pylové mateřské buňky. V nich pak redukčním dělením vznikají v procesu **mikrosporogeneze** čtyři haploidní **mikrospory** (pylová zrna). Pylové zrno se ještě před opuštěním prašného pouzdra mitoticky dělí na malou buňku rozmnožovací (generativní) a větší buňku láčkovou (vegetativní), takže pylové zrno je pak dvoubuněčné. Generativní buňka se ještě jednou dělí na dvě spermatické buňky (samčí gamety). Tento vznik samčích pohlavních buněk je označován jako **mikrogametogeneze** (obr. 4.2).



**Obr. 4.2** – Schéma tvorby samčích a samičích spor a gamet. (Zdroj: Westhoff et al., 1998)

Mikrospory a pyl jsou pro svůj haploidní stav, relativní jednoduchost a vývojovou synchronizaci vhodným systémem pro výzkum molekulárních mechanismů spojených s vývojem a diferenciací buněk. Při výzkumu buněčné specifičnosti genové exprese se v první fázi obvykle připraví knihovna cDNA z mikrospor nebo zralého pylu a klony, které nehybridizují s cDNA somatických orgánů, jsou považovány za specifické pro příslušné buňky.

K vývoji mikrospor je třeba koordinovaná genová exprese jak v těchto buňkách, tak v pletivech sporofytu, které je obklopují. Podle toho lze geny rozdělit do tří skupin:

- geny, které se transkribují jen ve sporofytických pletivech,
- geny, které se transkribují jak ve sporofytických pletivech, tak v mikrosporách a pylu,
- mikrosporově nebo pylově specifické geny.

Podle načasování aktivace jednotlivých genů je lze rozdělit na časně a pozdní. Časně geny se transkribují po skončení meiózy a většinou kódují cytoskeletární proteiny a proteiny potřebné pro syntézu buněčné stěny nebo ukládání škrobu. Pozdní geny jsou aktivovány po skončení mikrosporové mitózy a jejich mRNA dosahuje maxima ve zralém pylu. Obvykle kódují bílkoviny potřebné pro zrání pylu a růst pylové láčky.

K časným genům patří klon *I3* cDNA izolovaný z nezralých prašníků *Brassica napus*. Transkript tohoto genu se akumuluje v období mikrosporové mitózy a poté jeho množství klesá. V nezralých prašnicích *B. napus* byl dále identifikován gen *BA42*. Transkripty tohoto genu byly nalezeny jak ve vyvíjejících se mikrosporách, tak v buňkách tapeta a periferních buňkách cévního svazku. Nebyly však identifikovány ve zralém pylu. Tento gen má 64 až 67 % homologii s chalkonsyntázou, která se účastní biosyntézy flavonoidů.

Mezi geny, které se transkribují v buňkách tapeta v období po mikrosporové mitóze a jejichž produkty byly nalezeny na povrchu pylových zrn, patří geny pro **oleoziny**. U *B. napus* bylo identifikováno několik forem oleozinů o různých molekulových hmotnostech. Jednotlivé formy jsou kódovány rozdílnými transkripty jednoho genu. Jejich exprese začíná v buňkách tapeta ve stadiu pozdních mikrospor, zvyšuje se ve fázi dvoujaderného pylu a klesá po pylové mitóze, kdy začíná dehydratace prašníků a tapetum degeneruje.

U tabáku byl identifikován jeden gen *NTM19*, který je transkribován specificky v mikrosporách. Gen je aktivní ve stadiu tetrad, jeho transkripty se tvoří v mikrosporách a po mikrosporové mitóze jeho aktivita mizí. Transkripty byly identifikovány pouze v mikrosporách a nebyly nalezeny ve sporofytických pletivech prašníku. U *B. napus* byl identifikován gen *Bp4*, který se exprimuje v raných stádiích vývoje mikrospor a jehož transkripty se nehromadí ve zralém pylu.

Genetickou analýzu samčího gametofytu umožňuje řada mutantů s jadernou samčí sterilitou vyznačujících se defekty ve vývoji tyčinek, ale standardních ve vývoji plodolistů. V rámci této skupiny mutantů je možné další rozlišení podle typu defektu. U *A. thaliana* byly nalezeny mutace s defekty v procesu mikrosporogeneze, např. *ms* a mutace s defekty v uvolňování pylu *msH* nebo ve funkci pylu, mutace *pop*.

Jde většinou o sporofytické mutace, což znamená, že heterozygoti *Ms ms* tvoří normální pyl. Pouze v ojedinělých případech byly získány gametofytické mutace. U nich tvoří heterozygoti 50 % funkčního pylu.

### Oplození krytosemenných rostlin

Po opylení, tj. přenosu pylu z prašníku na bliznu, dochází k oplození. Pro všechny krytosemenné rostliny je charakteristické **dvojité oplození**, které spočívá v tom, že jedna spermatická buňka splyne s vaječnou buňkou a druhá spermatická buňka splyne s centrálním jádrem zárodečného vaku. Po splynutí buněk (plazmogamii) následuje splynutí jejich jader (karyogamie). Celý tento proces se nazývá **syngamie**. Z oplozené vaječné buňky vzniká diploidní **zygota** a z oplozené centrální buňky zárodečného vaku se vyvíjí **endosperm** (nejčastěji triploidní).

Celý proces vývoje samčího a samičího gametofytu a oplození u krytosemenných rostlin je znázorněn na obr 2.

### 4.1.3 Apomixis

Apomiktický způsob rozmnožování je považován za fylogeneticky nejmladší, odvozený od pohlavního rozmnožování. Apomixie je nepohlavní způsob rozmnožování semeny, při kterém nový jedinec vzniká bez splynutí samčích a samičích gamet (tj. bez syngamie) a nevyvíjí se tedy ze zygoty. Je to komplexní znak vyplývající z několika modifikací pohlavního cyklu rostlin.

Začátkem minulého století se chápala apomixie v širším smyslu. Např. Winkler pod tento pojem zahrnoval viviparii a ostatní formy vegetativního rozmnožování. Tato široce chápaná definice se dnes již nepoužívá. V současné době se vegetativní rozmnožování do tohoto pojmu nezahrnuje. Základní výzkum vzniku, rozšíření a klasifikace apomixie spadá do poloviny 40. let našeho století. Zasloužil se o to především švédský botanik Gustafsson a později v 60. letech indický vědec Battaglia.

Apomixis v užším slova smyslu tedy chápeme jako nepohlavní způsob rozmnožování semeny (**agamospermie**), pro který jsou typické následující odchylky v porovnání s pohlavním rozmnožováním:

1. modifikace nebo úplné vynechání meiózy,
2. tvorba neredukovaných megaspór,
3. partenogenetický vývoj embrya,
4. autonomní (nezávislý na opylení) nebo pseudogamní (závislý na opylení) vývoj endospermu.

V důsledku uvedených odchylek se vytvářejí embrya (a potomstvo), která jsou přesnou genetickou kopií mateřské rostliny.

Apomixie zahrnuje dva typy reprodukce:

1. gametofytickou apomixii a
2. adventivní embryonii (sporofytickou apomixii).

#### **Gametofytická apomixie**

Tento způsob apomixie předpokládá pozměněnou megasporogenezi, při které nedochází k redukci počtu chromozomů, tzn., že vzniklý primární zárodečný vak (megaspóra) a z něho odvozený zralý zárodečný vak (samičí gametofyt) nemá redukováný počet chromozomů. Dalším předpokladem úspěšné apomixie je schopnost neoplozené vaječné buňky (s neredukovaným počtem chromozomů  $2n$ ) vytvářet embryo. Tato schopnost se nazývá (diploidní) **partenogeneze**. Oba procesy jsou pod nezávislou genetickou kontrolou a jsou determinované pravděpodobně polygenně.

Vedle diploidní partenogeneze se někdy do apomixie zahrnuje i **haploidní partenogeneze**, kdy se haploidní zárodek tvoří z neoplozené vaječné buňky (**gynogeneze**) nebo mikrospory (**androgeneze**).

Podle původu a způsobu vzniku zárodečného vaku a odchylek v megagametogenezi se rozlišují dva typy gametofytické apomixie:

1. diplosporie a
2. aposporie.

Pro **diplosporii** je typický vznik neredukovaného zárodečného vaku z buňky samičího archesporia (obr. 4.3). Pro tento typ apomixie se užívá synonym mitotická, somatická, přímá diplosporie, generativní aposporie aj. Embryonální vak se vytváří z neredukované megaspory nebo mateřské buňky megaspory. Embryo se vyvíjí partenogeneticky. Endosperm se vyvíjí autonomně z neredukovaných centrálních jader také bez oplození (*Compositae*). Může mít proměnlivou úroveň ploidie. U rodů *Ergastosis* a *Tripsacum* je pro tvorbu endospermu nezbytné opylení (tzv. **pseudogamie**). Meiotická diplosporie se vyskytuje u rodů *Arabis*, *Paspalum*, *Taraxacum*, *Ixerix* a zástupců některých rodů *Compositae*. Mitotická diplosporie byla zjištěna u rodu *Antennaria*.

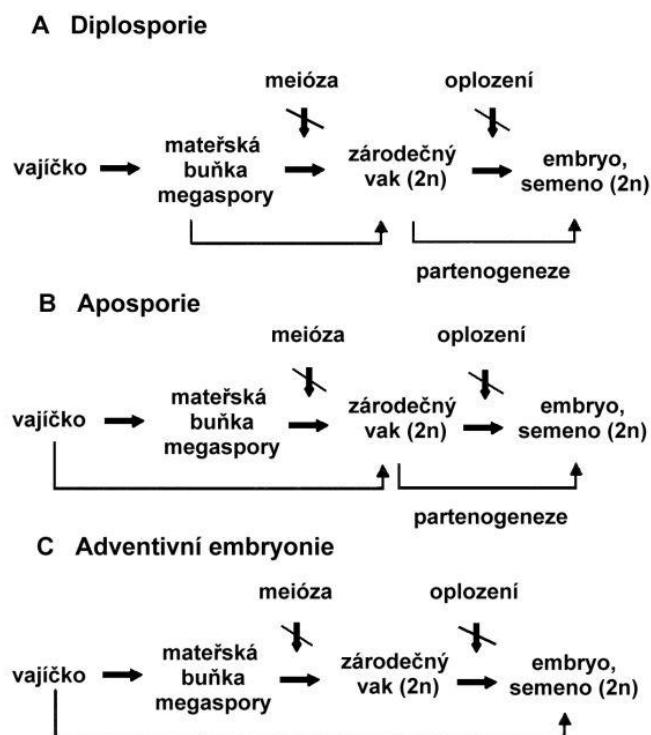
U polyploidních druhů *Allium nutans* ( $2n = 40$ ), *A. odoratum* ( $2n = 32$ ) a *A. tuberosum* ( $2n = 32$ ) je diplosporie typu *Allium*. U těchto druhů dochází k premeotickému zdvojení chromozomů endomitózou. Vznikají dva identické chromozomy, oba se dvěma chromatidami. Během následující meiózy se párují sesterské chromozomy a tvoří autobivalenty. Vzniká tetráda jader rodičovského genotypu.

Při **aposporii** (někdy též somatické aposporii) vzniká neredukovaný zárodečný vak z některé jiné somatické buňky nucelu, než ze které vzniká archesporová buňka (obr. 4.3). Aposporie i amfimixie mohou probíhat v jednom vajíčku. Při vývoji aposporních zárodečných vaků dochází k řadě morfologických odchylek v uspořádání a polaritě, které slouží jako kritérium pro klasifikaci jednotlivých typů (typy: *Hieracium*, *Poa*, *Panicum*, *Andropogon*). U typu *Hieracium* se tvoří neredukovaný 8 jaderný bipolární embryonální vak. Embryonální vak typu *Panicum* je zpravidla neredukovaný 4 jaderný monopolární. Pro vývoj endospermu je u většiny druhů s výjimkou *Hieracium* spp. nezbytné opylení. Aposporie je častým apomiktickým mechanismem u řady druhů trav patřících k rodům *Pennisetum*, *Poa*, *Paspalum* a *Cenchrus*.

### **Adventivní embryonie**

Embrya a nové sporofyty vznikají ze somatických pletiv vajíčka (obr. 4.3), nejčastěji z nucelu nebo integumentů (nucelární nebo integumentální embryonie). Na tvorbě adventivních embryí se tedy podílejí diploidní buňky, které bezprostředně sousedí se zárodečným vakem. Tyto buňky prorůstají do zárodečného vaku, kde se z nich vyvíjí embryo. Přitom může vznikat v zárodečném vaku pohlavním i nepohlavním způsobem embryo z vaječné buňky. Vznik více embryí v jednom zárodečném vaku se nazývá **polyembryonie**.

Jednotlivé typy apomixie jsou schematicky znázorněny na obr. 4.3.



**Obr. 4.3** – Jednotlivé typy apomixie.

### *Příčiny vzniku apomixie*

I když bylo vysloveno mnoho teorií o příčinách vzniku apomixie, je dnes všeobecně uznávaná koncepce dědičné determinace apomixie. K dispozici je však dosud málo experimentálních údajů o typu dědičnosti, počtu genů a jejich vztazích. Pozornost se soustřeďuje na objasnění genetické determinace jednotlivých složek apomixie. Klíčovými mechanismy apomixie je modifikace nebo vynechání samičí meiózy a podpoření autonomního vývoje embrya ve vajíčku. Nejčastěji jsou uváděny tyto odchylky vedoucí k apomixii:

1. Vynechání heterotypického meiotického dělení, jehož důsledkem je neredukovaný počet chromozomů a vznik neredukovaných diplosporních nebo aposporních zárodečných vaků.
2. Vynechání heterotypického meiotického dělení, jehož důsledkem je neredukovaný počet chromozomů a vznik neredukovaných diplosporních nebo aposporních zárodečných vaků.
3. Schopnost genotypů vytvářet diplosporní nebo aposporní zárodečné vaky.
4. Schopnost neoplozených vajíček k autonomnímu vývoji (partenogenezi).
5. Neschopnost neredukovaných vaječných buněk k oplození.
6. Schopnost somatických buněk nucelu a integumentů pronikat do zárodečného vaku a vytvořit adventivní zárodky (polyembryonie).
7. Na opylení nezávislá schopnost polárních jader nebo sekundárního jádra zárodečného vaku k autonomnímu vývoji endospermu.



Huseníček a rýže se staly hlavními rostlinnými objekty při izolaci odpovídajících genů podmiňujících jednotlivé procesy vedoucí k apomixii, a to především prostřednictvím mutagenese a získání apomiktických mutantů. K objasnění genetiky apomixie přispělo studium populací hybridů získaných křížením *Pennisetum squamulatum* a *Tripsacum dactyloides* s kukuřicí.

### **Rozšíření apomixie**

Existuje řada experimentálních důkazů o tom, že apomixie a amfimixie se jako dva základní způsoby rozmnožování navzájem nevylučují. Naopak se v populacích určitých rostlinných druhů často vyskytují současně ve stavu určité rovnováhy. Apomiktické taxony obvykle zahrnují pohlavně se množící diploidy a polyploidy, ale také fakultativní apomikty. Pozitivním aspektem většiny apomiktů je zachování samčí fertility. Diploidní partenogeneze u jinak pohlavně se množících druhů byla zjištěna např. u rodů *Fragaria*, *Solanum*, *Zea*, *Primula*, *Triticum*, *Petunia*, *Nicotiana*, *Brassica* aj. Z dalších kulturních rostlin, u kterých je významné apomiktické rozmnožování, můžeme jmenovat *Taraxacum officinale* a *Parthenium argentatum* (*Asteraceae*), druhy rodů *Malus* a *Rubus* (*Rosaceae*), dále *Poa*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* a další subtropické trávy čeledě *Poaceae*. Odrůdy druhů subtropických rodů *Citrus*, *Mangifera* a *Musa* se rozmnožují apomikticky semeny vzniklými adventivní embryonií. Celkově se různé typy apomixie zjistily u více než 300 druhů a 90 rodů krytosemenných rostlin. Přitom se často vyskytují ve fylogeneticky mladých čeledích, např. *Poaceae* (téměř 60 rodů) a *Asteraceae* (téměř 30 rodů). Nejčastější je výskyt apomixie u *Gramineae*, řádu *Compositae* a čeledě *Rosaceae*. Apomixie byla zjištěna většinou u druhů s vyšší ploidií, což také komplikuje její využití ve šlechtění.

### **Využití apomixie ve šlechtění**

Detekce apomixie předcházející jejímu využití je poměrně snadná při úplné apomixii. Např. u většiny rostlin *Taraxacum officinale* i po pečlivé kastraci jednotlivých květů a po vyloučení možnosti cizosprášení izolací úboru, vznikají normální semena. Naproti tomu částečnou apomixii zjistíme tímto způsobem velmi těžko. Ještě komplikovanější jsou případy pseudogamie, kdy embryo sice vzniká partenogeneticky, vyžaduje však stimulaci opylením pro vývoj endospermu. Na pseudogamii můžeme usuzovat tehdy, jestliže po „křížení“ dvou homozygotních rostlin s různými dominantními geny – markery (*AA bb* x *aa BB*) bude potomstvo  $F_1$  jednotné a fenotypově shodné s mateřskou rostlinou.

Zájem o apomiktický způsob rozmnožování a jeho využití ve šlechtění se soustřeďuje na několik základních oblastí:

1. Pozornost je zaměřena na ověření biologických a genetických předpokladů apomiktických forem při fixaci heteroze u vhodných hybridních kombinací hospodářsky důležitých rostlin, bez neustálého opakování křížení při tvorbě hybridů a na snadnější udržování rodičovských linií. Určité úspěchy byly v tomto směru

dosaženy u široku a jiných *Poaceae* a u některých zástupců z čeledě *Asteraceae*, např. u *Centaurea cyanus*.

2. Některé šlechtitelské programy jsou zaměřeny na zvýšení genetické variability hospodářsky důležitých apomiktů mezidruhovým křížením s pohlavně se rozmnožujícími formami nebo fakultativními apomikty. Obvykle se používá křížení, ve kterém se mateřské rostliny opylují pylem obligátních apomiktů. Vzniklé heterozygotní potomstvo vykazuje velkou variabilitu jak ve sledovaných znacích, tak i ve způsobu rozmnožování. Následující výběr je obvykle zaměřen na hospodářsky nejcennější vysoce apomiktické hybridy. V některých případech bylo možno tímto způsobem vybrat i obligátní apomikty (např. *Pennisetum ciliare*, *Panicum maximum*).
3. Další oblast využití je spjata s představou indukce vyšší četnosti haploidní partenogeneze, následným výběrem haploidních rostlin a po jejich diploidizaci rychlým odvozením homozygotních linií. Takové linie se mohou úspěšně využít jako rodičovské linie při tvorbě výkonných hybridů.
4. Opakovaný vznik partenogenetických rostlin je často pozorován v potomstvech mezidruhových i mezirodových hybridů, kdy v důsledku poruch v meióze dochází v některých případech k tvorbě neredukovaných gamet. Jejich vznik v řadě případů umožňuje i fixaci amfidiploidního stavu např. u mezirodových hybridů *Haynaldia* x *Triticum*, *Triticum* x *Aegilops*. Nejvíce amfiploidů s následným praktickým využitím bylo však získáno z křížení *Triticum* x *Secale*.
5. Adventivní embryonie je významným způsobem reprodukce u *Citrus* sp. a využívá se k získání bezvirózního potomstva. Tento typ reprodukce se prakticky využívá i u dalších rodů např. *Mangifera*, *Malus*, *Ribes* a *Beta*.

K uskutečnění uvedených šlechtitelských záměrů je nutná záměrná introgrese jednotlivých složek (geneticky kontrolovaných komponent) apomixie do pohlavně se množících hospodářsky důležitých rostlin. To je možné buď výběrem rostlin z cizosprašných populací (u samosprašných rostlin se předpokládá, že jsou tyto geny rychle eliminovány), nebo indukci mutací. V neposlední řadě je to možné uskutečnit přenosem celých chromozomů (nebo jejich fragmentů) vzdálenou hybridizací z geneticky příbuzných apomiktických forem nebo druhů a následným výběrem linií s vhodnými složkami apomixie. K jejich identifikaci se využívají izoenzymové nebo DNA markery. Byly rozpracovány vysoce efektivní metody přenosu částí chromozomů, které mohou tento proces podstatně urychlit. Podařilo se například přenést složky apomixie z *Tripsacum dactyloides* do *Zea mays*. K introdukcii apomixie byly využity také druhy rodů *Beta*, *Malus*, *Agropyron*, *Elymus* a *Solanum*. Pokusy o introdukcii složek apomixie ze vzdálených příbuzných druhů do druhů se zemědělským využitím však byly většinou neúspěšné, protože výsledkem byly jen částečně fertlní apomiktické rostliny. Z těchto důvodů se úsilí výzkumných pracovníků zaměřilo na identifikaci a izolaci klíčových regulačních genů.

## Genetická determinace apomixie

Přes mnohaleté úsilí šlechtitelů není apomixie ve větší míře využívána ve šlechtitelských programech a její genetická kontrola není doposud zcela objasněna. Pravděpodobně jde o znak kvalitativní. U většiny sledovaných druhů segregovala apomixie jako jeden lokus. U druhů *Panicum maximum*, *Ranunculus auricomus* a *Brachiaria* sp. byla zjištěna aposporie s monogenní dědičností, kde byla tvorba neredukovaného zárodečného vaku determinována dominantní alelou. Hlavními modelovými druhy při studiu genetiky diplosporie byly druhy rodu *Taraxacum*. U nich je gen nebo několik málo genů determinujících tento typ apomixie lokalizován na jednom chromozomu. U druhů rodu *Tripsacum* je apomixie kontrolována několika těsně vázanými geny a dědí se mendelovsky jako jeden lokus. Výskyt obligátní nebo fakultativní apomixie a odlišný stupeň fakultativní apomixie v rámci jednoho druhu naznačuje vliv jiných genů, tzv. modifikátorů, nebo vliv genetického pozadí.

Gametofytická apomixie zahrnuje několik modifikací pohlavního reprodukčního cyklu, jako je apomeióza, partenogenetická tvorba embrya a v některých případech změny tvorby centrální buňky zárodečného vaku a různé způsoby tvorby endospermu.

Výzkum prováděný v 80. a 90. letech minulého století u několika druhů naznačuje, že apomeióza se dědí monogenně, dominantní alelou. Různá penetrance genu vysvětluje výskyt fakultativních apomiktů. U některých druhů, jako je *Ranunculus auricomus*, *Pennisetum maximum* a *Hieracium piloselloides*, se apomeióza společně s dalšími elementy apomiktické reprodukce dědí také jako jeden znak. U druhů *Taraxacum officinale*, *Poa pratensis* a *Erigeron annuus*, apomeióza ne vždy kosegreguje s dalšími rysy apomeiózy. U všech testovaných druhů je silná suprese rekombinace v okolí lokusu pro apomeiózu, což naznačuje, že apomixis je asi kontrolována mnoha geny, které jsou v těsné vazbě, geny tvoří jeden nebo dva komplexy.

Práce od r. 1999 dokládají nezávislou kontrolu jednotlivých komponent apomeiózy a partenogeneze dominantními alelami majorgenů. Ale to nevylučuje, že každá komponenta apomixis může být kontrolována více geny. Doposud nejsou žádné poznatky o faktorech podmiňujících penetranci a expresivitu u různých genetických pozadí. Rozdíly v expresivitě a interakce genů jsou zodpovědné za širokou škálu způsobů reprodukce. Aposporie a partenogeneze a také jednotlivé geny segregují nezávisle.

Genetické analýzy jsou komplikovány nízkou rekombinací, nepravidelnou segregací a polyploidií. Nejobtížnější jsou analýzy tvorby apomiktických semen, protože gametofytická generace je reprezentována jen několika málo buňkami a je omezena na krátký časový interval.

*Poa pratensis* je významná pícnina. Je to aposporní pseudogamní apomikt s  $2n = 18$  až 150. Genetická kontrola apomixie byla studována u řady segregujících potomstev pocházejících z křížení a selfování obligátních pohlavně se množících rodičů a fakultativních apomiktických

rodičů. Výsledkem je model s pěti geny s velkým účinkem, které jsou nezbytné pro kontrolu tvorby asexuálních semen:

- *Apospory initiator*                      *Ait* aktivace aposporie
- *Apospory preventer*                      *Apv* inaktivace tvorby aposporního zárodečného vaku
- *Megaspore development*              *Mdv* tvorba mateřské buňky megaspóry
- *Partenogenesis initiator*              *Pit* aktivace partenogeneze
- *Partenogenesis preventer*              *Ppv* inaktivace partenogeneze

Rozdíly v expresivitě a interakce genů jsou zodpovědné za širokou škálu způsobů reprodukce. Aposporie a partenogeneze a také jednotlivé geny segregují nezávisle.

- Geny *Apv*, *Ppv* brání tvorbě aposporního zárodečného vaku a embrya bez oplození.
- Penetrance a expresivita je úplná u genů *Apv* a *Ppv* u rostlin s amfimixií.
- Recesivní alely *apv*, *ppv* tolerují, ale neindukují apomeiózu nebo partenogenezi.
- Dvojnásobný recesivní homozygot *apv apv ppv ppv* tvoří apomiktická semena sporadicky.
- Pro vyšší podíl apomixie existují dva další geny. Dominantní alely *Ait* a *Pit* indukují aposporii a partenogenezi. Nejvyšší podíl apomixie je u genotypů *Ait - apv apv*, *Pit - ppv ppv*.
- Obligátní amfimixie je u genotypů *ait ait Apv -*, *pit pit Ppv -*.
- Recesivní alela *mdv* způsobuje aborci megaspór nebo megagametofytů.
- Genotyp stabilního aposporního apomikta je *Ait - apv apv mdv mdv Pit - ppv ppv*.

### *Je možné šlechtění na apomixii?*

Testované přístupy introdukce apomixie do kulturních druhů jsou založeny např. na **hybridizaci příbuzných druhů**, apomikta s pohlavně se množícím kulturním druhem. Čeleď *Poaceae* má řadu apomiktických druhů a řadu ekonomicky významných druhů. V řadě programů byly snahy přenést pseudogamní apomixii do kulturního druhu prostřednictvím mezirodové nebo mezidruhové hybridizace (*Tripsacum dactyloides* x *Zea mays* nebo *Pennisetum squamulatum* x *Pennisetum squamosum*).

Hybridizace byla vždy málo úspěšná. U kříženců docházelo ke ztrátě apomiktické schopnosti, aborci semen a sterilitě v důsledku nerovnováhy endospermu vlivem fúze neredukovaných centrálních buněk s haploidní spermatickou buňkou. Introgrese autonomní apomixie, která je schopná obejít problémy s endospermem, však není k dispozici u čeledě *Poaceae*, ale vyskytuje se jen u čeledě *Asteraceae*. Další přístup byl založen na **indukci mutací** u pohlavně se množícího druhu a výběru rostlin s autonomní tvorbou semen. Byla prováděna řada pokusů a u jednotlivých mutantů byly získány dílčí znaky, jako je schopnost tvorby neredukovaných gamet a partenogenetických embryí. Ale nepodařilo se získat rostlinu, která vytváří asexuální embrya ve vysokých četnostech. Mutagenese a skrínink apomixie byly testovány i u *Arabidopsis*. Byly identifikovány tři mutace *fis* (*fertilisation independent seed*) – *fis1/meda* (*medea*), *fis2*, *fis3/fie* (*fertilization independent endosperm*). U mutantů docházelo

k autonomnímu vývoji centrální buňky ve zralém zárodečném vaku. Avšak žádná mutace samostatně nebyla schopná indukovat plnou diferenciaci autonomního endospermu. Dále se u mutantů nepodařilo iniciovat vývoj vaječné buňky, pravděpodobně proto, že gen *FIS* je pozdě exprimován.

**Klonování genů pro apomixii** u rostlin s apomixií a jejich následné využití při genetické transformaci je velmi obtížné z důvodů suprese rekombinace v okolí lokusu, polyploidie druhů a redukované sexualitě apomiktů. Ačkoli některé lokusy byly zmapovány, žádné nebyly osekvenovány. Je nezbytné aplikovat jiné přístupy, např. přes mRNA.

Byly identifikovány geny podílející se na indukci embryogeneze bez oplození. Např. roku 2001 byl identifikován gen *AtSERK1*, který je exprimován u vajíček před oplozením a u raných embryí; exprese genu zvyšuje embryogenní potenciál kalusů *in vitro*. Roku 2002 byl identifikován gen *BABYBOOM*, který je exprimován během tvorby semen; v podmínkách *in vitro* indukuje tvorbu somatických embryí např. na okrajích listů a v apikálním vrcholu. Exprese těchto genů stimuluje sice somatickou embryogenezi *in vitro* u vegetativních orgánů, avšak zdaleka nic neříká o možnosti indukovat partenogenezi v semenech, což je nezbytné pro apomixii.

## 5. Inkompatibilní systémy vyšších rostlin

U 90 z 320 čeledí vyšších rostlin byly nalezeny genetické mechanismy, které znemožňují samoopylení. Tato blokáda se nazývá **autoinkompatibilita**. Obecně pod pojmem inkompatibilita rozumíme neschopnost rostlin tvořit semena, ačkoli tvoří funkční gamety, a to jak při samoopylení, tak i při cizosprášení s geneticky blízkými formami. Inkompatibilita je v rostlinné říši velmi rozšířená. Nejznámější je u čeledí *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Papaveraceae* a *Poaceae*. Z tohoto velkého rozšíření v rostlinné říši je vidět, že inkompatibilita hraje důležitou roli v evoluci.

Termín inkompatibilita zavedl v roce 1917 Stout při studiu fertility u *Cichorium intybus*, ačkoli tento mechanismus byl znám již mnohem dříve. Již před dvěma stoletími Kölreuter pozoroval, že u rodu *Verbascum* se při opylení vlastním, zjevně fertillním pylem netvoří semena, zatímco při cizosprášení se semena tvoří v dostatečném počtu.

Hlavní funkcí inkompatibilních systémů je zabránění inbridingu a tedy zajištění cizosprášení. Tento mechanismus je uskutečňován na základě inkompatibility pylu a pletiva čnělky nebo blizny. Nelze jej tedy zaměňovat s formami sterility, kdy neschopnost vytvářet životaschopná semena je způsobena chromozomovými abnormalitami, některou formou poruchy tvorby gamet nebo vývoje embrya, popř. neschopností uvolňování pylu z prašných váčků.

Inkompatibilita je geneticky determinována jedním nebo více lokusy, označovanými symbolem *S*. Lokus má řadu charakteristik, které jsou společné všem čeledím:

- U některých druhů byl počet alel lokusu odhadnut až na 200. Jeden lokus může být tvořen skupinou několika vázaných genů.
- U diploidních rostlin jsou přítomny vždy dvě alely.
- Inkompatibilní reakce vzniká v případě, že alela (alely) *S* rodičovské rostliny poskytující pyl je stejná jako alela (alely) *S* u mateřské rostliny.

Inkompatibilní systém vyšších rostlin je mechanismus, který prostřednictvím lokusu *S* zabraňuje samooplození a tím zabezpečuje oplození mezi geneticky odlišnými jedinci. Byly získány poznatky týkající se molekulárních a biochemických procesů inkompatibility a postupně jsou odhalovány různé systémy.

Obr. 5.1 ukazuje klíčová pletiva rostliny, která souvisejí s mechanismy inkompatibility. K oplození dochází tehdy, jestliže pylová zrna tvoří pylové láčky, které prorůstají bliznou a pletivem čnělky až do semeníku k vajíčkům. Během růstu pylové láčky se jedno haploidní jádro pylového zrna (generativní) dělí mitoticky a v pylové láčce jsou přítomna tři haploidní

jádra. Může dojít k dvojitému oplození, jestliže láčka proroste k mikropylárnímu otvoru vajíčka.

Existují dva odlišné genetické mechanismy kontroly autoinkompatibility kódované lokusem *S*. Je to **gametofytická** (GI) a **sporofytická** inkompatibilita (SI). Dále se rozlišuje také **heteromorfní** a **homomorfní** inkompatibilita, která se vztahuje pouze k morfologii květu. V rámci jedné čeledě mohou být druhy jak autofertilní tak autoinkompatibilní. Ale u inkompatibilních druhů v rámci čeledě existuje jen jeden systém (GI nebo SI).

Čeď	Druh	Autofertilita	Auto-inkompatibilita
Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ano	
	<i>Brassica napus</i>	ano	
	<i>Brassica oleracea</i>		sporofytická
Gramineae	<i>Hordeum vulgare</i>	ano	
	<i>Secale cereale</i> <sup>1</sup>		gametofytická
Leguminosae	<i>Trifolium repens</i>		gametofytická
	<i>Pisum sativum</i>	ano	
Papaveraceae	<i>Papaver rhoeas</i>		gametofytická
Primulaceae	<i>Primula vulgaris</i>		sporofytická heteromorfní
Scrophulariaceae	<i>Antirrhinum majus</i>	ano	
Solanaceae	<i>Nicotiana alata</i>		gametofytická
	<i>Nicotiana tabacum</i>	ano	
	<i>Solanum tuberosum</i>		gametofytická
	<i>Petunia inflata</i>		gametofytická
	<i>Petunia hybrida</i>	ano	

<sup>1</sup> dvoulukusový inkompatibilní systém

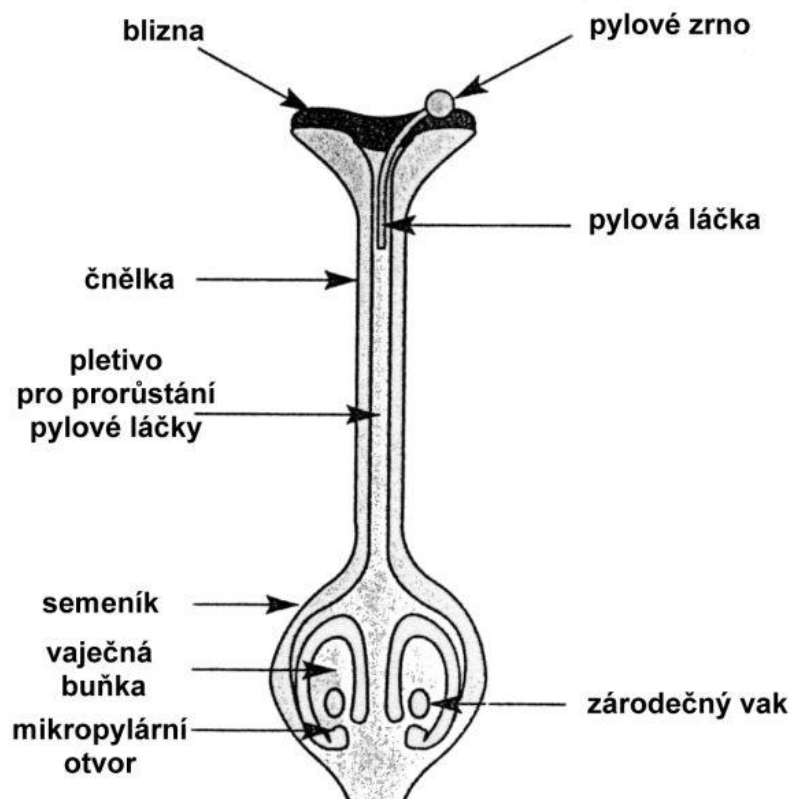
**Tab. 5.1** – Systémy inkompatibility u některých druhů vyšších rostlin.

Genotyp haploidního pylu (gametofyt) determinuje inkompatibilní reakci pylu při GI. V případě SI je inkompatibilní reakce determinována diploidním genotypem rostliny (sporofytem), která produkuje pyl (obr. 5.2). GI je u vyšších rostlin častější než SI.

Jsou opylovány tři různé mateřské rostliny s gametofytickým typem inkompatibility genotypů  $S_1S_2$ ,  $S_2S_3$ ,  $S_2S_4$ . Genotyp otcovské rostliny je  $S_1S_3$ . Veškerý pyl je genotypů  $S_1$  nebo  $S_3$ . Na blizně rostliny  $S_1S_2$  vyklíčí pouze pyl s alelou  $S_3$ , opylení pylem  $S_1$  je inkompatibilní, protože se setkává ve čnělce s identickou alelou. Vzniku zygot se účastní jen polovina pylových zrn. Na blizně rostliny  $S_2S_3$  vyklíčí pyl  $S_1$  a při opylení rostliny  $S_2S_4$  je kompatibilní veškerý pyl (obr. 5.2 I). GI se vyskytuje u řady druhů např. v čeledi *Solanaceae*.

SI je charakteristická pro čeleď *Brassicaceae*. Typickým představitelem je *Brassica oleracea*. Pyl rostliny genotypu  $S_1S_3$  je fenotypu  $S_1S_3$  ať nese alelu  $S_1$  nebo  $S_3$ . Je to způsobeno přítomností proteinů v obalech pylu, tzv. **samčích determinantů**, které mají původ v buňkách tapeta při mikrogametogenezi. U mateřských rostlin genotypů  $S_1S_2$  a  $S_2S_3$  k oplození po tomto opylení nedojde. Úspěšné je oplození pouze rostlin  $S_2S_4$ . Alely  $S$  jsou kodominantní, působí nezávisle (obr. 5.2 II). U některých druhů jsou alely  $S$  ve vztahu dominance (kap. 3.2).

Rozdíl mezi GI a SI se projevuje i v načasování exprese inkompatibility u pylu. V důsledku přítomnosti a charakteru samčích determinantů dochází u GI k inhibici růstu pylové láčky ve čnělce (ale láčka vyklíčí na blizně). U SI je růst pylové láčky inhibován již na povrchu blizny.





**Obr. 5.1** – Pletiva účastníci se mechanismů inkompatibility. (Zdroj: Hughes, 1996)

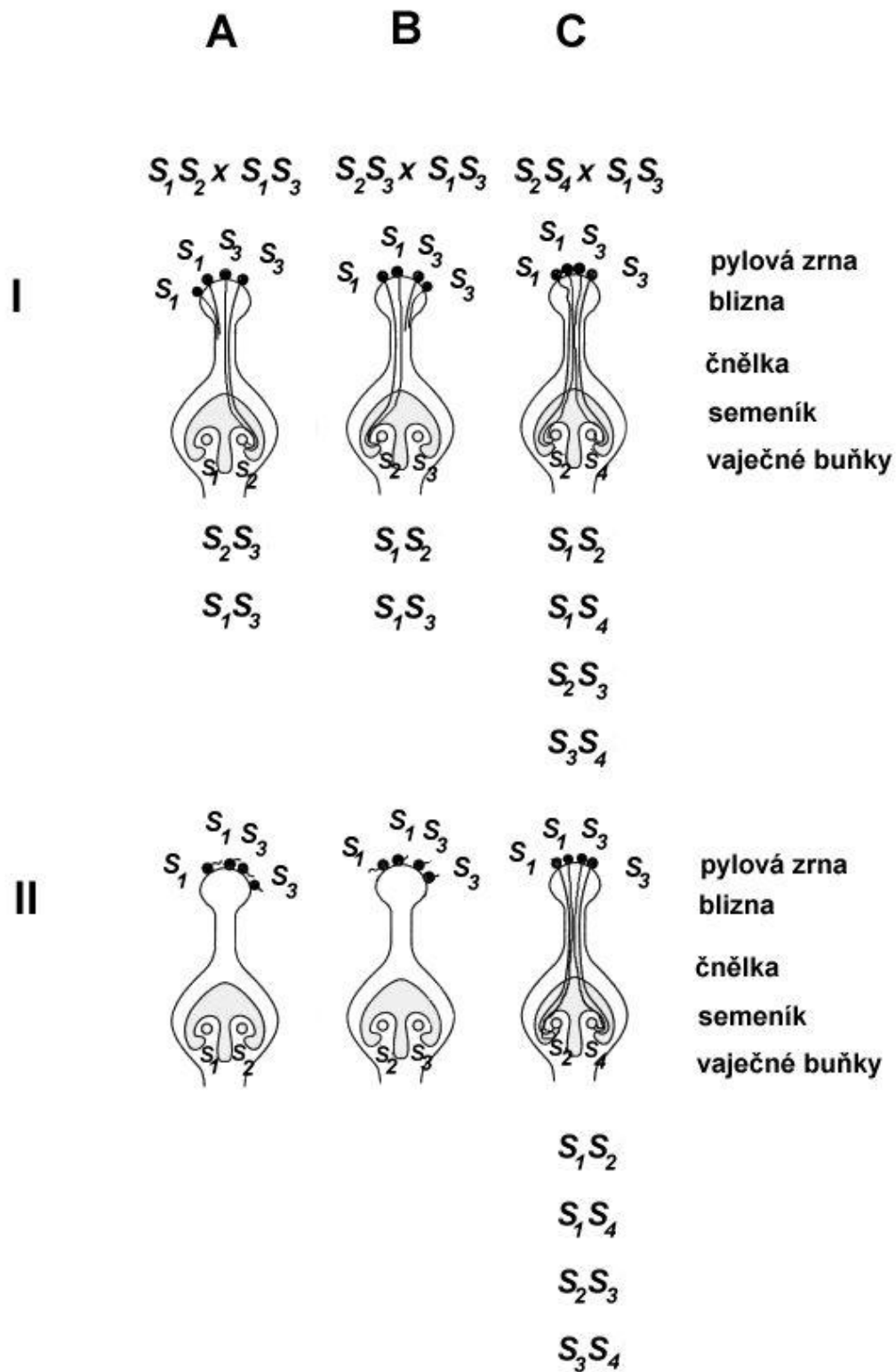
## **5.1. Gametofytická inkompatibilita**

Gametofytickou inkompatibilitu poprvé popsali East a Mangelsdorf (1925) u *Nicotiana sanderae*. V tomto systému je inkompatibilita podmíněna vzájemným působením pylu a pestíku, tj. haploidním genomem každého pylového zrna a diploidním genomem pletiva čnělky, kterou pylová láčka prorůstá do semeníku k vaječné buňce. Inkompatibilní reakce, tedy neschopnost růstu pylové láčky, nastává tehdy, jestliže pylové zrnko nese shodnou alelu jako pletivo pestíku. Jsou však možné i takové případy, kdy se mechanismus inkompatibility uplatní až v zárodečném vaku (inkompatibilní systém haploid – haploid). Takovýto mechanismus je charakteristický pro víceleté druhy rodu *Freesia*, *Hemerocallis* a *Narcissus*.

### **5.1.1 Jeden mnohoalelní lokus**

Na příkladu *Nicotiana sanderae* lze demonstrovat GI determinovanou jedním lokusem *S*. Tento lokus obsahuje velký počet alel:  $S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$ . Diploidní sporofyt je většinou heterozygotní (např.  $S_1S_2, S_1S_3$ ). Každé pylové zrnko obsahuje pouze jednu z alel *S*. Ke kompatibilnímu opylení dojde pouze v tom případě, kdy se daná alela pylu setká s odlišnými alelami v pestíku.

Genetické založení tohoto systému inkompatibility předurčuje minimální počet alel v izolované populaci na tři. Populace se pak bude skládat ze tří genotypů:  $S_1S_2, S_1S_3$  a  $S_2S_3$ . Při opylení (samoopylení i cizosprášení) budou z devíti recipročných kombinací tři inkompatibilní (při samoopylení) a zbývajících šest bude kompatibilních, i když pouze polovina pylových zrn bude schopna prorůstat čnělkou a účastnit se oplození (tab. 5.2A). Se zvyšujícím se počtem alel v populaci se bude zvyšovat podíl kompatibilních opylení. Budou-li v populaci čtyři alely *S*, pak ze 36 možných kombinací bude 6 inkompatibilních, ve 24 kombinacích bude kompatibilní pouze polovina pylových zrn a 6 bude plně kompatibilních (tab. 5.2 A,B).



**Obr. 5.2** – Kompatibilní a inkompatibilní křížení rostlin s **I**/jednolokusovým gametofytickým, **II**/sporofytickým systémem autoinkompatibility. Prorůstání pylových láček a oplození.

Obecně lze říci, jestliže v dané populaci je počet kombinací opylení (samoopylení i cizosprašení)  $T$  a počet inkompatibilních kombinací  $I_S$ , pak lze jejich vztah vyjádřit:

$$\frac{I_S}{\sqrt{T}} = 1$$

Další zvláštností populací s gametofytickým systémem inkompatibility se třemi alelami je jednosměrná kompatibilita potomstva při jeho křížení s rodičovskými genotypy: jestliže mateřské rostliny  $S_1S_2$  budou opyleny pylem rostliny  $S_1S_3$ , v potomstvu budou rostliny genotypů  $S_1S_3$  a  $S_2S_3$ ; rostliny mateřské populace mohou být opyleny oběma genotypy rostlin potomstva, avšak rostliny otcovské populace mohou být opyleny pouze rostlinami  $S_2S_3$ .

Až na nepatrné výjimky (např. *Solanaceae*) mají všechny druhy určité čeledě určitý systém inkompatibility. Gametofytický systém s jedním mnohoalelním lokusem  $S$  byl prostudován zejména v čeledích *Fabaceae* (*Trifolium*), *Solanaceae* (*Nicotiana*, *Lycopersicon*, *Solanum*, *Petunia*), *Scrophulariaceae* (*Antirrhinum*, *Nemesia*), *Rosaceae* (*Prunus*, *Malus*), *Oenotheraceae* (*Oenothera*) a *Liliaceae* (*Lilium*). V některých případech je tento systém funkční u kulturních druhů (např. *Prunus avium*, *Trifolium repens*), jindy se vyskytuje pouze u planě rostoucích předků (např. *Lycopersicon peruvianum* vs. *L. esculentum*; *Nicotiana alata* vs. *N. tabacum*). U kulturních druhů tedy došlo ke ztrátě inkompatibility modifikací lokusu  $S$ .

