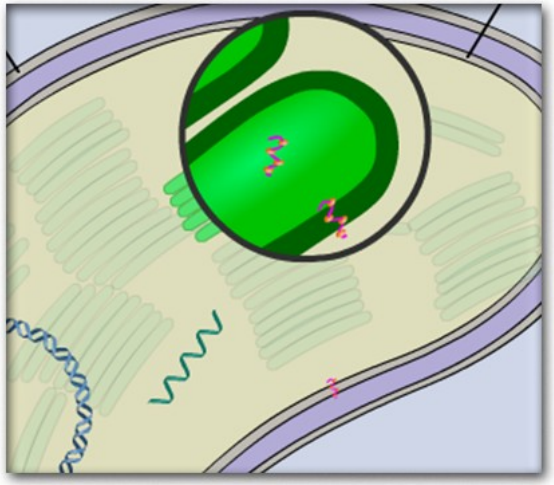
GENETIKA ROSTLIN

Bi8240 GENETIKA ROSTLIN

Prezentace 01
Rostlinný genom



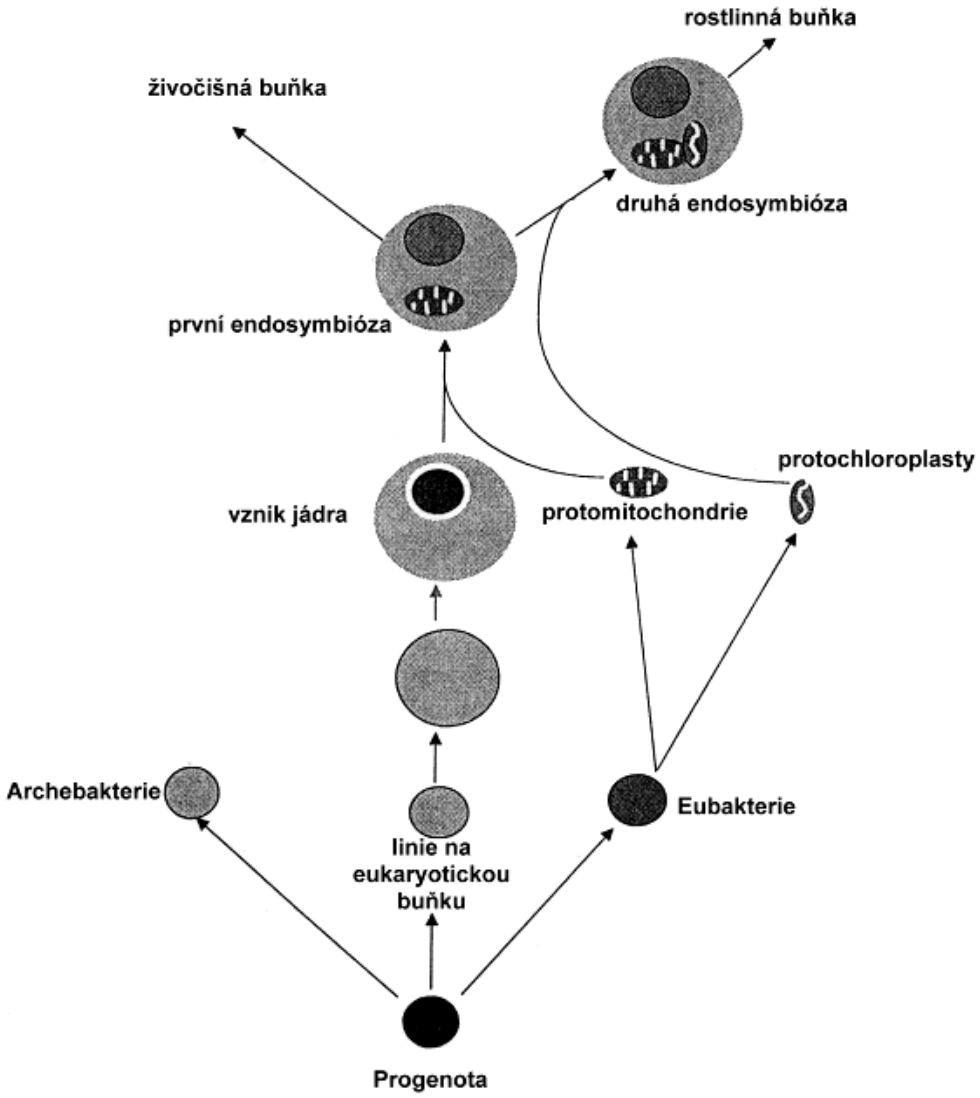
doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.

repkova@sci.muni.cz

Rostlinný genom

- Evoluční aspekty
- Velikost rostlinného genomu
- Organizace rostlinného genomu
- Jaderný genom – kódující, repetitivní a mobilní sekvence
- Chloroplastový genom
- Mitochondriální genom
- Studium funkce genů
- Srovnání genomů jednotlivých druhů rostlin

Rostlinná buňka a genetická informace

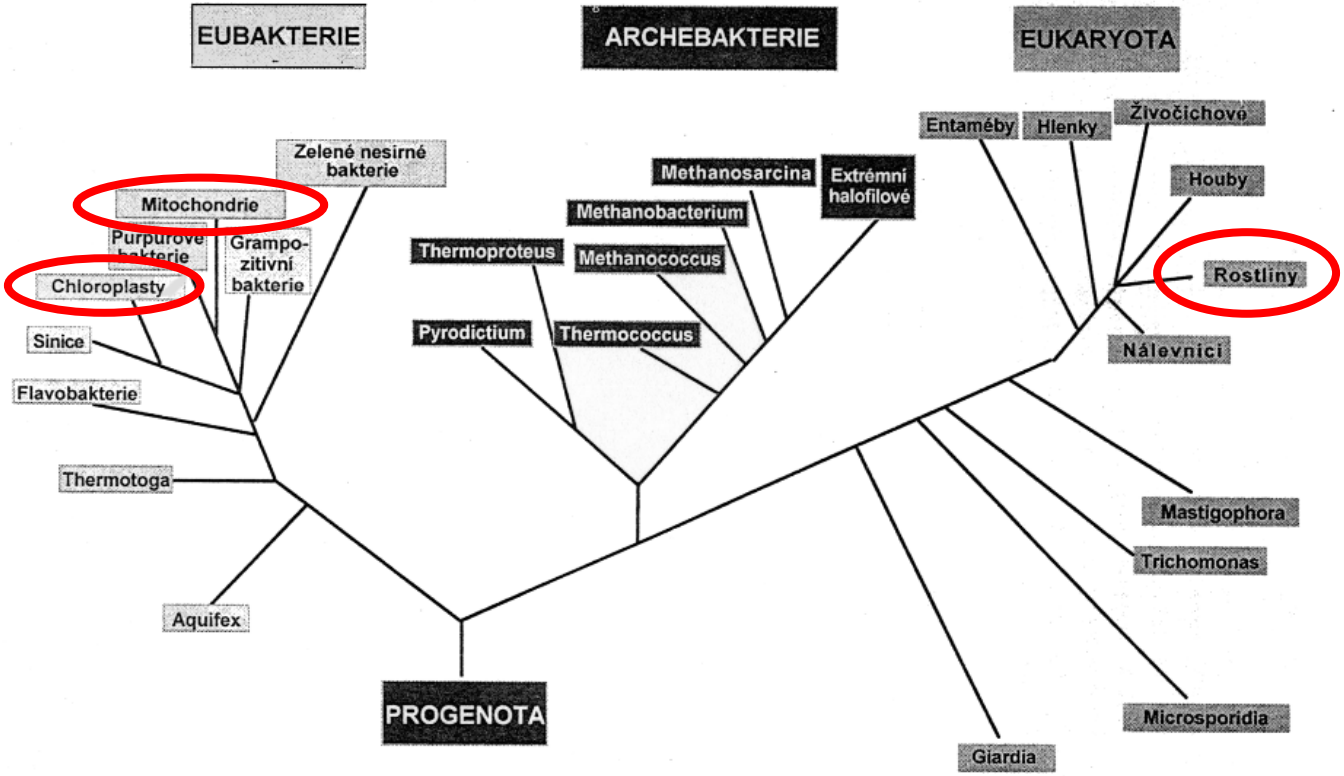


- 800 mil. let mnohobuněčné organizmy
- 1. a 2. endosymbióza 1,2 miliardy let

a důsledek!

- 3,8–4,2 miliardy let

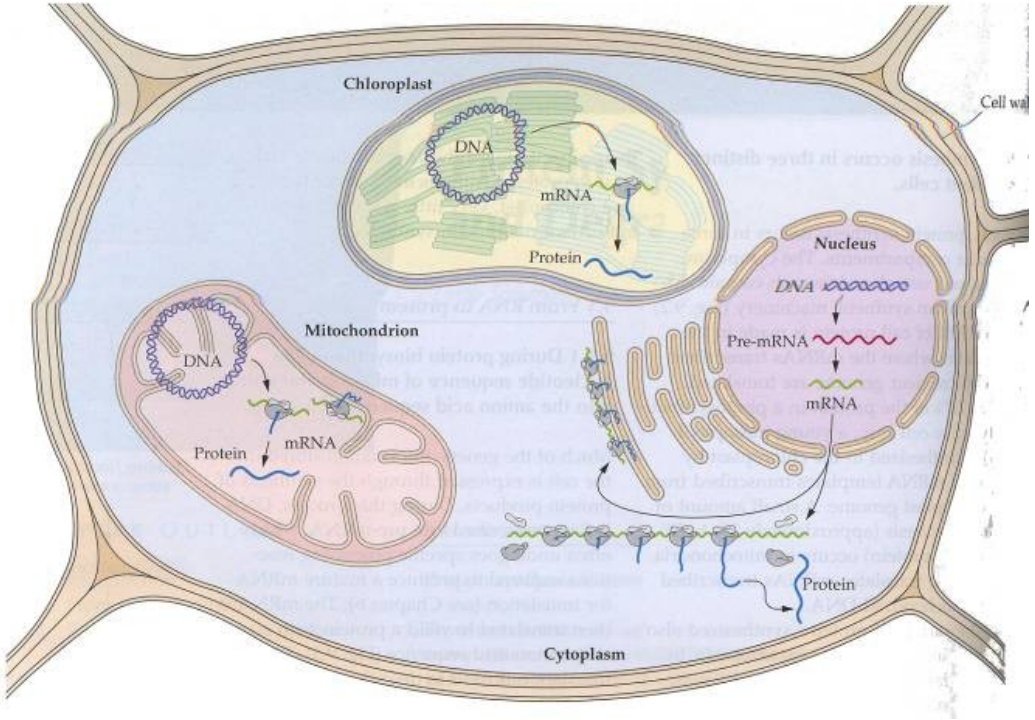
Evoluční linie rostlin



- Eukaryotické organizmy jsou stejně staré jako prokaryotické.
- Podstatná část genů člověka a jiných savců vykazuje vysokou homologii.
- Existuje určitý stupeň homologie mezi genomy různých organizmů.
- Stupeň homologie závisí na jejich evoluční příbuznosti.