♂ ♀		A			B		
		$S_1S_2$	$S_1S_3$	$S_2S_3$	$S_1S_4$	$S_2S_4$	$S_3S_4$
A	$S_1S_2$	-	1/2	1/2	1/2	1/2	1
	$S_1S_3$	1/2	-	1/2	1/2	1	1/2
	$S_2S_3$	1/2	1/2	-	1	1/2	1/2
B	$S_1S_4$	1/2	1/2	1	-	1/2	1/2
	$S_2S_4$	1/2	1	1/2	1/2	-	1/2
	$S_3S_4$	1	1/2	1/2	1/2	1/2	-

**Tab. 5.2** – Kompatibilní a inkompatibilní kombinace při reciprokých kříženích a samoopylení v populacích s gametofytickým systémem inkompatibility a jedním mnohoalelním lokusem  $S$  (A – populace se třemi alelami, A + B – populace se čtyřmi alelami. Čísla uvádějí podíl kompatibilních pylových zrn).

### 5.1.2 Dva mnohoalelní lokusy

Tento systém inkompatibility byl poprvé objeven u druhů *Secale cereale* a *Festuca pratense* Lundqvistem r. 1955. Později byl popsán i u jiných druhů čeledě *Poaceae*, např. u *Phalaris*

*coerulescens*, *Hordeum bulbosum*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*. Později v letech 1991 až 1993 byl identifikován třetí lokus *T*, který se podílí na determinaci inkompatibility u *P. coerulescens*, *L. perenne* a *S. cereale*. U *S. cereale* je lokus *S* lokalizován na chromozomu 1R, lokus *Z* na chromozomu 2R a lokus *T* na chromozomu 5R. U *L. perenne* je lokus *S* lokalizován na chromozomu 6 a lokus *Z* na chromozomu 2.

Genetická determinace inkompatibilní reakce je v tomto případě charakterizovaná dvěma lokusy označenými *S* a *Z*, které se dědí nezávisle, avšak funkčně spolupůsobí. Inkompatibilita se projeví při identitě alel obou lokusů v genotypu pylu a pestíku. Má-li pyl a pestík identické alely pouze v jednom lokusu, opylení je kompatibilní. Kompatibilní reakce je určena pouze genotypem gametofytu, neboť se jedná o gametofytický systém, přitom alely téhož lokusu jsou rovnocenné (neexistuje mezi nimi vztah dominance a recesivity) a také mezi alelami různých lokusů není epistatický vztah.

Tento systém inkompatibility lze demonstrovat na řadě křížení:

1. ♀  $S_1S_1 Z_3Z_3$  x ♂  $S_2S_2 Z_4Z_4$  kompatibilní
2. ♀  $S_1S_1 Z_3Z_3$  x ♂  $S_1S_1 Z_4Z_4$  kompatibilní
3. ♀  $S_1S_1 Z_3Z_3$  x ♂  $S_1S_2 Z_3Z_4$  kompatibilní
4. ♀  $S_1S_2 Z_3Z_4$  x ♂  $S_1S_1 Z_3Z_3$  inkompatibilní

Z uvedených příkladů je vidět, že reciproká křížení (3) a (4) vedou k různým výsledkům. U křížení (3) prorůstá pyl  $S_1Z_4$ ,  $S_2Z_3$  a  $S_2Z_4$ .

Další znaky tohoto systému ukážeme na jiném příkladu. Předpokládejme, že u rostliny heterozygotní v obou lokusech,  $S_1S_2 Z_3Z_4$ , získáme samoopylením potomstvo (i u autoinkompatibilních druhů je to za zvláštních podmínek možné). V tomto potomstvu bude 9 genotypů s četnostmi odpovídajícími teoretickému poměru 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1. Výsledky křížení všech těchto genotypů mezi sebou včetně samoopylení ukazuje tab. 5.3.

Z tabulky je zřejmé, že genotyp  $S_1S_2 Z_3Z_4$  je autoinkompatibilní. Bereme-li ho jako mateřskou formu, je se všemi ostatními genotypy inkompatibilní, jestliže ho však bereme jako otcovskou formu, je naopak se všemi ostatními genotypy kompatibilní. Dále je vidět, že podíl kompatibilních opylení je zde mnohem vyšší (60,9 %) než byl v potomstvu nuceně samosprášených rostlin  $S_1S_2$ , tedy v jednolokusovém systému (37,5 %).

Obecně lze říci, že stabilita inkompatibility je ve dvoulokusovém systému mnohem menší než v systému s jedním lokusem *S*.

Studium alel inkompatibility ve zcela neznámém systému je úkol velmi složitý. Ve dvoulokusovém a složitějším systému je determinace alel poměrně snadná pouze v tom případě, máme-li k dispozici rostliny známého genotypu.

### 5.1.3. Tři a více lokusů

Při analýze vztahů v systému inkompatibility se dvěma lokusy jsme došli k závěru, že jednosměrná inkompatibilita je charakteristická pro ty případy, kdy otcovská forma je homozygotní v lokusech, ve kterých je mateřská forma heterozygotní ( $\text{♀ } S_1S_1 Z_3Z_3 \times \text{♂ } S_1S_2 Z_3Z_4$  je kompatibilní, avšak  $\text{♀ } S_1S_2 Z_3Z_4 \times \text{♂ } S_1S_1 Z_3Z_3$  je inkompatibilní).

V některých případech se může stát, že rostlina A je kompatibilní jako otec se dvěma druhými rostlinami, B a C a rostlina B je jako otec kompatibilní s rostlinou C, avšak při tom jiná křížení mezi A, B a C jsou inkompatibilní. Kdybychom chtěli tyto případy vysvětlit na základě dvou lokusů inkompatibility, pak by se tato tříúrovňová kompatibilita dala zapsat:

A:  $S_1S_2 Z_3Z_4 \rightarrow$  B:  $S_1S_1 Z_3Z_4 \rightarrow$  C:  $S_1S_1 Z_3Z_3$

♂ ♀	$S_1S_1$ $Z_3Z_3$	$S_1S_1$ $Z_3Z_4$	$S_1S_1$ $Z_4Z_4$	$S_1S_2$ $Z_3Z_3$	$S_1S_2$ $Z_3Z_4$	$S_1S_2$ $Z_4Z_4$	$S_2S_2$ $Z_3Z_3$	$S_2S_2$ $Z_3Z_4$	$S_2S_2$ $Z_4Z_4$
1	1	2	1	2	4	2	1	2	1
$S_1S_1 Z_3Z_3$ 1	1	2	1	2	4	2	1	2	1
$S_1S_1 Z_3Z_4$ 2	2	4	2	4	8	4	2	4	2
$S_1S_1 Z_4Z_4$ 1	1	2	1	2	4	2	1	2	1
$S_1S_2 Z_3Z_3$ 2	2	4	2	4	8	4	2	4	2
$S_1S_2 Z_3Z_4$ 4	4	8	4	8	16	8	4	8	4
$S_1S_2 Z_4Z_4$ 2	2	4	2	4	8	4	2	4	2
$S_2S_2 Z_3Z_3$ 1	1	2	1	2	4	2	1	2	1
$S_2S_2 Z_3Z_4$ 2	2	4	2	4	8	4	2	4	2
$S_2S_2 Z_4Z_4$ 1	1	2	1	2	4	2	1	2	1

inkompatibilní kombinace

kompatibilní kombinace

**Tab. 5.3** – Vztahy mezi potomstvem získaným nuceným samosprášením rostlin (čísla udávají četnosti jednotlivých křížení z celkového počtu 256 za předpokladu, že jsou všechna křížení možná).

Vidíme, že rostlina C by musela být dvojnásobně heterozygotní, což v případě legitimního křížení není v tomto systému inkompatibility možné. Tyto případy, které byly objeveny např. u *Ranunculus acris*, mohou být vysvětleny na základě tří lokusů inkompatibility. U *Beta*

*vulgaris* a *Papaver rhoeas* byly na základě čtyřúrovňové jednosměrné inkompatibility odhaleny 4 lokusy inkompatibility.

V předchozím jednolokusovém mnohoalelním systému gametofytické inkompatibility jsme poznali, že se vzrůstajícím počtem alel v lokusu vzrůstal podíl kompatibilních křížení lineárně. Ve vícelokusovém systému roste tento podíl se vzrůstajícím počtem lokusů exponenciálně.

## 5.2 Molekulární analýza gametofytické inkompatibility

### 5.2.1 *Nicotiana*, *Petunia*

Druhy rodu *Nicotiana* mají gametofytické mechanismy inkompatibility. Molekulární analýza byla iniciována identifikací hlavního glykoproteinu čnělky jako **samičího determinatu**. Z knihovny cDNA byl izolován klon cDNA ze zralé čnělky a byl potvrzen jako gen kódující čnělkový glykoprotein. Přítomnost mRNA tohoto genu byla zjištěna ve zralých čnělkách a semenících a protein kódovaný genem byl detekován ve velkých koncentracích v mezibuněčných prostorech na povrchu pletiv, kterými prorůstá pylová láčka.

Sekvenční analýza klonu cDNA ukázala, že je homologní se skupinou houbových ribonukleáz (RNáz) a v důsledku toho byl nazván **S-RNáza** (30 kDa). Tab. 5.4 dokládá tvorbu enzymu degradujícího RNA během inkompatibilního opylení u *Nicotiana alata*. Rostliny různých genotypů byly opyleny pylem, jehož nukleové kyseliny byly radioaktivně značeny <sup>32</sup>P. Po určitém čase, aby mohlo dojít ke klíčení pylových láček, byla extrahována RNA ze čnělek a byla zjištěna koncentrace radioaktivní RNA (pocházející z pylu). Tab. 5.4 ukazuje, že z inkompatibilních křížení bylo získáno málo pylové RNA a z kompatibilních křížení to byly podstatně vyšší koncentrace. Toto potvrzuje předpoklad, že RNáza je produkována během inkompatibilního křížení (obr. 5.3).

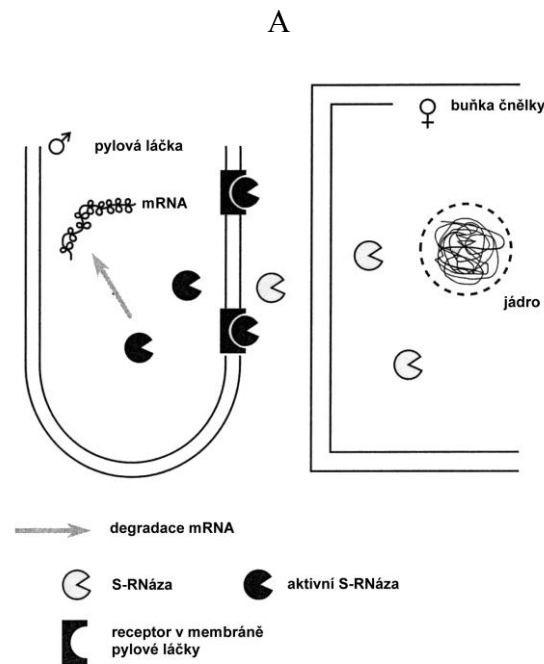
Genotyp čnělky	Genotyp pylu	Reakce	konc. <sup>32</sup> P RNA
<i>S<sub>1</sub>S<sub>3</sub></i>	<i>S<sub>2</sub>S<sub>2</sub></i>	kompatibilní	161
<i>S<sub>2</sub>S<sub>2</sub></i>	<i>S<sub>2</sub>S<sub>2</sub></i>	inkompatibilní	49
<i>S<sub>2</sub>S<sub>2</sub></i>	<i>S<sub>1</sub>S<sub>3</sub></i>	kompatibilní	165
<i>S<sub>1</sub>S<sub>3</sub></i>	<i>S<sub>1</sub>S<sub>3</sub></i>	inkompatibilní	43

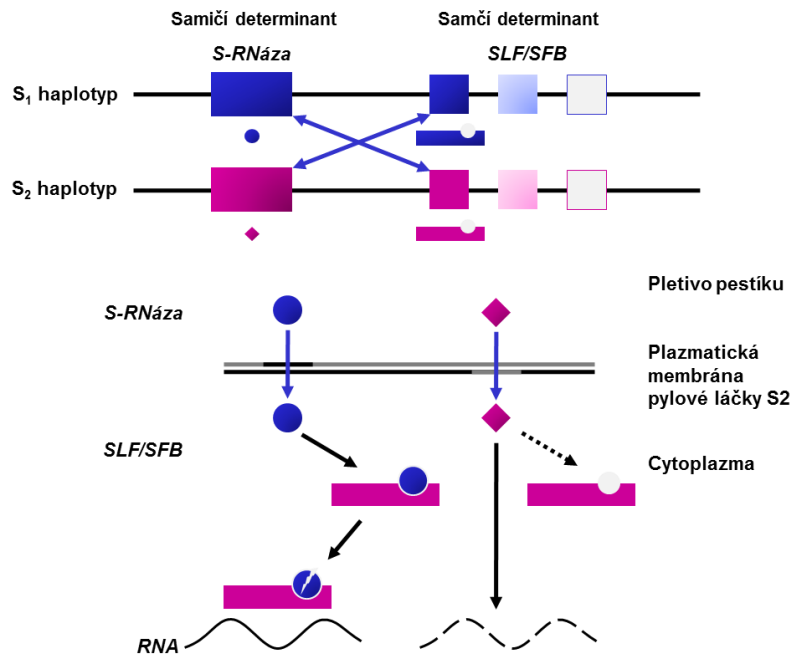
**Tab. 5.4** – Zjištěné koncentrace radioaktivní RNA po křížení rostlin různých genotypů s kompatibilními i inkompatibilními reakcemi.

Jako **samčí determinant** pylu byl identifikován **protein SLF** (*S*-locus F box), který funguje jako cytoplazmatický receptor v pylové láčce (obr. 5.3B). Byla tak korigována první představa funkce tohoto receptoru jako transmembránového (obr. 5.3A).

### 5.2.2 Model interakce pyl – čnělka

Geny pro samčí a samičí determinant jsou těsně vázané v lokusu *S*. Konkrétní dvě alely se dědí společně jako jeden znak, proto hovoříme o dvou haplotypech v případě heterozygotnosti rostliny v lokusu *S*. Na obr. 5.3 je schéma interakce pylu a buněk čnělky, při které dochází k S-RNázové aktivitě. **S-RNáza** je produkována buňkami čnělky a tento protein je transportován do prorůstajících pylových láček v pletivu čnělky. K rozpoznávací reakci mezi proteinem pylu a proteinem čnělky dochází na základě vazebných míst těchto proteinů, pokud jsou produkty různých haplotypů. Po navázání S-RNázy na receptor dojde k její detoxifikaci a neprojeví se její RNázová aktivita. V rostoucí pylové láčce **aktivní S-RNáza**, která se nenaváže na receptor, degraduje mRNA v láčce, což vede k zastavení růstu láčky a nedochází k oplození (obr. 5.3B).





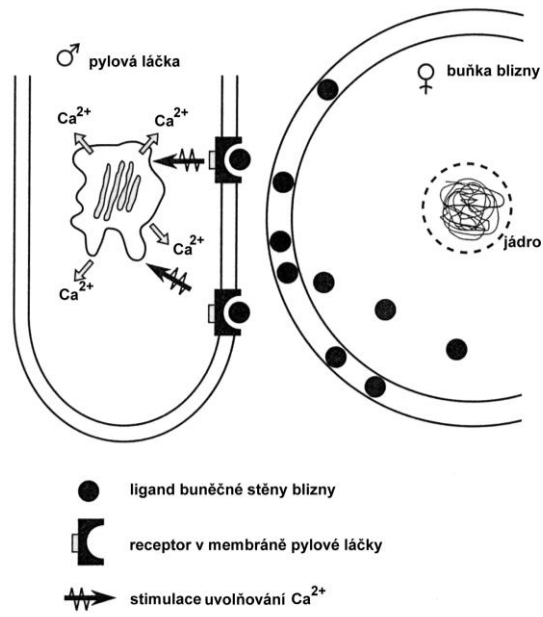
**Obr. 5.3** – Model účinku S-RNázy při inkompatibilní reakci mezi buňkami čnělky a pylových láček u r. *Nicotiana* a *Petunia*. Samčí determinant jako A) transmembránový receptor, B) cytoplazmatický receptor. (Zdroje: Hughes, 1996; Iwano a Takayama, 2012)

### 5.2.3 *Papaver rhoeas*

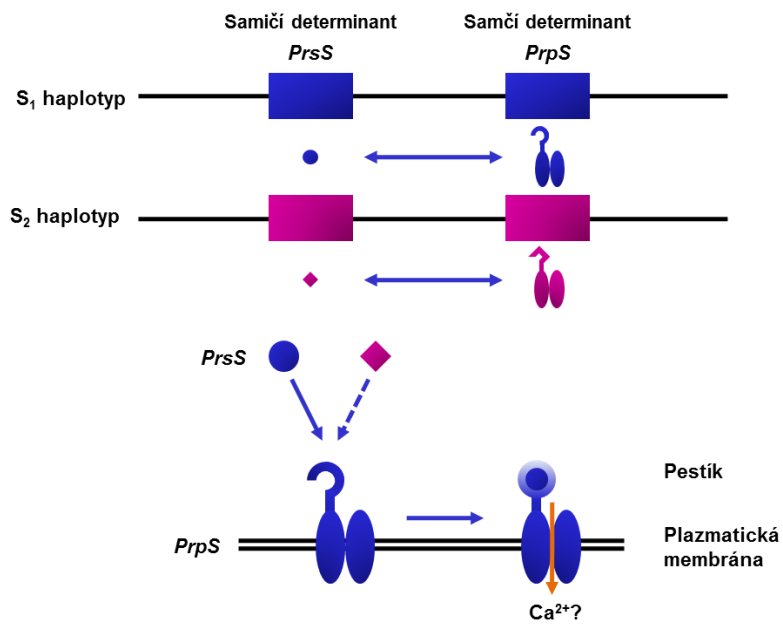
Druhy rodu *Papaver* mají gametofytický typ inkompatibility a podařilo se klonovat gen kódující tzv. **malý protein blizny** (15 kDa). Tento protein není S-RNáza, ale podobně jako tyto proteiny vykazuje úplnou vazbu s lokusem *S* u máku. Gen kódující tento protein byl exprimován u *E. coli* a ukázalo se, že rekombinantní protein inhiboval pylová zrna klíčící v podmínkách *in vitro*. Autoinkompatibilní reakce u máku je spojena s uvolňováním  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy pylových zrn a tato skutečnost vedla k vytvoření modelu vysvětlujícího interakci mezi pylem a bliznou, která je ve zjednodušené formě uvedena na obr. 5.4A.

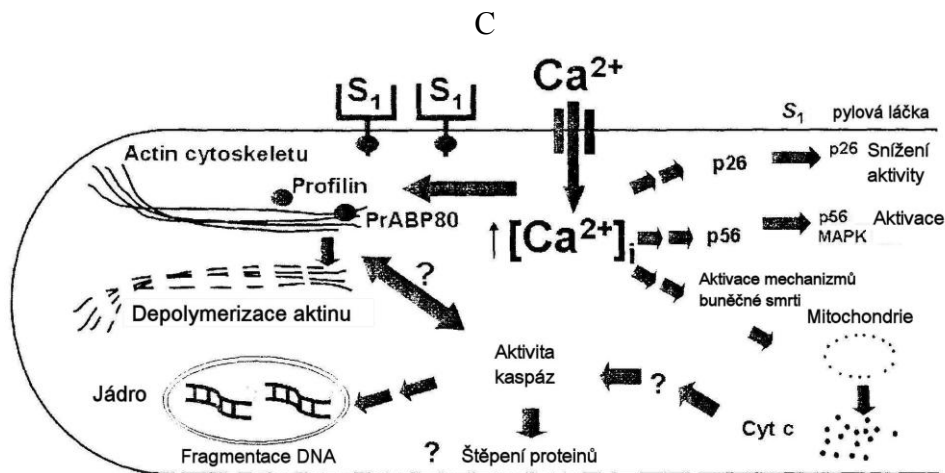


A



B





**Obr. 5.4** – Model působení malého proteinu blizny na inhibici růstu pylové láčky při inkompatibilní reakci u *Papaver rhoeas*. A), B) interakce samčího a samičího determinantu jako produktů buněk pylu a blizny, C) mechanismus buněčné smrti a zastavení růstu pylové láčky. (Zdroje: Hughes, 1996; Iwano a Takayama, 2012; Thomas et al., 2006)

Vazbou proteinu blizny s receptorem *S* v rozpoznávacích místech se aktivuje inkompatibilní reakce, jejíž signalační kaskáda je zahájena tokem  $\text{Ca}^{2+}$  do klíčící pylové láčky a zvyšuje se tak koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě pylu. Během 1,5 min. se aktivují dva mechanismy, do nichž jsou zapojeny dva pylové proteiny, p26 a p56. p26 má fosfatázovou aktivitu a má důležitou funkci při tvorbě ATP a biopolymerů nezbytných pro nově se tvořící membrány a buněčnou stěnu při růstu pylové láčky. Při inkompatibilní reakci je redukována fosfatázová aktivita proteinu p26. Fosforylací proteinu p26 se zvyšuje koncentrace fosfátu až na toxickou úroveň. Pylový protein p56 má kinázovou aktivitu (MAP kináza). MAP kinázy jsou často aktivovány stresem a podílejí se na programované buněčné smrti. Při inkompatibilní reakci se také aktivuje kaskáda apoptotického mechanismu, která má za důsledek uvolňování cytochromu c z mitochondrií, tvorbu kaspáz a fragmentaci jaderné DNA v pylové láčce. Mechanismus je doprovázen i reorganizací a depolymerizací vláken F-aktinu v cytoskeletu. Toto vše zastavuje růst pylové láčky.

K inhibici vývoje pylu při gametofytické inkompatibilitě máku dochází na povrchu blizny. Na rozdíl od jiných druhů, kde k inhibici dochází při prorůstání pylové láčky, je to způsobeno nepřítomností čnělky u máku.

### 5.3 Sporofytická inkompatibilita

Sporofytický systém inkompatibility poprvé popsali v roce 1950 Hughes a Babcock u *Crepis foetida* a Gerstel u *Parthenium argentatum*. Vyznačuje se tím, že reakce pylu (každého pylového zrna) je podmíněna diploidním genotypem somatického pletiva (sporofytu), ve kterém pyl vzniká. Znamená to tedy, že při mikrosporogenezi si všechen pyl bez ohledu na svůj genotyp ponechává fenotypovou reakci dominantní alely přítomné v samčím diploidním

pletivu, popř. je tento vztah kodominantní. Například otcovská rostlina  $S_1S_2$  bude mít všechny pyl fenotypu  $S_1$  při dominanci  $S_1 > S_2$ , ačkoliv část pylových zrn ponese alelu  $S_2$ . Křížení ♀  $S_1S_2$  x ♂  $S_1S_3$  je inkompatibilní, neboť všechny pyl bude fenotypově  $S_1$ , a tedy inkompatibilní s pletivem blizny  $S_1S_2$ . Reciproké křížení je také inkompatibilní.

Na rozdíl od gametofytického systému je ve sporofytickém systému možnost vzniku homozygotů vzhledem k alelám  $S$ . Např. při křížení ♀  $S_2S_3$  x ♂  $S_1S_2$  a dominanci  $S_1 > S_2$  v pylu vznikne potomstvo  $S_1S_2$ ,  $S_1S_3$ ,  $S_2S_2$  a  $S_2S_3$ .

Vzhledem k morfologii květů můžeme v systému sporofytické inkompatibility rozlišit dvě skupiny: heteromorfní a homomorfní inkompatibilitu.

U většiny čeledí s inkompatibilitou kódovanou lokusem  $S$  je morfologie květů identická u všech rostlin v rámci druhu. U 23 čeledí byly identifikovány geny determinující morfologii květů, které jsou ve vazbě s lokusem  $S$ . Tyto rostliny mají heteromorfní inkompatibilitu.

### **5.3.1 Heteromorfní inkompatibilita**

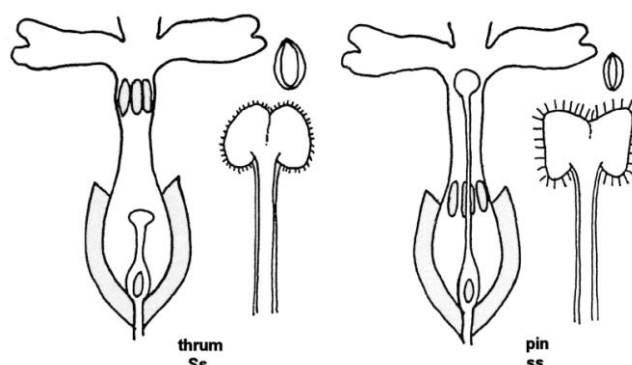
Již Darwin pozoroval, že u některých druhů rostlin existují rozdíly ve stavbě květů, které souvisejí se zábranou opylení. Termín „heteromorfní inkompatibilita“ pro tyto případy navrhli Fischer a Mather ve 40. letech minulého století.

Heteromorfismus zahrnuje celou řadu znaků, jako např. velikost a tvar pylových zrn a buněk blizny, avšak nejzřetelněji se projevuje v délce čnělky (heterostylie). Známa je tzv. distylie, kdy druhy (nebo populace) se skládají z rostlin dvou typů: s květy s krátkými pestíky a dlouhými tyčinkami a květy s dlouhými pestíky a krátkými tyčinkami. Při tristylii mají květy kombinace tří délek pestíků a tyčinek.

V systému heteromorfní inkompatibility nedochází k oplození ani při samoopylení, ani při cizosprašení mezi morfologicky stejnými rostlinami. Heterostylie byla nalezena u více než 130 rodů z více než 20 čeledí, a to jak u rostlin jednoděložných, tak dvouděložných. Z toho tristylie byla zjištěna u 9 rodů, u ostatních byla distylie.

Heteromorfní inkompatibilita se velmi zřídka vyskytuje u hospodářsky významných rostlin, byla popsána u čeledí *Linaceae* (*Linum*), *Plumbaginaceae* (*Plumbago*, *Ceratostigma*, *Limonium*), *Lythraceae* (*Lythrum*), *Amaryllidaceae* (*Narcissus*), *Pontederiaceae* (*Eichhornia*) a *Primulaceae* (*Primula*).

Klasickým případem distylie je *Primula vulgaris*. *P. vulgaris* má sporofytický systém inkompatibility determinovaný 2 alelami lokusu  $S$ . Tyto alely se podílejí na kontrole různých pozic blizny a prašníků v květech. Populace tohoto druhu mají stejný počet rostlin s dlouhými čnělkami a krátkými tyčinkami (tzv. „pin“ – genotyp  $ss$ ) a rostlin s krátkými čnělkami a dlouhými tyčinkami (tzv. „thrum“ – genotyp  $Ss$ ). U rostlin pin jsou buňky blizny mnohem větší a pylová zrna menší než u rostlin thrum (obr. 5.5).



**Obr. 5.5** – Dimorfní heterostylie u *Primula vulgaris* se sporofytickým typem inkompatibility.  
(Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

Zcela kompatibilní jsou pouze kombinace ♀ pin x ♂ thrum ( $ss \times Ss$ ) a ♀ thrum x ♂ pin ( $Ss \times ss$ ). Opylení vlastním pylem je inkompatibilní.

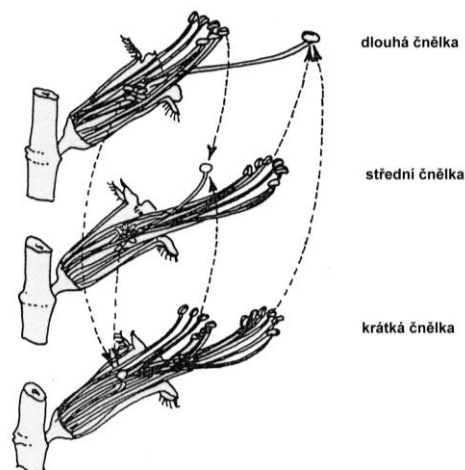
Heterostylie či heteromorfismus nemusí však být spojen s genetickými mechanizmy inkompatibility (např. u *Narcissus tazetta* z čeledě *Amaryllidaceae* nebo *Anchusa hybrida* – *Boraginaceae*). Tyto druhy jsou autoinkompatibilní, avšak nelegitimní opylení je fertillní.

Tristylie je známá ve třech čeledích krytosemenných (*Oxalidaceae*, *Lythraceae* a *Pontederiaceae*). V populacích jsou tři morfologické skupiny květů: s dlouhými, středními nebo krátkými čnělkami. Tyčinky mají obvykle dvě ze tří možných délek komplementujících v květu s délkou čnělky. Takovéto tři skupiny rostlin pozoroval už Darwin v populacích *Lythrum salicaria* (obr. 5.6).

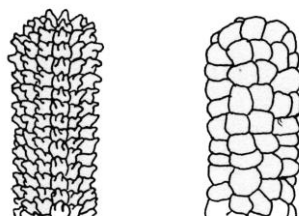
Mechanismus opylení u inkompatibility s tristylií je takový, že pyl z tyčinek určité délky je kompatibilní pouze s pestíkem stejné délky. To znamená, že pyl z tyčinek, které jsou v každém květu dvou různých délek, může oplodit oosféry v pestících květů dvou komplementárních forem. Geneticky je tento systém determinován dvěma nezávislými lokusy ( $M$  a  $S$ ), každý s dvěma alelami:

dlouhá čnělka: genotyp  $mm \ ss$   
 střední čnělka: genotypy  $Mm \ ss$  nebo  $MM \ ss$   
 krátká čnělka: genotypy  $MM \ SS$ ,  $Mn \ SS$ ,  $MM \ Ss$ ,  $Mm \ Ss$ ,  $mm \ Ss$  nebo  $mm \ SS$ .

Dominantní alela  $S$  determinuje krátkou čnělku a je epistatická k  $M$ ; recesivní alela  $s$  v homozygotním stavu spolupůsobí s  $M$  nebo  $m$  a determinuje střední či dlouhou čnělku. Kromě toho existují mezi rostlinami ještě jiné rozdíly, např. ve tvaru pylových zrn a struktuře blizen. Takovýto genetický mechanismus inkompatibility byl zjištěn u *Lythrum junceum*. U *L. salicaria* je genetická determinace složitější v důsledku autotetraploidie. Některé heteromorfnní druhy, jako např. *Armeria maritima* mají konstantní délku čnělky, ale jsou dimorfní vzhledem k morfologii pylu a blizny (obr. 5.7).



**Obr. 5.6** – Tristilie u *Lythrum salicaria* se sporofytickým typem kompatibility. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)



**Obr. 5.7** – Dimorfismus blizen u *Armeria maritima* var. *typica*. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

### 5.3.2 Homomorfní inkompatibilita

Už v roce 1912 pozoroval Correns sporofytickou kontrolu inkompatibility pylu u *Cardamine pratensis* (*Brassicaceae*), avšak teprve v 50. letech byla genetická kontrola tohoto systému podrobně prozkoumána u dvou druhů čeledě *Asteraceae*, u *Crepis foetida* a *Parthenium argentatum*. Systém homomorfní sporofytické inkompatibility je velmi důležitý u hospodářsky významných plodin především z čeledí *Asteraceae*, *Brassicaceae* a *Convolvulaceae*. Vyznačuje se těmito vlastnostmi:

1. Inkompatibilita je kontrolována jedním lokusem *S* s několika alelami, jejichž počet je obvykle menší než v jednolokusovém gametofytickém systému, i když u některých druhů (např. *Brassica oleracea*) bylo zjištěno více než 50 alel.
2. Všechny pyl rostliny vykazuje stejnou reakci (inkompatibilní nebo kompatibilní), neboť tato reakce je dána diploidním genotypem pletiva sporofytu, ve kterém pyl vznikl.
3. Dvě alely mohou působit buď nezávisle, nebo spolupůsobit tak, že jedna je dominantní nad druhou, a to jak v pylu, tak v pestíku (tab. 5.5). Recesivní alela je inaktivní.

4. Identita aktivních alel v pylu a pestíku způsobuje inkompatibilní reakci. Tab. 5.6 ukazuje různé modely kompatibility v potomstvech různých křížení.
5. Vztahy dominance a nezávislých alel se mohou různě kombinovat v pylu a v pestíku, což může vést k poměrně složitým reakcím. Např. při křížení ♀  $S_1S_3$  x ♂  $S_1S_2$  mohou nastat vztahy, jak je uvedeno v tab. 5.4. Příklady různých vztahů alel u některých rostlin jsou na obr. 5.8.

Zvláštní druh inkompability se vyskytuje u *Theobroma cacao*. Všechny pylové láčky proniknou čnělkou do zárodečného vaku, avšak při inkompatibilním křížení nedojde k oplození vajíčka. Celý systém je kontrolován nejméně pěti alelami  $S$  se složitými vztahy (obr. 5.8), není však vyloučeno i působení jiných nezávislých lokusů.

Z uvedených případů je zřejmé, že vzájemné vztahy alel při sporofytické inkompabilitě jsou poměrně složité. Naštěstí existuje již několik vypracovaných metod a postupů, které umožňují poznat tyto vztahy a využít je. Jsou to např. různé způsoby překonání bariér inkompability, dokonce i u rostlin homozygotních pro alely  $S$ , takže lze u nich uskutečnit i nucené samoopylení. Pomocí těchto rostlin můžeme identifikovat neznámé alely u geneticky neprozkoumaných rostlin. Nuceným samoopylením heterozygotních rostlin známého genotypu a následným křížením v potomstvu lze objasnit vzájemné vztahy těchto alel. Pomocí zpětného křížení s rodičovskými formami nebo křížením s rostlinou známého genotypu si pak můžeme ověřit správnost předpokládaných vztahů alel  $S$ .

Spolupůsobení alel		Kompatibilita křížení
v pylu	v pestíku	
nezávislé	nezávislé	inkompatibilní
$S_1 > S_2$	nezávislé	inkompatibilní
$S_2 > S_1$	nezávislé	kompatibilní
nezávislé	$S_1 > S_3$	inkompatibilní
nezávislé	$S_3 > S_1$	kompatibilní
$S_1 > S_2$	$S_1 > S_3$	inkompatibilní
$S_1 > S_2$	$S_3 > S_1$	kompatibilní
$S_2 > S_1$	$S_1 > S_3$	kompatibilní
$S_2 > S_1$	$S_3 > S_1$	kompatibilní

**Tab. 5.5** – Sporofytická inkompabilita. Kompatibilita křížení ♀  $S_1S_3$  x ♂  $S_1S_2$  při různém vztahu alel v pylu a v pestíku.

U druhů se sporofytickou inkompabilitou nenarušuje zdvojení počtu chromozomů inkompatibilní reakci (na rozdíl od mnoha rostlin s jednolokusovým systémem gametofytické inkompability).

Názorné srovnání sporofytického systému inkompability s gametofytickým ukazuje tab. 5.7. Pro jednoduchost je sporofytická inkompabilita demonstrována případem, kdy alely

*S* působí nezávisle jak v pylu, tak v pestíku a gametofytická inkompatibilita je kontrolována jedním lokusem *S*.

	♀	♂	Potomstvo
Křížení:	A	$S_1S_2 \times S_3S_4$	$S_1S_3, S_1S_4, S_2S_3, S_2S_4$
	B	$S_1S_3 \times S_2S_4$	$S_1S_2, S_1S_4, S_2S_3, S_3S_4$
	C	$S_1S_4 \times S_2S_3$	$S_1S_2, S_1S_3, S_2S_4, S_3S_4$
	D	$S_1S_3 \times S_2S_3$	$S_1S_2, S_1S_3, S_2S_3, S_3S_3$

Křížení uvnitř potomstev

**A**

	$S_1S_3$	$S_1S_4$	$S_2S_3$	$S_2S_4$
$S_1S_3$	0	0	F	F
$S_1S_4$	0	0	F	F
$S_2S_3$	F	F	0	0
$S_2S_4$	F	F	0	0

**B**

	$S_1S_2$	$S_1S_4$	$S_2S_3$	$S_3S_4$
$S_1S_2$	0	0	0	F
$S_1S_4$	0	0	F	F
$S_2S_3$	F	F	0	0
$S_3S_4$	F	F	F	0

**C**

	$S_1S_2$	$S_1S_3$	$S_2S_4$	$S_3S_4$
$S_1S_2$	0	0	0	F
$S_1S_3$	0	0	F	0
$S_2S_4$	F	F	0	F
$S_3S_4$	F	F	F	0

**D**

	$S_1S_2$	$S_1S_3$	$S_2S_3$	$S_3S_3$
$S_1S_2$	0	0	0	F
$S_1S_3$	0	0	F	0
$S_2S_3$	F	F	0	0
$S_3S_3$	F	F	F	0

**Tab. 5.6** – Sporofytická inkompatibilita. Kompatibilita v potomstvech čtyř různých křížení (A, B, C a D) za předpokladu dominance alel v pylu ( $S_1 > S_2 > S_3 > S_4$ ) a nezávislého působení alel v pestíku.

Gametofytický systém s jedním mnohoalelním lokusem *S*

**P**

**F<sub>1</sub>**

	S <sub>1</sub> S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub> S <sub>4</sub>	S <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub> S <sub>4</sub>
S <sub>1</sub> S <sub>3</sub>		2	2	4
S <sub>1</sub> S <sub>4</sub>	2		4	2
S <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	2	4		2
S <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	4	2	2	

 inkompatibilní kombinace

Homomorfně sporofytický systém s nezávislým působením alel *S* v pyly i v pestíku

♀ S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> x ♂ S<sub>3</sub>S<sub>4</sub>

S<sub>1</sub>S<sub>3</sub>, S<sub>1</sub>S<sub>4</sub>, S<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, S<sub>2</sub>S<sub>4</sub>

**F<sub>2</sub>:**

	S <sub>1</sub> S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub> S <sub>4</sub>	S <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub> S <sub>4</sub>
S <sub>1</sub> S <sub>3</sub>				4
S <sub>1</sub> S <sub>4</sub>			4	
S <sub>2</sub> S <sub>3</sub>		4		
S <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	4			

**Tab. 5.7** – Teoretické výsledky dialelního křížení rostlin F<sub>1</sub> získaných křížením ♀ S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> x ♂ S<sub>3</sub>S<sub>4</sub> v gametofytickém a sporofytickém systému inkompatibility (čísla udávají relativní počet zygot v každém křížení).

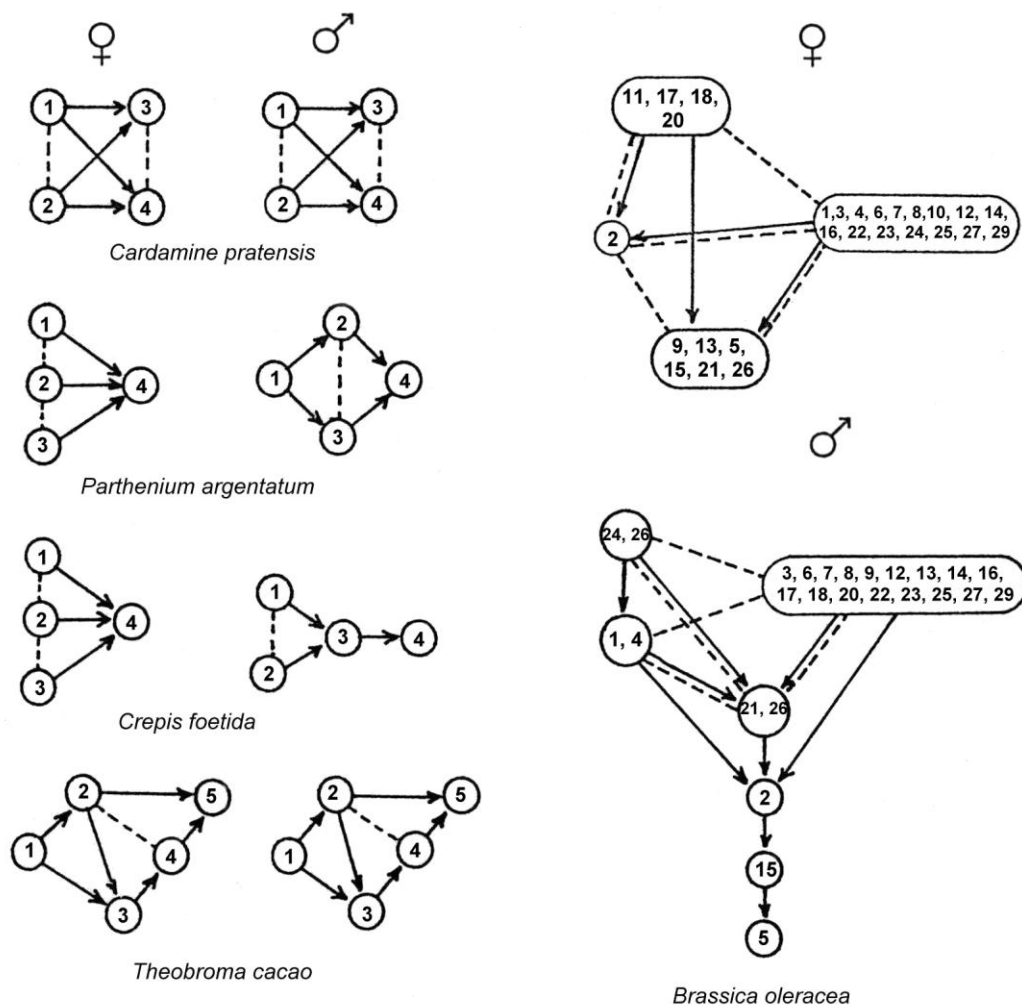
## 5.4 Molekulární analýza sporofytické inkompatibility

### 5.4.1 *Brassica oleracea*

Molekulární studium inkompatibility u *B. oleracea* bylo zahájeno identifikací proteinu syntetizovaného bliznou jeden den po vykvetení a uvolňování pyly z prašníků. Protein obsahuje glykosidické vazby a byl nazván SLG (angl. S-locus-specific-glycoprotein) - protein specifický pro lokus *S*. Skríníngem cDNA knihovny blizny se podařilo izolovat klon cDNA tohoto proteinu o délce 2 kb. Tento klon reprezentuje mRNA syntetizovanou bliznami v kritické době syntézy proteinu SLG (právě při otevírání květů). Tato mRNA není produkována listy ani pletivy semenáčků. SLG mRNA se netvoří u autokompatibilních



mutantů *B. oleracea*. Pomocí *in situ* hybridizace se podařilo dokázat, že protein SLG je přítomen v buněčných stěnách buněk blizny, v tzv. papilách.



(→ úplná dominance, ---- nezávislé působení).

**Obr. 5.8** – Vztahy mezi alelami u některých druhů se sporofytickou inkompatibilitou. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

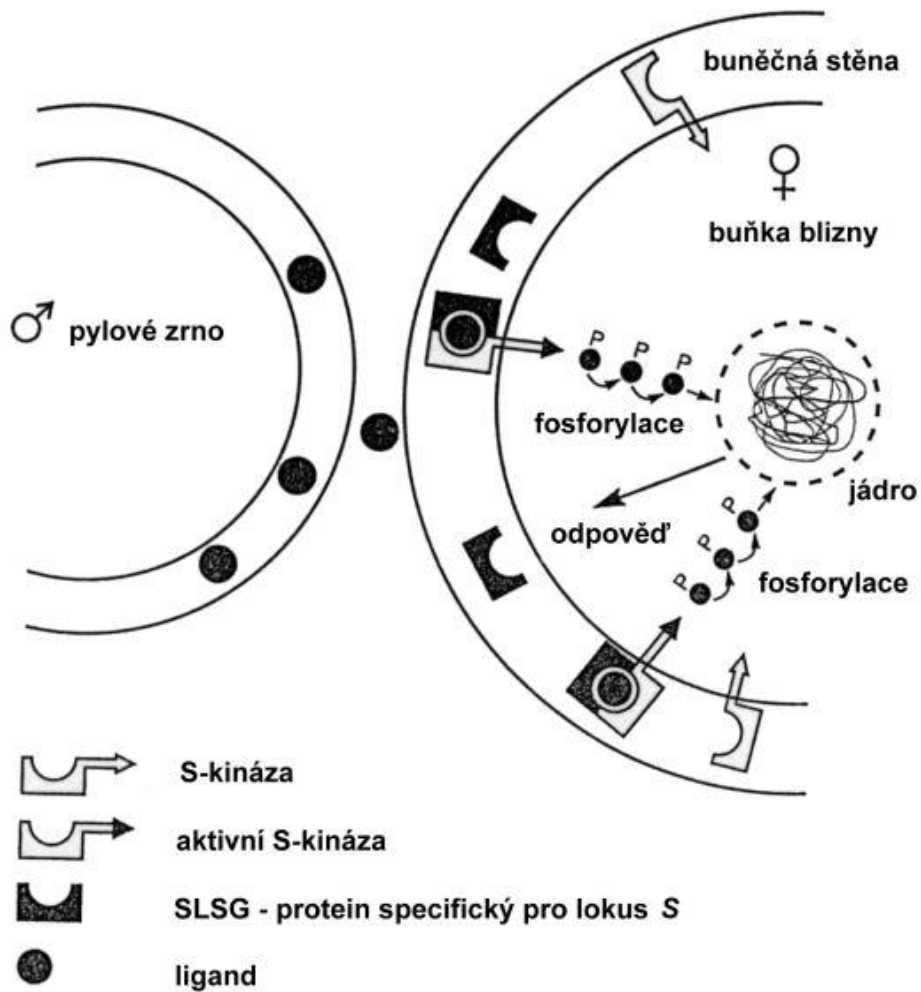
#### 5.4.2 Model interakce pylu a blizny

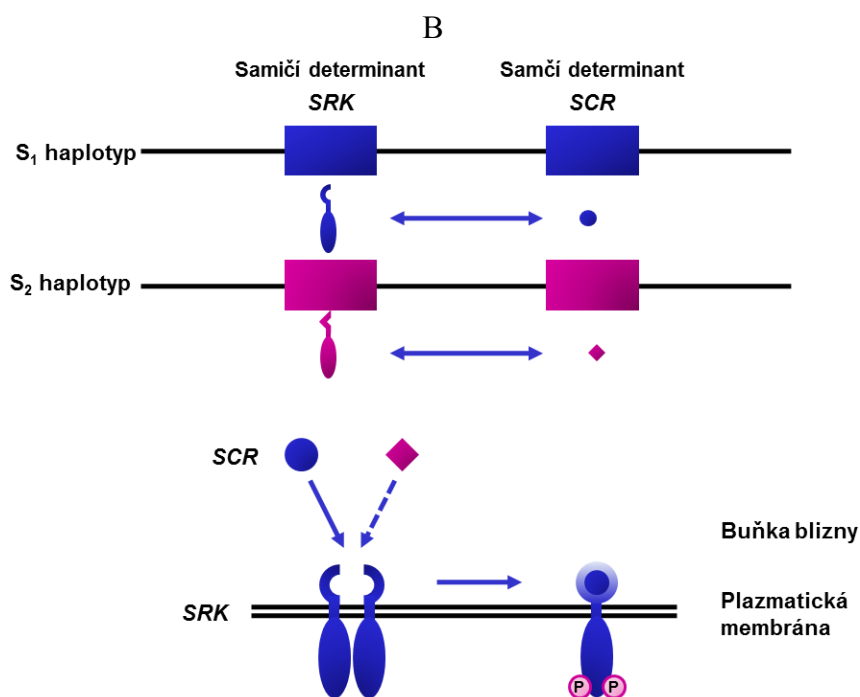
Při skrínungu genomové knihovny *B. oleracea* (genů *SLG*) byl izolován další gen, který měl do určité míry homologní sekvenci s cDNA sondou *SLG*. Protein byl nazván *SRK* (angl. S-locus receptor kinase – podle kinázové domény), je vázán s lokusem *S* a *SLG* a je také exprimován v buňkách čnělky.

V rámci lokusu *S* *B. oleracea* bylo postupně identifikováno celkem 17 genů v těsné vazbě. Dva z nich, *SLG* (*S*-locus-specific glycoprotein) a *SRK* (*S*-locus receptor kinase) jsou považovány za geny, které se podílejí na schopnosti blizny rozeznat příbuzný a nepříbuzný

pyl (**samičí determinanty**). Oba geny jsou vysoce polymorfní a jejich exprese byla zjištěna pouze na povrchu zralých blizen. I v prašnicích byla zjištěna nízká úroveň mRNA těchto genů, vlastní proteiny se zde nepodařilo detekovat. Třetí gen lokusu *S* spojený s inkompatibilní reakcí je gen *SCR* (*S-locus cystein protein*), jehož exprese probíhá naopak pouze v prašnicích. Produktem je protein, který je považován za **samčí determinant** inkompatibility.

A





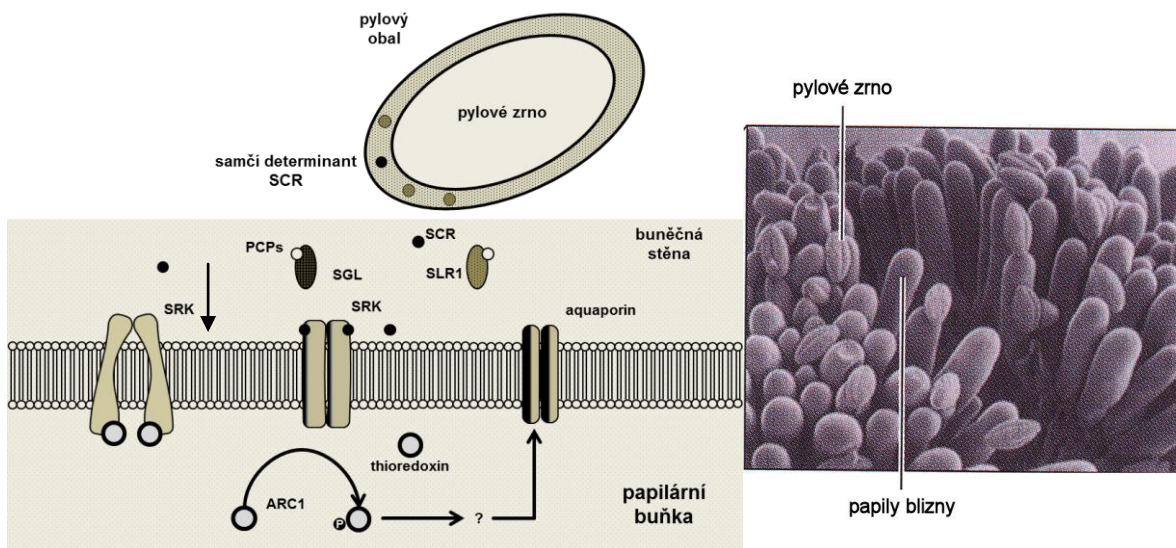
**Obr. 5.9** – Model objasňující interakci proteinů SLG a S kinázy při inkompatibilní reakci u *Brassica oleracea* (A). B) Proteiny SRK (S kináza) a SCR jako samičí a samčí determinanty. (Zdroje: Hughes, 1996; Iwano a Takayama, 2012)

Gen *SLG* má velikost 1,3 kb a kóduje glykoprotein o molekulové hmotnosti 55 kDa, který je vylučován do buněčné stěny papilárních buněk (buňky na povrchu blizny; obr. 5.9A). Přestože je aminokyselinová sekvence genů *SLG* velmi polymorfní, vždy má v podobné pozici 12 cysteinů. To svědčí o jejich významu při formování terciární struktury patrně nutné pro normální funkci glykoproteinu. Na každém aminokyselinovém řetězci je několik potenciálních N-glykosylačních míst, z toho dvě místa jsou konzervativní.

Klíčovou roli v rozpoznání pylu hraje protein SRK, což je samičí determinant. SLG se také účastní rozpoznávacího procesu. Gen *SRK* kóduje membránový protein (obr. 5.9B, 10), který je pravděpodobně proteinkináza serin-threoninového typu, a skládá se ze tří domén: 1. **extracelulární doména** (S-doména) má v rámci jednoho haplotypu značnou podobnost s *SLG* (min. 90%). Část genu *SRK* kódující S-doménu obsahuje 12 konzervativních cysteinů, stejně jako je tomu u ostatních genů z tzv. S-genové rodiny. S-doména je spojena přes 2. **doménu transmembránovou** s 3. **cytoplazmatickou doménou**, která je sekvencně blízká protein kinázám. Kinázová aktivita SRK byla prokázána expresí cytoplazmatické domény v *E. coli*. SRK je příbuzná s rostlinnými kinázami, které se podílejí např. na obranných mechanismech proti patogenům či regulaci vývoje meristému. Obranný systém i mechanismus inkompatibility jsou založeny na rozpoznávací reakci. Inkompatibilita má možná původ právě v mechanismu obrany proti patogenům.

U čeledě *Brassicaceae* je skupina genů strukturně příbuzných s *SLG* a *SRK*, komplexní multigenová rodina exprimující se jak v generativních tak ve vegetativních pletivech.

Předpokládá se, že i tato skupina genů je zapojena v různých mechanismech rozpoznávání pylu a buněk čnělky. Geny jsou sekvenčně příbuzné s *SLG*, ale nejsou geneticky vázané na lokus *S* (jsou lokalizovány na jiném chromozomu). Jsou označovány jako geny *SLR* (*S*-locus related). Byly analyzovány geny *SLR1*, *SLR2* a *SLR3*. *SLR1* je exprimován v blizně a produktem je glykoprotein sekretovaný podobně jako *SLG* do buněčné stěny papilárních buněk (obr. 5.10). Není ovšem tak vysoce polymorfní. *SLR2* je ve vazbě s *SLR1*, je exprimován v blizně a sekvenčně podobný genům *SLG* izolovaným z pylově recesivních haplotypů. Exprese *SLR3* byla zjištěna i ve vegetativních orgánech. Geny a jejich produkty jsou zapojeny do mechanismu tvorby adhezivní vrstvy na blizně, která umožňuje kontakt pylu a papilárních buněk blizny.



**Obr. 5.10** – Model objasňující interakci samčích (pyl) a samičích determinantů (papila blizny) při inkompatibilní reakci u *Brassica oleracea*. (Zdroj: Sáková a kol., 2002)

Pylovým proteinem je malý protein patřící do rodiny proteinů povrchu pylových zrn (PCP – pollen coat protein), které jsou součástí tzv. tryfinu. Je to materiál bohatý na proteiny a lipidy, který je součástí vnější buněčné stěny pylového zrna. Předpokládá se, že PCP má významnou úlohu v procesu pylové adheze. Dlouho se však nedařilo najít hlavní samčí determinant. Nedávno se podařilo identifikovat gen *SCR* a prokázat, že kóduje pylový samčí determinant (obr. 5.10). Proteiny *SCR* tvoří novou třídu proteinů PCP. Tak jako ostatní PCP jsou malé, bohaté na cystein, struktura jejich aminokyselinového řetězce se ovšem liší od známých zástupců rodiny PCP. Gen *SCR* je v těsné vazbě s geny *SLG/SRK* a vykazuje specifickou a vývojově regulovanou expresi v buňkách tapeta. Protein *SCR* funguje jako ligand (samčí determinant) a pokud je na blizně rozeznán komplexem *SLG-SRK*, následuje odmítnutí prorůstání pylu. *SRK* a *SLG* tvoří receptorový komplex analogický s mezibuněčnými signálními mechanismy savců. V případě opylení inkompatibilním pylem je samčí determinant *SCR* navázán na receptor *SRK*, což vede k jeho aktivaci a spuštění signální kaskády, která vede k degradaci proteinů buněk blizny nezbytných pro růst pylové láčky a v konečném důsledku znamená inhibici klíčení pylu.

Pro výzkum inkompatibility u rodu *Brassica* jsou také významné poznatky získané studiem hydratace pylu. Pro start růstu pylové láčky je nutné, aby na blizně došlo k úplné rehydrataci pylových zrn. Protože se jedná o druhy se suchou bliznou, zdrojem vody jsou papilární buňky. Při hydrataci proniká voda z papilárních buněk přes obalovou vrstvu do pylu. Krátce po dopadu pylového zrna na bliznu (10 min) se vytvoří adhezní vrstva (obr. 5.10). Je tvořená převážně tryfinem a zajišťuje spojení mezi pylem a bliznou. V tryfinu byly nalezeny proteiny ze skupiny oleosinů, které zřejmě umožňují transport vody do pylu. Průběh hydratace pylu se dělí na tři fáze a klíčová je druhá fáze, která trvá asi 10 min., a při níž probíhá rychlý transport vody do pylového zrna, a to až do dosažení plného turgoru. Jestliže je pyl inkompatibilního haplotypu, je hydratace ve své druhé fázi zastavena, tedy před tím, než je dosaženo turgoru pylového zrna. Hydratace pylu je zřejmě prvním z kontrolních mechanismů, kdy se rozhoduje o úspěchu nebo neúspěchu opylení.

Po dopadu pylového zrna na bliznu se musí proteiny SCR a PCP přesunout do buněčné stěny papilární buňky. Tato difúze probíhá krátce po opylení (časné stadium). Proteiny PCP se v buněčné stěně dostávají do kontaktu s proteiny SLG a SLR1, které jsou zde volně ve velkém množství. Protože SLG váže PCP, mohly by usnadňovat transport hlavního samčího ligandu SCR na plazmatickou membránu. SCR se pravděpodobně váže k aminokyselinovým zbytkům uvnitř extracelulární S-domény SRK. Model předpokládá, že po navázání ligandu dojde k dimerizaci SRK a autofosforylaci, a tím je vyvolána inkompatibilní odpověď. Autofosforylace SRK je normálně blokována thioredoxinem a jeho oddělení proběhne až po navázání pylového ligandu.

## ***5.5 Využití inkompatibility ve šlechtění***

První práce o inkompatibilitě byly zaměřeny především na její evoluční význam. S tím, jak se později objevily různé problémy při pěstování rostlin s inkompatibilitou, pokročil i výzkum mechanismu působení v některých systémech. Teprve poměrně nedávno se začaly poznatky využívat ve šlechtění rostlin.

Jedním z prvních problémů, které byly zdárně vyřešeny na základě znalostí inkompatibility, bylo zavedení autokompatibilních druhů u *Prunus domestica* místo autoinkompatibilních, které vyžadovaly pěstování více stromů v těsné blízkosti, jejich současné kvetení a příhodné podmínky pro hmyzí opylovače, aby byla zabezpečena dobrá sklizeň. V současné době se ve šlechtění druhů s inkompatibilními systémy můžeme setkat s potřebou zavedení inkompatibility do určitého kultivaru či druhu, nebo naopak se snahou o její trvalé či dočasné odstranění. Šlechtitele také zajímají způsoby využití inkompatibility při získávání hybridních semen, nebo získávání kultivarů okrasných rostlin, které v důsledku ztráty tvorby semen mají delší periodu kvetení.

Je samozřejmé, že před tím, než budeme chtít změnit inkompatibilní reakci nebo ji využít, je nutné znát její genetickou podstatu u daného druhu či kultivaru. Již bylo uvedeno dříve, že studium dědičnosti inkompatibility a identifikace genotypů v jednotlivých liniích, je možné

pomocí křížení. Kromě toho existují další doplňující způsoby, např. sérologická charakteristika pylu a pestíku, stanovení jejich izoenzymových spekter, využití speciálních signálních genů vázaných se specifickými geny *S*, opylení izolovaných pestíků *in vitro* apod.

### **5.5.1 Zavedení inkompatibility do odrůdy**

Pro šlechtitelské účely je někdy potřeba zavést inkompatibilitu do odrůdy, linie nebo specifického klonu, nebo posílit již existující inkompatibilitu. Odrůdy, kterým chybí inkompatibilita, mohou patřit k druhům, jejichž jiné odrůdy mají velmi silnou inkompatibilní reakci (např. *Brassica oleracea*, *Chrysanthemum morifolium*). Jindy se inkompatibilita vyskytuje u planě rostoucích příbuzných druhů. V těchto případech se může přenos inkompatibilních alel uskutečnit vnitrodruhovým nebo mezidruhovým křížením. Takovýto přenos byl úspěšný např. u *Lactuca* a *Phaseolus*.

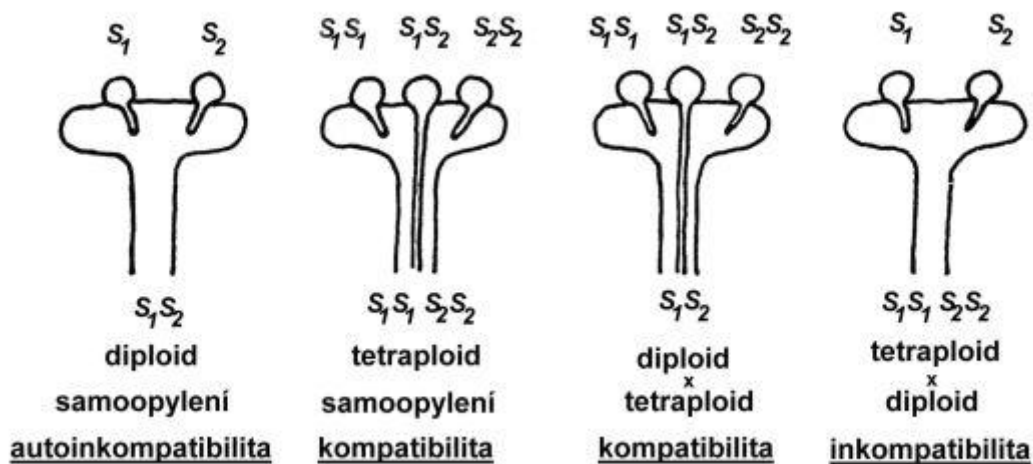
### **5.5.2 Odstranění inkompatibility**

Existují tři způsoby trvalého odstranění inkompatibility:

1. zdvojení počtu chromozomů,
2. indukce mutací,
3. přenos kompatibility do inkompatibilní linie.

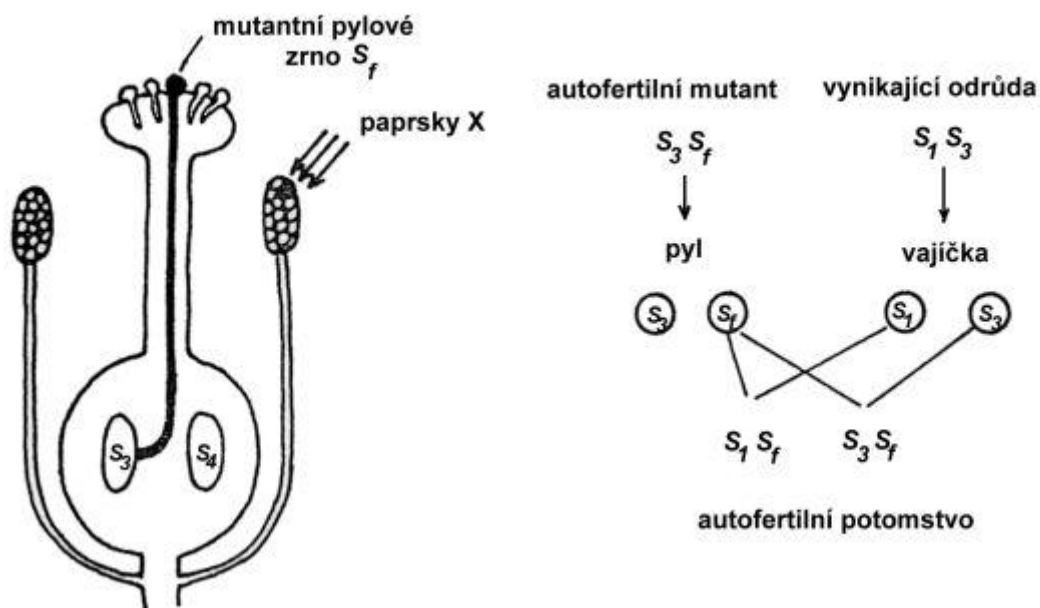
Zdvojení počtu chromozomů (např. použitím kolchicinu) u diploidních druhů je účinné při odstranění inkompatibility pouze v gametofytických systémech. Poněvadž pylové láčky tetraploidních rostlin obsahují dvě alely *S*, vzniká možnost interakce alel v heterogenních pylových láčkách (obr. 5.11). Z obrázku je zřejmé, že indukci tetraploidie autoinkompatibilního druhu lze navodit autokompatibilitu. Tak tomu bylo např. v rodech *Trifolium*, *Nicotiana*, *Prunus* a *Petunia*.

Při indukci mutací ozářením paprsky X způsobily mutace v některých případech ztrátu inkompatibility jak u pylu, tak u pestíku (*Trifolium repens*), v jiných případech pouze u pylu (*Oenothera*, *Petunia*, *Prunus*). Většinou se ozařují poupata ve stadiu pylových mateřských buněk. Postup, kterým byla získána autokompatibilní reakce u třešně a její přenesení do kultivaru s vynikajícími vlastnostmi uvádí obr. 5.12.



**Obr. 5.11** – Kompatibilita u diploidních a tetraploidních rostlin. Diploidní pyl  $S_1S_2$  je kompatibilní ve čnělkách  $S_1S_2$  resp.  $S_1S_1S_2S_2$ , neboť v důsledku interace alel v pylu došlo k odstranění inkompatibilní reakce. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

Obr. 5.12 zároveň ukazuje, jak pomocí křížení mohou být kompatibilní alely přeneseny do inkompatibilních linií. Jestliže šlechtitel potřebuje k získání čistých linií odstranit inkompatibilitu z odrůdy, bude mít ovšem i zájem uchovat si inkompatibilitu v takovémto šlechtitelském materiálu. Mít obě tyto vlastnosti v jedné linii je pro šlechtitele výhodné např. při masovém získávání hybridních semen  $F_1$  (linie s autoinkompatibilitou). Přenos kompatibility do inkompatibilních odrůd byl popsán např. u *Chrysanthemum morifolium*.



**Obr. 5.12** – Postup získání autokompatibilních ( $S_3S_f$ ) rostlin pomocí indukce mutací a přenesení této mutace do jiného kultivaru s vynikajícími vlastnostmi ( $S_1S_3$ ) u *Prunus domestica*. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

### 5.5.3 Pseudokompatibilita

Pseudokompatibilita (pseudofertilita) se vyskytuje při nelegitimním oplození následujícím po samoopylení nebo po křížení mezi rostlinami v jinak inkompatibilních kombinacích. Objevuje se za speciálních podmínek v přírodě spontánně, nebo ji lze navodit záměrně některou z uvedených metod:

1. Ozáření pylu – ozářením pylových mateřských buněk v poupatech lze docílit toho, že pyl je při samoopylení funkční. Tato metoda byla s úspěchem použita u některých druhů *Solanaceae*, kde v potomstvu vznikali buď homozygoti, nebo heterozygoti pro alely  $S$ , u nichž se obnovila původní inkompatibilní reakce.
2. Opylení v poupatech – nanesení zralého pylu na blizny v poupatech několik dnů před kvetením je nejrozšířenější metodou vedoucí k pseudokompatibilitě. Tato metoda je vhodná pro druhy s gametofytickou, tak i sporofytickou inkompatibilitou. Podrobně byla rozpracována v rodech *Brassica* a *Raphanus*. U některých druhů bylo opylení v poupatech efektivnější, jestliže na nezralou bliznu byl nanesen výměšek z povrchu zralých blizen.
3. Opylení na konci vegetace – u některých druhů se na konci vegetačního období nebo v podmínkách pozdního podzimu značně zeslabuje inkompatibilita. Např. u tabáku může být rostlina autoinkompatibilní po celou růstovou sezonu s výjimkou několika málo posledních dnů, kdy dochází k samooplození. Spolehlivost této metody je však sporná. Dokonce u téhož druhu (*B. oleracea*) byly získány protichůdné výsledky.
4. Působení vyšších teplot – u několika druhů (např. *Oenothera*, *Trifolium*, *Lycopersicon*) došlo po působení vyšších teplot (do 60 °C) na pestíky k překonání inkompatibilní reakce.
5. Chirurgické metody – tyto metody jsou založeny na umístění pylu na řeznou plochu čnělky po odstranění blizny (např. u *Brassica*) nebo na zavedení pylu přímo do semeníku (*Petunia*). U petúnie bylo také úspěšné oplození *in vitro* nanesením pylu na placentu.
6. Opakované opylení – v některých případech je možné dosáhnout oplození tak, že za několik hodin po kompatibilním opylení nanese se na bliznu inkompatibilní pyl nebo použijeme pro opylení přímo směs pylu.



## 6. Determinace pohlaví u krytosemenných rostlin

Pohlavní rozmnožování je nejrozšířenějším způsobem rozmnožování vyšších rostlin. Květ s rozmnožovacími orgány má téměř neomezenou rozmanitost morfologických a fyziologických znaků, jejichž kombinace představuje různá přizpůsobení květů především k efektivnějšímu opylení a regulaci stupně cizosprášení. Jedním z takových přizpůsobení je i různé rozmístění pohlavních orgánů v květech, na rostlinách a ve skupinách rostlin. Při klasifikaci je třeba rozlišovat typy pohlaví v samostatných květech, na celých rostlinách a v rámci skupiny rostlin (obr. 6.1).

### 6.1 Typy pohlaví jednotlivých květů

1. **Oboupohlavný** (obojaký, hermafroditní, hermaphroditus) - květ, který má jak tyčinky, tak i jeden nebo několik plodolistů
2. **Tyčinkový** (samčí, masculum) – květ, který má pouze tyčinky a nemá plodolisty
3. **Pestíkový** (samičí, feminus) – květ, který má pouze plodolisty a nemá tyčinky

### 6.2 Typy pohlaví jednotlivých rostlin

1. **Oboupohlavná** (obojaká, hermafroditní, hermaphroditus) – rostlina, která má pouze oboupohlavné květy
2. **Jednodomá** (monoecická, monoická, monoecious) – rostlina, která má jak tyčinkové, tak pestíkové květy
3. **Samčí** (androecická, androecious) – rostlina, která má pouze tyčinkové květy
4. **Samičí** (gynoecická, gynoecious) – rostlina, která má pouze pestíkové květy
5. **Andromonoecická** (andromonoecious) – rostlina, která má jak oboupohlavné, tak tyčinkové květy (*Veratrum album*, *Astrantia major*)
6. **Gynomonoecická** (gynomonoecious) – rostlina, která má jak oboupohlavné, tak pestíkové květy (*Paraetaria officinalis*)
7. **Trimonoecická** (trimonoecious) – rostlina, která má tři typy květů: oboupohlavné, tyčinkové a pestíkové (*Saponaria ocimoides*)
8. **Agamonoecická** (agamonoecious) – rostlina, která má vedle oboupohlavných květů ještě květy bezpohlavné se zakrnělými nebo abortovanými tyčinkami a semeníky (*Viburnum opulus*)

### 6.3 Typy pohlaví skupiny rostlin (populace, druhu, odrůdy)

1. **Oboupohlavná** (obojaká, hermafroditní, hermaphroditus) – skupina, která má pouze oboupohlavné rostliny
2. **Jednodomá** (monoecická, monoická, monoecious) – skupina, která má pouze jednodomé rostliny (*Zea mays*, *Juglans regia*, *Corylus avellana*)
3. **Dvoudomá** (dioecická, dioická, dioecious) – skupina, která má samčí a samičí rostliny, (*Bryonia dioica*, *Melandrium album*, *Silene alba*, *Humulus lupulus*)
4. **Androdioecická** (sub-androecická, androdioecious) – skupina, která má rostliny oboupohlavné a samčí (*Dryas octopetala*)
5. **Gynodioecická** (sub-gynoecická, gynodioecious) – skupina, která má rostliny oboupohlavné a samičí (*Origanum vulgare*, *Cirsium oleracea*, *Thymus serpyllum*)
6. **Triecická** – skupina, která má rostliny oboupohlavné, samčí i samičí (*Fraxinus excelsior*, *Asparagus officinalis*)

Přehled uvedených typů a používané symboly uvádí obr. 6.1.

Výčet typů v uvedeném přehledu není vyčerpávající a existují ještě další možnosti či varianty, které by vyžadovaly zvláštní popis. Jako příklad lze uvést tři varianty jednodomé rostliny:

1. tyčinkové a pestíkové květy jsou rozmístěny po celé rostlině (např. četné odrůdy okurek),
2. tyčinkové a pestíkové květy se shlukují v samčí a samičí květenství (např. kukuřice) a
3. v určitém stadiu růstu má rostlina květy pouze jednoho typu, jako např. u *Arisaema japonica* se zpočátku objevují pouze tyčinkové květy, později pouze pestíkové, takže se při zběžném pohledu jeví rostliny jako dvoudomé.

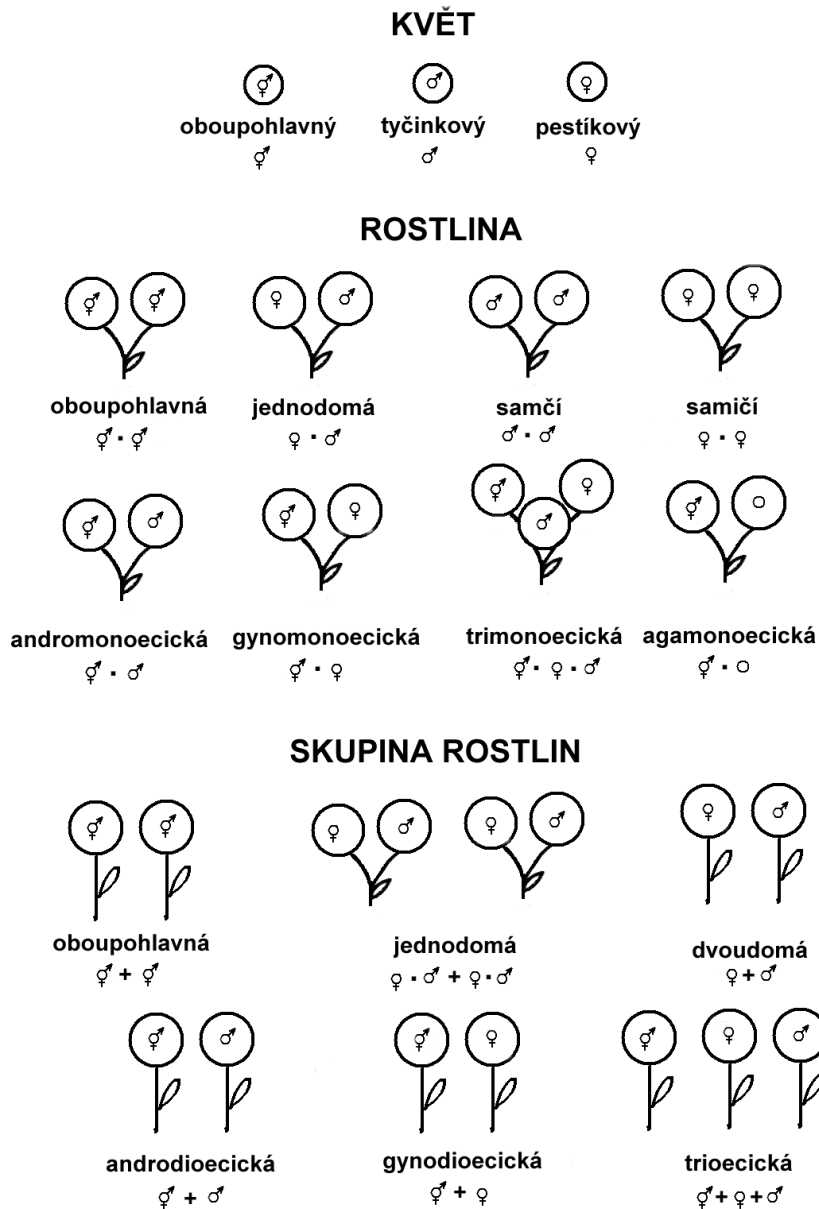
Podstatné je přesné vymezení pohlaví květů, rostlin a skupiny rostlin (např. musíme mluvit o tyčinkovém květu, samčí rostlině a dvoudomé populaci).

Převážná většina rostlin jsou rostliny oboupohlavné. Uvádí se, že mezi přibližně 120 tisíci druhy krytosemenných rostlin je 86 % druhů s rostlinami, které mají pohlavní orgány obou typů, 4 % druhů s rostlinami odděleného pohlaví a 10 % druhů ostatních. Je vidět, že jednopohlavných forem není v rostlinné říši mnoho. Toto rozdělení je významné z evolučního hlediska, neboť oboupohlavnost spolu s mechanismy izolace různého typu dává více možností ve smyslu adaptace k měnícím se podmínkám prostředí než jednopohlavnost.

U kulturních rostlin se **pohlavní dimorfismus** vyskytuje pouze u několika málo druhů; u mnoha dvoudomých kultur se objevují pravidelně nebo občas oboupohlavné nebo jednodomé rostliny v četnosti závislé na genetických faktorech či vnějších podmínkách. Dvoudomost se u rostlin hospodářsky významných vyskytuje hlavně u víceletých plodin. Jsou to např. *Cannabis sativa*, *Simonsia californica*, *Humulus lupulus*, *Piper nigrum*, *Dioscorea* sp., *Spinacia oleracea*, *Asparagus officinalis*, *Poa arachnifera*, *Atriplex* sp., *Ilex aquifolium*, *Acer negundo*, *Fraxinus* sp., *Pistacia vera*, *Carica papaya*, *Vitis rotundifolia*, *Morus alba*, *M. nigra*, *Ficus carica* a *Phoenix dactylifera*. U těchto rostlin dochází více nebo méně často

k **obligátnímu cizosprašení** v závislosti na výskytu oboupohlavných nebo jednodomých rostlin v populacích a na stupni jejich inkompatibility.

U oboupohlavných rostlin můžeme pozorovat velkou rozmanitost ve způsobu rozmnožování. Takovéto rozdíly jsou podmíněny jak genotypovou variabilitou uvnitř druhů, tak vnějšími podmínkami, kterým je tato potenciálně cizosprašná populace vystavena. Podle způsobu rozmnožování se rostliny rozdělují na **samosprašné (autogamní)** a **cizosprašné (alogamní)**.



**Obr. 6.1** – Schematické znázornění a názvy jednotlivých typů pohlaví u květů, rostlin a skupin rostlin. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

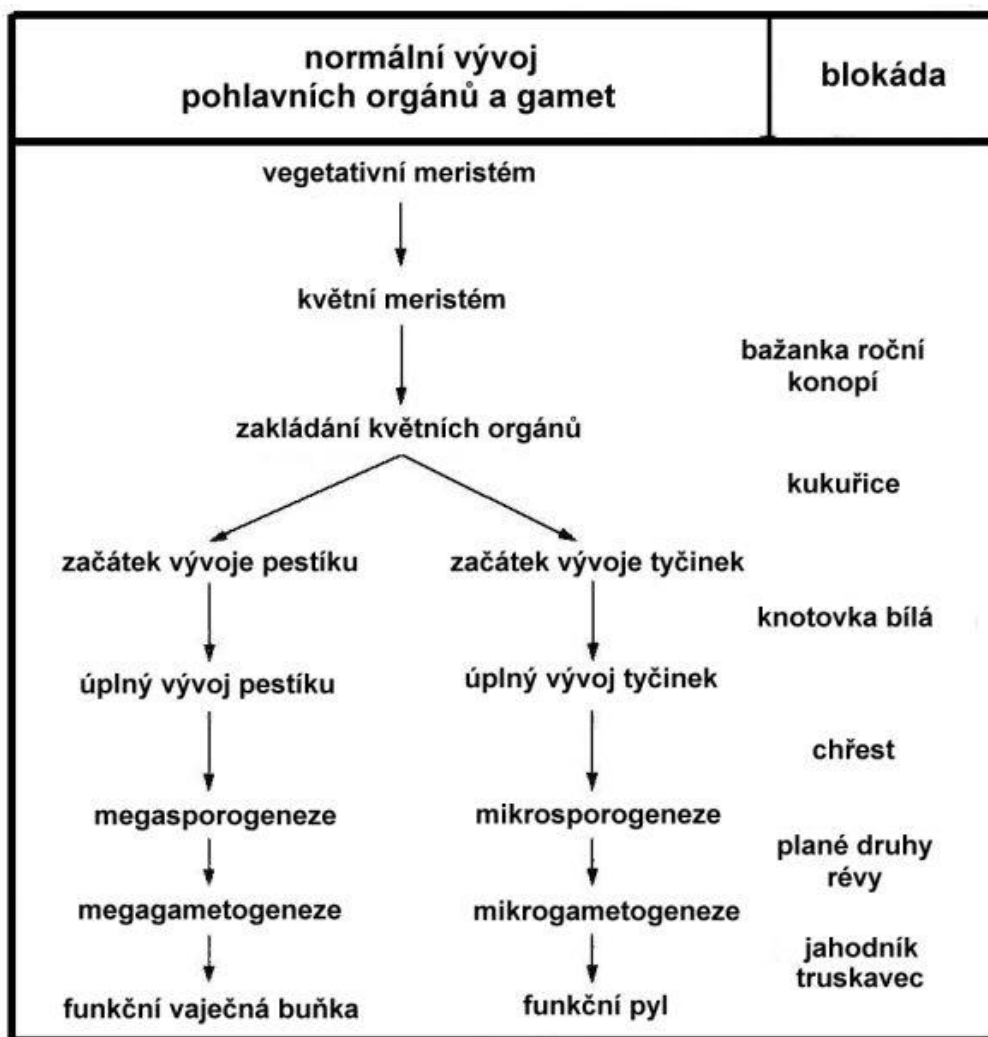
Samosprašné jsou takové rostliny, u kterých dochází nejen k opylení, ale i oplození vlastním pylem a podobně u cizosprašných rostlin předpokládáme nejen opylení, ale i oplození cizím pylem. Proto je výstižnější hovořit o rostlinách se samooplozením a náhodným oplozením.

#### **6.4. Determinace pohlaví**

Genetické založení pohlaví u rostlin bylo experimentálně prokázáno brzy po znovuobjevení Mendelových principů dědičnosti. Jedním z těch, kteří se o to zasloužili, byl Carl Correns, který svoje závěry založil na výsledcích tří základních pokusů s křížením rostlin rodu *Bryonia*. V prvním případě křížil samičí rostliny *B. dioica* s jednodomými rostlinami *B. alba* a dostal 11 rostlin, které byly buď zcela samičí nebo samičí s několika brzy odumírajícími nebo nefunkčními tyčinkovými květy. Ve druhém pokusu křížil Correns samičí rostliny *B. dioica* se samčími rostlinami téhož druhu a získal 41 kvetoucích rostlin (21 samčích a 20 samičích). Ve třetím pokusu křížil rostliny *B. alba* se samičími květenstvími se samčími rostlinami *B. dioica* a získal 76 kvetoucích rostlin, polovinu samčích a polovinu samičích. Correns ještě tehdy neznal význam vnějších podmínek na projev znaku, proto některé výsledky nemohl spolehlivě vysvětlit. Jasně však poukázal na vztah mezi pohlavím a genotypem rostliny.

Objev pohlavních chromozomů u rostlin se datuje do roku 1923, kdy Blackburn, Kihara a Ono a nezávisle na nich Winge objevili heteromorfní bivalenty u *Silene latifolia* (*Melandrium album*), *Rumex acetosa* a *Humulus* sp. Poté byly pohlavní chromozomy objeveny u mnoha dalších dvoudomých rostlin. Přitom se však ukázalo, že ne všechny dvoudomé rostliny musí obsahovat tento heteromorfní bivalent.

Determinace pohlaví u krytosemenných rostlin je proces, který zajišťuje potlačení vývoje samčích nebo samičích orgánů v jednotlivých květech. V případě dvoudomých druhů dochází takto ke vzniku jedinců nesoucích pouze samčí nebo samičí květy. K potlačení vývoje orgánů opačného pohlaví dochází v různých fázích vývoje květu (obr. 6.2). Tento proces je ovlivněn geneticky; u některých druhů však může být ovlivněn také různými faktory vnějšího prostředí, jako je např. intenzita světla, délka dne, teplota a minerální výživa. Exogenní aplikace rostlinných hormonů také vede v některých případech k ovlivnění pohlaví květů. Žádná z těchto látek nemá shodný účinek u všech druhů s jednopohlavními květy.



**Obr. 6.2** – Jednotlivé fáze potlačení vývoje orgánů určitého pohlaví u dvoudomých rostlin.  
(Zdroj: Janoušek, 1996)

Roku 1956 Hartmann formuloval tzv. „zákon potenciální oboupohlavnosti“, podle kterého nesou obě pohlaví veškerou genetickou informaci potřebnou k vytvoření pohlavních orgánů opačného pohlaví. Tento zákon odráží situaci u evolučně málo pokročilých typů determinace pohlaví, které jsou založeny na působení jednoho nebo několika genů řídicích pohlaví. U druhů s pohlavními chromozomy se však setkáváme s tendencí k akumulaci genů, které jsou výhodné pouze pro heterogametické pohlaví, na chromozomu Y. Může proto docházet k výjimkám z tohoto zákona, neboť u homogametického pohlaví nemusí být potom přítomny všechny geny potřebné pro vznik orgánů opačného pohlaví. U pohlaví heterogametického však platí tento zákon bez výjimek.

Obecná teorie genetické determinace pohlaví vychází z předpokladu, že geny zapojené do exprese pohlaví je možné rozdělit do dvou skupin. Početná je první skupina genů, které jsou přímo zapojeny do morfogeneze pestíků nebo tyčinek (angl. sex differentiation genes).

Druhou skupinu tvoří geny, které řídí expresi genů první skupiny (angl. sex determination genes).

#### **6.4.1 Determinace pohlaví u jednodomých druhů**

Jedním z možných modelů pro výzkum determinace pohlaví u rostlin je kukuřice, která je nejprozkoumanějším jednodomým druhem, ale podařilo se u ní získat i jednopohlavné linie. U kukuřice standardního fenotypu jsou samčí květy soustředěny v terminální latě (angl. tassel) a květy samičí se zase vyskytují pouze v postranních palicích (angl. ear), jejichž pestíky se vyznačují dlouhými bliznami (angl. silk). U kukuřice byl proveden pokus o vytvoření umělého systému dvoudomosti založeného na působení recesivních mutantních alel *silkless1* (*sk1*) a *tasselseed2* (*ts2*). Přítomnost alely *sk1* v homozygotním stavu vede k potlačení vývoje pestíků samičích květů v postranních klasech a vzniká rostlina samčího fenotypu. Pokud je rostlina homozygotní pro alelu *ts2*, dochází u ní k přeměně všech samčích květů v latě v samičí, a proto opět vzniká jednopohlavná rostlina. K vytvoření stabilní dvoudomé populace mělo vést křížení rostlin genotypu *sk1 sk1 ts2 ts2* (předpokládaný samičí fenotyp) se samčími rostlinami genotypu *sk1 sk1 Ts2 ts2*, jež by dalo vznik samčím a samičím rostlinám v poměru 1 : 1. Lokusy *silkless1* a *tasselseed2* však spolu interagují, a proto se rostliny genotypu *sk1 sk1 ts2 ts2* vyznačovaly zcela neočekávaným fenotypem; v postranních palicích se u všech květů vyskytovaly pestíky a v koncovém květenství se kromě očekávaných samičích květů vyskytovaly také květy samčí a hermafroditní.

V současné době je již známo několik lokusů důležitých pro orgánově specifickou aborci, která je nezbytná pro vývoj jednopohlavných květů u kukuřice. Dva lokusy zapojené do suprese tvorby pestíků v terminálním květenství byly identifikovány pomocí recesivních mutací *tasselseed* (*ts1* a *ts2*) a jeden lokus pomocí dominantní mutace *Tasselseed5* (*Ts5*). U mutantů dochází k feminizaci tyčinkových květů a květy jsou oboupohlavné. Gen *TS2* byl izolován prostřednictvím inzerční mutagenese; kóduje alkoholdehydrogenázu, která se podílí na buněčné smrti primordií pestíku. Genů, které se podílejí na řízení procesu aborce tyčinek je známo celkem sedm. Šest z nich jsou recesivní mutace: *dwarf* (*d1*, *d2*, *d3*, *d5*), *anther ear* (*an1*) a *silkless* (*sk1*). Jedna mutace je dominantní povahy – *Dwarf8* (*D8*). Gen *D8* je negativní regulátor kyseliny giberelové a u mutantů dochází k obnovení signálu, což má vliv na přerušení aborce tyčinek. V dalším výzkumu se ukázaly být velmi cenné rostliny recesivně homozygotní v lokusech *dwarf* (*d1*, *d2*, *d3*, *d5*), protože bylo zjištěno, že narušení funkce kteréhokoli z těchto lokusů vede k výraznému snížení obsahu giberelinů a maskulinizaci pestíkových květů, kdy je přerušena aborce tyčinek. Standardní alely genů se tedy podílejí na biosyntéze giberelinů a potlačení tvorby tyčinek.

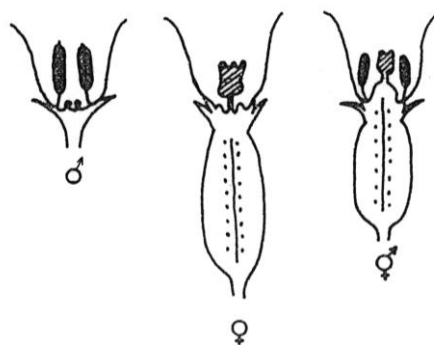
Ve studiu genetické determinace pohlaví se využívá několik modelových druhů, které zastupují různé typy determinace pohlaví. K perspektivním modelovým objektům patří kukuřice setá (*Zea mays*), bažanka roční (*Mercurialis annua*) a knotovka bílá (*Silene latifolia*).