Genetická informace rostlin

- Jaderná
- Chloroplastová
- Mitochondriální



Specifické rysy

- Evoluční původ genomů
- Komunikace tří složek genetického aparátu

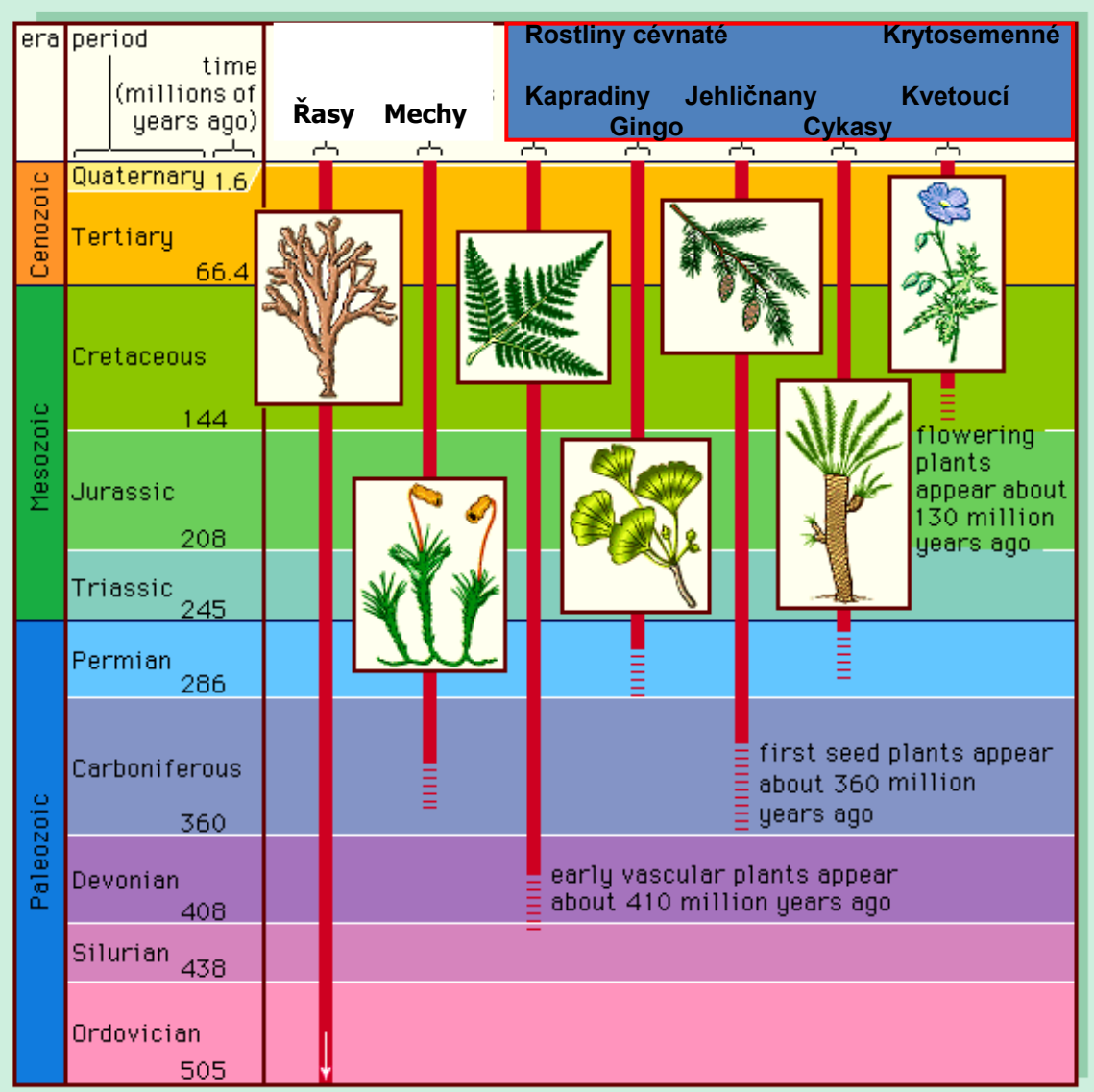
Evoluce rostlin a rostlinných genomů

- Nejstarší fosilie rostlin cévnatých
  - 410 mil. let

  Ozonová vrstva

  Tvorba kořenů
- Původ krytosemenných
  - 200 až 250 mil. let
  - 140 mil. let

  Mutace, bílé zbarvení, květy



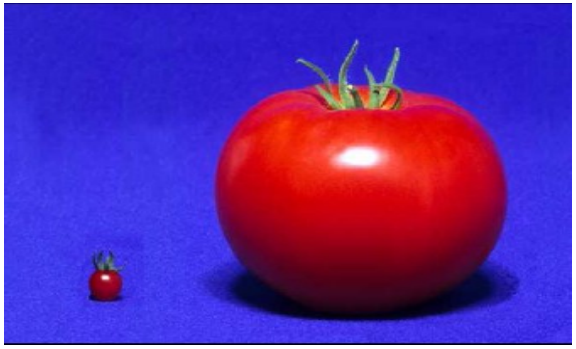
Evoluce rostlin a rostlinných genomů

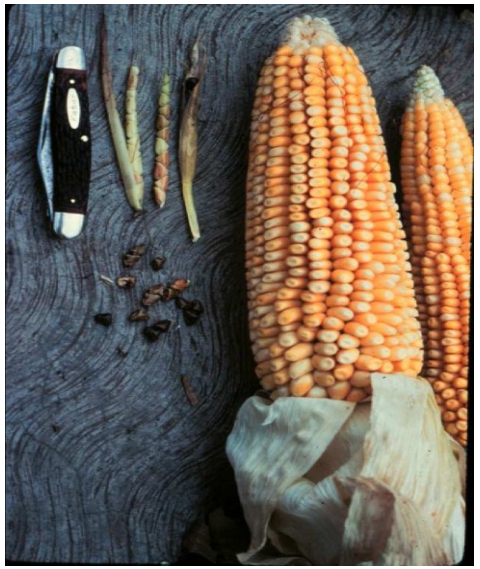
- Divergence 2 a 1děložné — 160 až 240 mil.
  - *Arabidopsis* a rýže — 200 mil.
  - *Arabidopsis* a rajčete — 150 mil.
- Původ trav — 100 až 65 mil.
- Nejstarší známé fosilie trav — 50 až 70 mil.
- Nejstarší fosilie linie rýže — 40 mil.
- Divergence v rámci čeledí
  - pšenice a žita — 10 až 14 mil.
  - *Arabidopsis* a *Brassica* — 12 až 19 mil.
  - *Arabidopsis* a *Capsella rubella* — 6 až 10 mil.

Navazuje evoluce kulturních rostlin!

- Začátek pěstování před 10 až 12 tis. lety

- Bylo domestikováno **230 plodin** ze 180 rodů a 64 čeledí.
- *Poaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae*
- **Fixace znaku 100 až 2000 let**



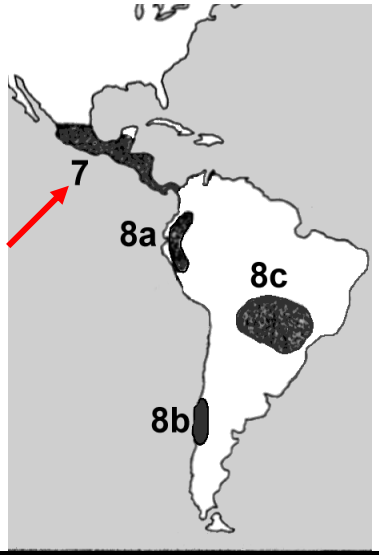


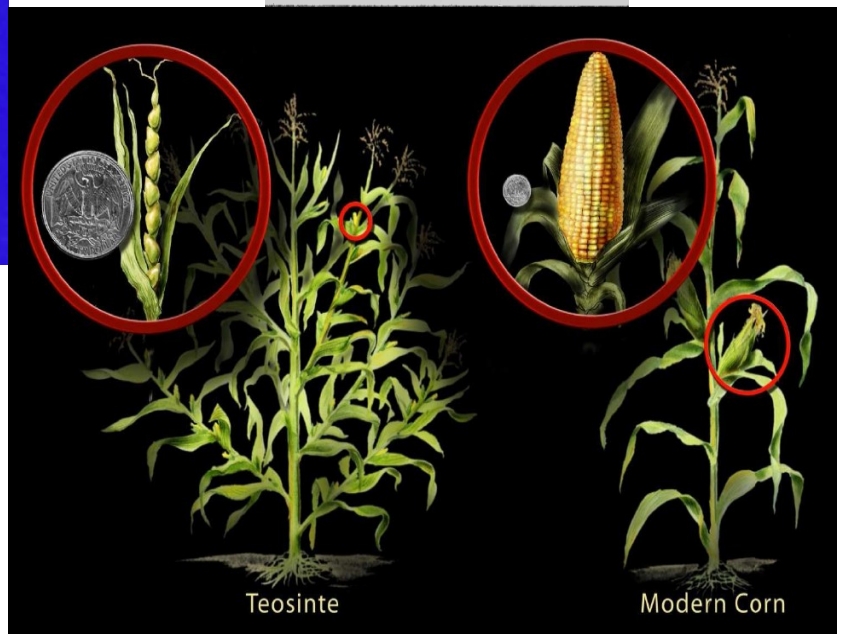
Evoluce a domestikace kulturních rostlin

- Kukuřice *Zea mays*

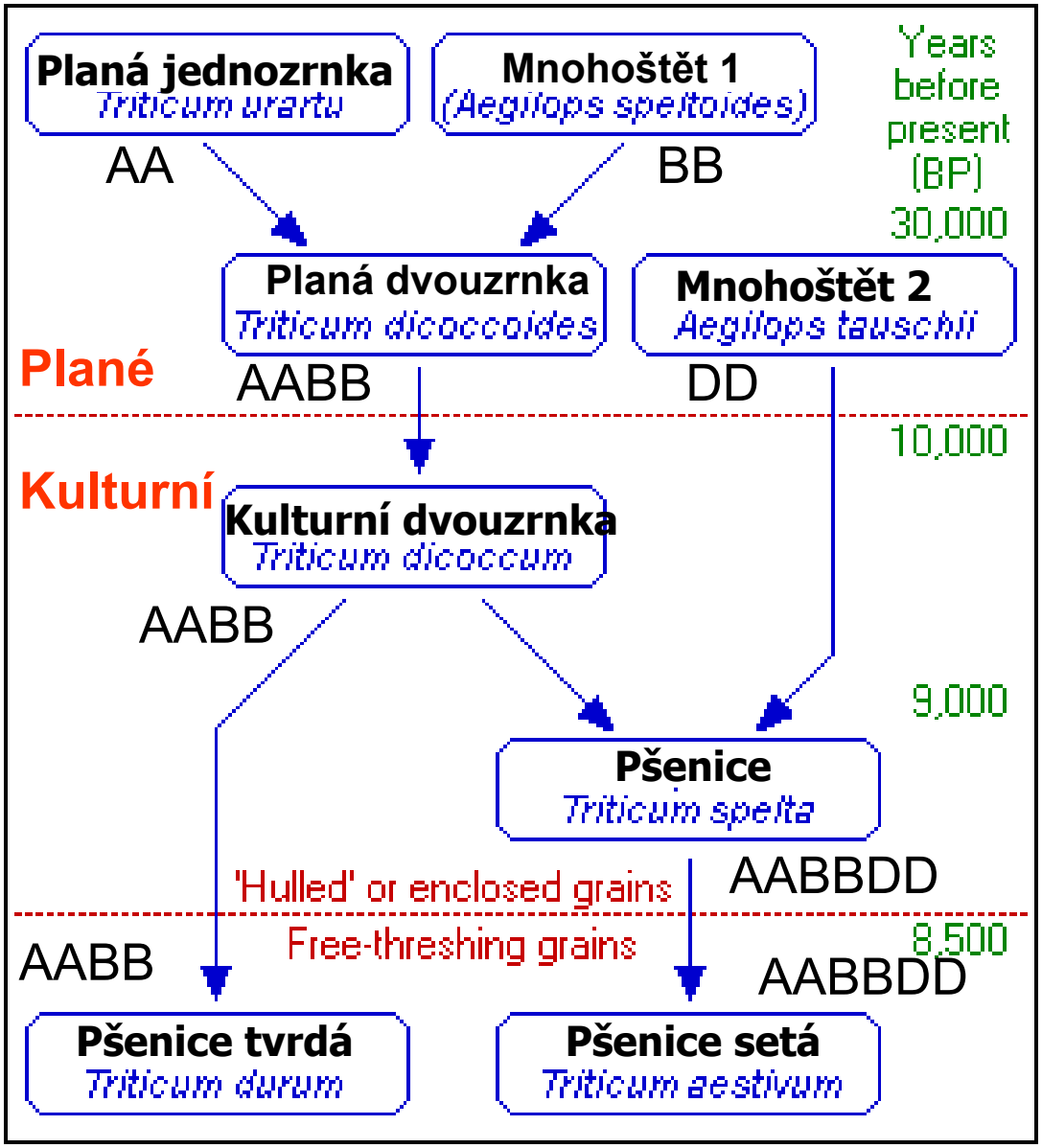
teosinte **kukuřice**

Z. mays ssp. parviglumis





Pšenice *Triticum aestivum*



http://www.newhallmill.org.uk/wht-evol.htm

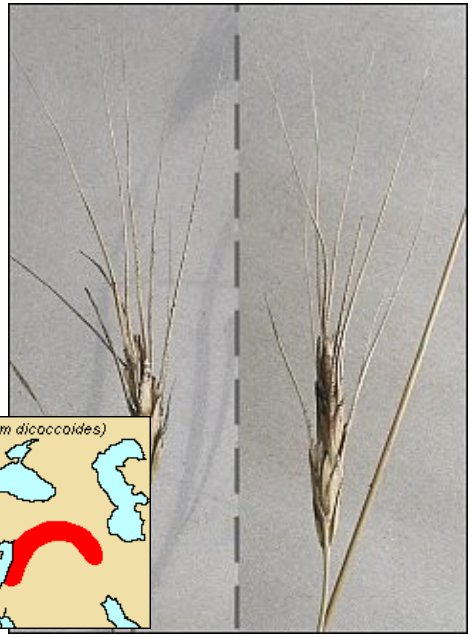
GENETIKA ROSTLIN

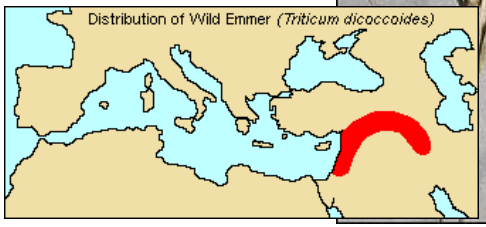
Planá jednozrnka

x

Mnohoštět 1

Planá dvouzrnka

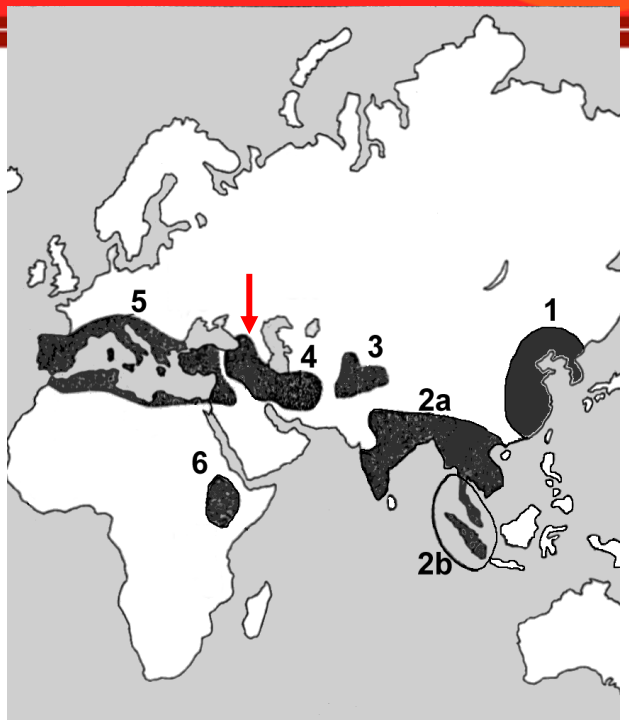




x

Mnohoštět 2

Kulturní dvouzrnka



Pšenice tvrdá

Pšenice setá

Šlechtění kulturních druhů je pokračující evoluce

T. aestivum
AABBDD
AABB

x

Secale cereale (RR)