Na základě studia vzájemných interakcí různých lokusů byl navržen model, podle kterého jsou v procesu determinace pohlaví u kukuřice rozhodující interakce mezi lokusy *TASSELSEED2*, *SILKLESS1* a hladinou giberelinů. Podle tohoto modelu standardní alela lokusu *Sk1* blokuje působení produktu genu *TASSELSEED2*, a to vede k tvorbě pestíků v květech postranních klásků. V koncovém květenství je zase naopak působení genu *SILKLESS1* blokováno genem *TASSELSEED2*, a proto zde dochází k aborci pestíků. Aborce tyčinek v samičím klasu u homozygotů *TS2 TS2 SK1 SK1* je důsledek antagonistického působení pestíků na tyčinky prostřednictvím feminizujícího faktoru, jakým jsou gibereliny.

Typické zástupce jednodomých rostlin najdeme v čeledi *Cucurbitaceae*. Jeden z nejdůležitějších hospodářských druhů této čeledě je *Cucumis sativus* (dýně okurka). Snad u žádné jiné kultury nebyl prozkoumán projev pohlaví tak detailně, jako právě u okurky. Kromě toho je tento objekt modelovým systémem ke zkoumání morfogeneze vyšších rostlin. Proto také genetická kontrola jednodomosti může být vyložena na příkladu okurky.

Rostliny okurky se vyznačují velkou různorodostí v projevu pohlaví (obr. 6.3). Květní poupata v raných fázích vývoje mají základy jak tyčinek, tak pestíků, avšak květy jsou většinou různopohlavné. Jednotlivé rostliny se vyznačují velkou variabilitou v rozmístění a počtu tyčinkových a pestíkových květů. U jednodomých rostlin okurky je prakticky ve všech úžlabích listů buď několik samčích, nebo jednotlivé (zřídka dva a více) samičí květy. Tendence k feminizaci je větší v akropetálním směru (podobně jako u *Cucurbita pepo*).

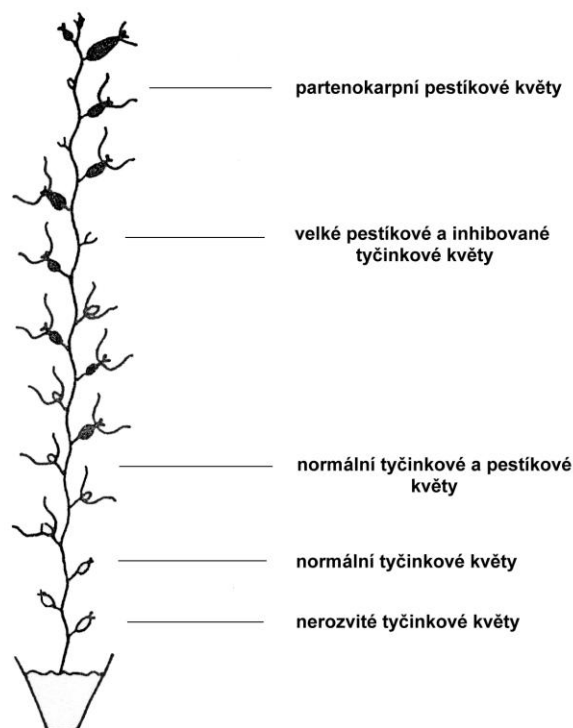
Některé odrůdy okurek mohou mít na rostlině kromě samčích květů i květy hermafroditní. Květy různého pohlaví se výrazně liší morfologicky (obr. 6.4).



**Obr. 6.3** – Schéma rozdělení květů různých typů na hlavním stonku *Cucurbita pepo* cv. Acorn. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

Determinace pohlaví u okurky se účastní tyto hlavní geny:

- *M/m* kontroluje spouštěcí mechanismus v květním poupěti; v přítomnosti alely *M*, která je úplně dominantní, se tvoří pouze jednopohlavné květy;
- *F/f* kontroluje schopnost k vývinu pestíku (*FF*) a tvoří gradient pro samičí pohlaví podél lodyhy; mezi alelami je vztah neúplné dominance;
- *A/a* gen je epistatický vůči genu *F*, zvyšuje samičí tendenci.



**Obr. 6.4** – Typy květů u *Cucumis sativus*. (Zdroj: Řepková, Relichová, 2001)

Kombinace těchto tří hlavních genů zodpovědných za determinaci pohlaví mohou dát následující fenotypy:

- *M- FF* populace monoecická, květy pestíkové
- *M- ff* populace monoecická, květy tyčinkové
- *mm ff* populace andromonoecická

Projev pohlaví u okurky může v některých případech podléhat i působení dalších genů.

Důležité je, že na projev pohlaví mají značný vliv i vnější podmínky, a to do té míry, že identické genotypy mohou dávat v různých podmínkách různé fenotypy a naopak různé genotypy mohou mít shodné fenotypy. Kromě klimatických podmínek (délka dne a teplota) mohou projev pohlaví ovlivňovat růstové regulátory a jiné chemické látky. Působením chemických látek lze změnit pohlaví libovolným směrem.

#### **6.4.2 Systémy dvoudomosti založené na jednotlivých lokusech**

Dvoudomost se vyskytuje v rostlinné říši asi dvakrát méně než jednodomost. Zcela dvoudomých je pouze asi 5 % čeledí a 75 % čeledí obsahuje některé dvoudomé druhy.

Pozornost byla dosud soustředěna převážně na druhy s pohlavními chromozomy, a proto jsou v současné době známy pouze dva druhy, u kterých je vznik samčích a samičích rostlin řízen



jednotlivými lokusy: tykvíce stříkavá (*Ecballium elaterium*) a bažanka roční (*Mercurialis annua*).

Typickým zástupcem této skupiny je druh tykvíce stříkavá z čeledě tykvovitých (*Cucurbitaceae*), u které o expresi pohlaví rozhoduje přítomnost tří druhů alel ( $a^D$ ,  $a^+$ ,  $a^d$ ) v lokusu určujícím pohlaví. Alela  $a^D$  je dominantní vůči alele  $a^+$  i alele  $a^d$ , její přítomnost vede u rostlin k samčímu fenotypu. Pokud se uplatní alela  $a^+$ , která je recesivní vzhledem k alele  $a^D$  a dominantní vůči alele  $a^d$ , vzniká rostlina jednodomá. Vznik samičích rostlin je podmíněn přítomností alely  $a^d$  v homozygotním stavu.

### 6.4.3 Pohlaví řízené více lokusy

Morfogeneze tyčinek a pestíků je determinována větším počtem genů. U oboupohlavných rostlin jsou všechny geny potřebné k tvorbě obou typů květních orgánů přítomné a funkční. V procesu diferenciaci (tj. při vývoji tyčinek nebo pestíků) jsou tyto geny různě exprimovány. Ztráta formy nebo funkce může být pak způsobena potlačením exprese příslušného genu nebo jeho nepřítomností.

U dvoudomých rostlin vzniknou při křížení mezi samičími a samčími rostlinami zase buď samičí, nebo samčí rostliny. Za předpokladu, že u obou pohlaví jsou přítomné jak geny zodpovědné za tvorbu tyčinek ( $A$ ,  $B$ ,  $C$ ), tak geny pro vznik pestíků ( $D$ ,  $E$ ,  $F$ ), pouze jejich aktivita je různá, odpovídá následující schéma:

$$Mm \begin{bmatrix} AA & BB & CC \\ DD & EE & FF \end{bmatrix} \text{♂}$$

$$mm \begin{bmatrix} AA & BB & CC \\ DD & EE & FF \end{bmatrix} \text{♀}$$

Je vidět, že klíčovou roli hraje alelový pár  $M/m$ :  $mm$  podmiňuje expresi pouze těch genů, které jsou zodpovědné za tvorbu pestíků,  $Mm$  pouze za tvorbu tyčinek. Podle tohoto modelu může být diferenciaci tyčinek a pestíků podmíněna neomezeným počtem genů, avšak determinace pohlaví je kontrolována pouze jedním lokusem působícím jako jakýsi spouštěcí mechanismus (angl. trigger).

U bažanky roční je pohlaví determinováno třemi lokusy  $A/a$ ,  $B_1/b_1$  a  $B_2/b_2$ , které nevykazují genetickou vazbu. Pro vývoj samčího pohlaví je nutná přítomnost dominantní alely lokusu  $A/a$  a navíc alespoň v jednom z lokusů  $B$ . Dominantní alela lokusu  $B_1/b_1$  má silnější maskulinizační efekt než alela  $B_2$ . Zároveň se samčí a samičí rostliny vyznačují rozdílným obsahem rostlinných hormonů. Cytokininový hormon trans-zeatin je přítomen pouze u samičích rostlin, příbuzný cytokininový hormon trans-zeatin mononukleoid se vyskytuje pouze u samčích rostlin. Expres pohlaví může být u jednoho druhu ovlivněna rostlinnými

hormony v souladu s výše uvedenými rozdíly. Auxiny mají maskulinizující a cytokininy feminizující vliv.

Vícelokusovému modelu odpovídá experimentální navození dvoudomosti u kukuřice. U kukuřice bylo nalezeno mnoho mutantů, u kterých jsou potlačena samičí květenství (rostliny silkless) nebo změněna samčí květenství – laty tak, že místo nich se tvoří pestíkové květenství (tzv. tassel seed).

Alelový pár  $Ts2/ts2$  můžeme v soulase s předchozím modelem považovat za spouštěcí mechanismus (trigger). Kromě genů  $Ts2/ts2$  jsou ostatní geny determinující vývoj pohlavních orgánů pro obě pohlaví společné a homozygotní a je tedy lhostejné, kde jsou lokalizovány (rekombinace je neúčinná). V tomto modelu tvoří samčí rostliny vždy dva druhy gamet, zatímco samičí rostliny pouze jeden druh.

Umělá dvoudomost u kukuřice byla také navozena pomocí jiné kombinace genů. Gen *ba* (*barren stalk*) je recesivní, lokalizovaný na III. chromozomu a genotyp *ba ba* tvoří na rostlinách pouze laty. Podobně jako v předchozím případě budou rostliny *ba ba ts2 ts2* samičí a *ba ba Ts2 ts2* samčí. Podobně jako gen  $Ts2/ts2$  může působit i jiný gen  $Ts3/ts3$ , v tomto případě však budou heterogametní rostliny samičí (*ba ba Ts3 ts3*). I když tyto systémy u *Zea mays* jsou velmi známé a často se uvádějí jako příklady umělé dvoudomosti, v některých případech se ukazuje tento systém složitější.

Jiný, složitější systém umělé dvoudomosti byl nalezen u *Rubus idaeus*. Předpokládá supresorové geny a vazbu mezi geny. Při determinaci pohlaví u normálně hermafroditního druhu *R. idaeus* působí dva geny: jeden potlačuje diferenciaci tyčinek ( $M/m$ ) a druhý diferenciaci pestíků ( $F/f$ ). Přitom samičí supresor je epistatický nad samčím supresorem. Tzn., že genotypy  $FF MM$ ,  $Ff Mm$  a  $FF Mm$  budou samčí rostliny a genotyp  $ff mm$  samičí. Mezi oběma geny existuje navíc silná vazba. V tomto případě křížení ♀  $fm fm$  x ♂  $FM fm$  dá pouze rodičovské typy, což odpovídá systému dvoudomosti u *R. idaeus*.

Popsaný model se může zdát složitý, představuje však obecný princip pohlavního dimorfismu u rostlin. Jiným způsobem zábrany crossing-overu mezi dvěma protichůdnými supresorovými geny je mechanická bariéra na chromozomové úrovni, tj. chromozomová aberace.

#### **6.4.4 Systémy determinace pohlaví u rostlin s pohlavními chromozomy**

Pohlavní dimorfismus založený na supresorových genech se bude nejefektivněji projevat při vazbě těchto genů. To vedlo ke vzniku pohlavních heteromorfních chromozomů, které se zřejmě vyvíjely v pozdějších stádiích evoluce a pouze u těch druhů, u kterých existovala dvoudomost. U mnohých dvoudomých druhů je heteromorfismus pohlavních chromozomů morfologicky vyjádřen slabě a může být cytologicky odhalen pouze v určitých fázích meiózy. Navíc se stupeň tohoto dimorfismu může i u velmi blízkých dvoudomých druhů značně lišit, což často vedlo k nejednotným experimentálním závěrům. V současné době byl dimorfismus

pohlavních chromozomů bezpečně prokázán u 13 druhů rostlin ze tří rodů (někteří autoři uvádějí 70 druhů z 24 rodů).

Nejjednodušším případem dimorfizmu chromozomů je systém X/Y. Tyto pohlavní chromozomy musí obsahovat alespoň dva odlišné segmenty: jeden homologní, který umožňuje synapsi v meióze a druhý heterologní. Složitější systémy zahrnují několik chromozomů X a Y. Zvláštním případem je systém X/0, jehož existence byla zjištěna pouze u tří druhů rostlin patřících k rodu *Dioscorea*, avšak některými autory nebyla potvrzena.

V tab. 6.1 jsou uvedeny druhy rostlin s heterologními pohlavními chromozomy a je z ní zřejmé, že v převážné většině případů jsou heteromorfní chromozomy u samčího pohlaví. Pouze u *Fragaria elatior* je heteromorfní samičí pohlaví. V rodu *Fragaria* se vyskytuje dvoudomost pouze na polyploidní úrovni (*F. orientalis* – 4x, *F. elatior* – 6x, *F. virginiana*, *F. grandiflora* – 8x).

Druh	Pohlavní chromozomy	
	♀	♂
<i>Cannabis sativa</i>	XX	XY
<i>Fragaria elatior</i>	XY	XX
<i>Humulus lupulus</i>	XX	XY
<i>H. lupulus</i> var. <i>cordifolius</i>	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> Y <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y <sub>2</sub>
<i>H. japonicus</i>	XX	XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>
<i>Rumex angiocarpus</i>	XX	XY
<i>R. acetosa</i>	XX	XY/Y <sub>2</sub>
<i>R. paucifolius</i>	XX	XY
<i>Silene latifolia</i>	XX	XY
<i>Melandrium rubrum</i>	XX	XY
<i>Populus</i> sp.	XX	XY
<i>Urtica dioica</i>	XX	XY
<i>Spinacia oleracea</i>	XX	XY nebo YY

**Tab. 6.1** – Druhy rostlin s heterologními pohlavními chromozomy.

U rostlin s pohlavními chromozomy jsou zpravidla uváděny základní typy determinace pohlaví, které jsou reprezentovány dvěma modelovými objekty: knotovkou bílou (*Silene latifolia*) a šťovíkem kyselým (*Rumex acetosa*). Nejvíce pozornosti bylo dosud věnováno druhům, které se vyznačují přítomností heteromorfních pohlavních chromozomů (tab. 6.1).

#### *Typ s aktivní úlohou chromozomu Y – Silene latifolia*

U *S. latifolia* uskutečnil už Correns ve 20. letech technicky velmi jednoduché pokusy ke zjištění, které pohlaví je heterogametické. Tyto pokusy byly založeny na předpokladu, že heterogametické pohlaví produkuje dva druhy pylu, u nichž existuje konkurence. Ta se

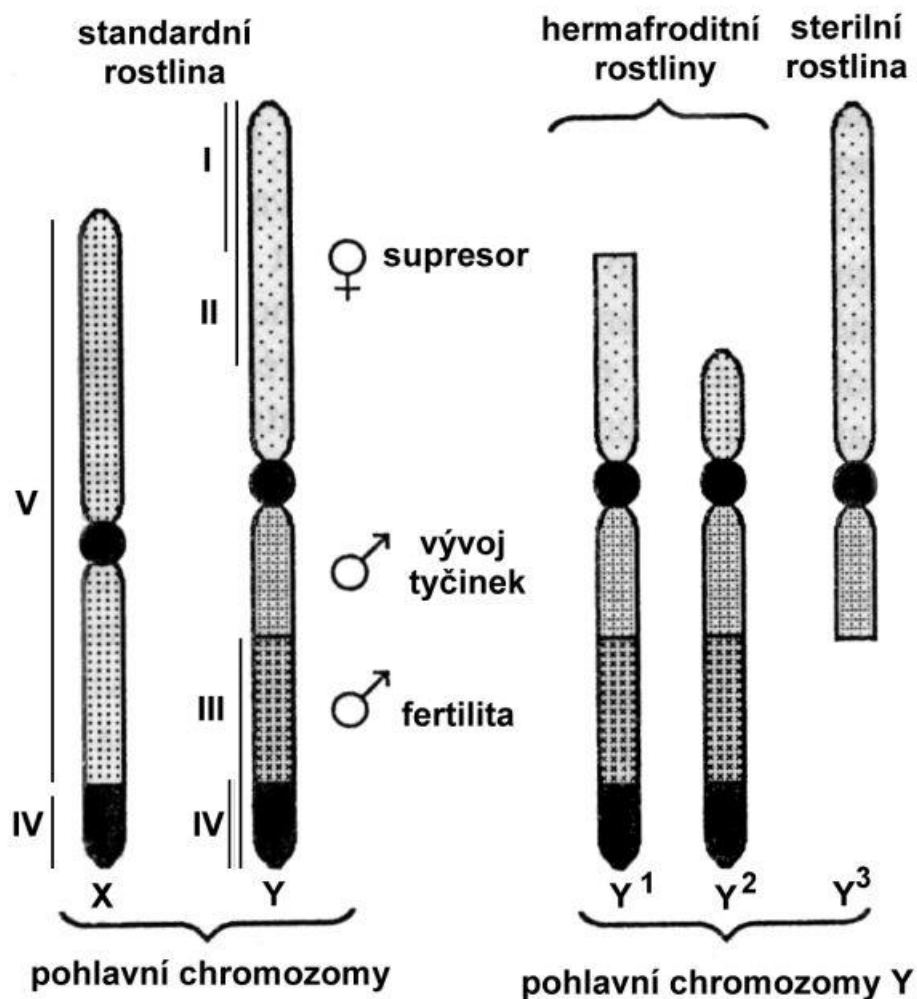
projeví při opylení dostatečným množstvím pylu tak, že v potomstvu vzniká více samičích rostlin než samčích. Naopak při opylení malým množstvím pylu se konkurence neuplatní a poměr pohlaví je zhruba 1:1. Podobné jednoduché pokusy byly založeny na rozdílném přežívání pylových zrn. Knotovka bílá má systém determinace pohlaví založený na aktivním působení chromozomu Y (samci se vyznačují konstitucí AAXY a samice AAXX), který obsahuje geny důležité pro tvorbu tyčinek a gen nebo genový komplex suprimující expresi samičího pohlaví. Chromozomy X a Y se u knotovky bílé navíc významně liší a exprese pohlaví nepodléhá vlivům prostředí. Kromě knotovky bílé a její příbuzné knotovky červené se tímto typem určení pohlaví vyznačují i některé jiné druhy z různých čeledí: chřest (*Asparagus officinalis*), plané druhy révy (*Coccinia indica*), šťovík menší (*Rumex acetosella*) a pravděpodobně i mnoho dalších dosud neprozkoumaných druhů s heteromorfními, případně i homomorfními pohlavními chromozomy. Chřest se vyznačuje homomorfními pohlavními chromozomy. Také funkční odlišnost mezi chromozomem X a Y není u tohoto druhu tak výrazná jako u dvoudomých druhů knotovek a je tedy možno získat i tzv. supersamce, kteří mají genetickou konstituci AAYY. Zatímco samičí rostliny nesou pouze rudimenty tyčinek, nejsou u samčích rostlin pestíky zcela zakrnělé a vykazují značnou variabilitu. Také tento fakt svědčí o menší evoluční pokročilosti systému determinace pohlaví u tohoto druhu a pravděpodobném vzniku dvoudomosti prostřednictvím gynodioecie. Dosavadní studie se zde zaměřovaly spíše na hledání pohlavně specifických rozdílů na úrovni proteinů. Z obecně genetického hlediska je zjevná podobnost determinace pohlaví u knotovky a typu savčího. Oba tyto systémy jsou založeny na aktivní úloze chromozomu Y, který nese geny potlačující expresi samičího pohlaví. Vlastní biochemické mechanismy, které realizují expresi pohlaví, jsou však zásadně odlišné i vlivem celkově odlišného metabolismu rostlin a savců.

Studium rostlin s aberantními chromozomy, které prováděl Westergaard, ukázalo na různý význam jednotlivých segmentů chromozomu Y (obr. 6.5): segment I potlačuje vývoj samičích orgánů, avšak nepřekáží vývoji samčího pohlaví (rostliny XY<sup>1</sup> mají květy se ♀ i ♂ orgány). Segmenty III a IV nepotlačují vývoj samičích orgánů, mají však vliv na konec etapy diferenciacce prašníků (rostliny XY<sup>3</sup> jsou samčí a pylově sterilní). Centrální segment II obsahuje geny, které kontrolují počáteční etapy tvorby prašníku. Chromozom Y je částečně homologní s chromozomem X (segment IV). Zbývající nehomologní část chromozomu X (segment V) obsahuje determinanty samičího pohlaví. Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> a Y<sup>3</sup> jsou skupiny rostlin z určité populace, které nesou delece různého rozsahu a polohy. Na základě hermafroditního fenotypu rostlin s chromozomem Y<sup>1</sup> a Y<sup>2</sup> bylo zjištěno, že diferenciální rameno chromozomu Y nese samičí supresor. Jelikož rostliny, které diferenciální rameno zcela postrádaly (typ Y<sup>2</sup>), tvořily normální prašníky, bylo možné konstatovat, že geny nezbytné pro tvorbu tyčinek (tzv. male promoter) leží v rameni částečně homologním s chromozomem X. V distální části homologního ramene chromozomu Y Westergaard dokázal přítomnost genů důležitých pro samčí fertilitu na základě fenotypu rostliny typu Y<sup>3</sup>.

U *S. latifolia* se sleduje možný vliv metylace DNA při determinaci pohlaví, protože byla pozorována hypermetylace jednoho nebo dvou chromozomů X. Nabízí se domněnka, že u rostlin by mohl existovat mechanismus zajišťující kompenzaci funkčních alel uložených

v pohlavních chromozomech X genetickou inaktivací jednoho nebo dvou chromozomů X u samičích rostlin a to metylací. Podobně je tomu u homogametického pohlaví savčího typu (tzv. lyonizace).

Podobně jako u *S. latifolia* je určeno pohlaví u *R. acetosella*, který však obsahuje homomorfní pohlavní chromozomy, označované jako  $S^F$  a  $S^m$ . Chromozom  $S^m$  hraje rozhodující úlohu v determinaci pohlaví tím, že inhibuje samičí potenci lokalizovanou v chromozomu  $S^F$ . Předpokládá se, že celkově je pohlaví kontrolováno několika málo geny s velkým účinkem a několika geny s malým účinkem lokalizovanými na uvedených chromozomech  $S^F$  a  $S^m$ . Autozomy se nepodílejí na determinaci pohlaví.



**Obr. 6.5** – Schematické znázornění normálních chromozomů X a Y u *Silene latifolia* a experimentálně získaných aberantních chromozomů  $Y^1$ ,  $Y^2$  a  $Y^3$ . (Zdroj: Janoušek, 1996)

### Typ s omezenou rolí chromozomu Y – *Rumex acetosa*

U druhů příbuzných šťovíku kyselému (*Rumex acetosa*) rozhoduje o expresi pohlaví poměr chromozomů X a sad autozomů. Tento pohlavní index je u samičích rostlin 1,0 ( $2A + XX$ )

a u samčích rostlin 0,5 ( $2A + XY_1Y_2$ ). V pokusech s polyploidy bylo zjištěno, že rostliny s poměrem 0,5 a menším, např.  $3A + XY_1Y_2$  byly samčí, zatímco rostliny s poměrem 1,0 a vyšším, např.  $3A + XXXX$  byly samičí. Rostliny s poměrem od 0,5 do 1,0 zaujímají střední postavení (oboupohlavné rostliny s karyotypy  $3A + XXY$  a  $3A + XXYY$  mají pohlavní index 0,67).

Vývoj tyčinek není závislý na přítomnosti chromozomu Y. Exprese pohlaví je velmi stabilní. Ztráta role chromozomu Y se projevuje jeho značným polymorfizmem v populacích rostlin. U samotného šťovíku kyselého jsou dokonce přítomny v buňkách samčích rostlin současně s chromozomem X také dva chromozomy Y, které vykazují opět značnou variabilitu. Chmel japonský (*Humulus japonicus*) se podobně jako šťovík kyselý vyznačuje přítomností dvou chromozomů Y v buňkách. Systém determinace pohlaví u typu šťovík je z obecně genetického hlediska podobný typu *Drosophila*, neboť ani zde nerozhoduje o expresi daného pohlaví přítomnost či nepřítomnost chromozomu Y, ale poměr počtu chromozomů X a sad autozomů.

### *Typ s heterogametickým samičím pohlavím*

Heterogametnost samičích rostlin byla dosud popsána pouze u planých polyploidních druhů jahodníků a u silenky ušnice (*Silene otites*). U silenky ušnice to bylo prokázáno křížením uměle získaných polyploidních samčích a samičích rostlin s diploidními rostlinami. Pokud byla samičí rostlina tetraploidní, tedy konstituce AAAAXXYY, vyskytovaly se v potomstvu takřka výhradně rostliny samičí, neboť gamety XX a YY se tvoří pouze výjimečně a převládají gamety XY. Tento typ připomíná systém determinace pohlaví u ptáků, neboť i zde je heterogametním pohlavím pohlaví samičí.

## 7. Genetika odolnosti rostlin k patogenům

Rostliny jsou zdrojem obživy nejen pro lidskou populaci, ale již na počátku své evoluce byly zdrojem výživy pro další organismy – mikroorganismy, jako jsou např. houby a bakterie. Většina těchto organismů jsou **saprofyté** využívající jako zdroj své výživy metabolity rostlin, které jsou již odumřelé a rozkládají se. Mnoho dalších však napadá živé rostliny. Některé organismy žijí s rostlinami v **symbióze**, která je výhodná pro rostlinu i mikroorganismus – př. jsou rizobia (fixace dusíku, význam v zemědělství), nebo mykorhizní houbové organismy. Další skupinou organismů jsou ty, které napadají rostliny a využívají jejich metabolity, rostlinu neusmrtí, ale negativně ovlivňují její metabolismus. Negativní vlivy působení cizího organismu se projeví u rostliny určitými příznaky jako **choroba**. Podle vnějších příznaků odborníci poznají, kterým organismem je rostlina napadena. Choroba má tedy určité fenotypové projevy. Důsledkem napadení je většinou zhoršená vitalita rostlin, a pokud jde o kulturní plodiny, vznikají tak škody v zemědělství. Takové organismy se nazývají **patogenní**, napadená rostlina je **hostitel**. Ne všechny organismy jsou pro určitý druh patogenní; **nepatogenní** organismus nenapadá rostliny určitého druhu.

Reakce rostlin na napadení patogenem jsou velice rozmanité a odolnost rostlin může mít různé příčiny. V procesu kontaktu parazita s hostitelem a v procesu vytváření parazitického vztahu lze nalézt obecné rysy:

První etapa je kontakt – **interakce** patogena s hostitelem. Nálet počátečního inokula na rostlinu se uskutečňuje vzdušnými proudy, vodou nebo hmyzem. Počáteční inokulum je určité množství jednotek, které se dostanou na hostitelskou rostlinu. Počáteční inokulum vyvolává tzv. infekční tlak. V této etapě působí mechanismy úniku před chorobou, tedy hlavně mechanismy zábrany vniknutí do pletiv. Průnik do rostliny se uskutečňuje přímo přes povrchové vrstvy prostřednictvím mechanického tlaku nebo enzymatického působení, přes přirozené otvory jako jsou průduchy a lenticely nebo až po poranění rostliny.

Druhou etapou je **infekce**. Počáteční inokulum se dostane do aktivního stavu, v němž je schopno infikovat hostitele. Etapa infekce končí, jakmile mezi parazitem a hostitelem vznikne parazitický vztah. V této fázi mohou s vysokou účinností působit inhibiční látky produkované rostlinou.

Třetí etapou je vlastní **parazitický vztah**. Ten je charakterizován výživou na úkor hostitele. Tento proces začíná skrytě (inkubační dobou) a končí vnějšími příznaky napadení.

Rostliny vzhledem ke svému nepohyblivému způsobu života musí mít schopnost adaptovat se k různým extrémním (stresovým) podmínkám prostředí. Řada adaptací se děje na úrovni transkripce genů. Rostlina disponuje četnými obrannými mechanismy, které se různým způsobem překrývají:

1. **konstitutivní** – předem vytvořené jako fyzické bariéry (kutikula, buněčná stěna) a různé antimikrobiální látky, pokud jsou přítomné i bez působení stresového faktoru,
2. **indukované** – vyžadují určitou formu indukčního signálu ke své aktivaci.

Obrana rostliny může být dvou typů:

1. **pasivní** – závisí na anatomických a morfologických vlastnostech rostliny,
2. **aktivní** – daná syntézou indukovaných obranných látek.

## ***7.1 Mechanizmy působení rostlinných patogenů***

Rostlinné patogeny působí různými mechanizmy, které byly zatím prozkoumány jen v hlavních rysech. Studium mechanismů jejich působení je důležité k tomu, aby bylo možné přesněji definovat jednotlivé typy rostlinných obranných mechanismů. Proto studium mechanismů působení rostlinných patogenů, zvláště jejich enzymů, které se patogenezí účastní, je stejně významné jako studium rostlinných genů podmiňujících rezistenci. Základní typy rostlinných patogenů jsou houbové, bakteriální a virové organizmy.

### ***7.1.1 Houbové organizmy***

Bylo popsáno asi 74 tisíc až 100 tisíc druhů hub, avšak většina z nich jsou saprofyty. Více než 10 tisíc druhů hub jsou parazité, kteří žijí na živých rostlinách a způsobují různý stupeň jejich poškození (vnější příznaky – choroba). Nejčastějšími patogeny u rostlin jsou *Blumeria* (padlí), *Erysiphe* (padlí), *Monilinia* (houbová choroba plodů), *Sclerotinia* (kořenové a stonkové hniloby), *Ustilago* (sněť), *Melampsora*, *Puccinia* a *Uromyces* (původci rzi), *Fusarium* (původce krčkových hnilob).

Tito parazité jsou:

- **biotrofní** a získávají živiny z živých hostitelských buněk pletiv a snižují tak vitalitu rostlin,
- **nekrotrofní** využívají svoje enzymy nebo toxiny, kterými naruší buněčnou stěnu i cytoplazmatickou membránu, rostlina uhynie a potom využívají metabolity rostlinných buněk pro svoji výživu.

Většina houbových organizmů jsou kombinované formy – **hemibiotrofní**. V první fázi po napadení dochází k biotrofní infekci, potom k poškození buněk a jejich smrti. Následuje sporulace houbového organismu.

Enzymy, které narušují rostlinné buněčné stěny, jsou zejména polygalakturonidázy, pektát lyázy a kutinázy. V dalším stadiu se účastní hydrolázy a esterázy, které rozrušují makromolekulární komponenty rostlinných buněk, jež jsou potom použity pro výstavbu buněčných komponent patogena. Často se podílejí i nízkomolekulární toxiny (alkaloidy a další). Geny pro základní enzymy, působící patogenicitu mnoha patogenů byly klonovány.



*Cochliobolus carbonum* produkuje specifický HC toxin, který inhibuje aktivitu histonové deacetylázy, enzymu nezbytného pro aktivaci genů obranného systému. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* produkuje AAL toxin, který pravděpodobně aktivuje mechanismus programované buněčné smrti u rajčete. Další houby tvoří neselektivní toxiny, např. *Fusicoccum amygdali* tvoří toxin fusicoccin, který působí na H<sup>+</sup>-ATPázu lokalizovanou na membránách. Působením toxinu dochází k nevratnému otevření stomat a vadnutí rostlin, to je následováno programovanou buněčnou smrtí a nekrotrofní kolonizací.

### 7.1.2 Bakteriální organizmy

Z 1 600 druhů bakterií asi 100 druhů způsobuje choroby rostlin (např. *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia* a další). Některé druhy *Pseudomonas* mohou být symbiotické, jiné patogenní. Bakterie podobně jako houby degradují pektin a další komponenty rostlinné buněčné stěny (pektin lyázy, polygalakturonidázy). Bakterie pak přežívají v mezibuněčných prostorech různých orgánů nebo v xylemu. Bakteriální geny, které působí patogenicitu, jsou zmapovány a klonovány lépe než houbové díky značným možnostem bakteriální genetiky a bakteriálního genového inženýrství. Je poměrně dobře známa degradativní dráha pektinu. U bakterie *Erwinia chrysanthemi* byly izolovány nejen enzymy, které se jí účastní, ale byly detekovány také jednotlivé geny, z nichž většina byla klonována a sekvenována. Jsou to následující geny kódující příslušné enzymy:

- *pel* pektát lyáza (kódovaná u *Pseudomonas* pěti geny *pelA* až *pelE*)
- *ogl* oligogalakturonát lyáza
- *kduI* 5-keto-4-deoxyuronát izomeráza
- *kduD* 2-keto-3-deoxyglukonát oxidoreduktáza
- *kdgK* 2-keto-3-deoxyglukonát kináza
- *kdgA* 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldoláza
- *pme* pektin metylesteráza
- *exuT* transportní systém galakturonátu do rostlin
- *uxaC* uronát izomeráza
- *uxaB* altronát oxidoreduktáza
- *uxaA* altronát hydrolyáza

Kromě toho mnoho druhů fytopatogenních bakterií produkuje toxiny, které spolupůsobí při vzniku a vývoji choroby.

Z hlediska poznání mechanismu působení toxinů můžeme rozlišit tři skupiny:

1. toxiny se známým mechanismem působení (nízký počet),
2. toxiny se známým metabolickým procesem, do kterého jsou zapojeny, případně které organely jsou jím postiženy,
3. toxiny s neznámým mechanismem působení (většina).

Jedním bakteriálním klonem může být produkováno větší množství toxinů, ale jen některé z nich jsou známy. Spektrum toxinů produkovaných mikrobiálním patogenem *in vitro* může

být odlišné od spektra toxinů produkovaných v rostlině. Toxiny jsou extracelulární polysacharidy a každý toxin má svůj jediný typ cílové molekuly – obvykle specifický enzym, který inaktivuje. Důsledek působení toxinů je cévní vadnutí, rakovina, sněti, hniloby a plísňe.

Například *Pseudomonas syringae* pv. (patovar) *phaseolytica* produkuje fazeolotoxin, který inhibuje specifický rostlinný enzym ornitinového cyklu, ornitin karbamoyltransferázu (OCTázu). *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* produkuje tabtoxin, jehož beta-laktam inhibuje glutamin syntázu, která se účastní odbourávání amonných iontů v rostlině. Genů pro produkci bakteriálních fytotoxinů (nízkomolekulárních difundabilních látek) bývá obvykle několik a bývají společně lokalizovány na velkém bakteriálním plazmidu. Řada těchto genů byla klonována. Pro patogenezí jsou obecně nezbytné geny *Hrp* (*Hypersensitive response and pathogenicity cluster*) produkující protein umožňující transport proteinů Avr do rostliny.

Hlavním molekulárně genetickým poznatkem využitelným pro genové manipulace rostlin je, že i bakterie mají enzymy obdobné těm rostlinným, které jsou cílovými místy působení toxinu. Tyto bakteriální enzymy jsou však k toxinu rezistentní. Klonované geny pro takové bakteriální enzymy mohou být po spojení s vhodnými rostlinnými regulačními sekvencemi vneseny do rostlinného genomu a tam podmiňovat rezistenci k bakteriálním toxinům.

### 7.1.3 Viry

Mnoho virů infikuje řadu rostlinných druhů; u různých hostitelů způsobují různé symptomy. Většina rostlinných virů má genom tvořený jednořetězcovou RNA a plášťovým proteinem (*Rhabdoviridae*, *Potyviridae*, *Luteoviridae*). Další rostlinné viry mají dsRNA (*Reoviridae*, *Partitiviridae*), mezi rostlinnými viry se vyskytují i ty s genomem tvořeným ssDNA (*Geminiviridae*) i dsDNA (*Caulimoviridae*). Hlavními vektory virů jsou mšice, dalšími nematody a živočichové, šířit se mohou ale i semeny nebo pylem. Jakmile je virus uvnitř rostliny, replikuje se, využívá a modifikuje rostlinný replikační aparát. Šíří se plazmodezmaty mezi buňkami a cévním systémem celou rostlinou.

## 7.2 Pasivní (konstitutivní) obranné mechanismy

Pasivní obranné mechanismy zahrnují jak strukturní elementy jako je kutikula, tak antimikrobiální chemické látky v rostlině, které jsou zde přítomny již před napadením patogenem, tzv. **fytoanticipiny**. Je to první obranná bariéra vůči napadení mikroorganizmem.

### 7.2.1 Strukturní bariéry

Povrch rostlin tvoří **kutikula** a její hlavní součástí je kutin, dále celulóza a pektin. Kutin je nerozpustný polyester, který se skládá z hydroxy a hydroxyepoxy mastných kyselin. Další významnou součástí je suberin s obdobným složením. První pasivní bariéru proti mikroorganizmům na povrchu kutikuly tvoří **vosky**. Chrání rostlinu před vyschnutím a působí jako bariéra proti vstupu mikroorganizmů. Brání tvorbě kapek vody, které jsou nezbytné pro

pronikání bakterií a klíčení spor hub. Podobnou funkci mají chloupky na listech. Kutikula je velmi účinná proti vstupu virů, ale ty pronikají přes poranění nebo prostřednictvím vektorů. Houby pronikají kutikulou přímo, v důsledku exkrece kutináz. **Buněčná stěna** epidermálních buněk tvoří další bariéru proti všem patogenům, kromě těch hub, které mají faktory patogenicity pro přímou penetraci, a vektorů, které nesou patogena. Stomata jsou jedinými otvory ve strukturní bariéře. Některé houby mohou pronikat zavřenými stomaty, jiné, jako např. rzi obilovin, musí čekat na jejich otevření.

**Lignifikace** rostlinných pletiv je jedním z dalších typů obranných reakcí. U starších rostlinných orgánů dochází k lignifikaci cévních pletiv. Lignin je komplexní heterogenní aromatický polymer, který zesiluje buněčné stěny buněk vyšších rostlin a činí je nepropustné pro vodu. Vzniká polymerací fenylypropanoidových monolignolů, para-kumaryl, -koniferyl a -synaptylalkoholů. Ligniny různých rostlin i různých částí téže rostliny se liší složením a obsahem svých monolignolů. Tato variabilita je pravděpodobně určována různými substrátovými specifitami enzymů syntetizujících lignin. Je to polymer s komplexní strukturou, s různými esterickými a uhlíkatými vazbami mezi monomery i příčnými vazbami s dalšími polymery buněčných stěn. Prekurzory ligninu jsou syntetizovány fenylypropanoidovou metabolickou drahou, která syntetizuje také prekurzory antokyanů, flavonoidů a taninů. Obecné enzymy fenylypropanoidového metabolismu jsou fenylalanin amonium lyáza (PAL) a cinamát-4-hydroxyláza (C4-H).

Byl získán transgenní tabák se sníženou aktivitou PAL a sníženým obsahem ligninu v xylemu. Měl mnoho morfologických abnormalit, jako zakrslý růst, změněný tvar listů, sníženou životaschopnost pylu, změněnou morfologii kvetení. Jiný transgenní tabák měl změněn jeden z terminálních enzymů syntézy ligninu. Vytvářel jiný typ ligninu červenohnědého zbarvení, takže lodyhy odkvétajících rostlin měly hnědé zbarvení. Tento typ ligninu by byl vhodný u dřevin používaných v dřevozpracovatelském průmyslu, protože se dá snadno oddělit od celulózy.

### 7.2.2 Chemické bariéry

**Fytoanticipiny** jsou chemické sloučeniny přítomné v rostlině, které fungují jako antimikrobiální látky a tvoří chemickou bariéru proti invazi patogenů. Detoxifikují enzymy patogenů; např. triterpenoid avenacin (saponin přítomný u ovsa) detoxifikuje enzym avenacinázu.

### 7.2.3 Morfologické strukturní bariéry

Spory patogenního organismu *Ustilago nuda* f. sp. *hordei* (sněť) se rozšiřují větrem a rostlinu infikují přes otevřené květy – přes bliznu a stěnu semeníku. Ječmen je autogamní, opylení tedy nevyžaduje otevření květů. Proto se šlechtí odrůdy kleistogamní, u nichž se květy neotvírají, k opylení a oplození dochází uvnitř zavřeného květu a patogen se nedostane do květů a neinfikuje rostlinu.

## 7.3 Aktivní (indukované) obranné mechanismy

### 7.3.1 Lokální signály

První reakcí rostliny po invazi patogena, před aktivací exprese specifických genů a syntézou proteinů, je tvorba iontových kanálů, reaktivních kyslíkových radikálů, tvorba kysličníku dusnatého a aktivace fosforylační kaskády.

### 7.3.2 Programovaná buněčná smrt

Důležitým aktivním obranným mechanismem u rostlin je **hypersenzitivní reakce (HR)**, která je charakterizována rychlou nekrózou, tj. místním odumřením živého pletiva v místě napadení patogenem. Tento mechanismus pravděpodobně zahrnuje dvě fáze: zaprvé indukce programované smrti okolních buněk může zamezit šíření patogena a lokalizovat jej od zbytku rostliny a zadruhé existuje široká fyziologicky podmíněná imunita, tzv. systémová rezistence, která je důsledkem hypersenzitivní reakce a aktivace genů spojených s obranným procesem.

HR je časově a prostorově koordinovaný mechanismus, kdy v buňkách dochází ke kondenzaci chromatinu a degradaci DNA.

### 7.3.3 Inhibiční látky rostlin

Příkladem účinku inhibičních látek je rezistence zelených plodů rajčat, které obsahují steroidní alkaloid tomatin, vůči *Fusarium* spp. Aby byla zjištěna funkce tohoto alkaloidu pro rezistenci, byly selektovány mutantní kmeny *Fusarium*, které měly schopnost růst při vysokých koncentracích tomatinu. Bylo zjištěno, že tyto kmeny mají zvýšenou virulenci k zeleným plodům, takže i tomatin má důležitou funkci v rezistenci vůči tomuto patogenu.

### 7.3.4 Biopolymery buněčné stěny

Poranění nebo infekce rostliny mají za následek akumulaci specifických proteinů **extenzinů** v buněčné stěně, zvláště u dvouděložných rostlin. Extenziny jsou glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin a mají schopnost vázat intramolekulárně různé komponenty buněčné stěny.

V buňkách ječmene a některých dalších *Poaceae* byly zjištěny **thioniny**, proteiny, které jsou vysoce toxické pro houby a jsou velmi odolné vůči degradaci patogenem. Geny pro tyto proteiny byly již klonovány a sekvenovány.

Další polymer, odolný k degradaci patogenem je **lignin**. Klíčové enzymy syntézy ligninu jsou cinamylalkoholehydrogenázy a polyfenoloxidázy. Další fenolickou sloučeninou ukládající se na vnitřním povrchu buněčné stěny je **suberin**. **Kalóza** je polysacharid ( $\beta$ -1,3-glukan), který je deponován při infekci patogenem v buněčné stěně, což blokuje šíření hub i virů. Kalóza blokuje také plazmodezmata vůči pohybu virů. Proces **lignifikace** může být indukován

patogenem a účastní se ho současně celá skupina genů hostitele, která je aktivována na úrovni transkripce. Mezi nimi jsou i hydrolázy, které rozkládají komponenty buněčné stěny hub, jako chitinázy a  $\beta$ -1,3-glukanázy. Některé chitiny mají současně také lysozymovou aktivitu a lze předpokládat, že působí antibakteriálně tím, že hydrolyzují buněčné stěny bakterií.

**Peroxidázy** jsou hlavní enzymy, které mají funkci při zesílení buněčné stěny a jsou indukované patogenem. Oxidují řadu substrátů, využívají  $H_2O_2$  jako donoru elektronu. Jde o velkou rodinu proteinů vyskytujících se v celé rostlinné říši. U jednoho druhu lze nalézt až 40 různých izoform. Peroxidázy modifikují buněčnou stěnu oxidací dvou rozpustných proteinů, proteinu bohatého na hydroxyprolin a proteinu bohatého na prolin. Jde o důležité strukturní proteiny v místech, kde dochází k lignifikaci.

### 7.3.5 *Fytoalexiny*

Houbové patogeny uvolňují do buněk hostitele specifické látky – **elicitory**, které indukují syntézu nízkomolekulárních látek. Elicitory jsou aktivní již při extrémně nízkých koncentracích. Typickým elicitem je glukan, který působí v koncentraci  $10^{-9}$ . Obecně elicitory mohou být sacharidy, ale také polypeptidy. Další elicitory jsou např. chitozan, houbové polysacharidy ale i glykoproteiny, ribonukleázy apod. Elicitory indukují syntézu **fytoalexinů**. Existuje mnoho typů fytoalexinů a každý rostlinný druh syntetizuje většinou jeden fytoalexin. Obecně jsou to nízkomolekulární obranné antibakteriální a protihoubové látky, které jsou chemicky velmi heterogenní, ale převážně se jedná o fenolické sloučeniny.

Fytoalexiny jako sekundární metabolity zahrnují terpenoidy (seskviterpeny – rišitin u bramboru), saponiny (avenacin u ovsu), alifatické kyselé deriváty, fenolické látky a fenypropanoidy (flavonoidy, izoflavonoidy, pterokarpany – medicarpin u vojtěšky), stilbeny (resveratrol u révy vinné) nebo organické látky (alkaloidy). Většina těchto látek jsou deriváty biosyntetických drah izoprenoidu, fenypropanoidu, alkaloidu nebo mastných kyselin.