Triticale
(AABBDDRR)
(AABBRR)

Hlavní domestikační znaky

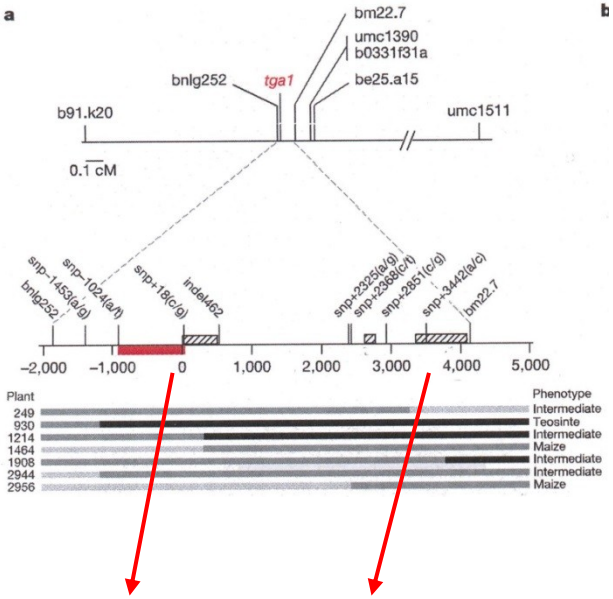
1. Omezení vypadávání semen
   - nerozpadavá vřetena klasu, nepukavost lusků
2. Synchronizace dozrávání
3. Minimalizace dormance
4. Jednoletost
5. Změny v rozmnožování
   - ztráta alogamie
6. Změny v chemickém složení a kvalitě užitečných orgánů
7. Bezsemenné plody

Některé geny pro domestikační znaky

Kukuřice

- *Tga-1 Teosinte glume architecture* – tvorba pevného osemení

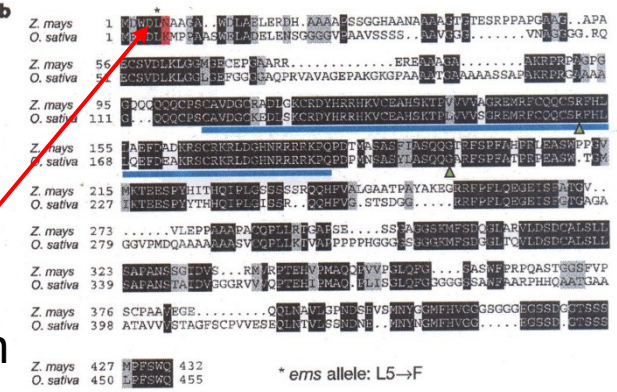
Tga1 *tga1*



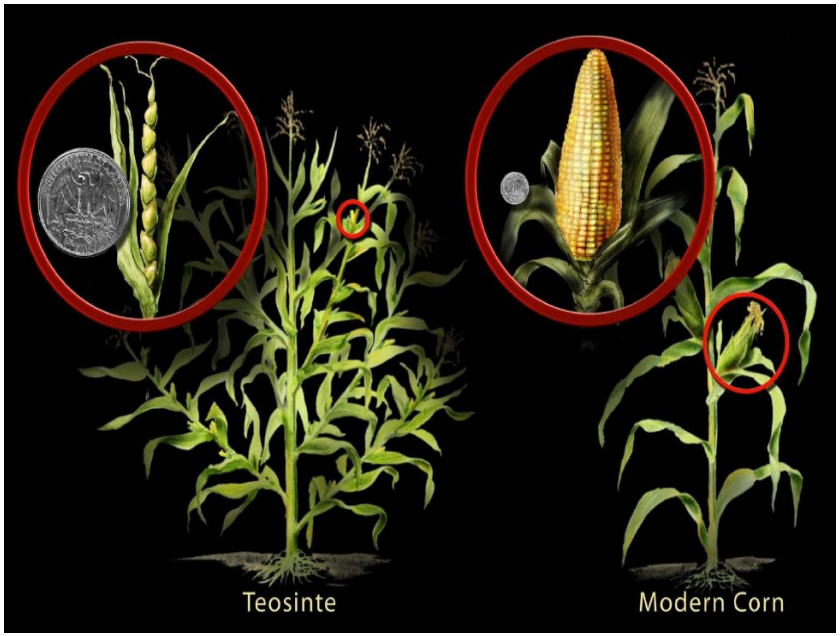
promotor 3 exony

Lokus *tga1* TF SBP
squamosa-promoter binding protein (modře)

Protein
teosinta vs. kukuřice
Záměna K → N
lysin asparagin



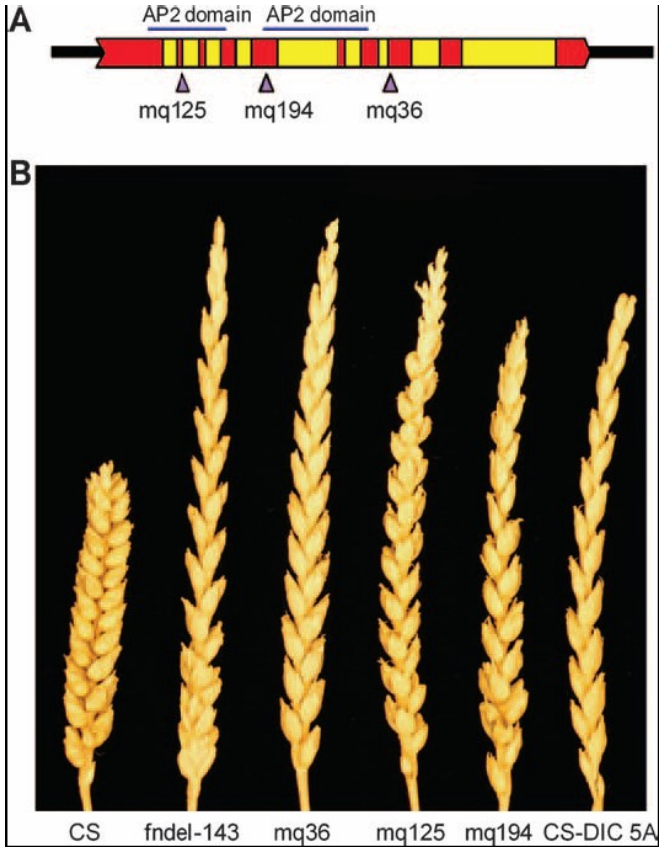
- *Tb-1 Teosinte branched* – architektura rostliny
- Transkripční faktor TCP (pouze u vyšších rostlin)
  - **T** *Teosinte branched* – kukuřice **C** *Cycloidea* – Antirrhinum **P** rýže
  - represe buněčného cyklu
- Dominantní mutace u kukuřice – potlačení větvení



Některé geny pro domestikační znaky

Pšenice

- **Q** – rozpadavost klasu, volná obilka



- Zelená intron, červená exon, modrá 3 UTR
- Kulturní genotyp **Q** Exon – isoleucin, pozice 329
- Planý genotyp **q** valin

```
                                576  617  2123 2189 2452                    3531
                                 ▼    ▼    ▼    ▼    ▼                       ▼
T. aestivum cv. CS (Q)       ..CTC..TGA..GAT..CAA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT------..GCG..
T. durum (Q)                 ..CTC..TGA..GAT..CAA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT------..GCG..
T. carthlicum (Q)            ..CTC..TGA..GAT..CAA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT------..GCG..
T. polonicum (Q)             ..CTC..TGA..GAT..CAA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT------..GCG..
T. spelta (DS5A Iran) (Q)    ..CTC..TGA..GAT..CAA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT------..GCG..
T. spelta (DS5A Euro) (q)    ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT---..GAG..
T. spelta (Eur; TA2603) (q)  ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT..GAG..
T. macha (q)                 ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT..GAG..
T. dicoccoides (q)           ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT---..GAG..
T. dicoccum (q)              ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT..GAG..
T. urartu (q)                ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT..GAG..
T. monococcum (q)            ..CCC..TAA..GGT..CGA..CCTCCTCCTCCTCCT----------..GAG..
```

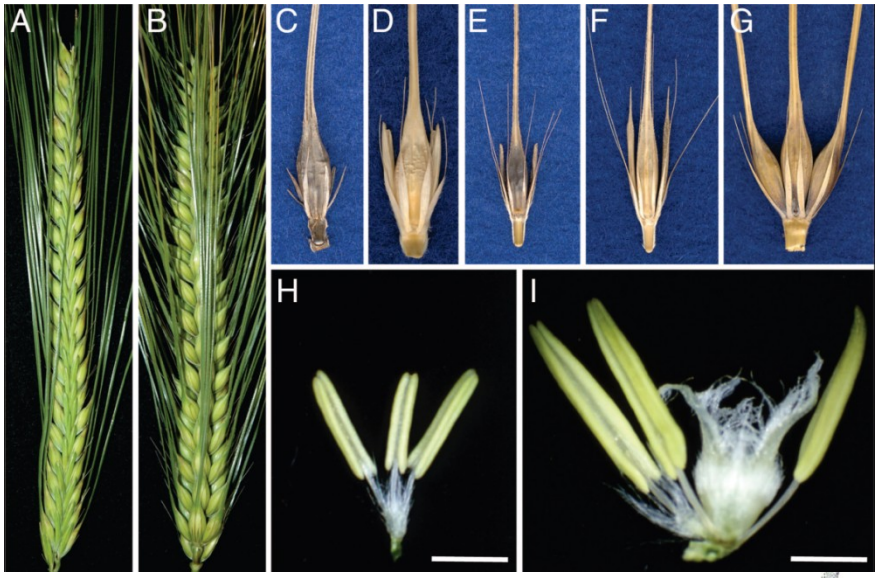
Pleiotropie genu *Q*

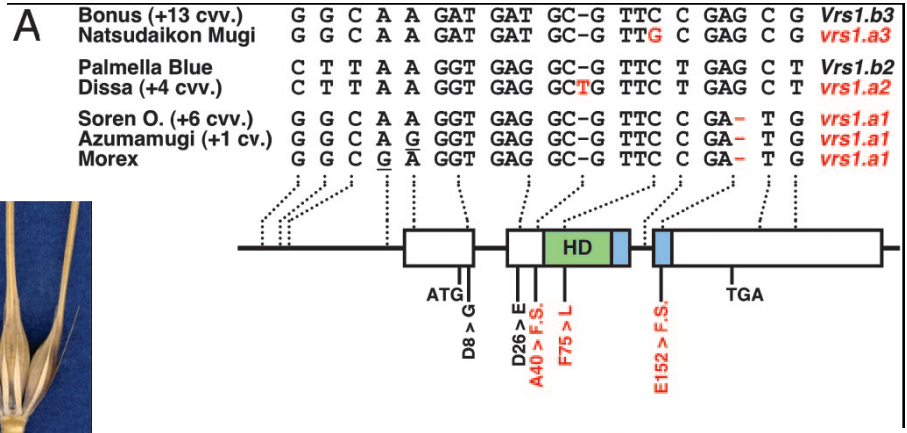
- *Rozpadavost vřetene klasu*
- *Tvar a pevnost plevy*
- *Délka klasu*
- *Výška rostliny*
- *Doba metání*

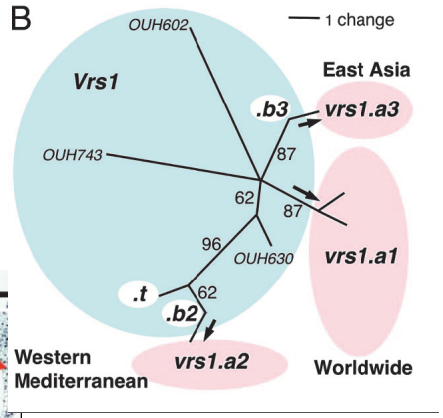
Některé geny pro domestikační znaky

Ječmen

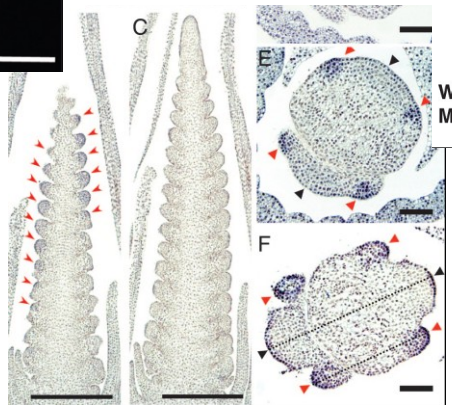
- 5 genů:
  - *vrs1* – šestiřadost klasu
  - *Vrs1* – dvouřadost, chromozom 2H







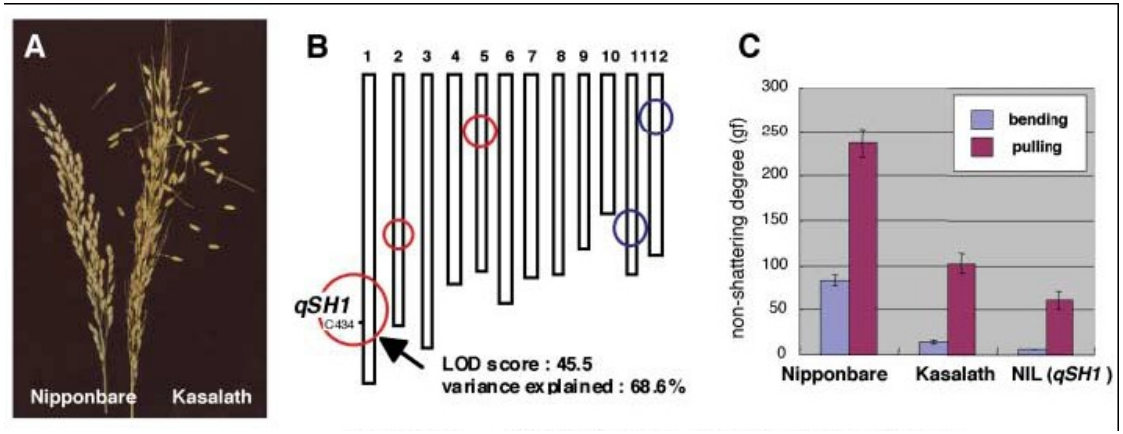
- Transkripční faktor – leucinový zip
- Vrs1 exprese v laterálních primordiích
- Vrs1 suprimuje vývoj laterálních větví
- Mutace – tvorba fertilních klásků v šestiřadém fenotypu

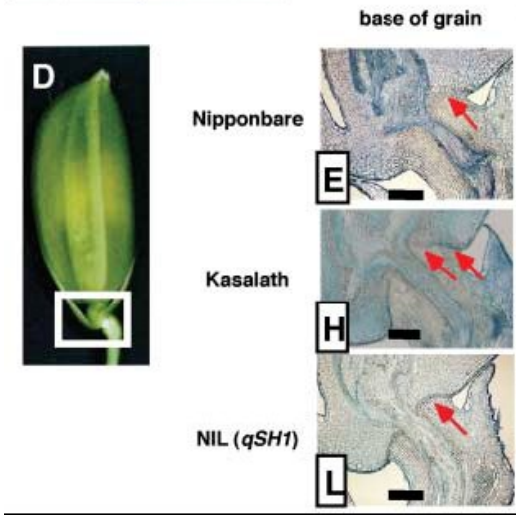


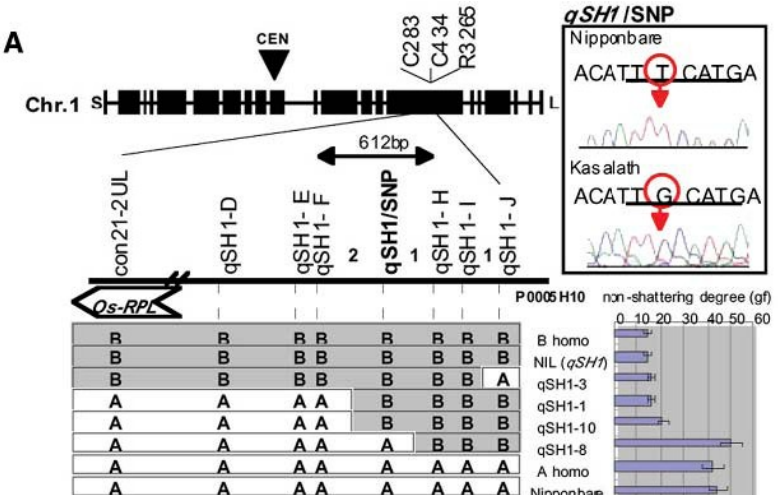
Některé geny pro domestikační znaky

Rýže

- *Sh4*, *qSh1* Shattering – uvolňování semen







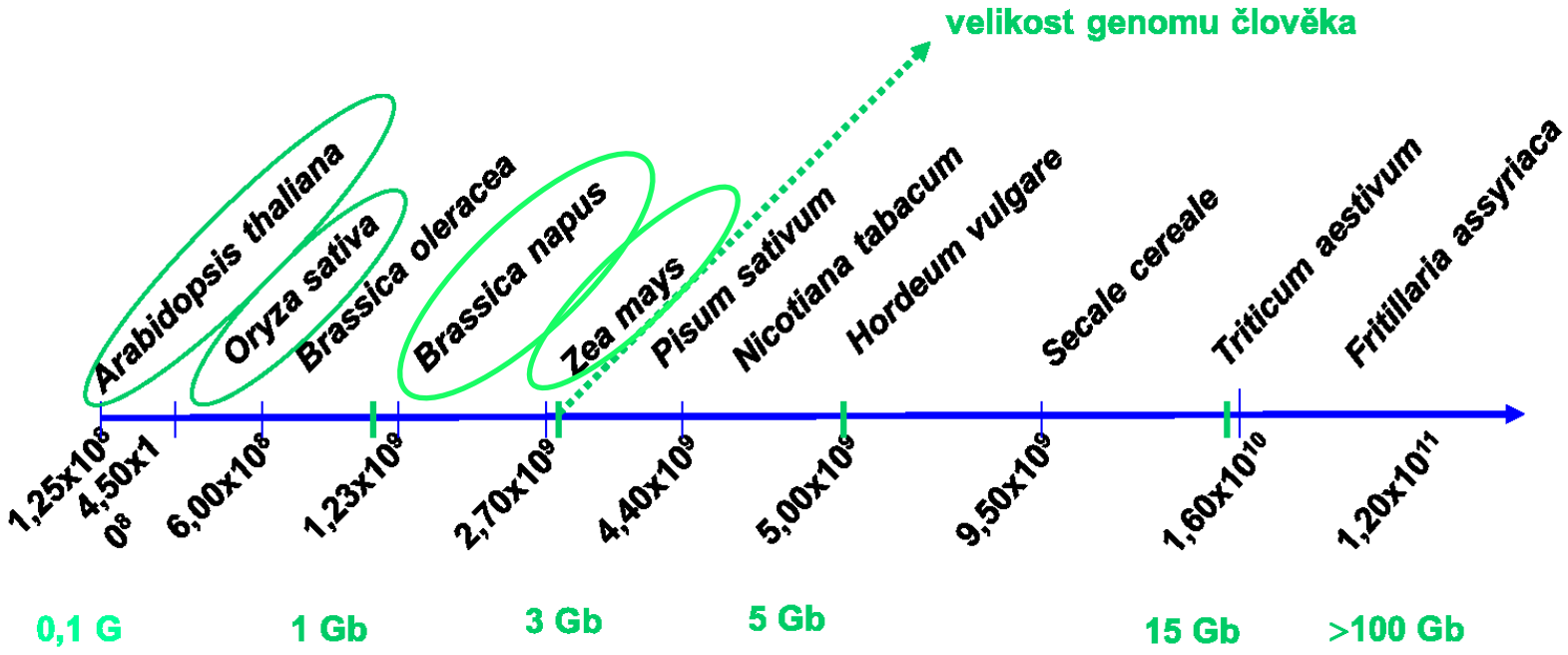
Shrnutí

Evoluce krytosemenných rostlin

- Kdy vznikly
- Jaká je jejich evoluční linie
- Co bylo předpokladem jejich evoluce
- Souvislost s evolucí živočichů a člověka
- Významné časové body
- Evoluce, domestikace, šlechtění

Rostlinné genomy

1. Velikost rostlinných genomů
2. Struktura rostlinných genomů a další poznatky



GENETIKA ROSTLIN

- *Arabidopsis thaliana*

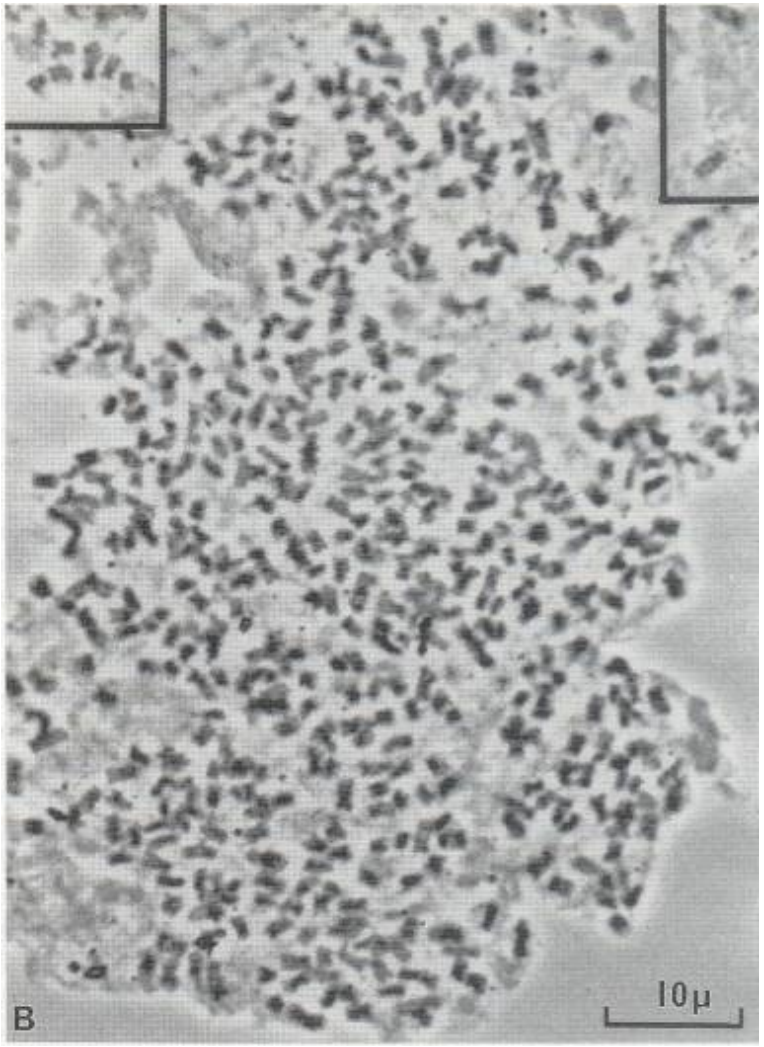
- *Fritillaria assyriaca*

Druh	J/D	n	ploidie	bp
Arabidopsis thaliana	D	5	2	$1{,}25 \times 10^8$
Oryza sativa	J	12	2	$4{,}50 \times 10^8$
Brassica oleracea	D	9	2	$6{,}00 \times 10^8$
Lycopersicon esculentum	D	12	2	$1{,}00 \times 10^9$
Brassica napus	D	19	2	$1{,}23 \times 10^9$
Antirrhinum majus	D	8	2	$1{,}54 \times 10^9$
Vicia sativa	D	6	2	$1{,}60 \times 10^9$
Solanum tuberosum	D	12	4	$1{,}80 \times 10^9$
Zea mays	J	10	2	$2{,}70 \times 10^9$
Pisum sativum	D	7	2	$4{,}40 \times 10^9$
Nicotiana tabacum	D	24	4	$4{,}40 \times 10^9$
Hordeum vulgare	J	7	2	$4{,}90 \times 10^9$
Secale cereale	J	7	2	$9{,}50 \times 10^9$
Triticum aestivum	J	21	6	$1{,}60 \times 10^{10}$
Fritillaria assyriaca	J			$1{,}20 \times 10^{11}$

Záhada C-hodnoty DNA

Extrémní počty chromozomů u rostlin

- Mitotická metafáze v kořenových špičkách
- A) trávy *Zingeria biebersteiniana*
  - 2n=4
- B) Palmy *Voanioala gerardii*
  - 2n asi 600
- *Haplopappus gracilis: 2n = 4*
- *Sedum suaveolens: 2n = cca 640*
- *Velikost chromozomů se mezi druhy liší až 60x*



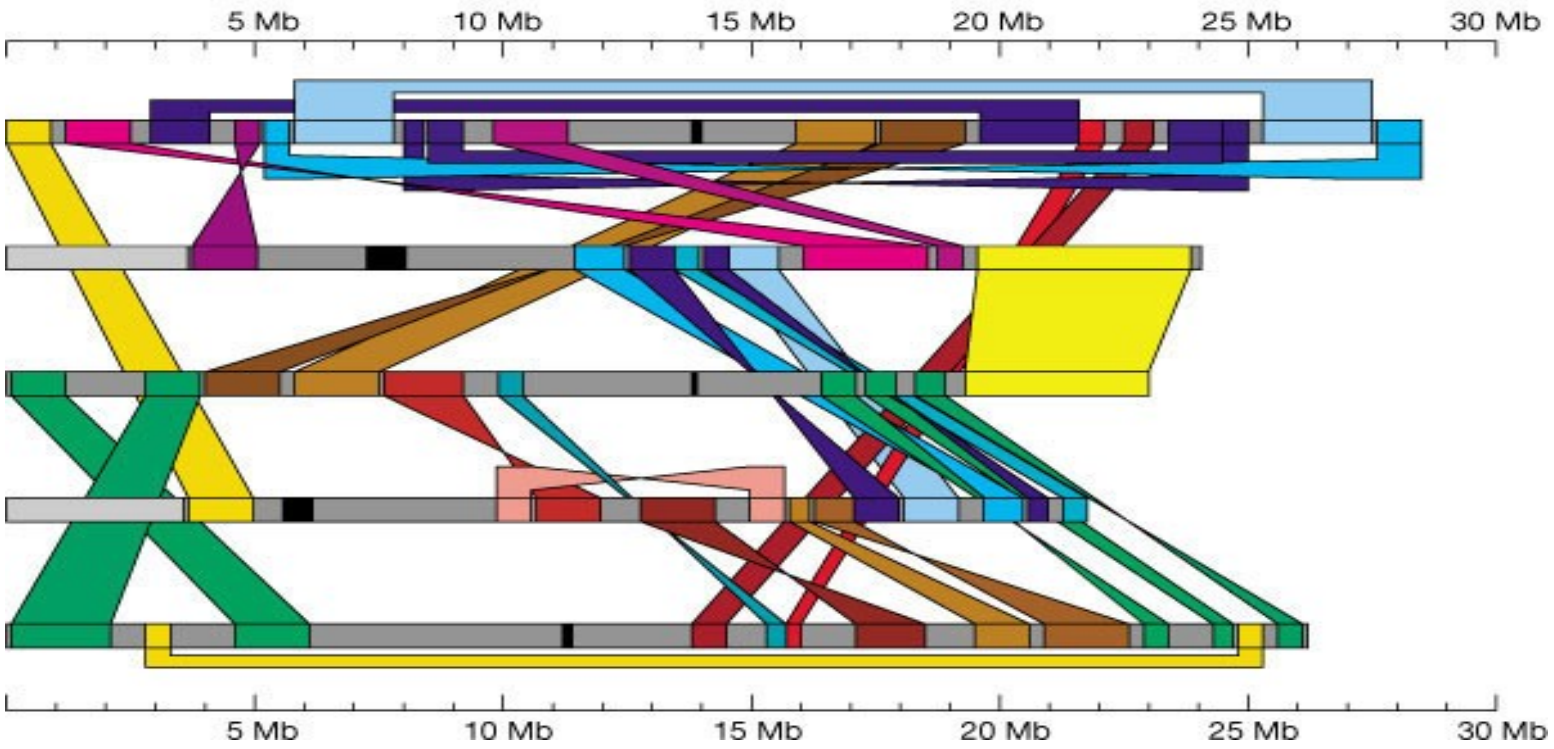
Evoluční mechanizmy ovlivňující velikost genomů rostlin