Klíčovým enzymem syntézy fytoalexinů je fenyalanin amonium lyáza (PAL), jejíž gen byl klonován. Způsobuje přeměnu fenyalaninu na kyselinu cinamovou. Ta je pak hydrolyzována acetylkoenzymem A za vzniku 4-hydroxycynamyl-CaA, který je využíván ve dvou metabolických drahách:

1. syntéza flavonoidů a isoflavonoidů nebo fytoalexinů prostřednictvím chalkonsyntázy (CHS, další enzym, jehož gen byl klonován z genomu řady rostlinných druhů),
2. přeměna na prekurzory ligninu.

Fytoalexiny jsou u rostlin druhově specifické (brambory – rišitin, hrách – pisatin, vojtěška – medicarpin, jetel – trifolirhizin, fazol – fazeolin, kukuřice – zeatin). Fytoalexiny jsou toxické i pro rostlinné buňky. Po indukci jejich syntéza dosahuje vrcholu a pak je blokována. I tak je u některých genotypů příčinou hypersenzitivní reakce.

Elicitory aktivují signalizační dráhu, která začíná jejich reakcí s receptory buněčné membrány nebo vniknutím do cytoplazmy. Signální polypeptid buněčné membrány, který tvoří článek řetězu přenosu signálu od elicitoru ke spuštění syntézy fytoalexinu, musí obsahovat tři úseky:

1. hydrofilní zónu, která interaguje s prostředím na vnějším povrchu buněčné stěny,
2. hydrofobní zónu, která je v interakci s lipidovou dvojvrstvou,
3. část, schopnou komunikovat s cytoplazmou.

Elicitory mohou v některých případech také procházet buněčnou stěnou a buněčnou membránou do nitra buněk (prostřednictvím pórů, plazmodezmat a kanálků).

Elicitory indukují syntézu fytoalexinů, ale mohou současně také stimulovat syntézu alkaloidů u těch rostlinných druhů, u nichž alkaloidy vznikají i v neinfikovaných rostlinných pletivech, ale také jsou indukovány nebo jejich syntéza je zvýšena po infekci patogenem. Alkaloidy mohou být toxické pro patogena.

U rostlin se předpokládá existence antivirových proteinů podobných interferonu. Jde o látky, které nebyly přesně identifikovány. Takovýto protein byl izolován z listů *Nicotiana glutinosa* infikovaných TMV (virus mozaiky tabáku). Jeho aplikace na další tabáky vedla ke snížení obsahu virů v rostlině. Rovněž protoplasty *N. tabacum* uvolňovaly do media protein, který měl antigenní vlastnosti, ale nebyl serologicky příbuzný s interferonem.

Některá pletiva vyšších rostlin produkují nízkomolekulární látky – **fytoncidy**, které působí baktericidně, fungicidně i insekticidně. Jsou to látky chemicky různorodé, které buď usmrcují mikroorganismy, nebo omezují jejich růst. Jsou obsaženy v rajčatech, cibuli, česneku, křenu, citronech, v kopřivě, černém rybízu a v mnoha dalších rostlinách, v jejich nadzemních i podzemních částech. Nazývají se rostlinnými antibiotiky, protože jde o léčiva rostlinného původu, která mají význam i v ochraně člověka před infekcemi.

### **7.3.6 Hydrolázy**

Hydrolázy jsou enzymy, které jsou indukovány patogenem a rozkládají komponenty buněčné stěny hub (chitinázy,  $\beta$ -1,3 glukanázy). Částečně se překrývají s PR-proteiny.

### **7.3.7 PR-proteiny**

PR-proteiny (angl. pathogenesis-related) jsou další, tentokrát zvláště významnou a univerzálně v rostlinách přítomnou skupinou proteinů, které se účastní obranných reakcí rostliny. Jsou to proteiny indukované infekcí virů a viroidů, ale také bakteriálními a houbovými patogeny. Je to skupina většího počtu heterogenních proteinů, které byly studovány především u tabáku, ale také u dalších druhů.

Geny pro různé PR-proteiny byly klonovány a sekvenovány a některé z nich mají chitinázovou nebo D-1,3-glukanázovou aktivitu. PR-proteiny jsou ve velmi nízkých

koncentracích přítomny i v neinfikovaných pletivech, ale po infekci se jejich hladina zvyšuje o 2 až 3 řády.

PR-proteiny nemusí ale vždy být indukovány jen patogeny. Například endogenně zvýšená aktivita auxinů v pletivech transformovaných bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* rovněž zvyšuje syntézu PR-proteinů. Předpokládá se, že etylén je obecným induktorem PR-proteinů. Prekurzory etylénu stimulují syntézu PR-proteinů a látky, které blokují syntézu etylénu, blokují také syntézu PR-proteinů.

Syntézu PR-proteinů zvyšují rovněž některé chemické látky, jako kyselina polyakrylová, kyselina salicylová, acetosalicylová, benzoová, dále  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$  a další látky. Jiné látky a faktory syntézu PR-proteinů inhibují. Jsou to například arginin, lysin, ornitin, spermidin, hydrochinon, EDTA a aktinomycin D.

PR-proteiny jsou lokalizovány především v mezibuněčných prostorech a vakuolách. Značné množství se jich hromadí v xylemu. Obranné vlastnosti PR-proteinů jsou z větší části vysvětlitelné jejich enzymovými aktivitami (chitinázy, glukonázy, ale i alkalické deproteázy). Není však zatím vysvětlena jejich antivirová aktivita. PR proteiny byly rozděleny do 14 tříd podle homologie a serologie.

Geny pro různé proteiny, spojené s indukovanou odpovědí na patogenezí u tabáku:

<i>PR-1</i>	kyselý, extracelulární, nejvíce zastoupený, funkce neznámá
<i>PR-1</i>	bazická forma kyselého <i>PR-1</i>
<i>PR-2</i>	kyselá extracelulární D-1,3-glukanáza
<i>PR-3</i>	kyselá extracelulární chitináza
<i>PR-4</i>	kyselý, extracelulární, funkce neznámá
<i>PR-5</i>	kyselý extracelulární homologní s thaumatinem a bifunkční inhibitor amylázy/proteázy kukuřice, rovněž označovaný <i>PR-R</i> nebo <i>PR-S</i>
<i>PR-9</i>	peroxidáza
<i>PR-11</i>	chitináza

### ***Biochemická funkce PR-proteinů a jim podobných proteinů***

Základní typy PR-proteinů u tabáku jsou PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 a PR-5. Je známo, že skupina proteinů PR-2 má D-1,3-glukanázovou aktivitu a PR-3 proteiny jsou chitinázy. Ochranná funkce D-1,3-glukanáz je dvojí:

1. mohou uvolňovat z buněk patogena karbohydrátové elicitory (viz fytoalexiny),
2. mohou rozrušovat hyfy hub, jejichž buněčné stěny obsahují D-1,3-glukany.

Také chitinázy narušují buněčné stěny houbových patogenů.

U rostlin jsou přítomny ještě jiné glukonázy a chitinázy, které nepatří k PR-proteinům. Ty se vyskytují konstitutivně, ale ve zvýšené míře jsou indukovány po infekci. Některé z nich jsou homologní s PR-2 a PR-3, zatímco jiné mají zcela odlišné aminokyselinové složení.

Proteiny PR-4 jsou homologní proteinu, který vzniká u bramboru translací určitého typu mRNA, indukované poraněním. Proteiny PR-5 jsou příbuzné thaumatínu, což je bazický, sladký (100 tisíc krát sladší než cukr) zásobní protein semen tropického keře *Thaumatococcus daniellii*. Proteiny PR-5 však nemají sladkou chuť. Jsou podobné proteinu osmotického stresu u tabáku, osmotínu. Syntéza PR-5 je indukována jednak vývojově a jednak patogeny.

Transgenoze genem pro PR-1 nevedla ke zvýšené rezistenci tabáku k virům. Je však možné, že PR-1 nepůsobí antivirově, ale některé jiné PR-proteiny ano.

### 7.3.8 Systémová rezistence

Při systémové rezistenci dochází k aktivaci transkripce genů kódujících různé komponenty buněčné stěny rostlin (polysacharidy, lignin, suberin, saponin), které mohou být bariérou pro infekci patogena. Infekci mohou zabránit i další rostlinné enzymy (proteiny PR), což jsou různé chitinázy, glukánázy a proteázy, které rozkládají komponenty buněčné stěny hmyzích škůdců, houbových nebo bakteriálních patogenů.

Nejvýznamnější je **získaná systémová rezistence** (SAR, angl. systemic acquired resistance), která zajišťuje širokou rezistenci vůči virovým, bakteriálním a houbovým patogenům.

Bylo zjištěno, že při hypersenzitivní reakci se v rostlině zvyšuje koncentrace kyseliny salicylové a že také exogenně aplikovaná kyselina salicylová (SA, popř. její analogy) indukuje stejné geny SAR jako při biologické iniciaci SAR. Toto zjištění vedlo k domněnce, že salicylová kyselina je endogenním signálem pro systémovou rezistenci. Systémová rezistence je výsledkem aktivace genů souvisejících s patogenezí, genů *PR*.

Biosyntéza SA se děje přeměnou fenylalaninu na kyselinu trans-skořicovou prostřednictvím enzymu fenylalaninamonium lyázy (PAL). Ten je pak přeměňován na SA přes alternativní intermediáty kyselinu ortho-kumarovou nebo kyselinu benzoovou. Existují vazebné proteiny kyseliny salicylové. SA blokuje katalázu a podmiňuje vznik superoxidových radikálů. SA spolupůsobí s dalšími signály, fungujícími na dlouhou vzdálenost jako je systemin, kyselina jasmonová, elektrické potenciály a etylén. Etylén indukuje expresi PR-proteinů a inhibitory syntézy etylénu inhibují také syntézu PR-proteinů zprostředkovanou ABA.

Metodou transgenoze byly získány transgenní rostliny tabáku, do jejichž genomu byl introdukován gen *nahG* z genomu bakterie *Pseudomonas putida*, který kóduje salicylát hydroxylázu. Tento enzym přeměňuje kyselinu salicylovou na katechol, který je inaktivní při SAR. Transgenní rostliny tabáku s tímto genem neakumulují kyselinu salicylovou po napadení patogenem a nemají SAR. Tyto výsledky naznačují, že kyselina salicylová má důležitou funkci při SAR.

Dalším typem systémové rezistence je **indukovaná systémová rezistence** (ISR, angl. induced systemic resistance). Je nezávislá na přítomnosti kyseliny salicylové a nedochází k expresi genů SAR. Tento typ rezistence zajišťuje jen asi 40 až 60% ochranu vůči houbovým



a bakteriálním patogenům (např. *Pseudomonas syringae* v. *tomato*). Důležitými signály při indukcii rezistence k mikrobiálním patogenům je kyselina jasmonová a etylén. Kyselina jasmonová zvyšuje expresi genů, které jsou součástí obranných reakcí rostliny. Existují i další obranné mechanismy, které nejsou vyvolány kyselinou salicylovou. Patří sem např. aktivace genů, které kódují chitinázy a glukonázy, inhibitory proteáz nebo thioniny. Jsou to tzv. malé antimikrobiální peptidy. Jejich funkce při obranných mechanismech rostliny jsou studovány u transgenních rostlin, do jejichž genomů byly introdukovány geny kódující tyto látky.

K hypersenzitivní reakci dochází i po virové infekci např. virem tabákové mozaiky (TMV). Šíření virů v rostlinných pletivech může být omezeno mechanismy závislými na přítomnosti kyseliny salicylové. Dochází ke zvýšení teploty v místě virové infekce (tzv. horečka rostliny) vlivem alternativní oxidativní respirace indukované kyselinou salicylhydroxyamicovou. Po virové infekci nemusí dojít k tvorbě příznaků (tzn. lézí či poškození), avšak virové částice způsobují zpomalení růstu rostliny a poruchy v reprodukci. Rostliny je možné ozdravit alespoň od některých typů virů. Po infekci virem kvěťákové mozaiky nebo nepoviry rostlina využívá mechanismů posttranskripčního umlčování genů. Umlčování genů je často pozorováno u rostlin, do jejichž genomů byla introdukována cizorodá DNA, především T-DNA. U těchto rostlin dochází k transkripci jaderných genů, avšak mRNA je v cytoplazmě degradována různými mechanismy. Prozatím není jasné, zda mechanismy umlčování cizorodých genů jsou příčinou rezistence nebo důsledkem jiné obranné strategie rostliny po virové infekci.

### **7.3.9 Překrývající se obranné mechanismy**

Rostliny reagují aktivací transkripce a translace genů pro stresové proteiny nejen na patogeny, ale ještě na mnoho dalších stresových faktorů (horko, chlad, sucho, zaplavení, mechanické poškození, paraziti, xenobiotika, atmosférický ozón a podobné). Každá z odpovědí je spojena se syntézou určitého počtu proteinů, ale různé odpovědi mohou mít některé proteiny společné. Toto překrývání odpovědí může mít za následek jejich vzájemné zeslabování. Například rezistence k patogenům může být silně oslabena abiotickým stresem.

Rezistence rostlin se ve značné míře odráží na výnosech určité plodiny, proto je také studium rezistence rostlin k chorobám důležitým a aktuálním tématem. Řada genů determinujících rezistenci k chorobám byla identifikována klasickou genetickou analýzou. V tab. 7.1 jsou uvedeny lokusy, které se podílejí na rezistenci k houbovým patogenům u ječmene. Je zřejmé, že tyto lokusy jsou rozptýleny po všech sedmi chromozomech tohoto druhu. U mnoha chorob se na rezistenci podílí několik lokusů (genů). Polygenní charakter rezistence odpovídá předpokladu, že se na genetickém založení rezistence u ječmene podílejí různé mechanismy.

Patogen	Počet lokusů	Lokalizace na chromozomech
<i>Puccinia hordei</i>	11	1, 2, 3, 5, 6
<i>P. graminis</i>	2	1
<i>P. striiformis</i>	4	5
<i>Ustilago nuda</i>	7	1, 5
<i>U. hordei</i>	4	
<i>U. nigra</i>	1	
<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	13	4, 5, 6
<i>Pyrenophora teres</i>	4	2, 3, 5
<i>P. gramineae</i>	3	
<i>Cochliobolus sativus</i>	4	2, 5
<i>Leptosphaeria avenaria</i> f. sp. <i>triticea</i>	3	
<i>Rhynchosporium secalis</i>	11	3, 4
<i>Fusarium</i> spp.	1	
<i>Pericularia oryzae</i>	1	

**Tab. 7.1** – Lokusy determinující rezistenci k některým houbovým patogenům u ječmene.

## 7.4 Vztah gen proti genu

Rezistenci rostlin k patogenům dělíme podle genetické determinace na dva základní typy, a to horizontální a vertikální.

### 7.4.1 Horizontální rezistence

Horizontální rezistence, nebo také rasově (genotypově) nespecifická rezistence, je účinná zpravidla proti širokému spektru patotypů parazita. Tato odolnost má vlastnosti typického polygenně založeného znaku. Projevuje se u ní silná interakce genotypu s prostředím. Je

označována jako polní rezistence. Podstatou rezistence je, že rostlina je schopna dokončit svůj životní cyklus dříve, než se patogen dostatečně rozšíří.

#### 7.4.2 Vertikální rezistence

Vertikální rezistence je rezistence rasově specifická. Odolnost tohoto typu je řízena jedním nebo několika málo geny s velkým účinkem (majorgeny) a týká se jediného genotypu patogena. Každá alela určitého lokusu odolnosti u hostitele zabezpečuje odolnost pouze vůči jedinému genotypu patogena. Tyto různé genotypy patogena se fenotypově projevují jako tzv. fyziologické rasy, které se označují jako patotypy.

Genotypy patogena, které nejsou potlačeny genem pro rezistenci, se označují jako virulentní k hostitelské rostlině. Mohou ale být blokovány genotypem jiného jedince populace hostitele. Genotypy patogena schopné překonat různé geny rezistence hostitele se nazývají fyziologické rasy (u hub) nebo kmeny (u bakterií a virů).

Rezistence k patogenům je tím stabilnější, čím více genů hostitele se jí zúčastní. Jestliže při horizontální rezistenci je jeden gen polygenního systému eliminován mutací nebo je překonán mutací patogena, nebude to mít podstatný vliv na stupeň rezistence. Pravděpodobnost, že při horizontální rezistenci patogen překoná všechny geny pro rezistenci hostitele, je téměř nulová. Jednotlivé geny polygenního systému však nelze ve šlechtitelských programech analyzovat. Šlechtitelé se proto spoléhají především na vertikální rezistenci a kombinování více genů velkého účinku pro rezistenci do genomu. Působení genů velkého účinku lze snadno měřit. Vertikální rezistence však není trvalá. Protože mikroorganismy se množí podstatně rychleji než rostliny, také rychleji mutují a jediná specifická mutace může překonat rezistenci hostitele.

Mezi bakteriálními geny avirulence (označovanými *Avr/avr*) a rostlinnými geny rezistence (*R/r*) existuje vztah gen proti genu, který charakterizuje interakci mezi patogenem a rostlinou (tab. 7.2).

Hostitelská rostlina	Patogen	
	Virulentní	Avirulentní
Rezistentní	choroba se neprojeví	choroba se neprojeví
Náchylná	příznaky choroby	choroba se neprojeví

**Tab. 7.2** – Typy interakcí mezi patogenem a hostitelskou rostlinou.

## 7.5 Klasické metody determinace interakcí hostitel – patogen u lnu (*Linum usitatissimum*)

Podstata rezistence lnu (*L. usitatissimum*) ke rzi travní byla objasněna ve 40. a 50. letech 20. století Florem, který analyzoval křížení mezi rezistentními a náchylnými odrůdami lnu a mezi virulentními a avirulentními rasami patogena (rzi travní). Výsledky studia dědičnosti virulence patogena a dědičnosti rezistence lnu ke dvěma rasám rzi jsou uvedeny v tab. 7.3 a tab. 7.4. V tab. 7.3 je uvedena dědičnost virulence a avirulence v potomstvu dvou ras rzi (22, 24). Tab. 7.4 uvádí dědičnost rezistence a náchylnosti v potomstvu dvou odrůd lnu (Ottava, Bombay). Z tab. 7.3 vyplývá, že rasa 22 rzi je virulentní u odrůdy Ottava a avirulentní u odrůdy Bombay. F<sub>1</sub> hybrid je avirulentní u obou odrůd. Rasy 22 a 24 jsou geneticky odlišné a tyto výsledky naznačují, že alela virulence je u obou ras recesivní (protože F<sub>1</sub> je avirulentní u obou odrůd). Potomstvo F<sub>2</sub> je virulentní nebo avirulentní u odrůdy Ottava a virulentní nebo avirulentní u odrůdy Bombay. Potomstvo lze klasifikovat do čtyř skupin: avirulentní u obou odrůd, virulentní pouze u odrůdy Ottava, virulentní pouze u odrůdy Bombay, virulentní u obou odrůd, přičemž počty kultur odpovídají štěpnému poměru 9 : 3 : 3 : 1. Tento mendelistický štěpný poměr se očekává, jestliže alely dvou genů segregují v meióze nezávisle a sledované geny tedy nejsou ve vazbě. Tento výsledek naznačuje, že virulence u odrůd Ottava a Bombay je determinována dvěma geny a tyto geny nejsou ve vazbě. Rasa 22 má genotyp  $a_L a_L A_N A_N$  a rasa 24 má genotyp  $A_L A_L a_n a_n$ .  $A_L/a_L$  a  $A_N/a_N$  jsou různé geny s alelou  $a_L$  determinující virulenci u odrůdy Ottava a alelou  $a_n$  determinující virulenci u odrůdy Bombay.

Tab. 7.4 shrnuje výsledky křížení dvou odrůd lnu Ottava a Bombay a sleduje generaci F<sub>1</sub> a segregující generaci F<sub>2</sub>. U těchto rostlin byl testována náchylnost a rezistence vůči rzi rasy 22 a 24. Odrůda Ottava je náchylná k rase 22 a rezistentní k rase 24, zatímco Bombay je rezistentní k rase 22 a náchylná k rase 24. Potomstvo F<sub>1</sub> získané křížením uvedených dvou odrůd je rezistentní k oběma rasám patogena. Odrůdy Ottava a Bombay jsou geneticky odlišné, a protože rostliny F<sub>1</sub> jsou rezistentní k oběma rasám, alela pro rezistenci je dominantní o obou odrůd. Potomstvo generace F<sub>2</sub> je možné rozdělit do čtyř skupin: rostliny rezistentní k oběma rasám, rostliny rezistentní pouze k rase 24, rostliny rezistentní pouze k rase 22 a rostliny náchylné k oběma rasám. Počty rostlin v jednotlivých kategoriích odpovídají štěpnému poměru 9 : 3 : 3 : 1. Z toho lze vyvodit jednoznačný závěr, že dva geny determinují rezistenci ke rzi rasy 22 a 24 u uvedených dvou odrůd a gen pro rezistenci vůči rase 22 není vázán s genem pro rezistenci k rase 24.

Odrůda Ottava má genotyp  $LLnn$  a odrůda Bombay má genotyp  $llNN$ . Alela  $L$  determinuje rezistenci k alele  $A_L$  genotypu rzi a alela  $N$  determinuje rezistenci k alele  $A_N$  genotypu rzi.

Hostitel (odrůda)	Rasa		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>			
	22	24					
	$a_L a_L A_N A_a$	$A_L A_L a_N a_a$	$a_L A_L a_N A_a$	$A_L^- A_N^-$	$a_L a_L A_a^-$	$A_L^- a_N a_N$	$a_L a_L a_N a_N$
Ottava ( <i>LL nn</i> )	náchylná	rezistentní	rezistentní	rezistentní	náchylná	rezistentní	náchylná
Bombay ( <i>ll NN</i> )	rezistentní	náchylná	rezistentní	rezistentní	rezistentní	náchylná	náchylná
Počet kultur				78	27	23	5

**Tab. 7.3** – Dědičnost virulence dvou ras (22 a 24) rzi (*Melampsora lini*) v jejich potomstvu (*L* kóduje rezistenci k  $A_L$ , *l* kóduje náchylnost k  $A_L$ , *N* kóduje rezistenci k  $A_N$ , *n* kóduje náchylnost k  $A_N$ ,  $a_L$  kóduje virulenci k  $L$ ,  $A_L$  kóduje avirulenci k  $L$ ,  $a_N$  kóduje virulenci k  $N$ ,  $A_N$  kóduje avirulenci k  $A$ ).

Tab. 7.5 shrnuje možné interakce mezi sledovanými genotypy rzi a lnu. Tento model dědičnosti, který je založen na jednom genu rezistence a jednom genu virulence je znám jako model gen proti genu a byl popsán u řady virových, bakteriálních a houbových patogenů rostlin, jež vyvolávají hypersensitivní reakci rezistence. Jedním z rysů tohoto typu interakce, jako u rezistence lnu ke rzi, je recesivní charakter alel virulence. Takové alely vznikají inaktivačními mutacemi. Tento předpoklad naznačuje, že funkční gen (alela) houbového patogena kóduje avirulentní fenotyp (viz inkompatibilní typ interakce popsany dále).

Tento typ rezistence je velmi efektivní při ochraně vůči infekci rostlin a je široce využíván ve šlechtitelských programech. Protože však ztráta funkčních mutací vede k virulenci a protože velikost populace patogena je mnohem větší než u rostlin, je tento typ rezistence nestabilní. Během několika let po introdukci rezistentních alel do genotypu plodiny, se objevují nové mutantní typy patogenů.

**Geny rezistence u lnu**  
 Podstata rezistence lnu (*L. usitatissimum*) ke rzi travní (*Melampsora lini*) byla objasněna ve 40. a 50. letech 20. století Florem. Do dnešní doby bylo identifikováno celkem 7 lokusů (K, L, M, N, P, D, Q) se 34 geny kódujícími rezistenci lnu k tomuto patogenu. V lokusu L bylo popsána alelová série alespoň 13 alel. Každá alela má různou specifitu navozené rezistence. Lokus M je tvořen multigenní rodinou 15 genů.

Patogen Rasa	Hostitel		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>			
	Ottava <i>LL nn</i>	Bombay <i>ll NN</i>	<i>Ll Nn</i>	<i>L- N-</i>	<i>L- nn</i>	<i>ll N-</i>	<i>ll nn</i>
22 <i>a<sub>L</sub>a<sub>L</sub>A<sub>N</sub>A<sub>N</sub></i>	náchylná	rezistentní	rezistentní	rezistentní	náchylná	rezistentní	citlivá
24 <i>A<sub>L</sub>A<sub>L</sub>a<sub>N</sub>a<sub>N</sub></i>	rezistentní	náchylná	rezistentní	rezistentní	rezistentní	náchylná	náchylná
Počet rostlin				110	32	43	9

**Tab. 7.4** – Dědičnost rezistence F<sub>2</sub> potomstev dvou odrůd lnu *Linum usitatissimum* (Ottava, Bombay) ke dvěma rasám rzi (*L* kóduje rezistenci k *A<sub>L</sub>*, *l* kóduje citlivost k *A<sub>L</sub>*, *N* kóduje rezistenci k *A<sub>N</sub>*, *n* kóduje náchylnost k *A<sub>N</sub>*, *a<sub>L</sub>* kóduje virulenci k *L*, *A<sub>L</sub>* kóduje avirulenci k *L*, *a<sub>N</sub>* kóduje virulenci k *N*, *A<sub>N</sub>* kóduje avirulenci k *A*).

Patogen alely genu <i>Avr</i>	Rostlina alely genu rezistence <i>L</i>		Patogen alely genu <i>Avr</i>	Rostlina alely genu rezistence <i>N</i>	
	<i>L</i>	<i>l</i>		<i>N</i>	<i>n</i>
<i>A<sub>L</sub></i>	rezistentní	náchylná	<i>A<sub>N</sub></i>	rezistentní	náchylná
<i>a<sub>L</sub></i>	náchylná	náchylná	<i>a<sub>N</sub></i>	náchylná	náchylná

**Tab. 7.5** – Shrnutí interakcí mezi genotypy rzi a genotypy hostitelské rostliny.

## 7.6 Inkompatibilní vztah mezi rostlinou a patogenem

Inkompatibilní vztah mezi rostlinou a patogenem je výsledkem specifického rozpoznávacího mechanismu mezi genovým produktem rostliny a genovým produktem patogena. V důsledku tohoto rozpoznání dojde k aktivaci obranného mechanismu, který zabrání rozšíření patogena. Kompatibilita mezi hostitelem a patogenem je důsledkem selhání aktivity obranného mechanismu, protože jeden nebo oba potřebné genové produkty se buď nevytvářejí, nebo jsou změněny natolik, že nejsou vzájemně rozpoznány.

Koncepce genů pro avirulenci dobře vysvětluje většinu případů rezistence podmíněné geny velkého účinku. V nejjednodušším případě jde o dvojici genů, z nichž jeden je dominantní gen pro avirulenci patogena  $Avr_L$  a ten je komplementován specifickou dominantní alelou genu rostliny  $R_L$ . Produkt genu pro avirulenci je v interakci s produktem genu pro rezistenci za vzniku projevu rezistence rostliny. Jestliže některý z obou genů není funkční nebo jeho produkt je podstatně změněn, ke vzniku rezistence nedochází.

Ze vztahu gen proti genu je zřejmé, že rezistence může vznikat v důsledku různých typů interakcí a je podmíněna různými geny. Bylo klonováno mnoho genů pro avirulenci z genomů bakterií a některých hub, ale jejich funkce není v některých případech stále jasná. Bakteriální geny pro avirulenci, proti kterým rostlina nemá odpovídající geny pro rezistenci, se ve skutečnosti chovají jako geny pro virulenci a podmiňují patogenezí i u rezistentního hostitele. Naopak inkompatibilitní reakce vede k rychlé blokádě množení patogena v místě infekce. V důsledku toho vznikají nejprve malá ohraničená chlorotická místa a pak obvykle následují nekrózy malých sektorů pletiva (lokální léze). Tato hypersenzitivní odpověď je nespecifická a je obecným projevem rezistence, jak proti houbovým a bakteriálním patogenům, tak proti virům. Je to aktivní obranný mechanismus, ke kterému dochází při kombinacích genotypů hostitele a patogena, které vedou k rezistenci. Je způsobena koordinovanou indukcí různých metabolických aktivit.

Při infekci a hypersenzitivní reakci je stimulována syntéza etylénu tím, že je indukován enzym ACC-syntáza, což je klíčový enzym syntézy etylénu. Etylén stimuluje nekrotizaci, ale stimuluje i mnoho dalších typů odpovědi na patogena.

Interakce mezi rostlinami rajčete a houbovým patogenem *Cladosporium fulvum* je ekvivalentní interakci mezi lnem a rzí *Melampsora lini* a je znázorněna na obr. 7.1. Gen avirulence  $Avr9$  *Cladosporium* kóduje peptid, který funguje jako signální molekula (elicitor) spouštějící hypersenzitivní reakci u rajčete. Odpovídající gen rezistence u rajčete je  $Cf-9$  a pravděpodobně kóduje receptorovou molekulu bohatou na leucin (LRR) pro  $Avr9$  peptid. Interakce peptidu  $Avr9$  a  $Cf-9$  LRR receptoru pravděpodobně způsobuje konformační změny receptoru a ten může fungovat jako první signál pro buňky při HR. Jedinou možnou kombinací alel, která iniciuje HR u rajčete je dominantní alela  $Cf-9$  a funkční alela *Cladosporium*  $Avr9$ . U všech dalších kombinací chybí buď receptor nebo elicitor nebo oba. HR není proto spuštěna a rostlina je náchylná k infekci *Cladosporium*.

Obecně podle teorie gen proti genu dochází k interakci mezi produkty genu  $R$  a genu  $avr$  formou vazby mezi receptorem a elicitorem (ligandem). Tato vazba je nezbytná pro spuštění obranné reakce rostliny.

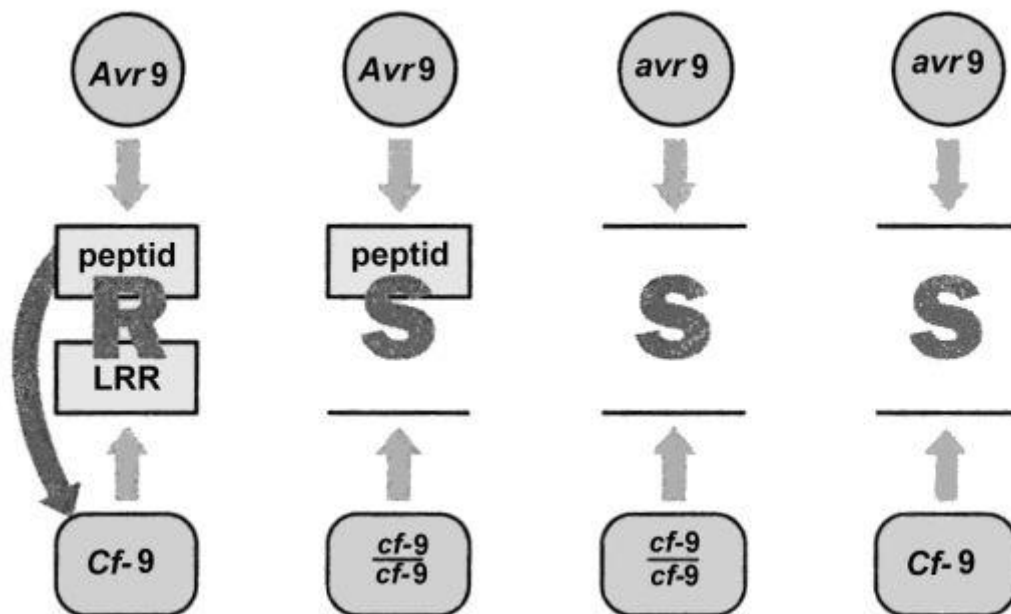
## **7.7 Kompatibilní vztah mezi rostlinou a patogenem**

Při kompatibilní interakci patogena a rostliny dochází k přímému ovlivnění rostliny prostřednictvím produktu genu  $Avr$  patogena bez příznaků hypersenzitivní reakce. Produktem

genu *Avr* bývá nejčastěji toxin, který je u rezistentní rostliny (genotypu *RR* nebo *Rr*) inaktivován konkrétním enzymem, který je produktem aktivní alely genu *R*. Rostlina je „rezistentní“ i vůči patogenu, který neprodukuje toxin (nemá aktivní alelu). Náchylnost rostliny se projeví pouze tehdy, jestliže rostlina není schopna tvořit enzym (je genotypu *rr*) a je napadena virulentním patogenem, který tvoří toxin.

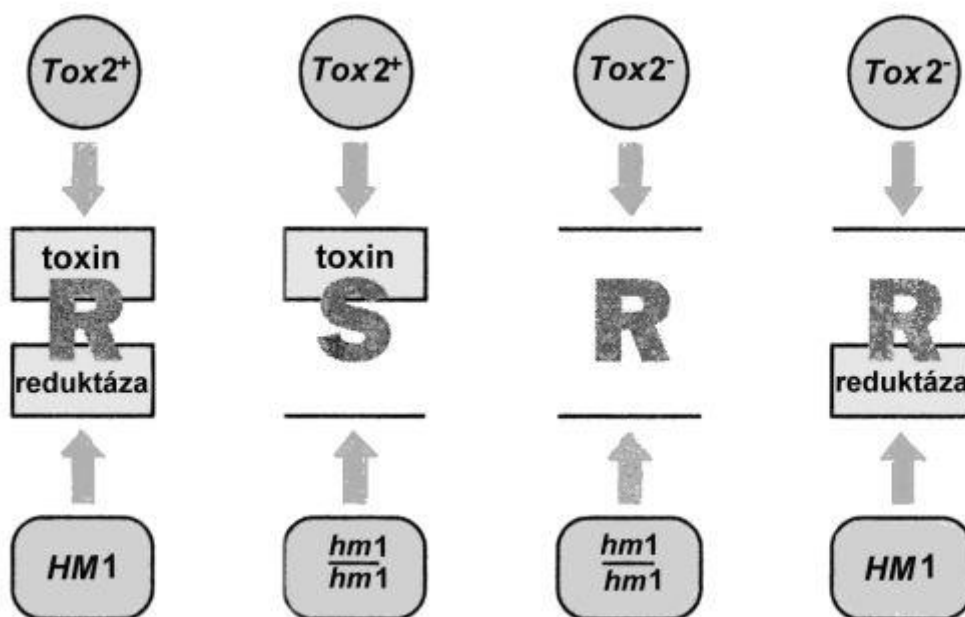
Obr. 7.2 znázorňuje tento typ interakce patogen – rostlina. Houbový patogen *Cochliobolus carbonum* (dříve *Helminthosporium carbonum*) způsobuje listovou skvrnitost a napadá i palice u kukuřice. Rasal *C. carbonum* tvoří cyklický tetrapeptidový toxin (tzv. HC-toxin) a tvorba tohoto toxinu kosegreguje s jedním lokusem *Tox2*<sup>+</sup>. HC toxin inhibuje aktivitu histonové deacetylázy, což ovlivňuje strukturu chromatinu.

Některé genotypy kukuřice jsou rezistentní k infekci *C. carbonum* rasy 1. Rezistence je kódována jaderným genem *HMI*, který je lokalizován na 1. chromozomu. Dominantní (funkční) alela genu determinuje úplnou rezistenci rostliny k *C. carbonum* rasy 1 a tato rezistence je způsobena tvorbou enzymu HC-toxin reduktázy, kódovanou genem *HMI*, který inaktivuje HC-toxin. Obr. 7.2 ukazuje, že jediná interakce, která vede k infekci, je funkční alela *Tox2*<sup>+</sup> houbového patogena a absence funkční alely *HMI* u rostliny. Ztráta funkčních mutací u patogena vede k avirulenci vůči všem genotypům rostlin. To znamená, že rezistence kódovaná genem *HMI* vůči kompatibilnímu genu u *C. carbonum* je stabilnější než rezistence rostlin k inkompatibilním genům virulence určitého patogena.



**Obr. 7.1** – Inkompatibilní typ interakce rostlina *Lycopersicon esculentum* (gen rezistence *Cf-9*) – patogen *Cladosporium fulvum* (gen avirulence *Avr9*). (Zdroj: Hughes, 1996)





**Obr. 7.2** – Kompatibilní typ interakce rostlina *Zea mays* (gen rezistence *HM1*) – patogen *Cochliobolus carbonum* (gen avirulence  $Tox2^+$ ). (Zdroj: Hughes, 1996)

## 7.8 Charakteristické rysy proteinů kódovaných geny *R*

Hlavní úlohu v přenosu signálu pro aktivaci specifických genů *R* pro rezistenci má přenos zprostředkovaný **kinázami**. Modulace fosforylovaného stavu je vůbec jeden z hlavních mechanismů, které živé organizmy používají k řízení aktivity proteinů prostřednictvím signalizační kaskády, která vede k aktivaci specifických transkripčních faktorů, těmi se aktivují např. geny *PR*.

Proteiny kódované rasově specifickými geny rezistence mají charakteristickou strukturu v důsledku přítomnosti konzervovaných domén se specifickými funkcemi. Takovou významnou doménou jsou na leucin bohatá opakování **LRR** (angl. Leucin Rich Repeats). Obsahují zbytky leucinu nebo jiné hydrofobní aminokyselinové zbytky v pravidelných opakováních a mohly by také obsahovat pravidelně uspořádané zbytky prolinu a asparaginu. Domény LRR tvoří terciární strukturu s charakteristickým prostorovým uspořádáním, které se účastní při interakcích mezi dvěma proteiny, interakcí mezi vnitrobuněčnými komponentami kaskády přenosu signálu. Podobné domény jsou známy z interakcí proteinů u živočišných buněk, např. hormonální receptory, které rozpoznávají glykoproteinové ligandy, nebo enzymové inhibitory, které rozpoznávají enzymy. Identifikace těchto domén u produktů genů *R* vedla k hypotéze a předpokladu, že jde o tzv. **rozpoznávací domény** (charakter **receptorů**). Rozpoznávací domény jsou v buňkách lokalizovány buď extracelulárně (vyčnívají ven

z buňky a umožňují interakci s elicitory patogena). Produkty jiných genů *R* mají tyto domény lokalizované v cytoplasmě, což není překvapující, protože viry se množí v buňkách, haustoria hub prorůstají do buněk.

Dále tyto proteiny často obsahují **vazebné místo pro nukleotidy** (NBS, angl. Nucleotide Binding Sites). Většinou toto místo zprostředkovává vazbu ATP nebo GTP. Je tedy zřejmé, že podstatnou součástí molekulárního mechanismu rezistence je vazba nukleotidtrifosfátů na odpovídající proteiny. Tato vazba může ovlivňovat například interakci mezi proteiny, které vznikají expresí genů *R* s dalšími proteiny regulační kaskády. Jde o signální domény se třemi vazebnými místy. Byla potvrzena homologie s proteiny apoptózy u živočišných buněk.

Další doména je označována **TIR** (angl. Toll Interleukin Receptor). Název je odvozen od její homologie s doménami jiných genetických systémů, jako Toll proteinu drozofily a savčího proteinu pro receptor Interleukin-1 a další. Jde o cytoplazmatickou signalizační doménu. Proteiny s těmito doménami jsou klíčovými komponentami imunitního systému, který existuje u mnohobuněčných organismů. Spouští řadu obranných reakcí jako je fagocytóza a exprese bakteriálních a antihoubových proteinů jako jsou defensiny.

**CC domény** (angl. Coiled Coil) jsou místem tvorby dimerů (u transkripčních faktorů eukaryot). Jejich funkce u produktů genů *R* není objasněna.

Některé proteiny obsahují **leucinový zip** – známou doménu jednoho z typů transkripčních faktorů, která se uplatňuje zejména při interakci dvou proteinů.

Další proteiny, kódované geny *R*, obsahují domény typické pro **transmembránové receptory**.

### ***7.8.1 Mechanizmy signalizace napadení patogenem v rostlinné buňce***

Indukce hypersenzitivní reakce elicitory vede k rychlým metabolickým změnám. Mění se aktivita  $H^+$ -ATPázy v plazmalemě, která za normálních podmínek udržuje transmembránový potenciál tím, že přesunuje protony na vnější stranu plazmatické membrány. To vede ke snížení pH cytoplasmy a uvolnění  $Ca^{2+}$ . Vápník jako **druhý posel** vede k aktivaci obranné reakce. Její podstatnou součástí je rychlé ukládání kalózy (D-1,3-vázaného polymeru glukózy, který blokuje plazmodezmata). Následují řetězce dalších biochemických dějů, které vedou k buněčné smrti. Pokud nekróza následuje několik hodin po infekci a únik patogena je blokován, léze bývají omezeny jen na sektory několika buněk.

Při infekci a hypersenzitivní reakci je stimulována syntéza **etylénu** tím, že je indukován enzym ACC-syntáza, což je klíčový enzym syntézy etylénu. Etylén stimuluje nekrotizaci, ale i mnoho dalších typů odpovědi na patogena.

R-proteiny působí jako receptory a detekují mikrobiální signály zprostředkované geny *Avr*. Ty zahrnují přímé a nepřímé produkty genů *Avr* patogena, látky typu chitinu, enzymů a složek

buněčných stěn. Receptorové proteiny jsou produkty genů *R*. Mechanismus signalizace zahrnuje aktivaci kináz, fosfatáz, G-proteinů i změn koncentrace iontů (především  $\text{Ca}^{2+}$ ). Dochází ke zvýšení hladin inozitol trifosfátů a diglycerolu a ke změnám poměru proteinů s vázaným GTP a GDP. Dochází k aktivaci superoxidů kyslíku, přímé indukci transkripce genů pro obranné proteiny, genů pro indukci syntézy kyseliny jasmonové a etylénu. Rychle se zvyšuje především aktivita fenylalaninamonium lyázy (PAL) a chalkonsyntázy (CHS). Po aktivaci prvních odpovědí na patogena dochází k rychlé aktivaci dalších signálních genů a dochází k amplifikaci odpovědi. Je suprimována syntéza histonů a genů buněčného cyklu, což jednak napomáhá apoptóze a jednak umožňuje soustředit síly na obrannou reakci. V posledním stadiu dochází k uzavření plazmodezmat kalózou, v důsledku toho snížení mezibuněčné komunikace a vyhasínání obranné reakce.

### 7.8.2 Klonování genů pro rezistenci k patogenům

Molekulární analýza a klonování genů se většinou zaměřuje na rezistenci, která je kódována jedním genem. Některé geny rezistence u rostlin, které byly zatím klonovány, jsou uvedeny v tab. 7.6.

V zásadě existuje několik možností klonování genů pro rezistenci:

1. Klonování **náhodných sekvencí** (angl. shotgun cloning), rezistentního rostlinného genomu. Po něm může následovat klonování jednotlivých sekvencí do binárních vektorů *Agrobacterium* a přenášení celé populace klonů do rostlinných buněk. Po transformaci rostlin, rezistentních k patogenům je možno selektovat rezistentní rostliny. Vektorový plazmid binárního vektoru, který takovouto rezistenci indukoval, pravděpodobně obsahuje hledaný gen.
2. **Gene tagging**, tedy mutační inaktivace a označování genu. Tento přístup je využitelný zejména u *Arabidopsis thaliana* (T-DNA tagging) a u kukuřice (označování genu včleněním transpozonu, transpozonový tagging). K inzerci T-DNA a transpozónů dochází do více či méně náhodných míst genomu a příslušné mutace je třeba selektovat. Gen, označený včleněním T-DNA nebo transpozonu se pak dá poměrně snadno klonovat.
3. Využití známé **mutace pro senzitivitu** v rezistentní linii k tzv. **pozičnímu klonování genu**. Tento přístup lze použít tam, kde je dobře vysycená molekulární genetická mapa (založená na RFLP, nebo AFLP) a mutace je v těsné vazbě s molekulárním znakem. Potom lze využít přístupu kráčení po chromozómu k nalezení kozmidového nebo jiného vektorového klonu, který pravděpodobně obsahuje daný gen. Přítomnost genu lze potvrdit jednak transgenozí a jednak sekvenováním.

Před více než dvaceti lety byl vytvořen a nyní potvrzen model “gen proti genu”. Podle něho bakteriální geny, které se podílejí na virulenci označené *Avr* (protože jejich mutované recesivní alely *avr* podmiňují ztrátu virulence). Rostlinné geny pro rezistenci se označují *R*. Model. Předpokládám, že geny *Avr* kódují elicitory, které slouží jako ligandy receptorů, kódovaných *R* geny.

První klonovaný *R* gen byl v roce 1992 gen *Hm1* kukuřice, který podmiňuje rezistenci k houbovému patogenu *Cochlioborus carbonum*, jeho rase 1. Gen kóduje NADPH – dependentní reduktázu, která inaktivuje potenciální rostlinný toxin produkovaný tímto kmenem patogena. Zde se jedná o ne zcela typický případ rezistence, protože protein nemá interakci s genem *Avr* patogena, neindukuje hypersenzitivní odpověď a nemá ani další rysy typické pro projev genů rezistence.