- Duplikace
- Spontánní delece a inzerce
- Aktivita transpozonů
- Přídatné chromozomy
- Expanze mikrosatelitů
- Expanze heterochromatinu (např. centromer)

Důsledky → redundance genů u rostlin

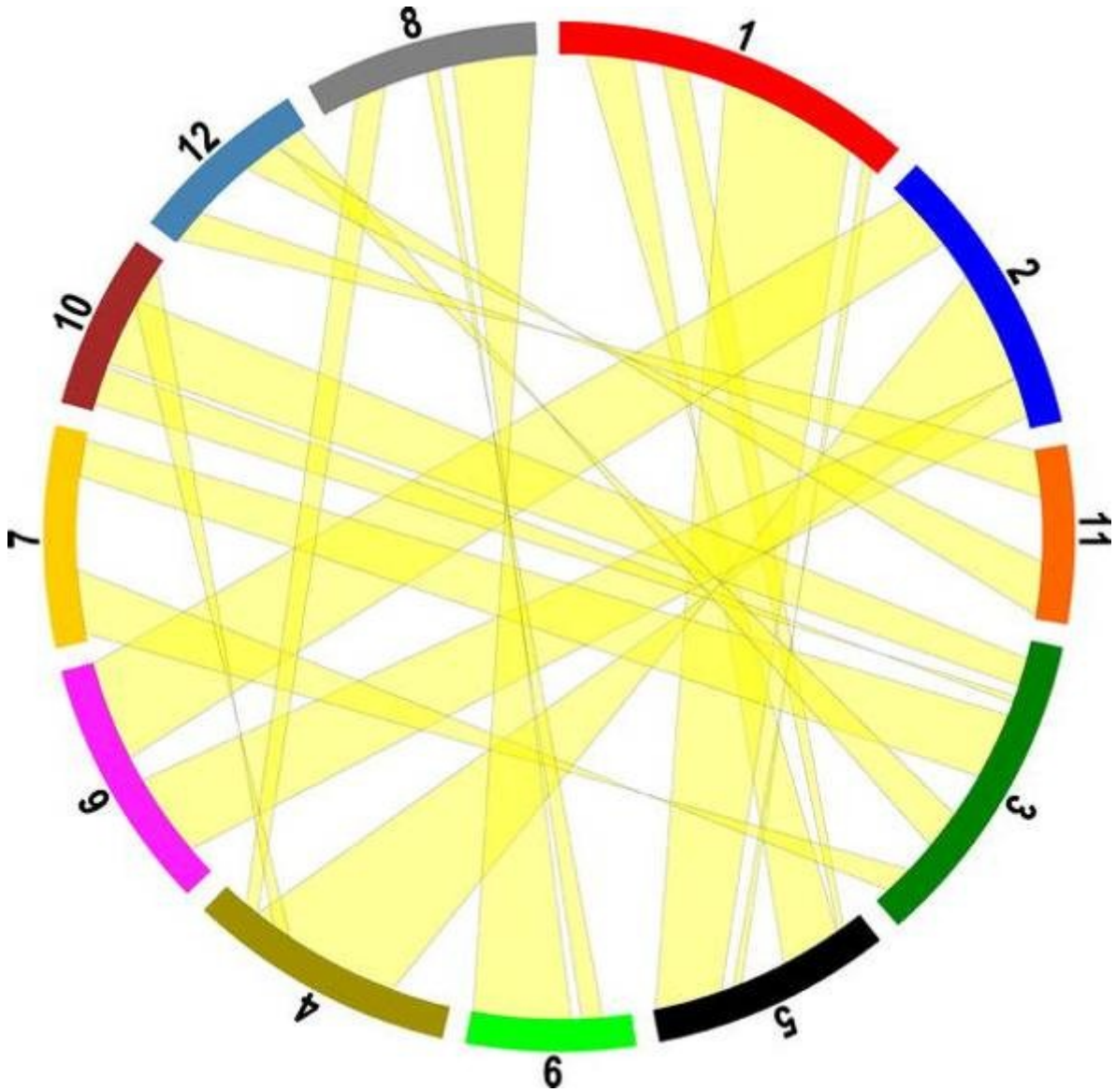
Arabidopsis je dávný tetraploid

- Jako zřejmě většina rostlin

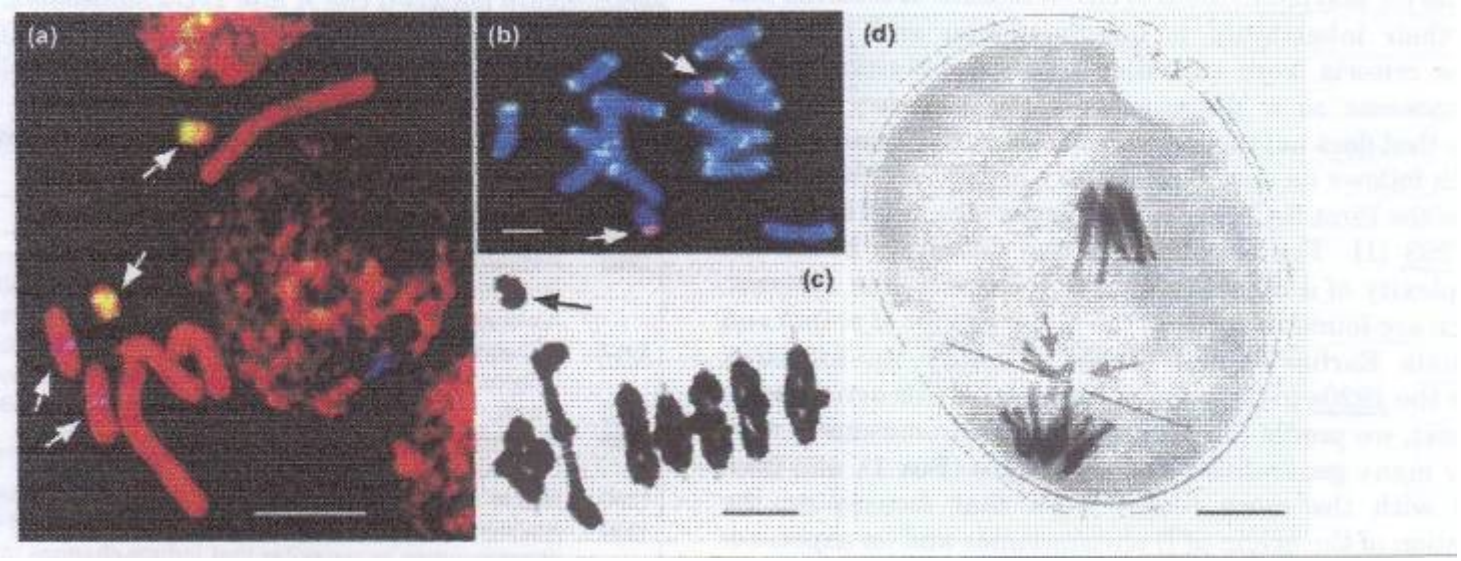


- Duplikované úseky chromozomů tvoří 60 % genomu (67.9 Mb)
- Polyploidizace výrazně zvyšuje plasticitu genomu a zřejmě hrála významnou roli v evoluci rostlin (rostlinných genomů)

Četné duplikace jsou i v genomu rýže



B chromozomy

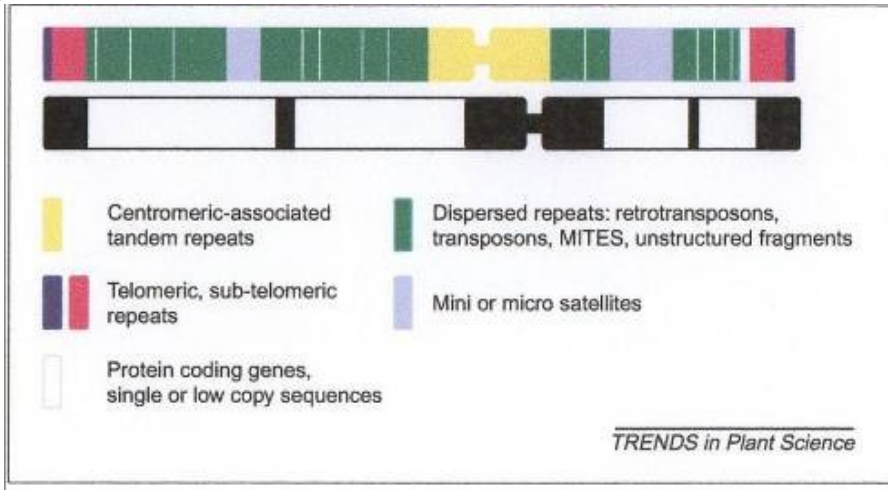


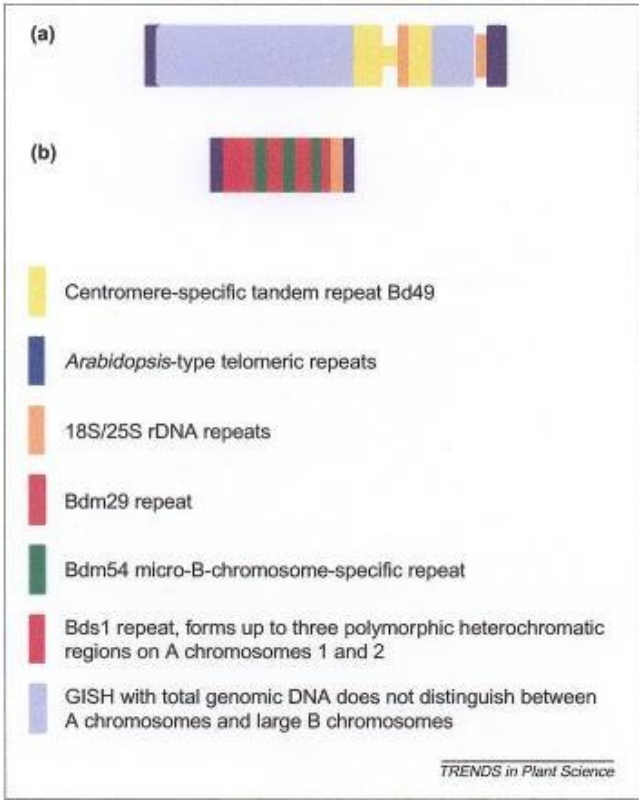
a) *Brachycome dichromosomatica* (mitóza, 2 B a 2 mikro-B chromozomy)

b) *Secale cereale* (metafáze, 2 B chromozomy)

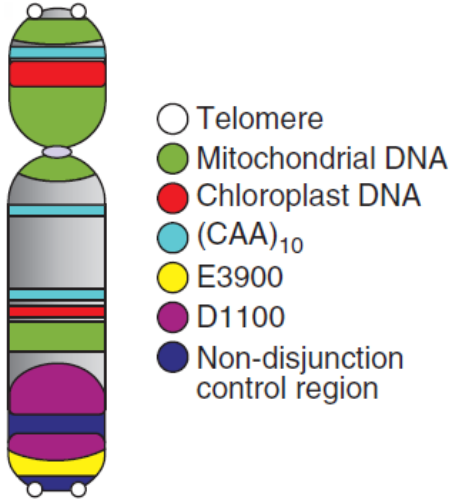
c) *Secale cereale* (metafáze I meiózy, 1 B chromozom, 7 bivalentů)

d) *Secale cereale* (1. mitóza v pylovém zrnu, nondisjunkce B chromozomu)