Vzápětí byl klonován gen *Pto* rajčete, který podmiňuje rezistenci vůči *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato*, který nese gen avirulence *avrPto*. Gen rezistence kóduje protein kinázu serin-threoninového typu. Jiné klonované geny rezistence kódují proteiny, které obsahují leucinem bohaté opakování (LRR) a řadu dalších oligopeptidových domén, které se často vyskytují v R- proteinech.

U *A. thaliana* byly klonovány dva geny pro proteiny SAR. První z nich na základě mutace *cpr1*, která se vyznačuje konstitutivní expresí PR-genů. Rostliny s tímto homozygotně recesivním genem mají konstantně zvýšenou hladinu SA a zvýšenou rezistenci k bakteriálním a houbovým patogenům. Rostliny s touto konstitutivní aktivací PR-proteinů jsou morfologicky odchylné: mají malé, úzké, tmavě zelené listy, hustě pokryté na spodní straně trichomy a dlouhá plodenství – šešule. Jiná zajímavá mutace opačného typu byla označena *npr1* (*nonsupresor of PR-genes*). Je zde narušen proces přenosu signálu od kyseliny salicylové. Obě mutace byly detegovány u *A. thaliana* s chimérickým transgenem GUS pro  $\beta$ -glukuronidázu, jehož kódující sekvence je zapojena za promotor pro  $\beta$ -1,3-D-glukanázu. Mutace *cpr1* byla zjištěna na základě konstitutivní exprese genu GUS, mutace *npr1* na základě její absence při pěstování klíčnicích rostlin na mediu s kyselinou salicylovou.

Na základě poznání, že mechanismy rezistence jsou obecné a obecné jsou i geny, které se účastní, při přenosu signálu pro rezistenci byly vybrány oligonukleotidy ze sekvenčních databází, které byly konzervativní u klonovaných genů pro rezistenci mezi tabákem a *A. thaliana*. Amplifikací podle DNA bramboru byly získány homology známých genů pro rezistenci a bylo zjištěno, že mohou sloužit jako sonda ke klonování předpokládaných, ale dosud neklonovaných genů pro rezistenci k hád'átku a k *Phytophthora infestans*. To ukazuje, že geny pro rezistenci k hád'átku jsou homologní ke známým, ale dosud neklonovaným genům a mohou být využity k jejich klonování pomocí PCR.

Rezistence k patogenům je tím stabilnější, čím více genů hostitele se jí zúčastní. Jestliže při horizontální rezistenci je jeden gen polygenního systému eliminován mutací nebo je překonán mutací patogena, nebude to mít podstatný vliv na stupeň rezistence. Pravděpodobnost, že při horizontální rezistenci patogen překoná všechny geny pro rezistenci hostitele, je nulová. Jednotlivé geny polygenního systému však nelze ve šlechtitelských programech analyzovat. Šlechtitelé se proto spoléhají především na vertikální rezistenci, kombinování (pyramidování) genů velkého účinku pro rezistenci v genomu. Působení genů velkého účinku lze snadno měřit. Vertikální rezistence však není trvalá. Protože mikroorganizmy se množí podstatně

rychleji, než rostliny, také rychleji mutují a jediná specifická mutace může překonat rezistenci hostitele.

Hostitel	Gen	Patogen	Gen virulence	Metoda klonování	Interakce
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Cf-9</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr9</i>	I	inkompatibilní
<i>Zea mays</i>	<i>HM1</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>	<i>Tox2</i>	I	kompatibilní
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>PTO</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>avrPto</i>	I	inkompatibilní
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RPS2</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>maculicola</i>	<i>avrRpt2</i>	K	inkompatibilní
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>N<sup>1</sup></i>	virus mozaiky tabáku	<i>CP</i>	I	inkompatibilní
<i>Linum usitatissimum</i>	<i>L<sup>6</sup></i>	<i>Melampsora lini</i>	<i>a<sub>L6</sub></i>	I	inkompatibilní

**Tab. 7.6** – Známé geny kódující rezistenci rostlin k některým patogenům, které byly izolovány přístupem inzerční metagenese, transpozonovým taggingem (I), kráčením po chromozomu (K).

Hostitel	Gen	Patogen	Typ proteinu
<i>Linum usitatissimum</i>	<i>L, P, M</i>	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
<i>Nicotina tabacum</i>	<i>N</i>	Virus mozaiky tabáku	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RPP1, RPP</i> <i>RPS4</i>	<i>Peronospora parasitova</i> <i>Pseudomonas syringae</i>	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Prf</i> <i>Mi</i>	<i>P. syringae</i> <i>Meloidogyne incognita</i>	CC-NBS-LRR
<i>brambor</i>	<i>Gpa2/Rx1</i>	<i>Glodobera</i> (nematoda),	

		virus X bramboru	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RPS2, RPS5, RPM1 RPP8/HRT</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>Peronospora</i>	
pepper	<i>Bs2</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	NBS-LRR
Locika	<i>Dm3</i>	<i>Bremia lactuca</i>	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>I2</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	
<i>Tritium aestivum</i>	<i>Cre3</i>	<i>Heterodera avenae</i>	
<i>Oryza sativa</i>	<i>Xa1</i> <i>Pib, Pi-ta</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> <i>Magnaporthe grisea</i>	
<i>Zea mays</i>	<i>Rp1</i>	<i>Puccinia sorghi</i>	
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Mla</i>	<i>Blumeria graminis</i>	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RRS1-R</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Kináza
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>PBS1</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Rpg1</i>	<i>Puccinia graminis</i>	Kináza-Kináza
<i>Oryza sativa</i>	<i>Xa21</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>	LRR-TM-Kináza
<i>Beta vulgaris</i>	<i>HS1pro-1</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Jedinečný
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RPW8</i>	<i>Erysiphe</i>	
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>mlo*</i>	<i>Blumeria graminis</i>	Membránový protein
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Ve1</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>	Glykoprotein buněčného

			povrchu
<i>Zea mays</i>	<i>Hm1*</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>	Toxin reduktáza

LRR leucine-rich repeat, NBS nucleotide binding site, CC coiled coil, TIR Toll interleukin receptor, NLS nuclear localisation signal, WRKY transkripční faktor, TM transmembrane, \* rasově nespecifická rezistence

**Tab. 7.7** – Klasifikace klonovaných genů rezistence u rostlin

## **7.9 Obrana před parazity a predátory: antinutriční faktory rostlin**

Parazité rostlin jsou především hmyz a háďátka (nematoda), predátoři jsou herbivorní živočichové. Rostliny se proti parazitům a predátorům (ale také proti mikroorganismům) brání především sekundárními metabolity. Ty patří do různých skupin, jako fenoly, terpenoidy, dusíkaté sloučeniny. Některé jsou konstitutivně přítomné, jiné jsou indukovatelné. Existují ve velkém množství heterogenních skupin a zde budou uvedeny jen některé příklady.

### **7.9.1 Konstitutivně přítomné toxiny**

Mnoho rostlinných druhů hromadí toxiny v průběhu celého vývoje. Například čekanka (*Cichorium intybus*) je chráněna třemi seskviterpenovými laktony, které jsou toxické a mají hořkou chuť. Jsou sekretovány v latexu v rostlině a hromadí se zvláště v místě poranění. Tím dochází ke kumulaci několika mechanismů antifeedantů. Podobné hořké laktony jsou také u salátu, ale tam byla při šlechtění proti nim prováděna selekce, takže dochází k okusu slimáky a dalšími škůdci.

### **7.9.2 Indukovaná akumulace toxinů.**

Syntéza toxinů může být zcela indukovaná (např. u fytoalexinů), nebo jsou toxiny v nízké hladině přítomny konstitutivně, ale jejich množství se zvyšuje při působení různých stresových faktorů. Například v rostlinách *Nicotiana glauca* je stále přítomen nikotin a normikotin, ale jeho množství se zvyšuje na dvojnásobnou až pětinasobnou hodnotu při okusu parazity nebo mechanickém poškození.

### **Přednostní ochrana ohrožených pletiv**

Parazity bývají ohroženy mladé listy podstatně více než listy staré. V korelaci s tím jsou toxické látky syntetizovány především mladými listy. V mladých listech kávovníku dochází k akumulaci kofeinu v množství až 4 % sušiny a se stárnutím listů se obsah kofeinu postupně snižuje. Koncentrace kofeinu v mladých kávových zrnech je asi 2 % sušiny a se zráním se snižuje na pouhých 0,24 % sušiny.

## *Syntéza hmyzích hormonů rostlinnými pletivy*

Mnoho rostlinných druhů syntetizuje a hromadí velká množství hmyzích hormonů, jde zvláště o analog juvenoidních hormonů, které narušují normální metamorfozu hmyzu. Koncentrace aktivního analogu juvenoidního hormonu je v šáchoru (*Cyperus iria*) 150x vyšší, než množství v pletivech hmyzu. Kromě toho existují rostlinné analogy svlékacích hormonů hmyzu. Ty rovněž narušují metamorfózu a způsobují sterilitu hmyzu.

## *Variabilita chemického složení antinutričních látek a toxinů*

Stromy mohou obsahovat v listech různá množství taninů (kondenzovaných fenolů), které mají svíravou chuť. Rozšířenými toxickými látkami jsou kyanogenní glykosidy. Ty jsou akumulovány ve vakuolách rostlinných buněk. Při požití dochází k narušení vakuol a glykosidy přicházejí do styku s cytoplazmatickými lytickými enzymy za uvolňování kyanovodíku. Kyanogenní glykosidy mají hořkou chuť, a proto se jim herbivora vyhýbají.

Brukev zelná produkuje isothiokyanáty (hořčičné oleje), které vznikají hydrolýzou glukosinolátů po poranění.

## *Uchovávání sekundárních metabolitů v rostlině*

Sekundární metabolity jsou toxické i pro rostlinu, která je produkuje. Jsou obvykle uchovávány v neaktivních formách jako glykosidy, estery nebo peptidy. V této formě jsou zpravidla rozpustnější a obvykle jsou uloženy ve vakuolách. Jsou uvolňovány při narušení pletiva parazity nebo herbivory. Mohou však někdy být také uchovávány v trichomech (zvláště terpenové oleje v sekrečních trichomech). Trichomy mohou po narušení produkovat nejen toxiny, ale také šťávu, která má lepkavou konzistenci a způsobuje přilepení hmyzích škůdců k rostlině a jejich úhyn.

## *Inhibitory proteáz*

Poranění rostlin v důsledku napadení parazity a predátory vede k indukci syntézy inhibitorů proteáz, které působí na živočišné a mikrobiální, ne však na rostlinné proteázy. Proteázy blokuje odbourávání v potravě přijatých proteinů a působí tak jako antifeedanty. Jsou to polypeptidy, různé inhibitory trypsinu a chymotrypsinu, které byly zjištěny v listech bramboru a rajčete, v semenech vikvovitých rostlin a jinde. Poranění nejprve uvolňuje endogenní elicitor, nazvaný indukční faktor inhibitoru proteázy. Současně vzniká látka, která proniká do ostatních částí rostliny a rovněž indukuje (na úrovni transkripce) syntézu inhibitorů proteáz. Ty se pak hromadí ve vakuolách a rostliny jsou připraveny na obranu před cizopasníky.

Systemin je signální molekula, peptid o osmnácti aminokyselinách, a je to forma prekurzorového proteinu, která vzniká po poranění. Dochází k jejímu transportu na vzdálená místa a tam se váže na receptorové molekuly na cytoplazmatické membráně buněk listů. Ty



uvolňují hormon, kyselinu jasmonovou, a ta již pravděpodobně přímo indukuje syntézu inhibitorů proteáz. Transgenoze tabáku genem pro inhibitor proteázy rajčete s konstitutivním promotorem vedla k rezistenci k larvám motýla *Manduca sexta*.

U rostlinných zásobních orgánů (semen, hlíz) jsou inhibitory proteáz konstitutivně přítomny. Uplatňují se tam současně jako frakce zásobních proteinů.

## 8. Genetika odolnosti rostlin k abiotickým stresovým faktorům

Vliv stresových faktorů na rostliny se projevují snižováním její vitality a u kulturních plodin také snižováním výnosů. Proto šlechtění odolných genotypů je v popředí zájmu šlechtitelů. Jsou nezbytné znalosti mechanismů odolnosti k jednotlivým typům stresových faktorů, znalosti molekulárních mechanismů, genetická determinace odolnosti a s tím možnost identifikace genů podílejících se na odolnosti. Posledním stupněm je izolace genů a jejich případné využití při genetických modifikacích. Toto vše vyžaduje studium a výzkum, který se provádí u modelových druhů jako je *Arabidopsis*, tabák, rýže, vojtěška aj. V současné době se tyto studie rozšiřují i na významné kulturní druhy s velkými genomy.

Odpovědí na stres je **aklimatizace** rostlin, která je jen dočasná a má určitou prahovou hodnotu. Při působení stresu dochází (1) nejdříve k **přestavbě buněk** poškozených stresem a ke **změnám metabolismu** prostřednictvím aktivace genů, což vede k syntéze specifických **stresových bílkovin**. Patří sem různé skupiny enzymů a proteinů, které eliminují poškození. Pokud je poškození buněk nevratné, (2) dochází k jejich **eliminaci**. Uplatňuje se aktivita apoptotických drah, což vede k programované buněčné smrti. V důsledku exprese genů, které jsou součástí programované buněčné smrti se aktivují enzymy, které způsobují fragmentaci poškozené DNA, fragmentaci buněk apod.

Jako abiotické stresové faktory působí

1. fyzikální stresy (sucho, vysoké a nízké teploty, poranění a další mechanické stresy),
2. chemické stresy (oxidativní stres, nedostatek kyslíku v půdě, zasolení půdy, toxické ionty v půdě, nadbytek těžkých kovů, nadbytek ozonu, přesevětlení).

Rezistence k fyzikálním a chemickým faktorům může být také horizontální a vertikální, podobně jako rezistence k patogenům. Zpravidla se uplatňují oba typy mechanismů společně. Rezistence ke každému faktoru má svůj molekulární mechanismus a tedy i své genetické založení a současně mají různé rezistence některé společné proteiny, enzymy a geny.

Rostlina se stresům brání jednak trvale přítomnými, konstitutivními prostředky a jednak indukcí exprese specifických genů, které vedou k syntéze specifických proteinů. Jako existuje mnoho typů stresů, existuje i mnoho typů genů pro genetické odpovědi. Každý stres vyvolává expresi jiné skupiny genů, i když některé členy se mohou překrývat.

Zatímco u některých typů stresů jsou poměrně podrobné informace o zúčastněných stresových proteinech a jejich genech, u jiných tato informace chybí. Budou uvedeny základní mechanismy známé přirozené ochrany rostlin. Pokud to bude možné, tato informace bude doplněna i základní informací o mechanismech ochrany jiných taxonů než rostlin. To je

zvláště významné, pokud zde existují mechanismy rezistence podmíněné geny, o jejichž přenášení do rostlinného genomu by bylo možné uvažovat.

Rostliny, vzhledem k přisedlému způsobu života, si v průběhu fylogeneze vyvinuly velmi bohaté genetické mechanismy, které jim umožňují vyrovnávat se s různými typy stresů. Základní regulační odpověď je přitom obvykle na úrovni transkripce.

Odolnost ke stresovým faktorům spočívá v tom, že stresový faktor dočasně aktivuje fyziologické procesy, ale také specifické geny, které poskytují ochranu. Stresové proteiny mají dlouhou životnost (až stovky hodin) a jestliže se rostliny se stejným stresovým faktorem setkají opakovaně v dohledné době, jsou proti nim chráněny od samého začátku.

## 8.1 Sucho (vodní deficit)

Ve světovém měřítku je sucho nejvýznamnější faktor, který omezuje produktivitu rostlin. Očekávané globální oteplování by mohlo vést k dalšímu zesílení těchto vlivů. Nicméně rostliny mají obranné strategie, kterými se jim brání.

- Dokončení citlivých stadií životního cyklu ještě před objevením se sucha jako stresového faktoru. Pokud dojde ke kritickému snížení obsahu vody v půdě během léta, rostliny, které vykvetly a nasadily semena brzy, nejsou suchem postiženy, zatímco u rostlin s pomalejším vývojem je riziko postižení suchem mnohem větší. **Krátký životní cyklus** je tedy jedna ze strategií ochrany proti suchu.,
- Při nedostatku vody rostliny reagují jednak **zamezením odpařování z listů** a jednak zvýšením příjmu vody kořeny. Protože rostliny mají voskovou kutikulu, výdej vody je regulován hlavně stupněm otevření průduchů. Jelikož fotosyntéza vyžaduje otevření průduchů, jejich zavření při vodním deficitu brání zvýšení fotosyntézy.
- Specifický typ ekonomie hospodaření s vodou mají **tučnolisté rostliny**. Ten se označuje CAM (crassulacean acid metabolism). Listy jsou přeměněny v trny a lodyhy jsou zduřelé a slouží současně jako fotosyntetické orgány i zásobárna vody. Příjem CO<sub>2</sub> je časově oddělen od fotosyntézy.
- Tolerance k suchu je vyvinuta zvláště u pouštní rostliny *Craterostigma plantagineum*, která může úplně vyschnout a zmenšit svou hmotnost na několik procent původní hmotnosti. Po přijetí vody je znovu schopna života a růstu.

Geny, které reagují na vodní deficit, mohou být rozděleny do 3 skupin podle citlivosti ke kyselině abscisové (ABA):

1. **Neresponzivní k ABA.** Expres těchto genů je regulována vodním deficitem, ale ne dodáním ABA rostlině zvnějšku.
2. **Responzivní k ABA.** Expres těchto genů je indukována buď vodním deficitem, nebo aplikací ABA.
3. Geny, které ke své expresi **vyžadují ABA.**

U genů druhé skupiny je známa promotorová sekvence **ABA-responzivního elementu** (ABRE), PYACGTGGC.

Geny, které reagují na ABA, se částečně překrývají s geny, které reagují na vodní deficit **Responzivní element vodního deficitu** (dehydration responsive element DRE) má sekvenci TACCGACAT.

### **8.1.1 Vliv kyseliny abscisové na vodní režim**

Při vadnutí listů se rychle zvyšuje hladina ABA v rostlině. Může se zvýšit 10krát až 50krát v průběhu 20 až 30 minut. ABA podmiňuje uzavírání průduchů; začíná již tehdy, jestliže se hladina ABA zvýší na dvojnásobek. Ve skutečnosti otevírání a zavírání průduchů je důsledkem interakce mezi ABA, hladinou CO<sub>2</sub> a světlem.

### **8.1.2 Vliv osmoticky aktivních látek jako ochrana před dehydratací**

V průběhu dehydratace osmoticky aktivní látky poskytují ochranu buněčným komponentám a strukturám buněk. Jedná se především o určité **polysacharidy** (manitol, trehalóza, sorbitol, fruktany), které mají schopnost nahrazovat vázané molekuly vody v makromolekulách a na povrchu membrán. To umožňuje zachování plné funkčnosti membrán. Současně ABA indukuje na úrovni mRNA syntézu skupiny proteinů o poměrně nízké molekulové váze, tzv. **dehydrinů**, které mají podobnou funkci jako osmotika.

Zvláště velký počet těchto proteinů je indukován u již uvedené pouštní rostliny *Craterostigma plantagineum* a geny pro některé z nich byly klonovány a budou využívány při transgenozí a k hledání obdobných genů u jiných rostlin.

Při působení sucha dochází k expresi různých skupin cílových genů s ochrannou funkcí; jsou to především **geny LEA** (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT*) a geny pro dehydriny,

## **8.2 Chlad**

Některé tropické rostliny jsou silně citlivé na chlad a jsou poškozeny již teplotami pod +10 °C. Naopak ozimé rostliny zvyšují svou rezistenci k mrazu, jestliže byly předem vystaveny teplotám těsně pod bodem mrazu (aklimatizace). Například neaklimatizované rostliny žito jsou sice poškozovány teplotou -5 °C, ale aklimatizované rostliny přežívají teplotu -30 °C. Například špenát a vojtěška snesou -10 °C.

Poškození mrazem má různé formy; od ztráty schopnosti rychlého růstu, přes vadnutí, chlorózu, sterilitu až po uhynutí. Dochází k porušení procesů fotosyntézy, dýchání, zastavení proudění cytoplazmy a ke **změnám permeability membrán**. Existuje hypotéza, podle které primárními citlivými místy jsou především membrány. Ty svým chladovým poškozením rozbíhají kaskádu jevů, které mají za následek různé další typy poškození. Při snížení teploty

pod bod mrazu dochází k tvorbě krystalů ledu nejdříve v mezibuněčných prostorech. Bod tuhnutí apoplastických tekutin je vyšší, než bod tuhnutí nitrobuněčné vody. V následující fázi dochází ke vzniku gradientu mezi mrznoucí vodou apoplastu a nemrznoucí cytoplazmatickou vodou a k přemísťování nitrobuněčné vody do mezibuněčných prostor. Dochází tím k silné **dehydrataci a kontrakci protoplastů buněk**. Rostliny zchlazené na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  ztrácejí více než 90 % aktivní vody. Současně dochází k různým typům **mechanického poškození membrán**. Při tání dochází k opačnému procesu, kdy se voda pohybuje zpět z mezibuněčných prostor do cytoplasmy.

Předpokládá se, že o senzitivě (tím i permeabilitě) buněčných membrán k chladu rozhoduje stupeň nenasycenosti (počet dvojných vazeb) specifického fosfolipidu, fosfatidylglycerolu. To, že stupeň nenasycenosti mastných kyselin ve fosfatidylglycerolu má vliv na stupeň mrazuvzdornosti, bylo experimentálně prokázáno, i když z tohoto důkazu nevyplývá, že by to byl obecný rozhodující faktor mrazuvzdornosti.

Tabák, který je citlivý k chladu, byl transformován genem pro glycerol-3-fosfát acetyltransferázu jednak z tykve, která je ještě citlivější k chladu a jednak z *Arabidopsis*, která je mrazuvzdorná. Transgenní rostliny tabáku s genem z tykve měly nižší úroveň nenasycených mastných kyselin ve fosfatidylglycerolu než netransformované tabáky a byly citlivější k chladu. Naproti tomu transgenní rostliny s genem z *A. thaliana* měly vyšší hladinu nenasycených mastných kyselin ve fosfatidylglycerolu než netransformované tabáky a také vyšší stupeň rezistence k nízkým teplotám. Výsledky studia mutací *A. thaliana* však podporují tento závěr jen částečně. Gen *FAD2* kóduje mikrozomální 18:1 desaturázu. První číslo poměru u mastných kyselin znamená celkový počet atomů uhlíku, druhé počet dvojných vazeb. Mutace v tomto lokusu silně snižuje podíl 18:2 a 18:3 mastných kyselin ve fosfatidylcholinu, což je nejhojnější lipid vyskytující se v pletivech, který není vázán na chloroplasty. Mutace *fad2-2* je skutečně citlivější k nízkým teplotám, ale rozdíl proti nemutovanému typu se projevují až po delší době působení nízké teploty. U *Arabidopsis* je známo ještě osm dalších nealelních mutací se změněným složením lipidů, které mají méně nenasycených mastných kyselin a tři z nich mají zvýšenou citlivost k chladu.

Kromě změn membrán dochází při působení nízké teploty ještě k řadě dalších změn; dochází k indukci nových izoenzymů, zvýšení obsahu cukrů a rozpustných aminokyselin, zvýšení hladin prolinu a organických kyselin (fungují jako **osmoprotektanta**). Některé z těchto změn pravděpodobně mají vliv na stupeň odolnosti k chladu. Kromě toho dochází k syntéze některých rozpustných proteinů, které se při chladu hromadí a rovněž zvyšují odolnost k chladu. Například u špenátu a zelí byl zjištěn protein, který má ochranné vlastnosti k chladu a je při stejné molární koncentraci 10 000krát účinnější než sacharóza z hlediska ochrany thylakoidů chloroplastů před poškozením chladem.

### **8.2.1 Oxidativní stres**

Porušení metabolismu kyslíku a vznik jeho aktivních forem je zdrojem oxidativního stresu. Hlavním zdrojem toxických kyslíkových radikálů u rostliny je transport elektronů ve fotosyntetickém řetězci v důsledku spoluexistence vysoce aktivních elektronů a tvorby kyslíku v jedné organelle, chloroplastech. Tvorba aktivních forem kyslíku v závislosti na světle se nazývá fotooxidativní stres, který je indukovaný i účinkem nízké teploty v normálních světelných podmínkách. Tvorba aktivních forem kyslíku je důsledek transportu elektronů ve fotosyntetickém řetězci v kyslíkovém prostředí. Rostliny si během evoluce vyvinuly systém na odstranění toxických forem kyslíku. Fotoinhibice a fotooxidace se všeobecně vyskytují jen ve stresových podmínkách.

Aktivní formy kyslíku jsou singletový kyslík, superoxidový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíku. Podobná situace se vyskytne i v době sucha, to je při uzavírání průduchů s cílem snížení ztrát vody. Aktivní formy kyslíku způsobují peroxidaci lipidů, ale značně poškozují i proteiny. Proces probíhá mechanismem řetězové reakce volných radikálů; nejčastěji postihuje vícenenasycené mastné kyseliny, protože obsahují větší počet dvojných vazeb, mezi nimiž se nacházejí skupiny  $-CH_2$  se zvláště reaktivními vodíky. Radikál mastné kyseliny není příliš stabilní molekula, proto snadno oxiduje s molekulárním kyslíkem a tvoří peroxylový radikál mastné kyseliny. Ten je také nestabilní a reaguje s dalšími molekulami mastné kyseliny, přičemž tvoří jiný kyselý radikál a lipidový peroxid nebo cyklický peroxid. Tento cyklus pokračuje a zastaví se v okamžiku, kdy dva radikály vytvoří neradikálovou molekulu. Není-li reakce dostatečně rychle ukončena, poškodí buněčnou membránu, která sestává hlavně z lipidů. Také oxidace různých funkčních skupin v proteinech, např. vznik různých disulfidických vazeb, je příčinou denaturace proteinů. Denaturace proteinů vyvolává nejen nízká teplota, ale i vysoká teplota. Důkazem je akumulace chaperonů typických pro vysokou teplotu i při nízkých teplotách.

Detoxikační systémy pro odstranění aktivních forem kyslíku jsou neenzymatické a enzymatické. Neenzymatické antioxidanty jsou malé molekuly jako např. kyselina askorbová, glutathion, alfa-tokoferol, karotenoidy, flavonoidy, polyamidy a různé cukry. Detoxikace toxických forem kyslíku enzymatickou cestou je katalyzována různými enzymy jako je superoxiddismutáza, askorbát- a glutathionperoxidáza, monoaskorbátreduktáza, dehydroaskorbátreduktáza, glutathionreduktáza a kataláza. Neenzymatické a enzymatické detoxikační mechanismy se aktivují v podmínkách nízké teploty a sucha.

### **8.2.2 Genetická determinace odolnosti**

Odolnost k chladu se geneticky hodnotí jako kvantitativní znak. Působení chladem vede k objevení řady typů nových mRNA a nových polypeptidů. Byla sledována spektra proteinů u rostlin při normální teplotě a při chladu. U *A. thaliana* bylo zjištěno v chladu asi 10 až 20 nových proteinů, které přibyly k několika stovkám polypeptidů listů, rozlišitelných dvojrozměrnou gelovou elektroforézou. Současně bylo u tohoto objektu detekováno přes 10

genů, k jejichž expresi dochází v podstatně zvýšené míře při chladovém působení. Všechny geny byly klonovány. Vysoká hladina mRNA těchto genů přetrvává tak dlouho, jak dlouho trvá nízká teplota a pak se vrací k původním nízkým až nulovým hodnotám.

Pozoruhodnou vlastností většiny těchto genů je to, že mohou být aktivovány i při normální teplotě působením ABA. Je známo, že působení ABA zvyšuje toleranci k nízkým teplotám u širokého spektra rostlinných druhů. Současně se u mnoha rostlinných druhů hladina ABA alespoň dočasně zvyšuje po působení nízké teploty. Mutace *A. thaliana* s poruchou biosyntézy ABA jsou velmi citlivé k nízké teplotě. Nízké teploty tedy zřejmě podmiňují zvýšenou syntézu ABA a ta způsobuje změny genové exprese, které vedou ke zvýšení chladové tolerance. Promotory některých genů indukovaných chladem mají známé krátké sekvenční úseky, typické pro regulaci prostřednictvím ABA. Předpokládá se, že uvedené geny kódují polypeptidy s kryoprotektivním účinkem. O jednom z nich (genu *A. thaliana* označeném *KINI*) bylo prokázáno, že kóduje protimrazový protein, podobný těm, které produkují některé arktické ryby a některé druhy hmyzu. Tyto proteiny snižují bod mrznutí roztoku a současně mohou ovlivňovat krystalizaci ledu.

Geny indukované chladem u *A. thaliana* jsou dosti specifické. Některé homologní geny se našly u jiných druhů čeledě *Brassicaceae*, ale ne u jiných čeledí. Zdá se, že geny pro proteiny indukované chladem jsou do značné míry druhově specifické (tzv. geny *COR*, *COLD REGULATED*).

Nízká teplota je hlavním vnějším faktorem, který omezuje geografickou distribuci rostlin. Rostliny mírného pásma mohou zvyšovat svou toleranci k mrazu, jestliže byly předtím umístěny v prostředí při nízké teplotě nad bodem mrazu. Tento proces, který se nazývá aklimatizace k chladu, zahrnuje změny genové exprese a z toho vyplývající změny enzymových aktivit a hromadění kryoprotektantů, jako jsou například polyaminy.

### **8.2.3 Proteiny a adaptace**

Hlavní poškození, které vzniká chladem, je důsledkem narušení funkce chloroplastů. Ustává syntéza některých významných proteinů a obnovuje se po přenesení do laboratorní teploty. Teplota, při které k chladovému šoku dochází, je velice různá v různých rostlinných taxonech a pohybuje se od 0 do +12 °C. Ochlazení vede k přerušení syntézy některých proteinů, ale současně k iniciaci syntézy nových typů proteinů, jako proteinů thylakoidů a membrán chloroplastů, které mají ochrannou funkci (protein 35 kD a další).

Adaptační proces znamená aktivaci genů, jejichž produkty zabezpečí metabolismus rostliny v nových podmínkách. V případě nízké teploty se aktivují proteiny s 1) ochrannou funkcí – kryoproteiny, 2) stabilní izoformy jednotlivých proteinů, které nahradí izoformy labilní při nízké teplotě, 3) proteiny, které zabezpečí propustnost membrán, tzv. **desaturázy**. U odolných rostlin se vlivem nízké teploty mění složení buněčné membrány, zvyšuje se hladina fosfolipidů a proběhne denaturace nasycených mastných kyselin. Enzymy desaturázy zabudovávají dvojnou vazbu do řetězce mastných kyselin. Dvojitá vazba v dlouhém řetězci

vyvolává zlom v prostorové struktuře rovného saturevaného řetězce, což zvyšuje propustnost membrán. Geny jednotlivých desaturáz jsou silně aktivované při nízkých teplotách u vyšších rostlin, ale i u cyanobakterií.

Při velmi nízkých teplotách pod 0 °C hraje v ochraně buněk důležitou úlohu tzv. **protimrazové proteiny**. Velmi citlivým místem tvorby ledových krystalů u rostliny je apoplast a xylém. U žita, které snáší až -30 °C, se zde při nízkých teplotách akumulují některé proteiny, které inhibují tvorbu ledových krystalů. Bylo identifikováno 7 takových proteinů, které měly 75 až 88% identitu se skupinou PR proteinů. Byly identifikovány proteiny typu endo-β-1,3-glukanáz, endochitináz, typu osmotinu a thaumatinu a jejich pravděpodobný původ je z PR proteinů, které se dále specializovaly jako tzv. protimrazové proteiny. Kryoprotektivní účinky mají i některé nízkomolekulární látky, jako je prolin, glycin betain a různé polyamidy. Tyto látky hrají důležitou roli při osmotické toleranci rostliny, i v toleranci k nízkým teplotám, suchu, protože vysoká koncentrace solí narušuje příjem vody.

Největší ochrannou skupinou proteinů jsou **LEA proteiny**. Dělí se do 6 skupin podle struktury. Do první skupiny patří proteiny, které mají zvýšenou kapacitu vázat molekuly vody a tak zvyšují hydrataci okolních molekul. Druhá skupina je největší a patří sem více než 30 proteinů s chaperonovou funkcí, které zachovávají strukturu různých proteinů v podmínkách nízkého obsahu vody v buňce. Třetí skupinu tvoří proteiny schopné vázat ionty, stejnou funkcí mají proteiny páté skupiny, ale mají jinou strukturu. Do čtvrté skupiny patří proteiny, které chrání membrány tím, že nahrazují molekuly vody navázáním na membrány.

#### **8.2.4 Proteiny COR a geny COR**

**Primárním signálem** v **signalizační kaskádě** je stresový faktor. Jedním z prvních kroků signalizace a dalšího přenosu signálu je dočasné zvýšení buněčné **hladiny vápníku** a tím narušení homeostázy Ca. Dočasná změna koncentrace Ca v cytosolu je nezbytná pro aktivaci mnoha procesů v buňce. Úloha Ca jako sekundárního přenašeče signálů v buňce byla zjištěna i v případě nízké teploty, která vyvolala přechodné změny v koncentraci cytoplazmatického Ca a aktivovala Ca kanály. Významnou úlohu přitom hraje i **kyselina abscisová**. **Proteinkinázy** fungují jako všeobecný receptor v signalizaci abiotických stresových faktorů, které ovlivňují vodní režim rostliny a tím vyvolávají dehydrataci a změny v propustnosti membrán. Zvyšuje se rovněž hladina **MAP kinázy** (mitogen aktivní proteinkinázy).

Výsledkem fosforylačních kaskádových reakcí je aktivace trans-elementů (transkripčních faktorů) buňky, které navázáním na cis-elementy promotorů přímo regulují expresi genů.

Dochází k aktivaci mnoha specifických genů a exprese přetrvává po celou dobu působení nízké teploty. Jsou to geny pro respirační enzymy, enzymy metabolismu karbohydrátů, lipidů, fenypropanoidů a antioxidantů, molekulárních chaperonů, protimrazových proteinů a mnoha dalších.



Kromě regulace exprese genů na úrovni transkripce jsou důležité i posttranskripční a posttranslační regulační mechanismy.

Chladové působení v různých fázích vývoje rostliny je procesem jarovizace, který je nutný k indukci kvetení v pozdějších fázích. Hlavní složkou odolnosti k chladu je tolerance buněk k podstatným ztrátám vody, způsobeným přítomností krystalků ledu v mezibuněčných prostorách. Voda v apoplastu má nižší osmotickou hodnotu než voda v cytoplasmě a mrzne tedy dříve. Mrznutí vody v apoplastu vede ke snižování vodního potenciálu uvnitř buněk a přežití buněk je závislé na schopnosti adaptace na snížený vodní potenciál. Rezistence k mrazu a suchu má tedy společný základ. Proces adaptace na chlad zahrnuje syntézu nových proteinů. Nejlépe byl tento proces prostudován u *A. thaliana*. Typickým rysem aktivity příslušných genů je, že jsou aktivovány nejen nízkou teplotou, ale i suchem a ABA. Téměř identické proteiny se vyskytují u mnoha rostlinných druhů. Podstatná část z nich patří do tzv. skupiny DHN/LEA/RAB. Mají vysoce konzervativní úseky pořadí aminokyselin charakterizované určitým motivem této sekvence. Ten se u nich vyskytuje v jedné až dvou kopiích. Střední část má 7 až 9 zbytků serinů, které mohou být fosforylovány. Na C-terminální části je úsek bohatý na lyzin. Proteiny jsou hydrofilní a nejsou degradovány varem. Odpovídající geny kódující tyto proteiny jsou *COR* (např. *COR47*), dehydriny (*dhnX*), *LTI* – *LOW TEMPERATURE INDUCED* (*LTI30*, *LTI75*), *RAB18*. Některé z nich nejsou regulovány ABA. Transkripční aktivátor, označený CBF1 stimuluje transkripční odpověď na nízké teploty. Gen pro tento aktivátor byl r. 1998 klonován, byl zkonstruován chimérický gen s konstitutivní expresí a přenesen zpět do genomu *A. thaliana*. Způsobilo to zvýšení rezistence k chladu neaklimatizovaných rostlin, aniž by to vedlo k fenotypovým změnám nebo nepříznivým vlivům na tyto rostliny. I tento gen může po přenesení do genomu kulturních rostlin působit obecně na zvýšení rezistence rostlin k chladu. Zvýšení rezistence k chladu bylo také vyvoláno konstitutivní expresí dalšího transgenu, pro superoxididizmutázu u vojtěšky.

### **8.2.5 Histidin kináza u cyanobakterie**

Aklimatizace živých organismů k chladu začíná schopností vnímat chladový signál, a jeho dalším přenosem. Problém je s identifikací receptorů chladu. Takový receptor byl identifikován u cyanobakterie *Synechocystis* sp. Regulace exprese více než 60 % chladově inducibilních genů se účastní **histidinová kináza Hik33**. Hik33 se také podílí na vnímání hyperosmotického stresu a zasolení. Dvojitá funkce Hik33 (dvoukomponentní systém jako u *E. coli* nebo *B. subtilis*): Hik33 vnímá změny v prostředí prostřednictvím své receptorové domény, dochází k autofosforylaci, ATP poskytuje fosfor, který je přenášen z Hik33 na konzervativní aspartátová rezidua domény, která funguje jako regulátor (Rre). Po fosforylaci dochází ke konformační změně Rre, která umožní navázání Rre k promotorové oblasti genů účastnících se aklimatizace. Regulace exprese genů ve vztahu ke stresu je pozitivní a negativní. Při pozitivní regulaci je dvoukomponentní systém inaktivní v podmínkách, kdy stres nepůsobí. Jestliže je buňka vystavena stresu, dvoukomponentní systém se aktivuje (fosforylaci) a dochází ke zvýšení exprese genů, které jsou umlčeny v nestresových

podmínkách. Většinou jde o pozitivní regulaci. Při negativní regulaci je dvoukomponentní systém aktivní v nestresových podmínkách, v podmínkách stresu se systém inaktivuje.

U rostlin regulace k chladu zahrnuje systém CBF/DREB. Analýza transkripční kontroly dvou inducibilních genů (*rd29A* a *cor15a*) u *A. thaliana* vedla k identifikaci responsivního elementu chladu – CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element) v jejich promotorech. Transkripční faktory s doménou AP2, u těchto dvou genů nazvanou DREB1 (DRE-binding protein) a CBF (CRT-binding factor), jsou rychle indukovány chladem, vážou se na CRT/DRE element a aktivují transkripci.

Přes řadu poznatků o regulaci genů chladem je jen málo známo o receptorech chladu u rostlin.

### **8.3 Horko**

U všech organismů při zvýšených teplotách dochází k syntéze specifických proteinů tepelného šoku, jejichž úkolem je chránit nukleové kyseliny a geneticky významné organely před nevratnými změnami struktury.

Při zvýšení teploty nad fyziologickou mez (obvykle 40 °C, ale podle druhu v rozmezí 35 °C až 40 °C) ustává transkripce a translace mRNA, která existovala před zvýšením teploty a začíná transkripce a translace typů mRNA pro proteiny tepelného šoku. Původní mRNA se uvolňují z polyzómů, ale současně vznikají polyzomální komplexy s nově transkribovanou mRNA a dochází k syntéze proteinů tepelného šoku. Těchto proteinů je několik desítek a jejich spektrum se mění se stoupající teplotou. Syntéza proteinů tepelného šoku je indukována velice rychle, asi 20 minut po zvýšení teploty.

Po několika hodinách syntéza proteinů tepelného šoku v obou systémech ustává a obnovuje se normální proteosyntéza, ale proteiny tepelného šoku jsou velmi stabilní a chrání významné buněčné struktury i při dalším setkání s vysokou teplotou. Proteiny tepelného šoku jsou velmi konzervativní během evoluce. Existuje pět tříd velikostí proteinů tepelného šoku: hsp110, hsp90 (80–95kD), hsp70 (63–78 kD), hsp60 (53–62 kD) a nízkomolekulární (LMW) hsp (14–30 kD). Třídy hsp90, hsp70 a hsp60 stabilizují konformaci proteinů při vysokých teplotách. Napomáhají správnému prostorovému uspořádání nově syntetizovaných nascentních polypeptidů, jejich transportu přes membrány, uspořádání oligomerů a podobně. Funkce ostatních HS proteinů je zatím známa jen přibližně. Geny pro každý typ proteinů tepelného šoku tvoří malé genové rodiny.

Aktivace genů zvýšenou teplotou je podmíněna specifickými (konzervativními) krátkými sekvenčními úseky promotorů, které jsou v jejich promotorových úsecích přítomny ve více kopiích. Jádrem těchto sekvencí je motiv (nGAAn), který se v promotoru opakuje nejméně třikrát v různých orientacích.

Regulační protein všech genů, aktivovaných tepelným šokem se označuje HSF (heat shock transcription factor). HSF se váže na specifická promotorová místa (HSE – heat shock elements) genů tepelného šoku. Gen pro HSF byl klonován u živočišného materiálu a z rostlin u rajčete a *A. thaliana*. Zatímco rajče má dva geny, z nichž jeden je konstitutivně aktivovatelný a druhý indukovatelný, *A. thaliana* má jeden, který je inducibilní. U rajčete dochází k vazbě HSF na HSE promotorů genů aktivovaných horkem inducibilně. U některých živočichů, u kterých je exprese genu HSF indukovatelná teplem, k vazbě HSF na promotory genů tepelného šoku dochází konstitutivně. Gen pro HSF je pak negativně regulován proteiny hsp70. Pokud je protein u některých druhů rostlin přítomen konstitutivně, při tepelném šoku dochází k jeho posttranslační aktivaci.

Proteiny tepelného šoku byly poprvé zjištěny v roce 1979 u drozofily a bylo potvrzeno, že se vyskytují univerzálně. Je možno je rozdělit na dvě skupiny:

1. s nižší molekulovou hmotností, v rozsahu asi 15–30 kD,
2. s vyšší molekulovou hmotností, 60–90 kD.

Proteiny se značí symbolem hsp a za ním následuje číslo, které udává hmotnost v kD, např. hsp20. U rostlin převažují právě typy 20kD, které jsou také transportovány do chloroplastů. Je téměř jisté, že zde není žádná dráha přenosu signálu, protože primární signál (teplota) může působit přímo na transkripční faktor. Proteiny tepelného šoku s vyšší molekulovou hmotností jsou vysoce konzervativní, mají značnou homologii i mezi rostlinami a živočichy, zatímco ve skupině s nižší molekulovou hmotností je homologie omezená. Po zvýšení teploty o 10 °C až 15 °C proti teplotnímu minimu rostliny se objevuje mRNA homologní genům hsp. Intenzita transkripce na počátku tepelného šoku je značná. U soji se objevuje asi 20 typů hsp a hromadí se v množství 20 000 kopií na buňku v průběhu dvou hodin. V průběhu tepelného šoku ustává normální proteosyntéza a začínají se syntetizovat HS proteiny. Poměr syntézy běžných typů proteinů a proteinů tepelného šoku může být velmi různý a může se lišit i v různých buňkách jednoho organismu.

U *D. melanogaster* je řízení genové exprese HSP na úrovni translace. V cytoplasmě je přítomna jak “normální”, tak HS mRNA, ale v průběhu tepelného šoku dochází téměř výhradně k translaci mRNA genů tepelného šoku. Normální buněčné proteiny jsou v cytoplasmě stabilní a jsou znovu aktivovány po odeznění tepelného šoku. Jiná situace je u kvasinek. Pokračuje tam translace buněčné mRNA, ale současně je blokována její transkripce. Protože obměna mRNA u kvasinek je rychlá, dochází k postupnému snižování jejího množství a tedy translace normální buněčné mRNA. U rostlin, konkrétně u soji, dochází k podobnému jevu. Rovněž dochází ke snižování normálních buněčných typů mRNA a tedy v důsledku obměny i odpovídajících buněčných proteinů na úkor mRNA a proteinů tepelného šoku. Po několika hodinách však transkripce mRNA genů tepelného šoku ustává a situace se vrací k normálu. Proteiny tepelného šoku však přetrvávají dlouhou dobu a chrání buňky před nepříznivými vlivy dalších tepelných šoků. Předpokládá se, že některé proteiny tepelného šoku jsou v malé míře syntetizovány konstitutivně a stabilizují nově syntetizované proteiny a proteiny na membránách.

V embryu ječmene je regulace genů pro  $\alpha$ -amylázy při teplotním šoku ještě odlišná. Dochází k rychlé degradaci mRNA a ustává normální proteosyntéza. Tam zřejmě v průběhu tepelného šoku dochází k disociaci lamel endoplazmatického retikula. To vede k rychlé destabilizaci jinak velmi stabilní mRNA pro  $\alpha$ -amylázy. Takovýto mechanismus vede k její selektivní degradaci v průběhu teplotního šoku. V průběhu prvních hodin tepelného šoku tak dochází k degradaci 85 % mRNA pro  $\alpha$ -amylázu, přičemž poločas životnosti této mRNA bez tepelného šoku je asi 100 hodin. To je zcela jiný mechanismus než u kvasinek. U embryí ječmene se to týká pouze genů pro  $\alpha$ -amylázu. Zrychlená degradace tohoto typu mRNA pod vlivem tepelného šoku je novým morforegulačním mechanismem. Expres dalších, normálních typů mRNA nerušeně pokračuje.