- B chromozom – struktura



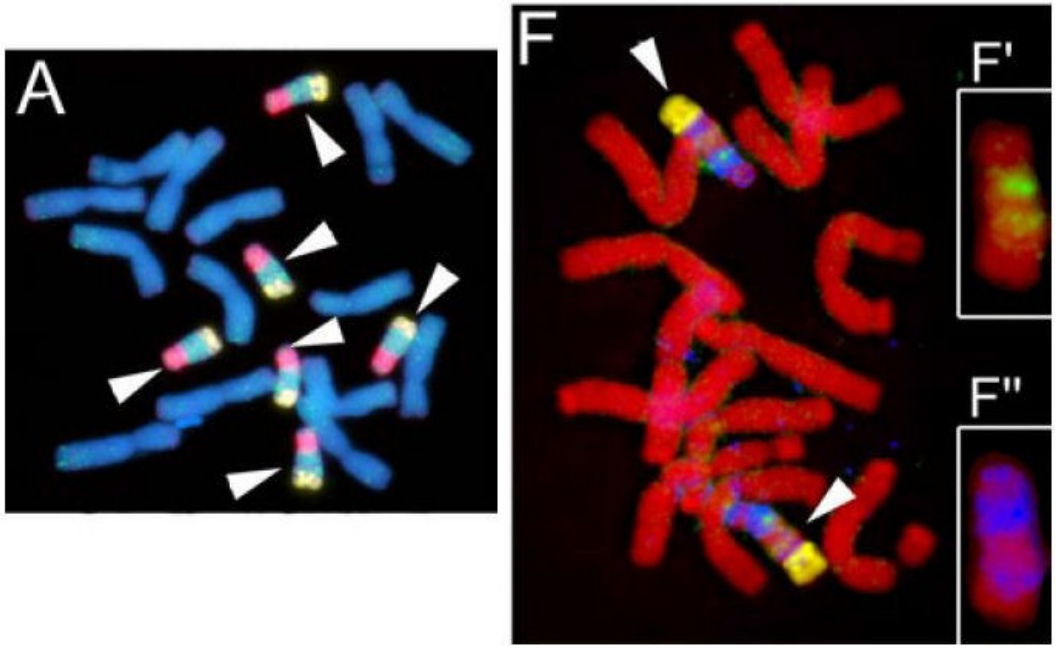
- B chromozom *Secale cereale*
- oblast nezbytná pro nondisjunkci

Brachycome dichromosomatica

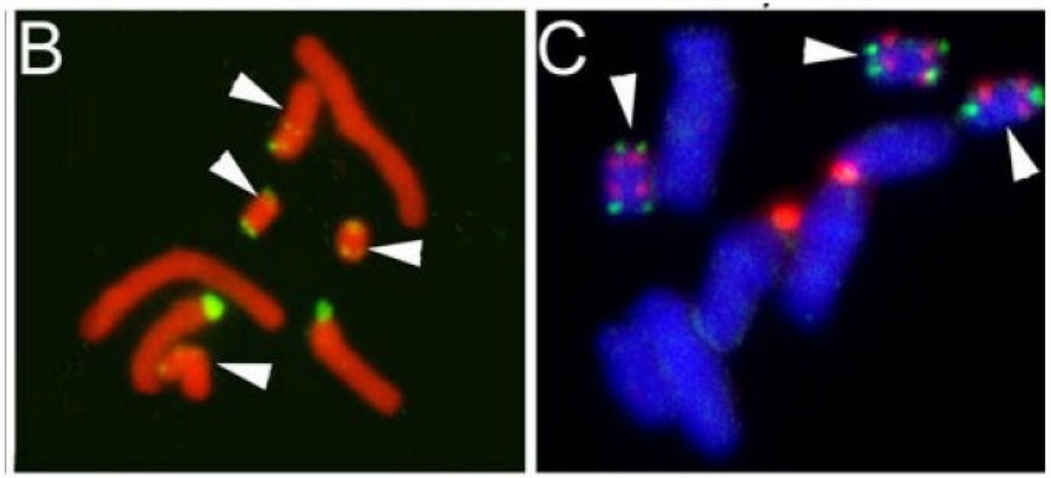
a) B chromozom

b) Mikro-B chromozom

Secale cereale
A 6 B chr
3 typy repeticí
F mt DNA modrá
cp DNA zelená
repetice žlutá



B *Brachycome dichromosomatica*
45S rDNA zelená
C *Crepis capilaris*
45S rDNA červená
telomery Ath zelená

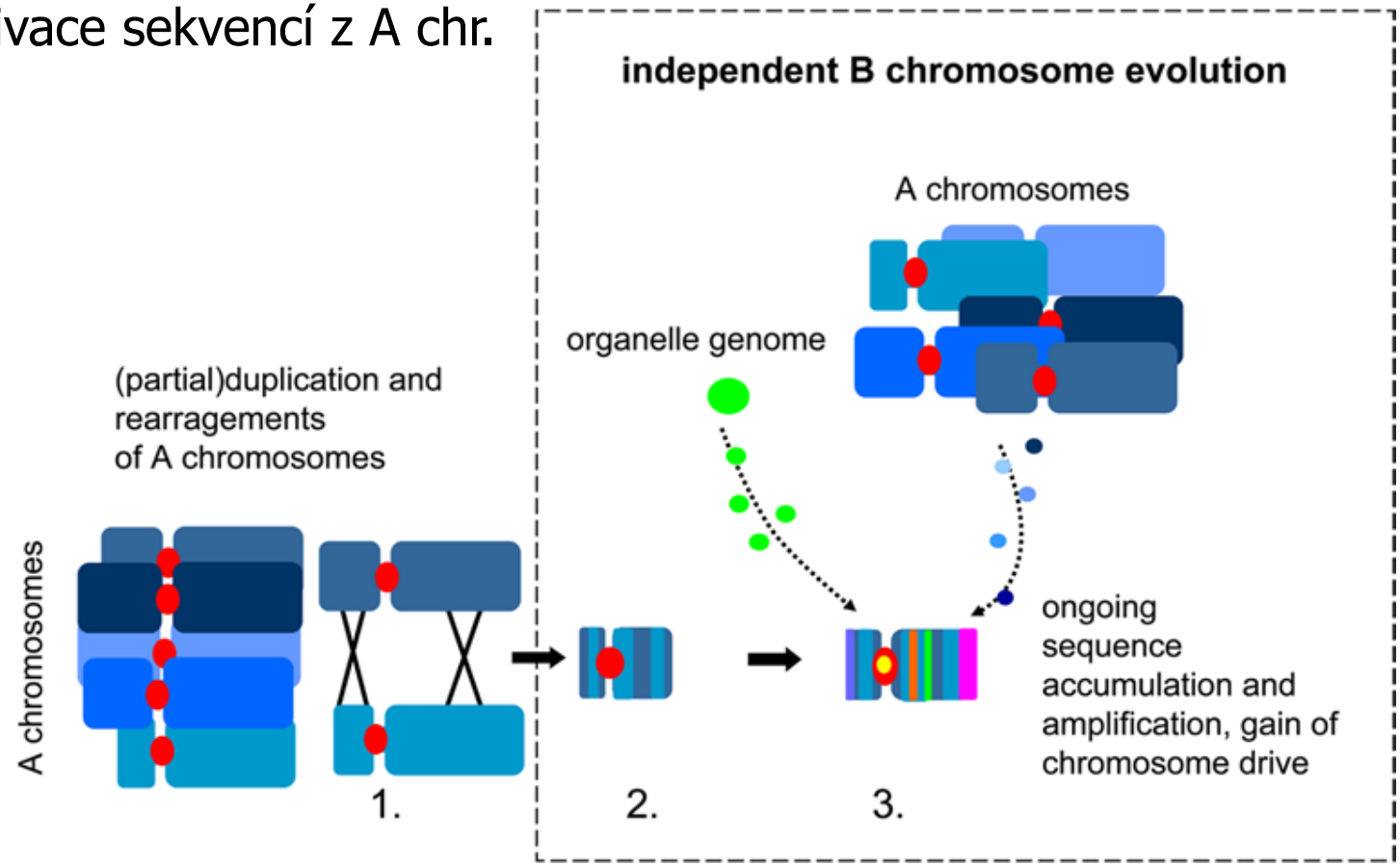


Evoluce vzniku B chromozomů

1. Duplikace a částečná duplikace A chr., přeuspořádání/translokace
2. Znemožnění párování A – B v meióze, vytváří se proto-B
3. Akumulace organelové DNA a fagmentů z A (genomická houba)

amplifikace spec. sekvencí pro B chr.

inaktivace sekvencí z A chr.



Genomika rostlin

Strukturní genomika

1. **Velikost rostlinných genomů**
2. **Struktura rostlinných genomů a další poznatky**

- **Strukturní genomika**
  - Projekt **The *Arabidopsis* Genome Initiative** 1996–2000 Nature, December 2000, Vol. 408, pp. 796–815, www.nature.com
    - *Arabidopsis thaliana* (1,25 x 10^8)
  - Projekt **International Rice Genome Sequencing Project**
    - Oryza sativa (4,50 x 10^8)
  - *Populus trichocarpa*
  - *Vitis vinifera*
  - *Zea mays*
  - *Brassica napus*

Genom *Arabidopsis thaliana*

Projekt **The *Arabidopsis* Genome Initiative** 1996–2000
- Nature, December 2000, Vol. 408, pp. 796-815, www.nature.com

Počet genů	25 498	*D. melanogaster* 13 601 genů *C. elegans* 19 099 genů
Počet typů proteinů	11 601	
Jedinečné geny	35 %	
Genové rodiny	65 %	
– s více než 5 členy	37,4 %	
Transpozony		10 %
Nekódující sekvence		14 %
Vzdálenost mezi geny prům.		4,5 kb
1 gen prům.		205 bp

Porovnání jaderného a mimojaderných genomů *A. thaliana*

	jádro	plastidy	mitochondrie
velikost	125 Mb	154 kb	367 kb
duplikace	60 %	17 %	10 %
počet genů kód. proteiny	25 498	79	58
hustota genů – kb na 1 gen	4,5	1	6,25
geny s introny	79 %	18,4 %	12 %
transpozony	10 %		4 %

- *Oryza sativa*
- Current Opinion in Plant Biology 6(2), 2003

Jaderný genom

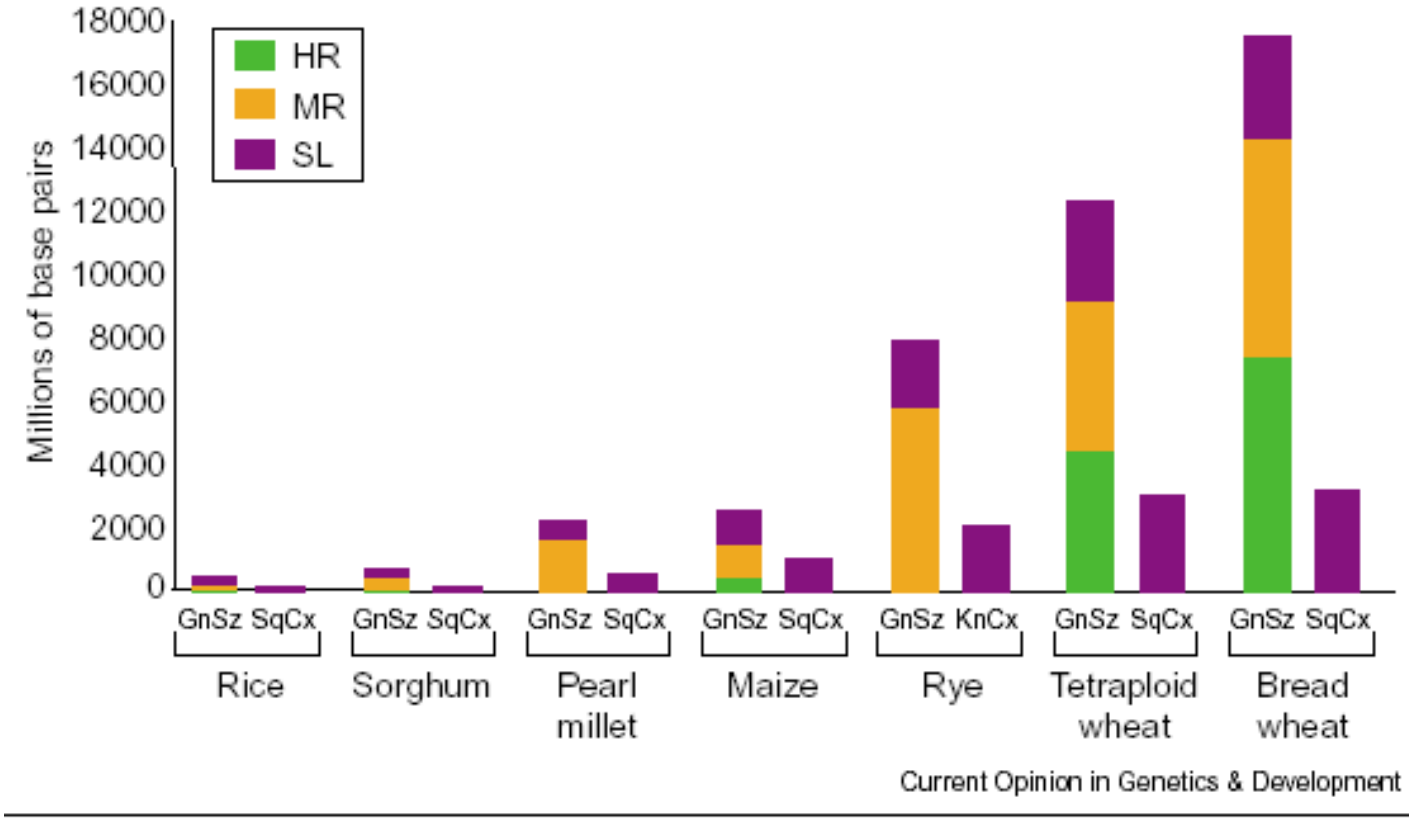
Sekvence jaderného genomu

1. **Kódující** – geny a genové rodiny
2. **Nekódující** – repetitivní a mobilní

– RNA není matrice pro syntézu bílkovin

- Repetitivní
  - centromery
  - telomery
  - satelity – tandemové repetice
    - minisatelity (motiv 9 až 20 bp)
    - mikrosatelity (motiv 1 až 5bp)