Tepelný stres zastavuje syntézu proteinů, vázaných na endoplazmatické retikulum, ale ne proteinů, vázaných na volné polyribosomy v cytoplazmě. Podobné programované zastavení syntézy se týká také proteinů buněčných stěn bohatých na hydroxyprolin, jako je například extenzin. U kotyledonů sóji naopak při teplotním šoku dochází ke stimulaci syntézy zásobních proteinů, která je rovněž vázána na endoplazmatické retikulum. Proteiny tepelného šoku se ukládají v membránách, jádře, chloroplastech a mitochondriích. Chrání (působí pro ně jako chaperony) především nově syntetizované proteiny, jejichž uspořádání nebylo ještě dokončeno, ale je velmi citlivé ke zvýšení teploty a dále u proteinů, které jsou právě transportovány přes membránu a v tomto stadiu jsou rovněž citlivé ke zvýšení teploty. Citlivost se týká právě uspořádání. Dále proteiny tepelného šoku chrání nukleové kyseliny v jádře a organelách, které by byly jinak snadno porušeny již zvýšenou koncentrací iontů, zvláště iontů kovů, ke které dochází v důsledku změn permeability membrán.

## ***8.4 Poranění***

Poranění rostlinných pletiv vede k regulačnímu přeprogramování v okolí rostlinných buněk na úrovni transkripce. Současně se signály z poškozených buněk šíří po celé rostlině a vyvolávají ve všech buňkách aktivaci dalších genů. Některé z nově aktivovaných genů se současně účastní při obranných reakcích proti napadení patogeny, parazity a herbivory. Dochází také k aktivaci genů, které se podílejí na regeneraci poškozeného místa, případně na kalogenezi. Poraněním dochází také k selektivní inaktivaci některých genů.

Je zřejmé, že mnoho genů, které jsou indukovány poraněním, je indukovatelných i dalšími stresovými faktory. Při poranění dochází k rychlé indukci fytohormonů etylénu, kyseliny abscisové a kyseliny jasmonové. Je proto obtížné rozhodnout, co je primární příčinou aktivace genů, zda poranění nebo zvýšená hladina fytohormonů.

U rajčete byla například po poranění zjištěna exprese genů pro syntézu kyselin 1-amionocyklopropan -1-karboxylové (ACCC), která se účastní biosyntézy etylénu, některých dalších enzymů a hydroxyprolinem bohatých glykoproteinů buněčné stěny. U bramboru je poraněním indukována exprese genů pro serinové proteinázy, zvané Inhibitor I (Mr 8100) a Inhibitor II (Mr 12 300). Tyto geny nejsou po poranění aktivovány jen v okolí místa

poranění, ale v celé rostlině. Tato systémová odpověď je způsobena uvolněním a transportem předpokládaného hormonu poranění. Oba inhibitory proteináz jsou také konstitutivně syntetizovány v hlízách bramboru, kde tvoří až několik procent rozpustných proteinů. U tabáku bylo zjištěno 6 podobných genů. Poraněním jsou rovněž indukovány geny pro specifické proteiny buněčné stěny – extenziny. Molekuly těchto proteinů jsou bohaté na hydroxyprolin a vyskytují se v buněčné stěně. Uplatňují se při hojení poranění a při rezistenci k patogenům.

Rostliny reagují na poranění indukcí obranných mechanismů, které spočívají v syntéze proteinů zúčastněných na hojení poranění a zabránění infekce patogeny. Skládají se z:

1. zesílení buněčných stěn ukládáním kalózy,
2. syntézy ligninu a glykoproteinů, bohatých na hydroxyprolin,
3. syntézy fytoalexinů,
4. produkce inhibitorů proteáz jako ochrany proti škůdcům a predátorům,
5. indukce chitináz a glukonáz na obranu proti houbovým patogenům.

Produkce kalózy vyžaduje stimulaci již existující kalóza syntázy ionty vápníku. Ostatní aktivity však vyžadují aktivaci genů. Aktivace některých genů může být omezena na nejbližší okolí rány, k aktivaci dalších může docházet systémově (např. k indukci genů pro inhibitory proteáz). Existují signální mechanismy, které to umožňují. Účastní se fytohormony (kyselina jasmonová, kyselina abscisová, zprostředkovaně etylén a auxiny). Kyselina salicylová naopak inhibuje geny indukované poraněním.

K této skupině patří i geny, aktivované dotykem, poryvy větru nebo jinak způsobeným pohybem rostlin. Důsledkem aktivace jsou typické změny morfologie rostlin (trpasličí růst, zpevněné lodyhy). U *A. thaliana* bylo klonováno 5 genů označených *TOUCH (TCH)*, jejichž exprese je indukována dotekem, větrem, deštěm, poraněním a ořesy. Za 10 až 30 minut po indukci se množství mRNA zvyšuje 10krát až 100krát pro geny *TCH1* (gen pro kalmodulin), *TCH2*, *TCH3* (geny pro protein podobný kalmodulinu) a *TCH4* (gen pro xyloglukan endotransglykozylázu). Kalmodulin je všeobecně se vyskytující vysoce konzervativní eukaryotický protein, který moduluje aktivitu mnoha enzymů. Enzym xyloglukan endotransglykozyláza modifikuje xenoglykanové polymery, které podmiňují přeskupení celulóznic vláken v průběhu růstu buněčné stěny a může také částečně lyzovat buněčnou stěnu, např. v zónách abscise.

Byla klonována řada dalších genů aktivovaných poraněním rostlin zejména u tabáku, bramboru, ale i u dalších rostlin. Ukázalo se, že hormonem, který šíří signál poranění po rostlině, je kyselina abscisová. Zatím stále není znám transkripční faktor, který působí aktivaci těchto genů.

## **8.5 Nedostatek kyslíku**

Nadměrné zvlhčení až zaplavení půdy má za následek nedostatek kyslíku, anaerobiózu a metabolismus kořenového systému se v takovýchto případech musí krátkodobě radikálně přeorientovat. Dochází k zastavení Krebsova cyklu a k urychlení alkoholového kvašení za vzniku pyruvátu.

Je známo asi 20 typů proteinů, které jsou syntetizovány v anaerobním prostředí v pletivech kořenů po zaplavení půdy. Nejlépe prostudovaným proteinem této skupiny je alkoholdehydrogenáza, dále sem patří glukosafosfátisomeráza, pyruvátdekarboxyláza a aldoláza. U kukuřice (a jistě i ostatních rostlinných druhů) anaerobióza vede k charakteristickým změnám regulace proteosyntézy. Ustává normální proteosyntéza a je indukována syntéza proteinů, potřebných k překonání nedostatku kyslíku. Původní proteosyntéza se opět obnovuje po několika hodinách. Proces je regulován na úrovni transkripce.

## ***8.6 Zasolení půdy***

Nadbytek solí v půdě snižuje příjem vody rostlinami v důsledku snížení rozdílu mezi vodním potenciálem v kořenech a v půdě. Dochází ke zvýšení osmotického potenciálu a rostlina se s ním vyrovnává podobně, jako s dehydratací v důsledku sucha.

## ***8.7 Toxické ionty v půdě***

Přítomnost toxických iontů nebo iontů těžkých kovů v důsledku kontaminace půdy nebo vody porušuje minerální rovnováhu. Tyto ionty také působí na buněčný metabolismus a kapacitu růstu. Překyselení půdy, ke kterému dochází v důsledku kyselých dešťů nebo přílišného hnojení minerálními hnojivy uvolňuje toxické ionty hliníku.

Znečištění vzduchu působí příjem toxických a oxidativních plynů stomaty. V těžké formě vede k viditelnému poškození rostlin, v lehčí formě k urychlení jejich stárnutí. Hlavními polutanty vzduchu jsou kysličníky dusíku a síry, amoniak a ozon. Kysličníky dusíku a síry jsou přijímány stomatální i kutikulární transpirací. Reagují s buněčnou vodou za vzniku kyseliny siřičité, případně kyseliny dusité a dusičné, což jsou procesy, ke kterým dochází i v atmosféře při vzniku kyselého deště.

Anionty kyseliny siřičité v cytoplazmě jsou přijímány chloroplasty a tam jsou redukovány na siřičíky nebo elementární síru nebo oxidovány na sulfáty. Siřičíky mohou být vylučovány z buněk jako sirovodík. Redukovaná síra může také být využita k biosyntéze aminokyselin, které obsahují síru. Současně probíhající oxidace na sírany však vede k překyselení pletiv. Tomu se rostliny brání několika mechanismy:

1. Snižování nitrobuněčného pH posunuje rovnováhu disociace slabých kyselin k nedisociované formě, takže dochází k určitému pufrování.

2. Ionty  $H^+$  a  $SO_4^-$  jsou transportovány do vakuol.
3. Protony jsou transportovány do kořenů a tam vyměňovány za kationty, např. vápníku.

Kapacita každého z těchto mechanismů je však značně omezená.

Dusičnany, vznikající konverzí kyslíčnicku dusičného z atmosféry obvykle nemají škodlivý vliv, naopak slouží jako další zdroj dusíku. Rezidua dusičnanů v potravinách jsou vážným hygienickým problémem, protože jsou metabolizována na mutagenní nitrózoaminy.

## ***8.8 Stres působený nadbytkem těžkých kovů***

Těžké kovy jako železo, mangan, zinek, měď, molybden a kobalt jsou esenciální mikroprvky. Jiné, jako hliník, kadmium, rtuť nejsou potřebné. Oba typy však mohou mít toxický účinek již od poměrně nízkých koncentrací. Rezistence k nim je založena hlavně na toleranci, je pro jednotlivé prvky specifická a je způsobena řadou různých mechanismů. Jedním z nich je preferenční vazba určitého kationtu na pektiny buněčných stěn buněk kořenů. Daleko významnější jsou nitrobuněčné chelatovací systémy, k nimž patří deriváty některých aminokyselin, kyselina citronová, kyselina jablečná a fytochelatiny (polypeptidy, které váží těžké kovy). **Fytochelatiny** mají strukturu  $(Glu-Cys)_n-Gly$ , kde  $n=2$  až 11 a k vazbě iontů kovů dochází především prostřednictvím SH-skupin. Syntéza fytochelatinů je indukována nadbytkem těžkých kovů. K jejich syntéze dochází velmi brzy (za 5–10 minut) po působení těžkých kovů. Jejich syntéza je podmíněna enzymem fytochelatin syntázou, která je přímo aktivována ionty těžkých kovů. Když bylo syntetizováno dostatečné množství fytochelatinů, jejich syntéza opět ustává. Fytochelatiny působí v cytoplazmě, ale těžké kovy se mohou hromadit ve vakuolách. Předpokládá se, že fytochelatiny by mohly právě zprostředkovávat transport z cytoplazmy do vakuol. Tolerance ke specifickým kovům však nemůže být vysvětlena existencí fytochelatinů.

Byly získány transgenní rostliny, které obsahují živočišné geny pro proteiny, schopné vysoce specificky vázat těžké kovy (metalothioneiny). Tyto proteiny mohou být lokalizovány v kořenech a bránit tak transportu toxických kovů do listů. Mohou ale také být lokalizovány v listech a zásobních orgánech rostliny. Potom by tyto rostliny mohly být po sklizni likvidovány tak, aby se těžké kovy nemohly dostat zpět do prostředí. Takovéto transgenní rostliny by sloužily pro remediaci (ozdravení) půdy. Využití transgenních rostlin k tomuto účelu však dosud neumožňuje legislativa.

Některé rostliny běžně syntetizují proteiny bohaté na thiolové skupiny, které jsou rovněž schopné vázat těžké kovy. Tyto proteiny jsou příbuzné metalothioneinům u živočichů.

## ***8.9 Nadbytek ozónu***

Krátkodobé působení vysoké koncentrace ozónu působí akutní poškození, viditelné jako nekróza. Chronické vystavení nízkým koncentracím ozónu způsobuje fyziologické změny, které vedou k redukci růstu, výnosu kulturních rostlin a k redukci reprodukční kapacity bez dalších symptomů. Rezistence k ozónu závisí na:

1. genetické konstituci rostliny,
2. vývojovém stadiu, na které ozón působí,
3. dalších vnějších faktorech, jako klimatické faktory, další typy znečištění vzduchu a patogeny.

Ozón působí na permeabilitu membrán. Působí však zevnitř, nejprve tedy musí být přijat se vzduchem stomatální a kutikulární transpirací a rozpuštěn v cytoplazmě. Pak teprve působí změny permeability membrán a působí toxicky na dalších cílových místech. Množství ozónu, které se nakonec dostane na cílová místa jeho toxického působení, závisí na jeho rozpustnosti, schopnosti absorpce, transportu, metabolismu a detoxifikačních procesech. Dává vznik reaktivním kyslíkovým radikálům, jako hydroxylovým radikálům, superoxidovému aniontu, peroxidu vodíku a dalším radikálům v listech. Ochranné mechanismy rostlin spočívají v působení enzymů superoxiddismutázy (SOD), katalázy (CAT), peroxidázy (POD), monoaskorbátreduktáza, glutathionreduktáza. Jejich geny jsou klonovány a využívají se také jako transgeny (se změněnými regulačními sekvencemi) ke zvýšení rezistence. Dalším důležitým mechanismem resistance k ozónu jsou reakce s antioxidanty jako kyselina askorbová (vitamin C) a tokoferol (vitamin E). Poslední působí zejména tím, že chrání membránový systém (především membrány chloroplastů a mitochondrií) před **peroxidací** lipidů. Tokoferol tuto reakci inhibuje. K dalším antioxidantům neenzymatické povahy patří karotenoidy, flavonoidy, polyaminy a z cukrů manitol.

Ozón může také snižovat rezistenci rostlin k patogenům i k dalším stresovým faktorům. Rostliny jsou citlivější k ozónu než lidé. Západoevropská norma připouští maximální množství ozónu ve vzduchu (0,12 ppm), což je koncentrace neškodná pro člověka, která ale již může škodit senzitivním rostlinám.

## ***8.10 Přesvětlení***

Přesvětlení úzce souvisí s nadbytkem ozónu. Nadbytek světla vyvolává při fotosyntetických procesech fotooxidaci, která vede ke vzniku kyslíkových radikálů. Současně dochází k fotoinhibici fotosyntézy a k destrukci chlorofylu. Na obranu proti těmto jevům rostliny syntetizují karotenoidové a anthokyanové pigmenty které absorbují část světla a tak chrání chloroplastové membrány.

V přírodních podmínkách je tento faktor spojen s nadbytkem světla. UV způsobuje vznik thyminových dimerů v DNA a tím vznik mutací a ukončení funkce, či chybnou funkci genů. K tomu by mohlo docházet v exponovaných vrstvách buněk epidermis a listového mezofylu a rostlinné buňky mají mechanismy ochrany vůči UV záření, které vedou k jeho pohlcování a tím zabraňují vlivům na DNA. Vysoká intenzita UV záření ovlivňuje biosyntézu



fenylpropanoidů a flavonoidů a podmiňuje hromadění flavonoidů, které absorbují UV záření. Klíčový enzym, který se na syntéze těchto látek podílí, je chalkonsyntáza. Její geny byly klonovány a je poměrně dobře známa struktura a regulace jejich promotorů. Gen se využívá k transgenozí, protože chalkonsyntáza je také jeden z klíčových enzymů syntézy antokyanů a transgen se uplatňuje také při manipulaci barvy květů a plodů.

## **8.11 Křížová odpověď na stresy**

Byly uvedeny příklady některých překrývajících se stresových faktorů (nízká teplota – sucho – zasolení, přesvětlení – nadbytek ozónu a podobné).

- Charakteristickou skupinou proteinů a příslušných kódujících genů jsou proteiny LEA. Tyto proteiny jsou syntetizovány ve velké míře v pozdních fázích embryogeneze, kdy již embryo vysychá. Předpokládá se, že pomáhají uchovávat neporušené buněčné struktury během vysychání. Současně jsou syntetizovány také při dehydrataci, nadbytku solí v půdě nebo jiném osmotickém stresu a při chladovém stresu.
- Společným faktorem, který se účastní při odpovědi na různé stresy, je ABA. Její hladina se podstatně zvyšuje při zrání semen a různých typech stresů. ABA činí rostliny podstatně odolnějšími k suchu, chladu a osmotickým stresům. Geny, aktivované ABA (*RAB* – geny) jsou indukovány během embryogeneze a dále suchem, solemi a chladem. Primárním signálem pro zvýšenou syntézu ABA mohou být změny turgoru.
- Působení středně intenzivního stresového faktoru indukuje rezistenci k dalším stresovým faktorům. Sucho vede u ozimých pšenic ke zvýšení odolnosti k mrazu. Rovněž nadbytek solí v půdě zvyšuje odolnost k mrazům právě tak, jako poranění. Ozon, který působí rovněž jako stresový faktor, zvyšuje odolnost k houbovým patogenům. Působení horka zvyšuje odolnost k chladu a naopak.
- Jedním z mechanismů, který může působit rezistenci k mnoha typům stresů, je aktivní biosyntetická dráha antioxidantů. Jedná se především o enzymy superoxid-dismutázy, peroxidázy, katalázy a enzym askorbát-glutathionového cyklu. Jejich vysoká aktivita byla zjištěna po působení horka, chladu, mrazu, solí, sucha a poranění stejně jako u oxidativních stresů.
- Ke hromadění některých proteinů tepelného šoku dochází také při nízkých teplotách. Středně velký tepelný šok je schopen chránit před poškozením mnoha dalšími stresovými faktory. Proteiny tepelného šoku, které chrání membrány, tak činí i při nízkých teplotách.

## 9. Geneticky modifikované rostliny

Za posledních 50 let se lidská populace více než zdvojnásobila, z 3 na 7 miliard. Do r. 2050 se předpokládá, že přibudou více než 2 miliardy lidí a to hlavně v rozvojových zemích. Přesto asi 1/5 lidí hladoví. Z toho vyplývá tlak na neustálé zlepšování vlastností kulturních plodin, které slouží k obživě, např. na vyšší odolnost k patogenům a abiotickým stresovým faktorům prostředí aj. Úkolem šlechtění je aplikovat neustále nové metody, jednak klasické, ale především biotechnologické a molekulární včetně genového inženýrství, které mají potenciál zajistit vyšší výnosy plodin. Současné šlechtění můžeme tedy charakterizovat jako období aplikace **molekulárních metod** a **genetických manipulací**. Někdy se hovoří o tzv. molekulárním šlechtění.

Teoretický výzkum problematiky související s genetickými modifikacemi (GM) zahrnuje modelové druhy, studium různých metod transformace, využívání různých konstruktů nebo identifikaci cílových genů u různých organismů. Aplikovaný výzkum se zabývá např. studiem stupně exprese transgenů a optimalizací postupů vedoucích ke konečnému produktu využitelnému ve šlechtění nové odrůdy.

První zemí, která pěstovala transgenní plodinu pro komerční využití, byla Lidová republika Čína začátkem 90. let. Byl to tabák rezistentní k virům. V USA firma Calgene získala jako první povolení pro pěstování GM plodiny jako potraviny, bylo to rajče FlavrSavr se zpožděným dozráváním r. 1994. V následujících kapitolách budou popsány hlavní znaky, které jsou cílem genetických modifikací, a mechanismy jejich dosažení.

### 9.1 Rezistence k herbicidům

Prvním šlechtitelsky významným úspěchem bylo vnesení transgenů pro odolnost rostlin vůči herbicidům. Plevel má významný negativní podíl na výši výnosů a kvality určité plodiny. Je to důsledek konkurence mezi plodinou a plevelem při získání výživných látek a světla, plevele jsou také zdrojem různých škůdců. Aplikace herbicidů je tedy nezbytná. Jsou to chemické látky, které narušují určité metabolické, biochemické procesy v rostlině a tím ji poškozují. Jsou pro rostliny toxické. Řada těchto procesů probíhá v chloroplastech a často je ovlivňována fotosyntéza.

Problémem využití herbicidů je selektivní eliminace jen plevelu a nepoškození kulturní plodiny. To je klasickými přístupy vyřešeno jen v některých případech, jednoděložné vs. dvouděložné. Navíc řada herbicidů zatěžuje přírodní prostředí. Vyřešení tohoto problému nabízejí genetické modifikace. Využívají se herbicidy nové generace, které jsou sice velmi účinné, ale účinkují jen na rostliny, ne na živočichy, a rychle se v prostředí rozkládají, aniž by zanechávaly škodlivé zplodiny. Byly známy dříve, než byly vytvořeny účinné transgenní

rostliny, ale nedaly se použít pro ochranu před zaplevelením, protože působily na všechny rostliny, tedy i na kulturní odrůdy, které mají chránit; jsou to herbicidy **totální**.

Teprve po vnesení **transgenů pro necitlivost** k těmto herbicidům do rostlinných genomů kulturních druhů jsou tyto účinné a bezpečné herbicidy k dispozici pro ošetřování transgenních plodin. V praxi to znamená, že místo několikanásobného postřiku různými herbicidy se rostlina ošetří tímto novým herbicidem jen jednou nejvýše dvakrát. Celkové množství herbicidu se snižuje, uspoří se peníze, lidská práce, sníží se produkce skleníkových plynů. Vše je prospěšné pro životní prostředí.

Herbicid zpravidla působí toxicky na jediný enzym, významný pro život rostlin. Např. **glyfozát** (chem. A-fosfinometylglycin) inhibuje syntézu enzymu EPSPS, **glufosinát** (chem. kyselina dialkylfosforová) inhibuje glutaminsyntetázu, **chlorsulfuron** (chem. sulfonilmočovina) inhibuje acetolaktátsyntázy (ALS), **bromoxynil** (chem. nitril) inhibuje fotosyntézu, fotosystém II.

Vlivem dalších herbicidů dochází k inhibici

- mitózy prostřednictvím narušení organizace mikrotubul,
- buněčného dělení,
- syntézy celulózy v buněčné stěně,
- syntézy lipidů,
- transportu auxinů.

Existují tři hlavní mechanismy, tzv. **strategie** dosažení rezistence rostlin k herbicidům transgenozí:

1. Transgen kóduje **nadbytek** cílového enzymu (proteinu), který je inaktivován herbicidem. Tato nadprodukce způsobuje, že část enzymu – proteinu zůstane aktivní. Nadprodukce může být dosaženo integrací více kopií genu nebo použitím silných promotorů.
2. Transgen kóduje **odlišnou (modifikovanou, mutantní)** formu enzymu, která není herbicidem inaktivována. Tento modifikovaný protein je funkční.
3. Transgen kóduje enzym, který **rozkládá** herbicid. Dochází k **detoxifikaci** herbicidu, jeho přeměně na méně toxickou formu, nebo jeho odstranění. Strategií je využívání detoxifikačních mechanismů rostliny, tj. přirozených obranných mechanismů rostliny vůči toxickým látkám. Je prozatím využívána v minimální míře.

Dále budou popsány tři nejdůležitější typy herbicidů a jim odpovídající transgeny, které se využívají.

### ***9.1.1 Transgeny pro rezistenci k herbicidu glyfozátu***

**Glyfozát** (A-fosfinometylglycin) je vyráběný pod technickým názvem **Roundup**. Mechanismus poprvé využila firma Monsanto, USA. Herbicid je účinný vůči 76 ze 78 nejvýznamnějších plevelů, je to derivát glycinu.

## *Mechanismus účinku herbicidu na rostliny*

Herbicid blokuje aktivitu **enzymu 5-enolpyruvát šikimát-3-fosfosyntázy – EPSPS**. V rostlinách je to klíčový enzym, který syntetizuje aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin, tryptofan), stavební kameny bílkovin. V případě inhibice enzymu se netvoří určité proteiny. Tento enzym netvoří živočichové, ale jen rostliny, bakterie a některé houby. Na živočichy nemá herbicid škodlivé účinky, živočichové získávají aromatické aminokyseliny v rostlinné potravě.

### *Dopad*

Dochází k inhibici buněčného dělení, meristemické aktivity a růstu rostlin. Také je inaktivována syntéza auxinů, jako je kyselina indolyloctová (IAA), která má jako prekurzor indol – ten je inaktivován herbicidem.

### *Využívané strategie rezistence*

Ze 3 výše uvedených strategií se testují 2 až 3, z toho 2 nejdéle. Jsou již vytvořené komerční odrůdy běžně využívané v polních podmínkách.

#### *Strategie 2*

Strategie zahrnuje využití genu z bakterií rezistentních ke glyfozátu, nejčastěji z *Agrobacterium*. Ke kódující sekvenci bakteriálního genu je připojen promotor 35S CaMV a sekvence pro chloroplastový transportní protein z *Arabidopsis* nebo petunie. Tím je zajištěn transport proteinu do chloroplastů, místa účinku enzymu.

Gen *aroA* ze *Salmonella typhimurium* je vložen mezi promotor a terminální sekvenci genu *ocs* *Agrobacterium* v Ti plazmidu. Transgen kóduje obdobný enzym EPSPS, který však není glyfosátem blokován. Vnesený gen je pouze variantou vlastního rostlinného genu. Je to způsobeno bodovou mutací, která vede k záměně aminokyseliny prolinu za serin. Funkce enzymu je zachována.

Z dvouděložných druhů je transgen využit např. u sóje, bavlníku, řepky olejky. U jednoděložných druhů – kukuřice – je konstrukt optimalizován. Mutantní gen EPSPS z kukuřice byl izolovaný z explantátových kultur, připojen promotor z rýže a sekvence pro chloroplastový transportní protein je také z kukuřice. Protein kódovaný transgenem je funkční, enzym není rozkládán herbicidem v důsledku mutace.

Geneticky modifikovaný bavlník tvoří již více než 80 % z celkové produkce (hlavně rezistence ke glyfozátu Roundupu). GM bavlna je šetrnější k životnímu prostředí, snižuje potřebu orby a kypření. Snižuje množství reziduí, která přetrvávají hluboko v půdě.

#### *Strategie 1*

Podarilo se selektovat buňky petúnie z explantátových kultur schopné růst v přítomnosti zvýšené koncentrace glyfozátu. Tato tolerance byla důsledek amplifikace příslušného genu pro enzym EPSPS v genomu petúnie až na 20 kopií. Enzym sám byl beze změny. cDNA byla použita k tvorbě transgenu a introdukována do rostlinného genomu pod řízením promotoru 35S CaMV. Sekvence EPSPS obsahovala vlastní transportní protein, který zajistil přenos do plastidů. Transgen má 40x vyšší aktivitu exprimovaného enzymu EPSPS a tolerance rostlin vůči aplikaci herbicidu glyfozátu postřikem je 2 až 4x vyšší.

### ***9.1.2 Transgeny pro rezistenci k herbicidům typu fosfinotricinu***

**Fosfinotricin** (4-hydroxy-methyl fosphinoyl-D,L-homoalanin) je známý také pod názvem glufosinát, komerční název **Basta**.

#### *Účinek herbicidu*

Tento herbicid blokuje **enzym glutaminsyntázu**, který zneškodňuje amoniak, který se tvoří při používání dusičnanů i dalšími cestami. Pokud je enzym inhibován, amoniakové ionty se kumulují na toxickou koncentraci, rostlina uhynie. Glutaminsyntáza přeměňuje L-glutamát na glutamin. Inaktivace glutaminsyntázy také způsobuje inhibici fotosyntézy. Oba účinky se působením herbicidu kombinují.

#### *Strategie rezistence 3*

Pro získání necitlivosti k tomuto herbicidu se používají dva transgeny, které oba pocházejí z běžné půdní aktinomycety *Streptomyces*. Jsou to geny *bar* a *pat*. Gen **bar (bialaphos resistance)** byl získán ze *S. hygrosopicus* a obdobný gen **pat (phosphinothricin acetyltransferase)** byl klonován ze *S. viridochromogenes*. Enzymy kódované těmito geny přeměňují herbicid na sloučeninu, která je netoxická jak pro rostliny, tak pro živočichy a rychle se rozkládá. Enzymy dodávají acetylové skupiny k aminoskupině alaninu fosfinotricinu a tak jej inaktivují.

Tento způsob rezistence byl vyvinut v Plant Genetic Systems (PGS) patřící firmě Hoechst. PGS později získalo AgrEvo. Strategie byla využita u řepky olejné a kukuřice. Gen *bar* se často využívá jako selektovatelný marker při inzerční mutagenezi k identifikaci a selekci transformantů.

### ***9.1.3 Transgeny pro rezistenci k herbicidům typu sulfonylmočoviny***

Herbicidy založené na **sulfonylmočovíně** (např. **sulfuron**) působí jen na dvouděložné rostliny, a proto se již dříve používal k ošetřování kultur obilovin. Nyní se tyto možnosti rozšiřují i na transgenní dvouděložné rostliny. Toxicita herbicidů typu sulfonylmočoviny je podobně jako u glyfozátu záležitostí biochemických drah tvořících aminokyseliny, které

živočichové nedovedou syntetizovat. Proto herbicid nepůsobí na živočichy. Herbicid inhibuje enzym **acetolaktátsyntázu**, který se podílí na syntéze aminokyselin.

## Strategie 2

Jako transgen se používá např. gen pocházející z mutantní linie rostliny *Arabidopsis thaliana*.

## 9.2 Rezistence k hmyzím škůdcům

### 9.2.1 Transgeny z *Bacillus thuringiensis*

V přírodě žijící bakterie druhu *Bacillus thuringiensis* produkují při vytváření spor bílkovinu toxickou pro některé skupiny hmyzu,; především pro larvální stadia hmyzu Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera aj. Jednotlivé poddruhy a kmeny produkují proteiny s různým spektrem citlivosti ke hmyzím taxonům. Tento protein se nazývá **delta-endotoxin**. Dříve se kultury této bakterie vyráběly ve velkých objemech (u nás např. ve Slušovicích) a používaly se jako postřik kulturních plodin proti hmyzím škůdcům (ekologický insekticid).

Různé geny *cry* pro  $\delta$ -endotoxiny nebo jen jejich části se užívají jako transgeny a prostřednictvím T-DNA jsou včleňovány do rostlinného genomu (existují i  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  endotoxiny). Geny jsou lokalizovány na plazmidech, kde tvoří rodiny genů, kterých bylo identifikováno asi 500. Aby se však dostatečně projevíly v rostlinném genomu, musely se metodami genového inženýrství upravit. V poslední době byla účinnost tohoto systému podstatně zvýšena a spektrum hmyzích řádů, na které působí, rozšířeno (Coleoptera, Lepidoptera, Diptera).

Účinnost transgenů byla obvykle dosti nízká. Příčinou byla především nestabilita mRNA v rostlinných buňkách. Původní geny byly proto modifikovány. Gen pro delta-endotoxin z *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* byl znovu syntetizován tak, aby při zachování struktury výsledného proteinu bylo využito degenerovaných kodonů, vyskytujících se v rostlinném genomu nejčastěji. Takovýto gen byl vnesen do genomu bramboru a byla zjištěna vysoká rezistence k mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Transgenní brambory mají vysokou odolnost k mandelince bramborové, jejich výnosové a jakostní parametry zůstávají stejné a mikrobiální populace na transgenních rostlinách se jen nepatrně liší od těch, které byly nalezeny na standardních odrůdách. U tabáku bylo dosaženo podstatného zvýšení proporce delta-endotoxinu v proteinech listů, jestliže byl protein směřován do chloroplastů. Nyní existuje transgenní kukuřice odolná proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*). Kukuřice odolná k zavíječi kukuřičnému MON810 se smí pěstovat ve všech zemích EU. Obdobně byl upraven také gen *cryIA(b)* pro rezistenci k motýlím škůdcům, který se vnášel do genomu rýže. Další geny jsou vhodné pro navození odolnosti vůči broukům nebo hád'átkům.

Transgeny pro delta-endotoxin byly zavedeny také do genomu sóje, rajčete, brokolice, bavlníku a dalších kulturních rostlin. Na toxickou formu se endotoxin mění až ve střevu hmyzu, kde je zásadité prostředí a kde dochází k jejich vazbě se specifickými receptory.

Další mechanismy rezistence rostlin k hmyzu směřují k využití **transgenů rostlinného původu**

### ***9.2.2 Transgeny kódující syntézu antimetabolických proteinů, které narušují proces trávení u hmyzu***

#### ***Inhibitory proteáz***

Inhibitory proteáz jsou malé proteiny z různých rostlinných druhů, které inhibují proteázy v trávicím traktu hmyzu.

Např. inhibitory serinových proteáz mají dvě aktivní místa a inhibují trypsin a chymotrypsin. Tyto proteiny jsou hojné v semenech a zásobních orgánech některých druhů rostlin.

První gen, který byl identifikován a přenesen do genomu druhého druhu, je gen z *Vigna savi*, čeleď *Fabaceae*. Byl to **gen pro inhibitor trypsinu**. Účinkuje proti motýlům a dvojkřídlému hmyzu. Gen byl introdukovan do genomu řepky, bramboru, rýže, pšenice, jahodníku, slunečnice, tabáku, rajčete, jabloně, salátu. Další gen ze sóje byl vnesen do genomu řepky, topolu, rajčete, bramboru, tabáku.

Gen pro inhibitor cysteinové proteázy z rýže byl vnesen do genomu topolu, měl inhibiční účinek vůči broukům.

Je však známo, že hmyz se může přizpůsobit těmto inhibitorům proteáz. Lepidoptera nebo Coleoptera mohou nadprodukovat proteázy nebo produkovat nové typy proteáz, které jsou necitlivé k inhibitorům. Proto je potřeba u transgenních rostlin využívat více typů inhibitorů proteáz současně, tedy více genů.

#### ***Inhibitory amyláz***

V genomu fazolu existuje celá skupina genů pro proteiny, které jsou obsaženy v semenech a fungují jako inhibitory  $\alpha$ -amylázy. Gen pro inhibitor  $\alpha$ -amylázy má základní funkci při ochraně rostlin před hmyzem a navozuje rezistenci. Introdukcí genu do genomu hrachu byla sledována rezistence k některým broukům. Další geny s touto funkcí byly introdukovány z obilovin do tabáku.

#### ***Geny pro chitinázy***

Hmyz obsahuje polysacharid chitin jednak v exoskeletu, ale také v peritrofní membráně. Aktivita enzymů chitináz (degradují chitin) tak může narušovat trávení hmyzu. V této oblasti nebyly zaznamenány výrazné výsledky; perspektivní je jejich využití v kombinaci s geny *cry*.



## **9.3 Rezistence k virům**

### **9.3.1 Geny pro plášťové proteiny**

Roku 1985 byla vyslovena hypotéza, podle které hostitel, u něhož dochází k expresi určitých sekvencí nukleových kyselin patogena, se může stát rezistentní k tomuto patogenu. Hypotéza byla poprvé potvrzena roku 1996 u tabáku. Transgenní rostliny s genem pro plášťový protein byly rezistentní k viru tabákové mozaiky. V současné době se projev transgenů pro plášťový protein považuje za obecně působící mechanismus rezistence k odpovídajícímu viru. Zdrojem transgenů pro plášťové proteiny jsou viry.

V polních pokusech byly úspěšně testovány rostliny brambor, které jsou rezistentní k viru X. Další pokusy se provádí s rezistencí k viru Y a viru svinutky listů brambor. Přítomnost bílkoviny v rostlinné buňce působí odolnost proti tomu typu viru, z něhož pochází gen, a proti virům příbuzným. Plášťový protein je zabudován do buněčné stěny rostliny a brání vniknutí dalších virových částic se stejným plášťovým proteinem. Stupeň rezistence závisí na konstrukci chimérického genu a na místě začlenění v rostlinném genomu.

#### **Výsledky**

- Brambor – PVX, PVY, virus X a virus Y, PLRV
- Vojtěška – AIMV virus mozaiky vojtěšky
- Rajče – TGMV virus zlaté mozaiky rajčete
- Pšenice – BYDV virus zakrslosti ječmene
- Rýže – RTSV, RSV, RYMV
- Virus mozaiky okurku
- Papája – PRSV potyvirus
- Podzemnice olejná – TSWV

Virus kóduje kromě plášťového proteinu také protein, který umožňuje pohyb a replikázu. Od toho jsou odvozeny další strategie.

### **9.3.2. Rezistence k proteinu pro pohyb**

Při použití transgenů pro defektní proteiny pohybu docházelo k omezení pohybu TMV uvnitř rostliny. Defektní proteiny se hromadí v plazmodezmatech, kterými se virus v rostlině pohybuje. Transgenní rostliny tabáku, které obsahují defektní protein přenosu TMV, jsou rezistentní nejen k TMV, ale i k CaMV a AMV.

### **9.3.3 Rezistence založená na antimediátorových konstruktech**

Dlouho se nedařilo získat rezistenci k virům pomocí antimediátorových konstruktů transgenů. Antimediátorová RNA vzniká transkripcí DNA, která je komplementární ke kódující genové

sekvenci. V současné době jsou pouze v některých případech pro získání rezistence k rostlinným virům účinné transgeny kódující antimediatorovou RNA. Tak je tomu např. u potyvirusu – viru žluté mozaiky bobu (BYMV), nebo u geminivirusu – viru zlaté mozaiky rajčete. U tabáku a bramboru byl jako transgen využit gen pro antivirový protein z *Phytolacca americana*. Tento protein působí rezistenci k virovým infekcím obecně.

### **9.3.4 Další mechanismy**

Byly popsány transgenní rostliny bramboru, které ve svém genomu mají krysí gen pro 2-5 oligoadenyl syntetázu a které jsou rezistentní k viru X bramboru více než transgenní rostliny s genem pro plášťový protein tohoto viru. Enzym úzce souvisí s interferonovým systémem savců. Interferony jsou specifické proteiny, vylučované savčími buňkami při virové infekci, při proliferaci buněk a imunitních procesech. Indukují syntézu dalších proteinů, které vedou k inhibici množení virů. Jedním z těchto proteinů je právě 2-5 oligoadenylát syntetasa.

Plášťové bílkoviny a příslušné geny denně konzumujeme ve velkých kvantech, protože mezi rostlinami v naší stravě jsou i rostliny virózní. Konzumujeme plášťový protein, ale i virovou RNA, které v transgenní rostlině budeme ušetřeni.

## **9.4. Rezistence k bakteriálním chorobám**

### **9.4.1 Geny pro PR proteiny**

- typu glukonáz
- typu chitináz

Jsou to enzymy, které degradují polymery buněčné stěny mnoha mikroorganismů, neškodí rostlině, ani jiným živočichům.

Zdrojem genů jsou:

- **rostliny** – rýže, ječmen. Gen pro chitinázu z rýže byl introdukován do genomu okurky – rezistence k *Botrytis cinerea*,
- **bakterie** – *Serratia marcescens* – extracelulární i intracelulární formy enzymů,
- **houby** – *Trichoderma harzianum* Zvýšená tolerance tabáku a ječmene k *Rhizoctonia solani*.

Ke kódujícím sekvencím se přidávají promotory 35S CaMV.

### **9.4.2 Geny pro antimikrobiální proteiny**

Mnoho genů kóduje proteiny s antihoubovým a antibakteriálním účinkem.

- Gen pro **lysozym** z **bakteriofága T4** – který narušuje buněčné stěny bakterií, enzym narušující chitin a peptidoglykany. Byl využit jako transgen a začleněn do genomu **bramboru**, zde působí vysoký stupeň rezistence k *Erwinia carotovora*.
- Účinné jsou transgeny pro některé toxické proteiny jiných rostlinných druhů. Např. exprese genu pro **thionin ječmene** v genomu **tabáku** vede ke zvýšení rezistence k bakteriálním patogenům, např. *Pseudomonas syringae*.
- Transgen pro rezistenci k **tabtoxinu** z *Pseudomonas syringae* patovar *tabaci* působí rezistenci tabáku k tomuto patogenu.
- Geny pro defenziny – proteiny identifikované v živých buňkách, aktivují obranné mechanismy – vážou se na mikrobiální plazmatickou membránu a mají lytickou aktivitu.
- Gen *alfAFP* pro defenzin z vojtěška do bramboru – defenzin se hromadí v extracelulárních prostorech listů a kořenů. Výsledkem je rezistence k houbě *Verticillium dahlia*.

### 9.4.3 Geny pro indukci hypersenzitivní a systémové rezistence

Jako transgeny se využívají rasově specifické geny (*R* geny), které byly identifikovány, např. z genomu rýže a *Arabidopsis*. Gen *Pto* s 35S promotorem byl vnesen do rajčete. Aktivuje se inkompatibilní interakce mezi produktem genu *R* (*Prf*) a produktem *Avr* genu (*AvrPto*) patogena, protein PTO působí jako prostředník pro zprostředkování této interakce. Aktivuje se signalizační kaskáda, výsledkem je aktivace transkripčních faktorů pro geny *PR* – dochází k hypersenzitivní reakci rostliny, aktivací kyseliny salicylové se signál šíří po rostlině a indukuje se systémová rezistence. Rostliny jsou rezistentní k patogenu *Pseudomonas syringae* f. sp. *tomato*.

## 9.5 Složení zásobních látek

### 9.5.1 Oleje

Celková produkce rostlinných olejů ve světě se odhaduje na 100 mil. tun ročně. Hlavní 4 kulturní plodiny pro produkci olejů jsou sója (Kanada a USA), palma olejová, řepka olejná a slunečnice. Oleje slouží k přímé konzumaci člověkem a zkrmování zvířaty, jednak pro různé průmyslové využití. Rostlinné oleje jsou triglyceridy mastných kyselin. To znamená, že tři mastné kyseliny jsou esterifikovány třemi hydroxylovými zbytky glycerolu. Ve všech případech je podstatné složení mastných kyselin.

Základní výstavba mastných kyselin se děje v chloroplastech, kde dochází ke skládání jednotek obsahujících dva uhlíky do řetězců obsahujících 16 až 18 uhlíků. V jedlých olejích převažují mastné kyseliny, které mají 18 uhlíků a 1 až 3 dvojně vazby. Olejové kyseliny se charakterizují čísly, z nichž první udává počet uhlíků a druhé počet dvojných vazeb. Někdy se také ještě uvádí, ve kterých polohách se nacházejí dvojně vazby. Tento údaj se píše před obě

čísla. Mastné kyseliny **bez** dvojných vazeb jsou **nasyčené**, s **dvojnými** vazbami **nenasyčené**. Zápis tedy vypadá např. takto: 18:1, což označuje kyselinu olejovou s 18 atomy uhlíku a jednou dvojnou vazbou.

Kyselina	Počet uhlíků : počet dvojných vazeb
laurová	12 : 0
palmitová	16 : 0
stearová	18 : 0
olejová	18 : 1
linolová	18 : 2
linolenová	18 : 3
eikosenová	20 : 1
eruková	22 : 1

**Tab. 9.1** – Hlavní mastné kyseliny

Hlavním prekuzorem všech olejových kyselin je kyselina palmitová. Ke vzniku dalších mastných kyselin dochází dvěma cestami:

1. **prodlužování** uhlíkatého řetězce
2. **desaturace**, kterou vznikají mastné kyseliny s jednou, dvěma nebo třemi dvojnými vazbami.

Pro potravinářské účely je žádoucí, aby v olejích převažovaly nenasyčené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou a se středním (16–18) počtem uhlíků (především 18:1). Hlavním cílem je snížení obsahu kyseliny erukové 22:1 a linolenové 18:3 a zvýšení obsahu kyseliny olejové.

Dvě prozatím nejpozoruhodnější linie s modifikací poměru mastných kyselin v olejích semen byly uvedeny do polních pokusů v letech 1993–94 firmou *Calgene*. Řepka obsahuje v olejích semen 1–2 % kyseliny stearové a méně než 0–1 % kyseliny laurové.

Obohacení mastné kyseliny dvojnou vazbou se uskutečňuje prostřednictvím enzymu desaturáza, Např. v 18 uhlíkovém řetězci delta<sup>9</sup> desaturáza dodá na 9 uhlík dvojnou vazbu za vzniku 18:1. Kyselina olejová se může zvýšit až na koncentraci větší než 90 %. Toho bylo využito u řepky. Podobně u sóje bylo dosaženo obsahu kyseliny olejové 22 až 79 %.

Omega-3 desaturáza byla nejdříve identifikována pozičním klonováním u *Arabidopsis*. Gen byl použit k izolaci homologních genů z dalších organismů, a ty pak byly využity ke genetickému inženýrství nenasycených (nenasyčených) matných kyselin u rostlin.

Existují linie s obsahem 40 % kyseliny stearové a s obsahem 40 % kyseliny laurové v olejích semen. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny laurové byla již v roce 1995 v USA uvolněna pro komerční využití. Byl zde využit antisens konstrukt pro delta<sup>9</sup> desaturázu. Způsobilo to snížení enzymu desaturázy a snížení tvorby olejové kyseliny (18:1) na 1–2 % a zvýšení stearové až na 40 %. Tyto typy olejů jsou vhodné pro průmyslové využití.

Jsou i další linie novošlechtění, z nichž každá obsahuje jeden transgen, který mění obsah mastných kyselin v olejích semen. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny laurové (12:0) obsahuje gen pro lauroyl-ACP thioesterázu z genomu jiné rostliny. Tento enzym způsobuje předčasné ukončení řetězce a hromadění mastných kyselin C<sub>12</sub> (kyseliny laurové) místo C<sub>18</sub> (kyseliny stearové a olejové). Oleje s převahou kyseliny laurové jsou využitelné hlavně pro výrobu mýdel a detergentů ale také v cukrářských tucích a náhražkách mléka. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny stearové obsahuje antisense kopii genu pro stearat desaturázu z řepky. Tato antimediátorová genová konstrukce inhibuje projev genu pro stearat desaturázu, což vede k hromadění olejů s nadbytkem kyseliny stearové (18:0), protože je blokována její desaturace na kyselinu olejovou. Olej s vysokým podílem kyseliny stearové je zvláště vhodný pro výrobu margarínu.