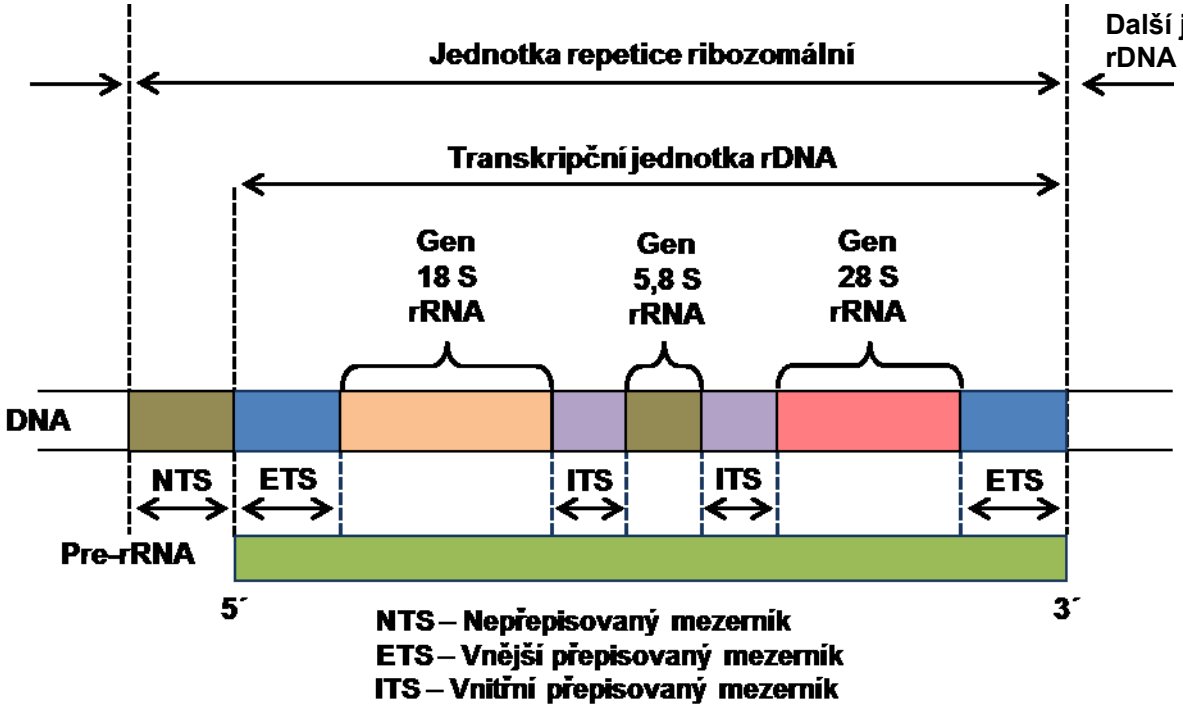
Zastoupení repetitivní DNA v rostlinných genomech



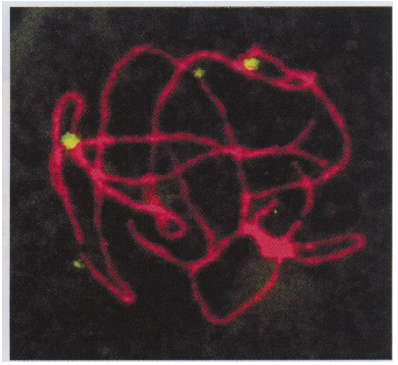
Geny rostlinného genomu

Geny složek genetického aparátu

Geny kódující 18S – 5,8S – 28S rRNA



Organizátor jadérka



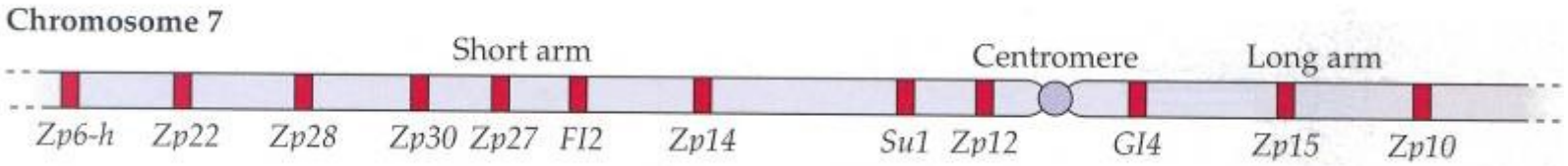
- Geny pro 5S rRNA
- Geny tRNA
- Geny pro histony

- 1 blok genů 10^3 až 10^4 kopií, 7800 až 185 tis. bp
- transkripce jako 1 prekurzor
- postranslačními úpravami 3 typy rRNA
- pomerančovník 125 kopií, hyacint 32 tis. kopií

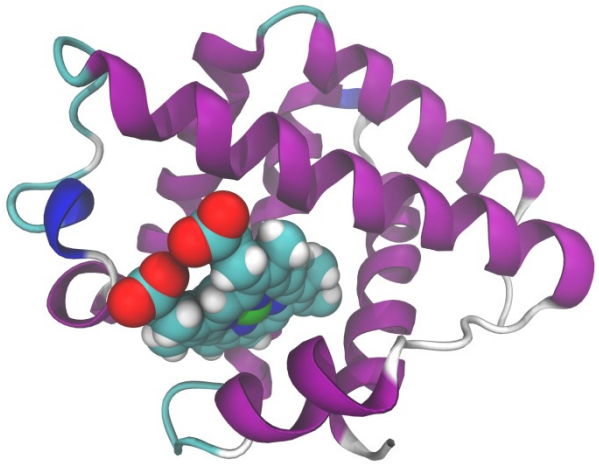
Geny rostlinného genomu

Geny kódující proteiny

- Geny zásobních proteinů semen a hlíz – albuminy, globuliny, prolaminy, gluteliny, leguminy, viciliny, zeiny

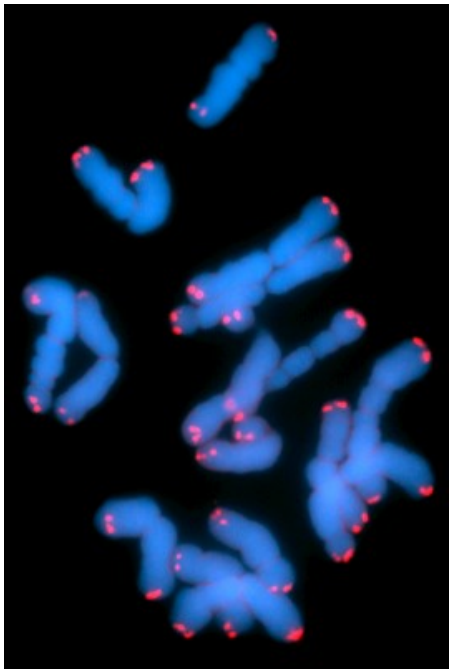


- Geny pro enzymy fotosyntézy
- Geny pro stresové proteiny
- Geny pro leghemoglobin



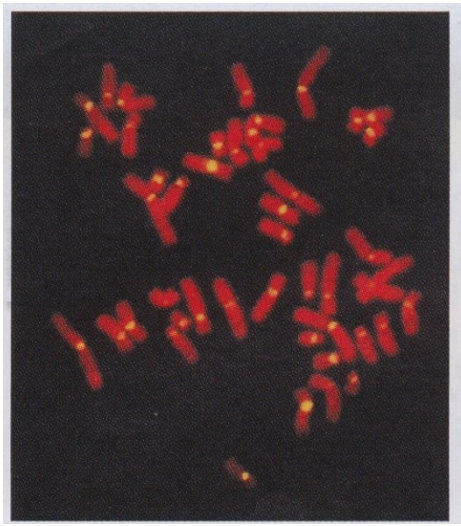
Telomery

- DNA/proteinové struktury zajišťující stabilitu chromozómových konců
- žito – 12 až 18 % genomu
- 7 bp (TTTAGGG)
- 6 bp (TTAGGG)



Centromery

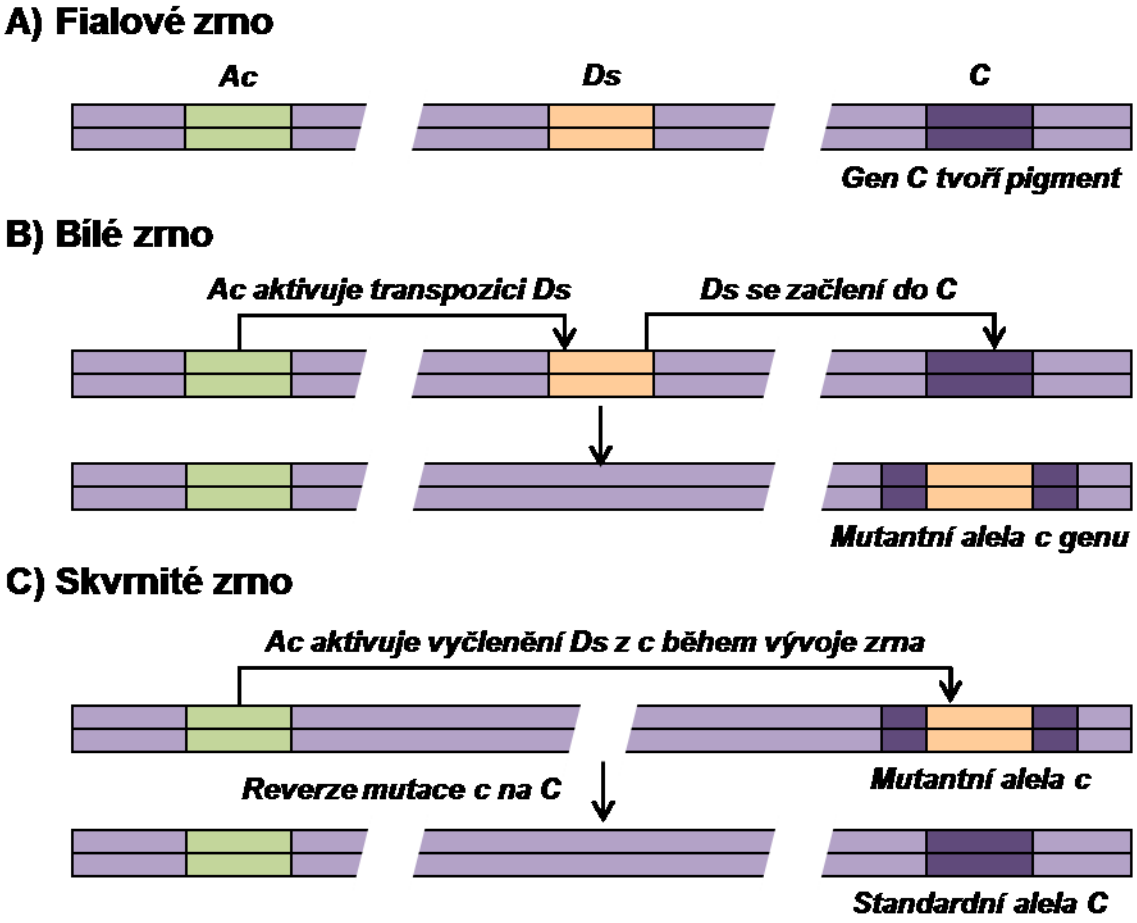
- Primární konstrikce
- funkce při segregaci chromozomů
- rozpětí 30 až 140 bp
- celková délka až 1 Mb – kukuřice



DNA transpozony (struktura a funkce)