Výjimku tvoří kyselina  $\gamma$ -linolenová, která má příznivé vlivy na léčení atopického ekzému kojenců, snižování alergie, snižování obsahu cholesterolu v krvi a další parametry. Vyskytuje se ale převážně jen ve speciálních typech olejů (z pupalky, brutnáku, jader černého rybízu). Bylo dosaženo přeměny kyseliny linolenové v  $\gamma$ -linolenovou. Přeměna se uskutečňuje prostřednictvím enzymu delta<sup>6</sup> desaturázy. Gen pro tento enzym byl klonován z genomu sinice *Synechocystis*, upraven a pokusně přenesen do genomu tabáku. V semenech docházelo k syntéze kyseliny gama-linolenové; cílem je obohacení oleje řepky o tuto kyselinu.

### **9.5.2 Obsah ligninu**

Genetické modifikace u stromů jsou zaměřeny na nízký obsah ligninu ve dřevu, aby bylo vhodnější pro výrobu papíru. Ročně stojí odstraňování ligninu ze dřeva 20 miliard dolarů. Gen zodpovědný za tvorbu ligninu byl nalezen a pracuje se na jeho vyřazení z funkce u vybraných druhů stromů. Geneticky modifikované osiky mají o 45 % méně ligninu a zároveň rychleji rostou. Hledají se geny, které by zabránili GM stromům produkovat pyl a zabránilo se tak hybridizaci GM a normálních stromů. Tím by se také ulevilo lidem alergickým na pyl. Je snaha o rozluštění genetického kódu stromů; za vhodného kandidáta byl vybrán topol *Populus balsamifera* (genom 550 Mb). Pro srovnání, borovice *Pinus taeda* má genom velký 20 000 Mb, její genom je také sekvenován.

V roce 1994 se podařilo transgenozí dosáhnout změn složení lipidů. Do genomu tabáku byla vnesena antisens konstrukce, která inaktivuje geny pro cinnamyl alkoholdehydrogenázu,

enzym katalyzující poslední krok biosyntézy prekursoru ligninu. Lignin byl pak pozměněn ve složení i struktuře a byl přístupnější chemické extrakci. Xylemová pletiva měla červenohnědou barvu. Genová konstrukce vnesená do genomu osiky podmiňuje červenohnědou barvu dřeva jako nový, nábytkářsky dobře využitelný znak podmíněný transgenozí.

### 9.5.3 Zásobní bílkoviny semen

Manipulace se spektrem zásobních bílkovin semen se provádí se dvěma praktickými cíli:

1. Optimalizace spektra aminokyselin v zásobních proteinech semen. Semena rostlin, zvláště luskovin a obilovin, slouží k potravinářským a krmivářským účelům, ale z hlediska složení aminokyselin nejsou plnohodnotná. Semena luskovin mají nedostatek methioninu a cysteinu, obilninám chybí lysin a methionin. Cílem genových manipulací je doplnit zásobní proteiny semen o typy, které obsahují nadbytek těchto aminokyselin.
2. Ve specifických případech je výhodné, aby byly do genomu vneseny geny pro další proteiny, které by mohly být ukládány podobně jako zásobní proteiny, protože jsou v této formě snadno extrahovatelné a využitelné např. farmakologicky.

Proteiny semen *Brassica napus* jsou významné z hlediska vyváženého, plnohodnotného složení aminokyselin, protože pokrutiny zbylé ze semen řepky po extrakci olejů se používají jako krmivo. Proteiny semen řepky mají nedostatek aminokyselin lysinu a methioninu. Byl klonován gen pro zásobní protein semen z *Bertholetia excelsa* (paraorech). Tento albumin 2S obsahuje vysoký podíl methioninu. Jeho gen, i s původním promotorem, byl vnesen do genomu řepky. V semenech dochází k expresi transgenu a tím ke zlepšení složení aminokyselin v jejich proteinech.

Stejný gen, ale pro protein legumin *Vicia faba*, byl včleněn také do genomu *Vicia narbonensis* a projevoval se v semenech této vikvovité rostliny, v nichž se trojnásobně zvýšil obsah methioninu.

### 9.6 Trvanlivost plodů rajčat

Existují dva typy transgenních rajčat. První typ jsou rajčata s genem **flavr savr**, izolovaným z cv. Caligrande. Později byl využit syntetický transgen. Gen řídí tvorbu antimediatorové-RNA, která blokuje tvorbu (vyřazuje z činnosti normální gen rajčat) **polygalakturonidázy**. Polygalakturonidáza je enzym, který se podílí na poslední fázi zrání plodů. Způsobuje rozklad pektinů ve středních lamelách buněčných stěn. Tento gen se do rajčat vnášel proto, že se předpokládalo, že aktivita enzymu způsobuje měknutí plodů. Zjistilo se, že tomu tak není, že ztráta aktivity enzymu sice měknutí plodů nezabrání, zabrání však do značné míry kažení plodů a plody získají lepší chuťové vlastnosti. Obchodní skladovatelnost se prodloužila z 1 až na 2 až 3 týdny.

Druhý gen, který byl do dědičného základu rajčat vnesen, aby zlepšil vlastnosti plodů, je opět syntetický gen, který zamezuje expresi jednoho z genů pro syntézu etylénu. Etylén je plynný rostlinný hormon. Signál zprostředkovaný etylénem spouští mimo jiné kaskádu procesů, které vedou ke zrání plodů. Pokud se v průběhu vývoje plodů etylén v příslušnou dobu netvoří, plody nečervenají a nedozrávají a zůstávají na keřích velké a zelené. Je možno je pak sklídit všechny najednou, bez poškození je transportovat a ještě po transportu delší dobu skladovat. Jestliže mají dozrát, dají se do kontejneru, do kterého se vpustí etylén. Ke spotřebiteli se pak dostanou plody v optimální kvalitě, čerstvě dozralé a nepoškozené.

Tato rajčata byla uvolněna do americké prodejní sítě k 1. 6. 1994. Bylo prokázáno, že zbytky příslušné DNA i bílkoviny nejsou dieteticky závadné.

Hormon etylén vyžaduje specifické receptory pro citlivost a přenos signálu po směru reakce. Nově byly genetické manipulace biosyntézy etylénu zaměřeny na identifikaci genu kódujícího tento specifický receptor. Gen *Etr1-1* kóduje mutovaný receptor, který kóduje dominantní necitlivost k etylénu u *A. thaliana*, a způsobuje významné zpoždění ve zrání plodů u rajčete a petúnie.

## 9.7 Pylová sterilita

Praktický význam pylové sterility v klasických šlechtitelských postupech spočívá především v nuceném cizosprášení pro produkci heterózního osiva. Při tvorbě transgenních odrůd je často požadavek, aby transgen nebyl přenášen pylem, tedy požadavek pylové sterility. Pylová sterilita využitelná ve šlechtění (jaderně cytoplazmatický typ s obnoviteli fertility) neexistuje u všech odrůd kulturních rostlin a je tedy žádoucí, aby transgenoze přinesla široce využitelné systémy. Takovéto systémy jsou v současné době asi čtyři.

První systém využívá chimérického genu pro barnázu z *Bacillus amyloliquifaciens*. Barnáza je extracelulární vysoce aktivní nukleáza této bakterie, která degraduje jak RNA, tak DNA. Je syntetizována jako neaktivní pre-proenzym, k jehož jedné úpravě dochází při opuštění bakteriální buňky a odstranění signálního peptidu, a potom teprve vně bakteriálních buněk ke druhé úpravě a vzniku aktivního enzymu. V bakteriálních buňkách současně existuje vnitrobuněčný inhibitor, protein barstar, který má 89 aminokyselin. Příslušný gen byl rovněž klonován. Upravený zkrácený gen pro barnázu (zbavený sekvencí, jež jsou u vzniklého proteinu upravovány) byl zařazen za promotor specifický pro tapetovou vrstvu buněk tabáku (označen TA29) a vnesen transgenozí do genomu tabáku a řepky olejné. Tím způsobil selektivní destrukci tapetových buněk prašníků a následně degeneraci pylových zrn. Stejný vliv měl i chimérický gen pro ribonukleázu *T1* z *Aspergillus oryzae* s promotorem TA29. Pokud se použije obdobným způsobem v jiné transgenní linii gen *barstar* se stejným promotorem, pak tato linie může působit obdobně jako obnovitel fertility při klasické cytoplazmaticko-jaderné pylové sterilitě.

Jaderně podmíněná pylová sterilita byla získána u *Petunia hybrida* blokádou syntézy flavonoidů v prašnicích, která vedla k předčasnému zastavení vývoje pylu. Bylo toho dosaženo jednak transgenozí jednak antisens genem a jednak kosupresí, tedy vnesením transgenů pro chalkonsyntázu, jehož přítomnost vedla k potlačení vlastního genomového genu pro chalkonsyntázu. Tento enzym katalyzuje první krok syntézy prekurzorů flavonoidů. K obnovení fertility byly flavonoidy aplikovány na bliznu nebo jako příměs pylu.

Třetí systém byl zatím použit pouze u tabáku. Pylové sterility tam bylo dosaženo expresí genu *rolC* *Agrobacterium rhizogenes* řízeného promotorem 35S. Exprese genu však vedla k morforegulačním změnám. Fertilita byla obnovena expresí genu pro antisens RNA u F<sub>1</sub> hybridů.

Čtvrtý systém byl rovněž využit u tabáku. Je to inducibilní systém destrukce specifických rostlinných pletiv. Je založen na aktivitě genového produktu genu *E. coli argE*, který mění netoxickou látku N-acetyl-fosfinitricin na herbicid fosfinitricin. U rostlin, které nesou tento gen, k jehož expresi dochází specificky v tapetálních buňkách prašníků, je tvorba pylu blokována po postřiku rostlin netoxickou koncentrací N-acetyl-fosfinitricinu.

## **9.8 Nové typy rostlin**

### **9.8.1 Rýže s provitaminem A**

Hlavní potravina asi pro 4 miliardy lidí je rýže. Hlavním problémem především v chudých zemích je nedostatek vitamínu A. Symptodem nedostatku je šeroslepost až úplná slepota. Uvádí se, že asi 124 mil. dětí má nedostatek vitamínu A, slepota postihuje až 0,5 mil. dětí ročně. Proto je snaha obohatit rýži o  $\beta$  karoten = provitamin A. Prostřednictvím genetických modifikací byla provedena introdukce tří genů do genomu rýže, jejichž exprese vedla k tvorbě provitaminu v endospermu.

Byly to geny *psy* (phytoen syntáza) z narcisu s promotorem specifickým pro endosperm, *ctrl* (karoten desaturáza) z bakterie *Erwinia* a gen *lcy* pro enzym lykopen  $\beta$ -cyklázu. Tato modifikovaná rýže má žlutooranžovou barvu, proto se jí říká zlatá rýže. Další modifikace u rýže má za cíl zvýšit obsah železa.

### **9.8.2 Řepka olejná a sója se zvýšeným obsahem vitamínu E**

*Arabidopsis* hraje důležitou roli i při odhalování genů, které mají příznivý dopad na nutriční kvalitu plodin. Cestou pozičního klonování genů u *A.* byl identifikován gen *VTE3* kódující syntézu enzymu 2-metyl-6phytylbenzoquinol methyltransferázy, který je součástí biosyntézy vitamínu E. Gen pro tento enzym byl dlouho hledán, protože se předpokládalo, že přeměňuje delta-tokoferol na více biologicky aktivní gama-tokoferol. Delta-tokoferol se akumuluje v relativně vysoké koncentraci u sóje a dalších olejnin. Transgenní rostliny sóje



s exprimovaným genem *VTE3* během tvorby semen již neakumulují delta-tokoferol, tak zlepšují nutriční hodnotu sójového oleje. Koexprese *VTE3* a *Arabidopsis* gamma-tokoferol metyltransferázy *VTE4* v semenech způsobuje 100% akumulaci alpha-tokoferolu, který je biologicky nejvíce aktivním tokoferolem. Tak introdukce dvou genů *Arabidopsis* zlepšuje nutriční kvalitu sójového a řepkového oleje ve srovnání se standardem.

### **9.8.3 Kávovník s bezkofeinovými boby**

Brazilskými vědci byly identifikovány rostliny kávovníku *Coffea arabica* téměř bezkofeinové (3 keřky z 3000) v důsledku spontánních mutací. Problém se řeší efektivněji genetickými modifikacemi. Pěstují s již rostliny, kterým chybí klíčový gen pro tvorbu kofeinu, a produkují o 50 až 70 % méně této látky. Toto snížené množství je i v zrnkách budoucí kávy. Podařilo se tak vytvořit produkt, který má srovnatelné množství kofeinu jako u produktů, u nichž je kofein odstraňován fyzikálními metodami. Alkaloid kofein se extrahuje ze zrn organickými rozpouštědly nebo kyslíčným uhlíčitým. První způsob je levný, ale používaná rozpouštědla jsou karcinogenní, a v kávě mohou zůstat stopy rozpouštědla. CO<sub>2</sub> je neškodný, ale aby se z plynu stalo rozpouštědlo, je třeba jej zkapalnit a zchladit. Celý proces je energeticky a technologicky náročný a výsledný produkt se prodražuje. Často se odstraňují i žádoucí aromatické látky.

U GM plodiny je káva bez kofeinu bez jakýchkoliv vedlejších nákladů. Kávovníkové keře se sníženým obsahem kofeinu patří ke kávovníku *Coffea canephora*. Na tvorbě kofeinu v rostlinách se podílí tři enzymy. Genetická modifikace je založena na zabránění exprese jednoho genu

## **9.9 Odolnost vůči stresovým faktorům**

Je známo několik typů transgenů, které zvyšují odolnost rostlin k suchu a k nízkým teplotám. Jeden z nich je gen *SacB* z *Bacillus subtilis*. Tento gen kóduje enzym levansukrázu, který podmiňuje syntézu a akumulaci fruktanů. Transgen má promotor 35S a jeho kódující sekvence navíc signální sekvenci pro přenos enzymů do mitochondrií. Fruktany jsou molekuly polyfruktózy, které jsou produkovány některými bakteriemi a některými rostlinami. Rostlinné fruktany se skládají z 10–200 molekul fruktóz bakteriální mohou být ještě podstatně větší. Jsou rozpustné, mají schopnost depolymerace a opětné polymerace a tím ovlivňují stabilitu osmotické hodnoty při suchu a nízkých teplotách. Gen *SacB*, vnesený do genomu tabáku, zvyšuje toleranci k suchu. Zvýšenou toleranci k suchu podmiňuje také vnesení upraveného bakteriálního genu pro cholindehydrogenasu do rostlinného genomu. Tento enzym podmiňuje syntézu glycin betainu, což je rovněž osmotikum, které zvyšuje odolnost k suchu. Transgenní tabák je tak schopen růst na médiu s vysokým obsahem chloridu sodného.

Zajímavou skupinu transgenů tvoří geny pro metalothioneiny. Jsou to živočišné proteiny, které mají schopnost pevně vázat některé toxické těžké kovy, jako např. kadmium, olovo, rtuť. Cílem praktického využití transgenních rostlin s těmito geny je získat rostliny, které by sloužily jako „odpadní koše“ a čistily půdu při rekultivacích.

### **9.9.1 Rezistence k chladu a suchu**

K odstranění **oxidativního stresu** se využívá antioxidantů, genů, kódujících látky enzymatické i neenzymatické povahy, které mají schopnost odstraňovat kyslíkové radikály. Příkladem je superoxid dismutáza; gen z tabáku byl vnesen do genomu vojtěšky.

Odolnost vůči **dehydrataci** je možné řešit prostřednictvím změn ve složení lipidů plazmatické membrány. Trstuje se gen izolovaný ze sinice a změny ve spektru mastných kyselin prostřednictvím enzymu delta-desturázy, který tento gen kóduje. Dochází k menším ztrátám vody.

Geny pro fruktany jako **osmoprotektanta** se využívají k ochraně enzymů a membrán před poškozením.

Rezistence k **zasolení** – je známo, že v rostlinách je protein, který vycytává sůl a ukládá ji v oddělených kompartmentech uvnitř rostlinných buněk. Pokud je soli hodně, bílkovina nestačí všem sůl zabudovat a volná sůl přítomná v rostlině naruší normální biochemické pochody v buňkách, a rostlina usychá. Bylo vytvořeno geneticky modifikované rajče, které vytváří více proteinu transportujícího sůl, a to rostlině dovoluje růst a produkovat plody i v případě, že je zalévána 50x slanější vodou než je běžné. Rajče odolává vodě, která obsahuje třetinu solí vody mořské. Gen byl získán z arabidopsis – *AtNHX1*.

Rajče je obecně považováno za citlivé k chladu. Stejně jako u arabidopsis konstitutivní exprese transkripčního faktoru CBF1 (C-repeat/dehydration response element binding factor 1) z rodiny AP2/EREBP způsobuje zvýšenou **toleranci k chladu, oxidativnímu stresu a vodnímu deficitu** u rajčete a řepky olejky.

### **9.10 Tvorba protilátek**

V živočišných organizmech jsou protilátky důsledkem variability základních proteinů – imunoglobulinů. Molekula imunoglobulinu je tvořena ze čtyř polypeptidových řetězců, ze dvou těžkých řetězců o stejné primární struktuře a ze dvou lehkých řetězců. Těžké řetězce obsahují asi 430 aminokyselinových zbytků a lehké asi 214. Molekula imunoglobulinu je tvořen pohromadě bisulfidickými vazbami. Každý řetězec sestává ze dvou základních oblastí:

- **konstantní oblasti (C)**. To je úsek, který se vyznačuje relativně neměnnou sekvencí aminokyselin.

- **variabilní oblasti (V).** To je úsek, kterým se imunoglobuliny příslušného typu těžkého nebo lehkého řetězce navzájem liší.

Variabilní oblast každého řetězce je složena ze tří hypervariabilních úseků a čtyř úseků základní struktury. Hypervariabilní úseky jsou na rozdíl od úseků základní struktury značně proměnlivé a tvoří vazebná místa pro antigen. Specifita imunoglobulinu vzhledem k antigenu je tedy podmíněna primární strukturou variabilní oblasti. Část konstantní oblasti těžkého řetězce je flexibilní a svou flexibilitou usnadňuje vazbu antigenu k imunoglobulinu.

Úplná molekula IgG má tvar písmene Y a má mnoho nezávislých domén. U člověka je 5 základních typů těžkých řetězců, které se dělí na další podtypy. Podle toho, jaký typ nebo podtyp těžkého řetězce se v molekule imunoglobulinu vyskytuje, zařazujeme ho do jedné z pěti tříd:

1. IgG se nacházejí jako protilátky v séru,
2. IgM se vyskytují jako receptory na povrchu B-lymfocytů,
3. IgA se vyskytují ve slinách,
4. IgD působí jako receptory v nezralých lymfocytech,
5. IgE se vyskytují při parazitární imunitní odpovědi.

V průběhu zrání B lymfocytů dochází k častým rekombinacím v hypervariabilních oblastech a to vede k velké variabilitě imunoglobulinů. Monoklonální protilátky obsahují jen jeden typ imunoglobulinů. Teoreticky může vzniknout nejméně 500 milionů kombinací. Geny pro monoklonální protilátky je možno vnést do rostlinného genomu. Nemusí obsahovat celý lehký a celý těžký řetězec, ale jen jejich variabilní oblasti (Fab – antibody binding fragment). Využití transgenních rostlin pro produkci monoklonálních protilátek bylo poprvé publikováno v r. 1989. Pro produkci celé protilátky je třeba vnést do rostlinného genomu gen pro lehký řetězec i gen pro těžký řetězec. Oba mohou být na jednom úseku exogenní DNA (jedné T-DNA) nebo mohou geny pro lehký a těžký řetězec existovat ve dvou různých transgenních liniích a ke vzniku protilátky dojde až po zkřížení obou linií.

IgG jsou vylučovány do mezibuněčných prostor. Zmenšené deriváty těchto proteinů však jsou lokalizovány v cytoplasmě. Úseky, které jsou schopny vázat antigeny, tvoří jen malou část celé molekuly. K imunitní odpovědi stačí, aby rostlinné buňky syntetizovaly tyto úseky (domény Fv). Dalším zjednodušením je, že tyto domény se skládají jen z jednoho řetězce, místo obvyklých dvou scFv (single chain Fv). Tyto scFv fragmenty jsou velmi malé a odpadají problémy spojené se vzájemným připojením obou velkých molekul řetězců. Gen pro scFv je syntetická sekvence DNA, která kóduje variabilní lehkou a variabilní těžkou doménu. Obě jsou spojeny vazebnou sekvencí a tvoří malý polypeptid (asi 28kDa). Tyto scFv mohou být dále modifikovány. Například dva různé scFv mohou být spojeny. Tyto fragmenty mohou být použity proti některým regulačním proteinům rostlinných buněk nebo proti rostlinným patogenům, např. virovým proteinům.

Předpokládá se, že rostliny budou zdrojem nejlacinějších protilátek. Bylo prokázáno, že rostliny budou vhodné pro pasivní imunizaci spočívající v požívání transgenních rostlin

obsahujících fragmenty protilátek. Protilátky, využitelné v průmyslu mohou být ukládány v semenech rostlin a tam dlouhodobě skladovány, dokud nebudou izolovány.

Prvním příkladem produkce funkční protilátky rostlinou (tabák) byl myší imunoglobulin IgG1. Tvorba protilátky se skládala ze dvou kroků. V 1. kroku byly vytvořeny dvě transgenní linie tabáku vždy s jedním genem pro těžký nebo pro lehký řetězec. V 2. kroku byly kříženy dvě rostliny produkující odlišný řetězec a byl vytvořen hybrid mající v genomu oba geny a produkující kompletní protilátku v listech, kde byla součástí proteinů (1,3 %).

Protilátky proti *Streptococcus mutans*, původci zubního kazu, působí průkazně proti této bakterii. Protilátky rozpoznávají streptokokový antigen a brání kolonizaci patogena v ústní dutině. Ke genetické modifikaci byl použit tabák. Do jedné linie rostlin tabáku byl introdukovan gen pro těžký řetězec, do druhé gen pro lehký řetězec. Kompletní protilátky produkovaly hybridní rostliny získané křížením obou typů rostlin

V roce 1999 firma Monsanto vyprodukovala rostlinné protilátky proti **herpesvirům**. Pokusným objektem byla sója. Byly získány čtyři typy rostlin, které produkovaly H řetězec, L řetězec, J (joining, nezbytný pro tvorbu dimerů) řetězec a sekreční komponentu. Teprve křížením jednotlivým rostlin byl vytvořen čtyřnásobný hybrid produkující kompletní protilátku.

V roce 1999 byla také publikována zpráva, že byla vytvořena rostlinná terapeutická vakcína, která je schopna bránit růstu experimentálně udržovaných nádorových buněk myši (non-Hodgins lymphoma cells). U laboratorní myši docházelo k uzdravení 80 % zvířat, při čemž v kontrolním vzorku všechny myši do tří týdnů umíraly. Vakcína proti této chorobě existuje, produkuje se biotechnologicky savčími buňkami v kultuře a je velice drahá. Produkce rostlinnými buňkami je mnohem levnější a je naděje, že bude možno využít rostlinné vakcíny k léčení některých nádorových onemocnění u lidí.

## ***9.11 Rostlinné vakcíny***

Transgenní rostliny mohou produkovat proteiny, které jsou vlastní lidským patogenům, napadajícím epiteliální membrány. Jedná se o bakterie a viry, způsobující nachlazení, ale také ty, které jsou přenášeny kontaminovanými potravinami nebo pohlavním stykem. Vakcíny, účinné proti těmto infekcím, stimulují mukózní imunitní systém k produkci imunoglobulinů IgA (S-IgA). Tato imunitní odpověď vzniká v buňkách epitelu respiračního a trávicího traktu. K imunizaci dochází požíváním čerstvé zeleniny nebo jiných rostlinných produktů. Transgenní rostliny, u nichž v jedlých pletivech dochází k produkci antigenů, mohou být využívány jako levné "potravinové vakcíny". Zatím byly USA patentovány některé transgeny, využitelné v rostlinách jako vakcíny. Prozatím se počítá s jejich využitím v rostlinách tabáku a bramboru, perspektivně banánů, jahod, salátu, ředkviček, mrkve, rajčat atp. Jsou to zejména tyto transgeny:

1. Protein *spaA* ze *Streptococcus mutans*. Tato bakterie se vyskytuje v ústní dutině člověka a je hlavní příčinou zubních kazů. V listech transgenního tabáku její uvedený protein tvoří asi 0,02 % proteinu listů.
2. Povrchový antigen hepatitis B (HBsAg). Hrubý extrakt listů tabáku obsahuje 0,01 % tohoto proteinu z celkového množství proteinů listů. Byl použit k imunizaci myši a vyvolával imunitní reakci.
3. Termolabilní enterotoxin B z *E. coli* a podjednotka B toxinu cholery. V zemích třetího světa se občas objevuje nakažlivé průjmové, někdy smrtelné onemocnění, způsobené některými kmeny *E. coli*. Enterotoxin (LT) z *E. coli* je multimerní protein, který je strukturně, funkčně i antigenními vlastnostmi podobný toxinu cholery (CT). U myši byl prokázán imunitní charakter transgenních rostlin tabáku a bramboru.

## 9.12 Farmakologicky využitelné vzácné proteiny

K hlavním úspěchům genového inženýrství již v letech 1980–1990 patřilo, že byly klonovány geny pro  **lidský inzulin**, **interferon** a **růstový hormon**. Biotechnologické firmy tyto vzácné proteiny začaly vyrábět pro terapeutické účely s využitím transgenních mikroorganismů a živočichů. Se sekvenováním lidského genomu jsou rozpoznávány a klonovány další geny pro vzácné proteiny, které by mohly reparovat některé genetické choroby člověka. V mnoha případech nemusí jít jen o lidské geny a genetické choroby.

**Hirudin** je protein, který působí proti srážení krve. Patologickým typem srážení krve u starších osob je trombóza a při jejím léčení se využívá antitrombinových látek. Z nich nejznámější je heparin. Ten ale má své nevýhody. Pijavky mají ve svých slinách antikoagulační protein hirudin. Je to malý protein (7kDa), který je vysoce acidický, tvoří komplexy s trombinem a je to nejsilnější existující inhibitor trombinu. Je to farmakologicky významný protein, který již byl biotechnologicky vyráběn (prostřednictvím *E. coli*, *Streptomyces*, bakulovirů, kvasinek). Ten však je řádově méně účinný než přírodní. Přírodní hirudin obsahuje v poloze 63 tyrosin, na který je vázána síra, ale vyráběný prostřednictvím mikroorganismů tuto anomální aminokyselinu neobsahuje. Nyní je možnost ho produkovat prostřednictvím transgenních rostlin. Upravený chimérický gen byl včleněn do genomu *Brassica napus* tak, aby polypeptid kódující hirudin byl součástí proteinu oleosinu. Oleosiny jsou proteiny, které se nacházejí v membránách olejových tělísek buněk zásobních orgánů semen. Vyznačují se tím, že se velmi snadno extrahují a s nimi se extrahuje i hirudin. Ten se od oleosinu odděluje proteolytickým štěpením. Jedná se tedy o vnesení fúzního transgenu oleosin hirudin.

Další skupina proteinů, o jejichž produkci prostřednictvím transgenních rostlin se uvažuje, jsou některé minoritní **proteiny lidské krevní plazmy**. Ty jsou rovněž produkovány pomocí savčích buněk *in vitro*, ale produkce prostřednictvím rostlin je často výhodnější. Jedním z takovýchto proteinů je cytokin GM-CSF. Ten je potřebný po transplantaci kostní dřeně, kdy často dochází k infekcím a tento protein zvyšuje imunitu. Gen byl klonován a kódující sekvence má 432bp. Polypeptid má signální peptid 17 aminokyselin a zralý polypeptid má

délku 127 aminokyselin. Pro expresi v rostlinách bylo třeba zkonstruovat chimerický gen, který má jiný signální peptid. Byl to signální peptid gluteinu rýže a z téhož genomu byl také promotor. Docházelo k dostatečné expresi proteinu v semenech tabáku a není pochyb o tom, že v současné době je již protein exprimován v semenech některých produkčně výhodných kulturních druhů rostlin.

Dalšími kandidáty jsou geny pro **faktory srážlivosti krve** pro léčení hemofilie FVIII a IX. Je velmi pravděpodobné, že některé proteiny, produkované v zásobních proteinech semen, budou vhodné přímo ke konzumaci bez izolace pro aktivní i pasivní imunizaci.

Jiný typ lidských proteinů, které bude vhodné produkovat prostřednictvím transgenních rostlin, jsou **proteiny lysozómů**. Lysozomy jsou degradativní orgány živočišných buněk a jsou důležité pro degradaci makromolekul a recyklaci vzniklých monomerů. Lysozomy obsahují nukleázy, fosfatázy, proteázy a další enzymy, které degradují polysacharidy a lipidy. Absence některé ze specifických hydroláz v lysozomech vede k hromadění nerozložených molekul substrátu a u člověka to má za následek pestré klinické obrazy. Např. Tay-Sachsova nemoc, která vede v nervových buňkách k hromadění gangliosidu  $G_{M2}$ , vede k smrti obvykle ve věku dítěte kolem pěti let. Gaucherova choroba je defektem enzymu glukocerebrosidu (kyselý  $\beta$ -glukosidázy) a vede k akumulaci glykosfingolipidů v buňkách makrofágů, což vede k vážným poruchám kostry a trávicího traktu. Tato dědičná choroba se dá léčit dodáváním chybějícího enzymu, problém je však jeho získávání v dostatečném množství. Velmi vhodné jsou pro jeho produkci transgenní rostliny. Chimérický gen byl vnesen do genomu tabáku a projevuje se v proteinech listů v míře, při níž se již vyplatí jej extrahovat.

Produkt	Druh transgenní rostliny
<b>Krevní proteiny</b>	
albumin	brambor a tabák
enkefaliny	tabák, <i>Arabidopsis thaliana</i>
interferon $\alpha$	rýže
GM-CSF	tabák
scFv	tabák
<b>Potenciální vakcíny</b>	
HIV, rhinovirus	<i>Vigna</i>
HBsAg	tabák
endotoxin <i>E. coli</i>	tabák a brambor

antigen malárie	tabák
lidský sérový albumin	tabák, brambor
virus neštovic	tabák

**Tab. 9.2** – Lidské farmakologicky významné proteiny produkované transgenními rostlinami

### 9.13 Tvorba fytáz

Fytáza je enzym, který je univerzálně rozšířen a podmiňuje degradaci kyseliny fytové, která je hlavní zásobní formou fosforu v semenech. Rostliny nemají dostatek tohoto enzymu. Fytáza z *Aspergillus niger* přeměňuje kyselinu fytovou na další formy a pak dochází až k přeměně na fosfor. U přežvýkavců mikroflóra zajišťuje rozložení kyseliny fytové rostlinného původu až na využitelný fosfor. Avšak v trávicím traktu drůbeže zůstává většina anorganického fosforu nespotebována a je výhodné, aby hladina fytázy v rostlinách byla zvýšena. Kyselina fytová je navíc antinutričním faktorem, který brání vstřebávání dalších minerálů, jako je železo, zinek, vápník nebo hořčík. Gen pro fytázu z *Aspergillus niger* se projevuje v genomu tabáku a uvažuje se i o biotechnologické produkci enzymu prostřednictvím rostlinných buněk.

### 9.14 Tvorba biodegradovatelných polyesterů

Organizmy mohou za specifických podmínek uchovávat uhlík a energii ve formě osmoticky inertních polymerů. U bakterií to mohou být polyestery jako poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) a jiné poly(3-hydroxyalkanoáty) (PHA). Tyto látky jsou využitelné jako biodegradovatelné plasty. Jsou značně perspektivní vzhledem ke zvyšujícím se problémům hromadění umělohmotného odpadu. Polyhydroxyalkanoáty jsou syntetizovány např. v bakteriích *Pseudomonas aeruginosa*, *P. oleovorans* nebo *Alcaligenes eutrophus*. Tvorba PHB je u bakterií zprostředkována třemi enzymy:

1. 3-ketothiolasou (gen *phbA*)
2. NADH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázou (gen *phbB*) a
3. PHB syntázou, také nazývanou PHB polymerázou (gen *phbC*).

Produkce PHB je vázána na syntézu mastných kyselin, jejíž podstatná část probíhá v chloroplastech.

Polyhydroxybutyrát se hromadí v transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana*, které jej syntetizují. Do genomu *Arabidopsis thaliana* byly přeneseny upravené 3 bakteriální geny, které mají všechny promotor 35S. PHB se hromadí v listech, v buněčných inkluzích v cytoplasmě, vakuolách i buněčném jádře, ale tvoří jen asi 0,14 % sušiny. Akumulace PHB se silně zvyšuje, jestliže je dopravován do chloroplastů. Tvoří potom až 14 % sušiny. Produkce polyhydroxybutyrátu prostřednictvím *Arabidopsis thaliana* je jen modelový přístup.

Pro vlastní průmyslovou produkci se předpokládá, že tento polymer bude produkován v plastidech hlíz bramboru. Pravděpodobně by pro tento účel byly vhodné již existující transgenní brambory, jejichž hlízy neobsahují škrob. Uvažuje se rovněž o akumulaci v semenech. Přitom je samozřejmou podmínkou, aby transgenní rostliny nebyly závadné pro ekosystémy a člověka. Rostlinné části, kumulující PHB nebudou vhodné k požívání. Nemohou to tedy být takové rostlinné části, které obvykle slouží jako potrava nebo krmivo, aby nedošlo k záměně. Nemohou to být ani semena plodin, která jsou příležitostně konzumována ptáky. Produkce PHB bude vyžadovat podrobný rozbor z hlediska zajištění neškodnosti transgenních rostlin. Předpokládá se, že to budou semena takových rostlinných druhů, která nejsou pojídána člověkem ani požívána zvířaty (např. *Ricinus communis*).

Transgenozí bylo dosaženo také akumulace fruktanů v rostlinných pletivech. Fruktany jsou některými rostlinami syntetizovány. Jsou to polyfruktosové molekuly, které slouží k akumulaci cukrů. Ve vakuolách jsou enzymy, které mění sacharosu na fruktany a ty pak mohou být degradovány specifickými hydrolasami. Zatímco rostlinné fruktany se skládají z 5–60 zbytků fruktosy, bakteriální se skládají až ze 100 000 zbytků fruktosy (u rodů *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*). Gen *SacB* z *Bacillus subtilis*, který kóduje příslušný enzym levansacharasu byl modifikován a vnesen do buněk tabáku. Transgenní rostliny akumulovaly fruktany shodně s bakteriálními v množství 3–8 % sušiny. To otevírá perspektivu produkce fruktanů pro potravinářské i průmyslové účely prostřednictvím transgenních rostlin. Kromě toho gen *SacB*, vnesený do genomu tabáku, zvyšuje toleranci k suchu. Zvýšenou odolnost k suchu podmiňuje také vnesení upraveného bakteriálního genu pro cholindehydrogenázu do rostlinného genomu. Tento enzym podmiňuje syntézu glycin betainu, což je rovněž osmotikum, které zvyšuje odolnost k suchu. Transgenní tabák je pak schopen růst na mediu s vysokým obsahem chloridu sodného.

### **9.15 Fytoremediace**

Existují transgenní rostliny, které jsou schopné měnit toxickou formu dvojmocných iontů rtuti na mnohem méně toxickou formu elementární rtuti. Transgenních rostlin se již ujala biotechnologická firma PhytoWork Inc., která chce produkovat transgenní rostliny pro remediaci.

Zajímavou skupinu tvoří geny pro metalothioneiny. To jsou živočišné proteiny, které mají schopnost pevně vázat některé toxické těžké kovy, jako například kadmium. Většina rostlin hromadí kadmium v kořenech, ale u salátu, tabáku a některých dalších se kadmium dostává i do listů. Jakýkoli způsob konzumace rostlin pak může nepříznivě ovlivňovat lidské zdraví. Jsou dva způsoby využití transgenů pro metalothioneiny:

1. Expres v kořenech zdržuje toxické kovy již v kořenech a nedovolí jim hromadit se v požívaných částech rostlin.



2. Druhou možností je využít rostlin k tzv. bioremediaci, t.j. odstranění toxických látek z půdy tím, že budou ve zvýšené míře akumulovány v rostlinách a ty pak zlikvidovány.

Ničivé účinky trinitrotoluenu (TNT) se neomezují jen na exploze. TNT a látky vznikající jeho rozkladem jsou pro člověka a další živé organizmy silně toxické. Nejen výrobní haly, skladiště, ale i rozsáhlé prostory vojenských stělnic jsou touto látkou silně kontaminovány. V likvidaci TNT by měly pomáhat i GMO. Bakterie *Pseudomonas putina* s dědičnou informací obohacenou o gen pro světélkující enzym a geny pro enzymy rozkládající TNT se intenzivně množí právě v místech, kde je půda kontaminována výbušninou. Fluoreskující světlo z rostoucích bakterií pak tato místa jasně označí. Po geneticky modifikovaných „bakteriálních průzkumnících“ může přijít GM „úklidová četa“. V laboratořích byly získány rostliny tabáku s dědičnou informací obohacenou o gen pro nitroreduktázu. Díky ní dokáže tabák rozkládat TNT a může růst i na půdách znečištěných výbušninou. Při laboratorních pokusech tabáky zlikvidovaly TNT z živné půdy za 3 dny a samy žádné TNT neobsahovaly. Byly jej schopny rozložit na neškodné látky.

Také byla získána GM bakterie druhu *Sinorhizobium meliloti*, která je schopná rozkládat dinitrotoluen (DNT), jednu z látek vznikajících při rozkladu TNT. Mikroorganismus patří mezi hlízkové bakterie žijící symbioticky na kořenech motýlokvetých rostlin (bobovité, *Fabaceae*). Kontaminovaná půda byla obohacena jak GM bakterií, také zde byl vysazen hostitel – vojtěška. Na jiných pozemcích kontaminovaných DNT vysadili vojtěšku bez bakterií. Vojtěška podporovaná GM bakteriemi vytvořila dvakrát tolik zelené hmoty než vojtěška bez GM bakterií. Navíc rostliny a bakterie dokázaly z půdy odstranit téměř všechny DNT i při velmi silném znečištění.

# Literatura

Arabidopsis Genome Initiative: *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796–815, 2000.

Ausubel, F.: *Summaries of National science foundation-sponsored Arabidopsis 2010 Projects and National science foundation-sponsored Plant genome projects that are generating Arabidopsis resources for community*. Plant Physiol. 129: 394–437, 2002.

Azpiroz-Leehan, R., Feldmann, K.A.: *T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: Going back and forth*. Trends Genet. 13: 152–159, 1997.

Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.: *In Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. C. R. Acad. Sci. Paris 316: 1194–1199, 1993.

Blanc, G., Barakat, A., Guyot, R., Cooke, R., Delseny, M.: *Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome*. Plant Cell 12: 1093–1102, 2000.

Buchanan B.B., Cruissem W., Jones R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp. 282 – 357, 988-1023, 1102–1201, 2000.

D'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N. et al.: *Turning meiosis into mitosis*. PLoS Biol. 7: e1000124, 2009.

Dickinson, M.: *Molecular Plant Pathology*. BIOS Scientific Publishers, New York, USA, 2003.

Diggle, P.K., Di Stilio, V.S., Gschwend, A.R. et al.: *Multiple developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms*. Trends in Genet. 27: 368–376, 2011.

Feldmann, K.A., Marks, D.M.: *Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of Arabidopsis thaliana: a none tissue culture approach*. Mol. Gen. Genet. 208: 1–9, 1987.

Grimanelli, D.: *Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms*. Curr. Opin. Plant Biol. 15: 57–62, 2012.

Goff, A.S., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H. et al.: *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa ssp. japonica)*. Science 296: 92–100, 2002.

Hardeman, K.J., Chandler, V.L.: *Characterization of bz1 mutants isolated from mutator stocks with high and low numbers of Mu1 elements*. Dev. Genet. 10: 460–472, 1989.

- Hilson, P. et al.: *Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications*. Genome Res. 14: 2176–2189, 2004.
- Hrubá, P.: *Exprese genů během mikrosporogeneze a vývoje pylu*. Biol. listy 64: 201–214, 1999.
- Hughes, M.A.: *Plant Molecular Genetics*. Addison Wesley Longman Limited, Dorchester, Great Britain, 1996.
- Iwano, M., Takayama, S.: *Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility*. Curr. Opin. Plant Biol. 15: 78–83, 2012.
- Janoušek, B.: *Determinace pohlaví u krytosemenných rostlin*. Biol. listy 61: 101–122, 1996.
- Koblížková, A.: *Mapování genomů rostlin pomocí mikrosatelitových markerů*. Biol. listy 63: 139–153, 1998.
- Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R.: *T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis*. Plant Cell 11: 2283–2290, 1999.
- Křížková, L.: *Přenos a inzegrace T-DNA do rostlinného genomu*. Biol. listy 63: 17–37, 1998.
- Lindsey, K., Topping, J.F.: *T-DNA-mediated insertion mutagenesis*. In: Foster, G.D., Twell, D. (eds.) *Plant Gene Isolation: Principles and Practise*. John Wiley & Sons Ltd., England, pp. 275–300, 1996.
- Lubberstedt, T., Zein, I., Andersen, J., Wenzel, G., Krutzfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M., Chun, S.: *Development and application of functional markers in maize*. Euphytica 146: 101–108, 2005.
- Martienssen, R.: *Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2021–2026, 1998.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., Henikoff, S.: *Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics*. Plant Physiol. 123: 439–442, 2000.
- Meinke, D.W., Meinke, L.K., Showalter, T.C., Schissel, A.M., Mueller, L.A., Tzafrir, I.: *A sequence-based map of Arabidopsis genes with mutant phenotypes*. Plant Physiol. 131: 409–418, 2003.
- Ondřej, M.: *Genové inženýrství kulturních rostlin*. Academia Praha, 1992.
- Ondřej, M., Drobník, J., Gartland, K.M.A., Gartland J.S.: *Genové inženýrství rostlin*. VŠCHT Praha, 1999.
- Østergaard, L., Yanofsky, M.: *Establishing gene function by mutagenesis in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 39: 682–696, 2004.

Peters, J.L., Cnudde, F., Gerats, T.: *Forward genetics and map-based cloning approaches*. Trends Plant Sci. 8: 484–491, 2003.

Phillips, R.L., Vasil, I.K.: *DNA-Based Markers in Plants*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 2001.

Ramulu, K.S., Sharma, V.K., Naumova, T.N., Gijkhuis, P., Lookeren Campagne, M.M.: *Apomixis for crop improvement*. Protoplasma 208: 196–205, 1999.

Řepková, J., Relichová, J.: *Genetika rostlin*. MU v Brně, 2001.

Sáková, L., Sobotka, R., Čurn, V.: *Molekulární základ sporofytické autoinkompatibility*. Biol. listy 67: 41–57, 2002.

Sasaki, T., Burr, B.: *International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome*. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 138–141, 2000.

Slade, A.J., Fuerstenberg, S.I., Loeffler, D., Steine, M.N., Facciotti, D.: *A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING*. Nature Biotech. 23: 75–81, 2005.

Snustad, D.P., Simmons, M.L.: *Genetika*. Masarykova univerzita, 2009.

Srikanth A., Schmidt M.: *Regulation of flowering time: all roads lead to Rome*. Cell. Mol. Life Sci. 68: 2013–2037, 2011.

Snustad, D.P., Simmons, M.L.: *Genetika*. Masarykova univerzita, 2009.

Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., Martienssen, R.: *Patterns of gene action in plant development revealed by encancer trap and gene trap transposable elements*. Genes Dev. 9: 1797–1810, 1995.

Sussman, M.R., Amasino, R.M., Young, J.C., Krysan, P.J., Austin-Phillips, S.: *The Arabidopsis knockout facility at the University of Wisconsin-Madison*. Plant Physiol. 124: 1465–1467, 2000.

Tamás, L.: *Nízka teplota – stress – proteíny*. Biol. listy 64: 19–32, 1999.

Tanurdzic, M., Banks, J.A.: *Sex-determining mechanisms in land plants*. Plant Cell 16: S62–S71, 2004.

*The Multinational Coordinated Arabidopsis thaliana Functional Genomics Project*. Annual Report, 2005.

Thomas, S.G., Huang, S., Staiger, C.J., Franklin-Tong, V.E.: *Signals and targets triggered by self-incompatibility in plants: recognition of "self" can be deadly*. In: Baluška, F., Mancuso,

S., Volkmann, D. (eds.). *Communication in Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 75–89, 2006.

Westhoff, P. et al.: *Molecular plant development from gene to plant*. Oxford Univ. Press, 1998

Yu, J., Hu, S., Wang, J. et al.: *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica)*. *Science* 296: 79–92, 2002.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

CZ.1.07/2.2.00/28.0041