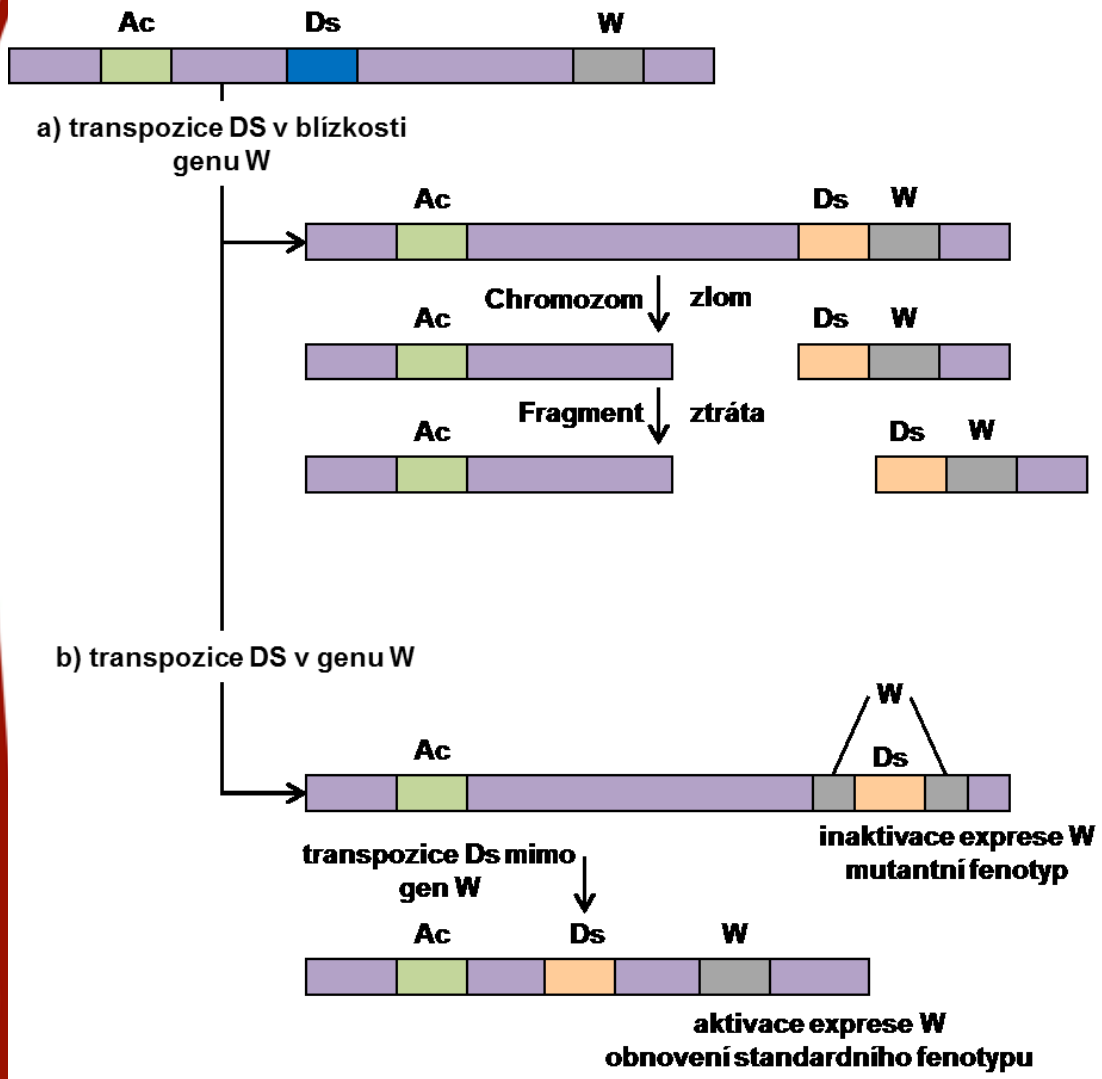
Kukuřice *Ac/Ds* (rodina transpozonů hAT)

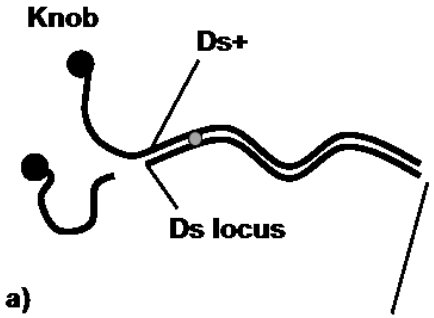
- Mechanismus transpozice



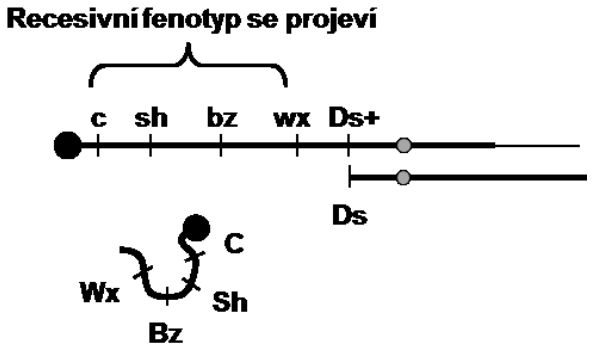
Gen *Colorless*
chromozom 9

Příčiny nestability fenotypového projevu – shrnutí



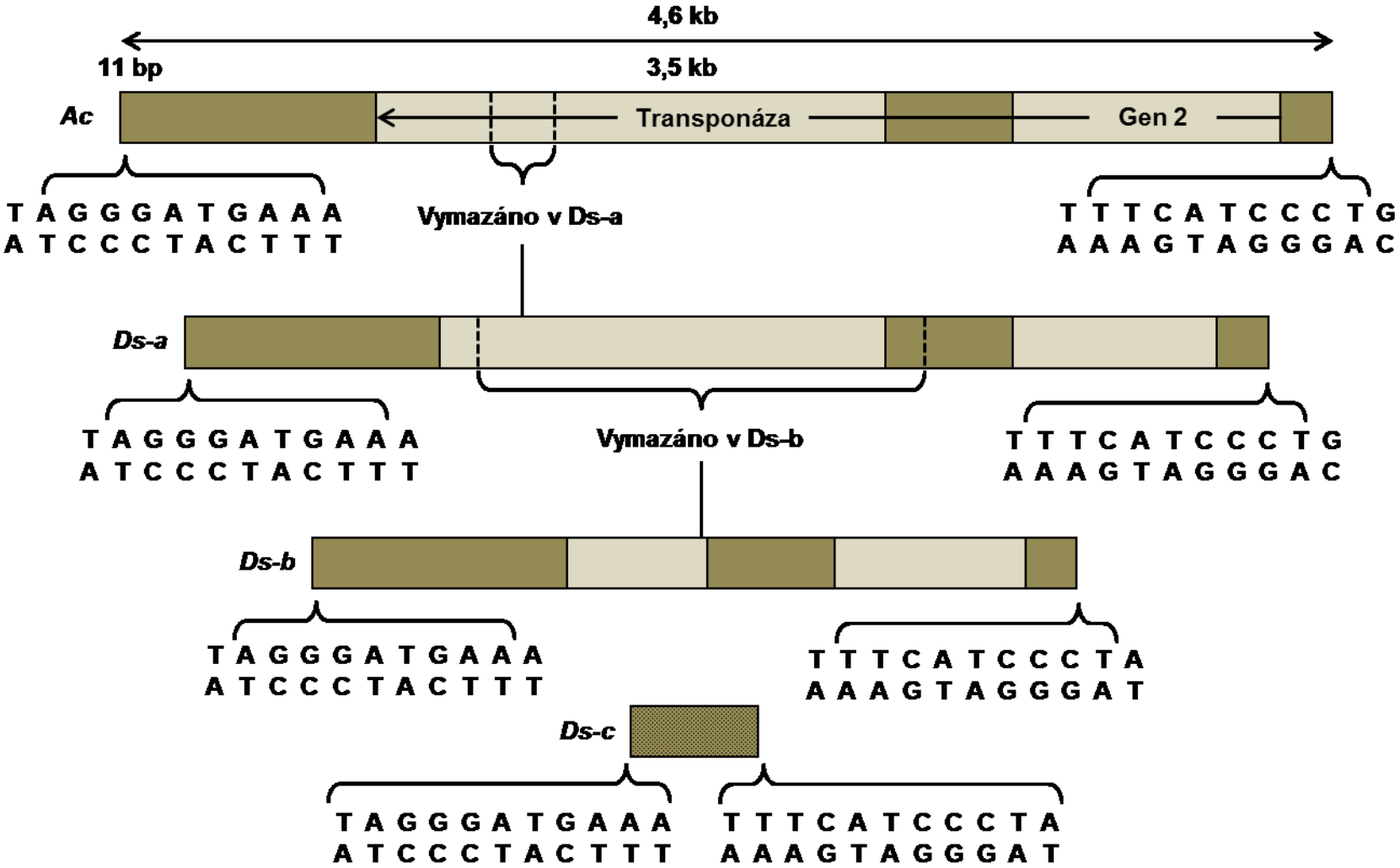


Pár homologických chromozomů 9 v meiozi (kukuřice)

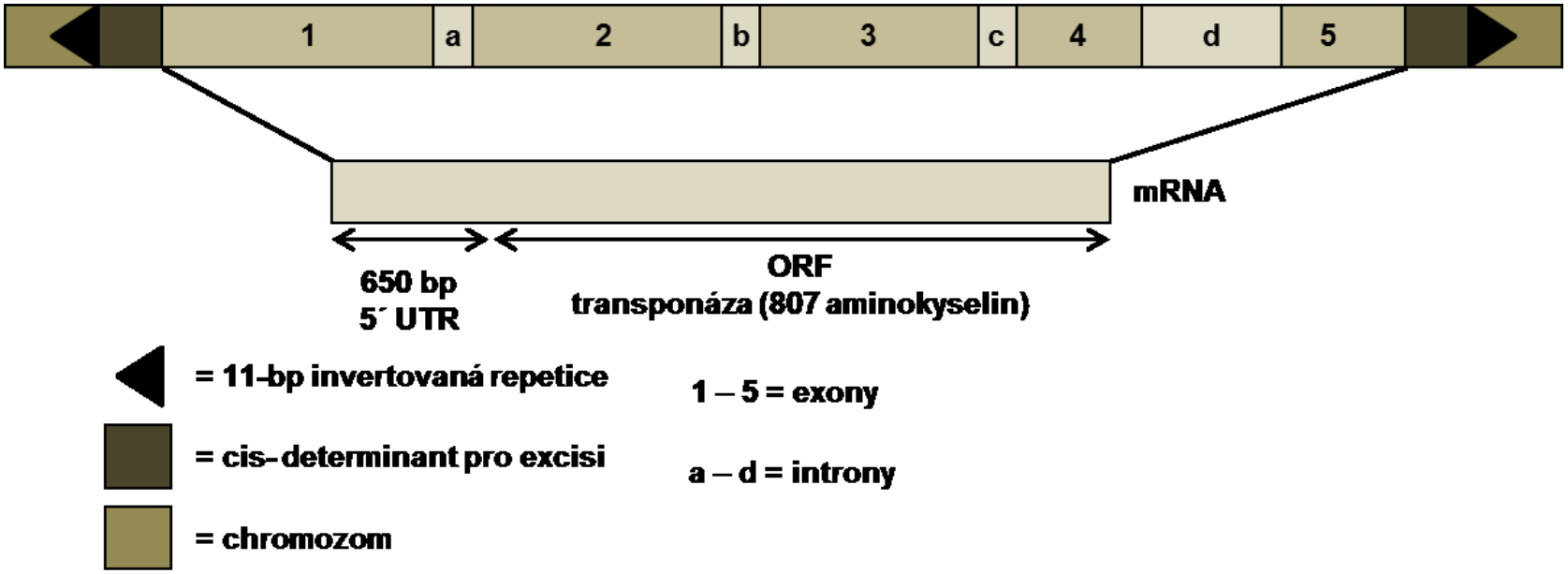


Výsledné pletivo:
- c (colourless)
- sh (shrunken)
- bz (brnoze)
- wx (waxy)

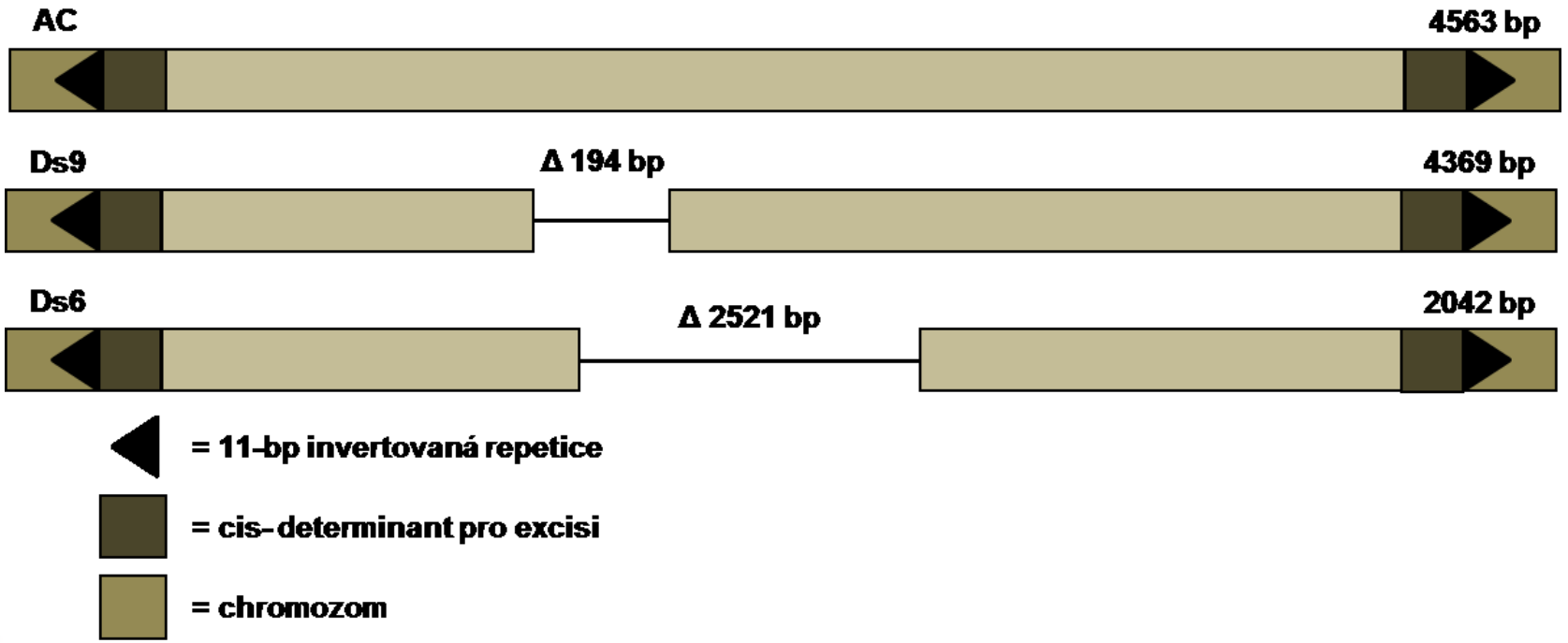
Struktura elementů *Ac* a *Ds* u kukuřice



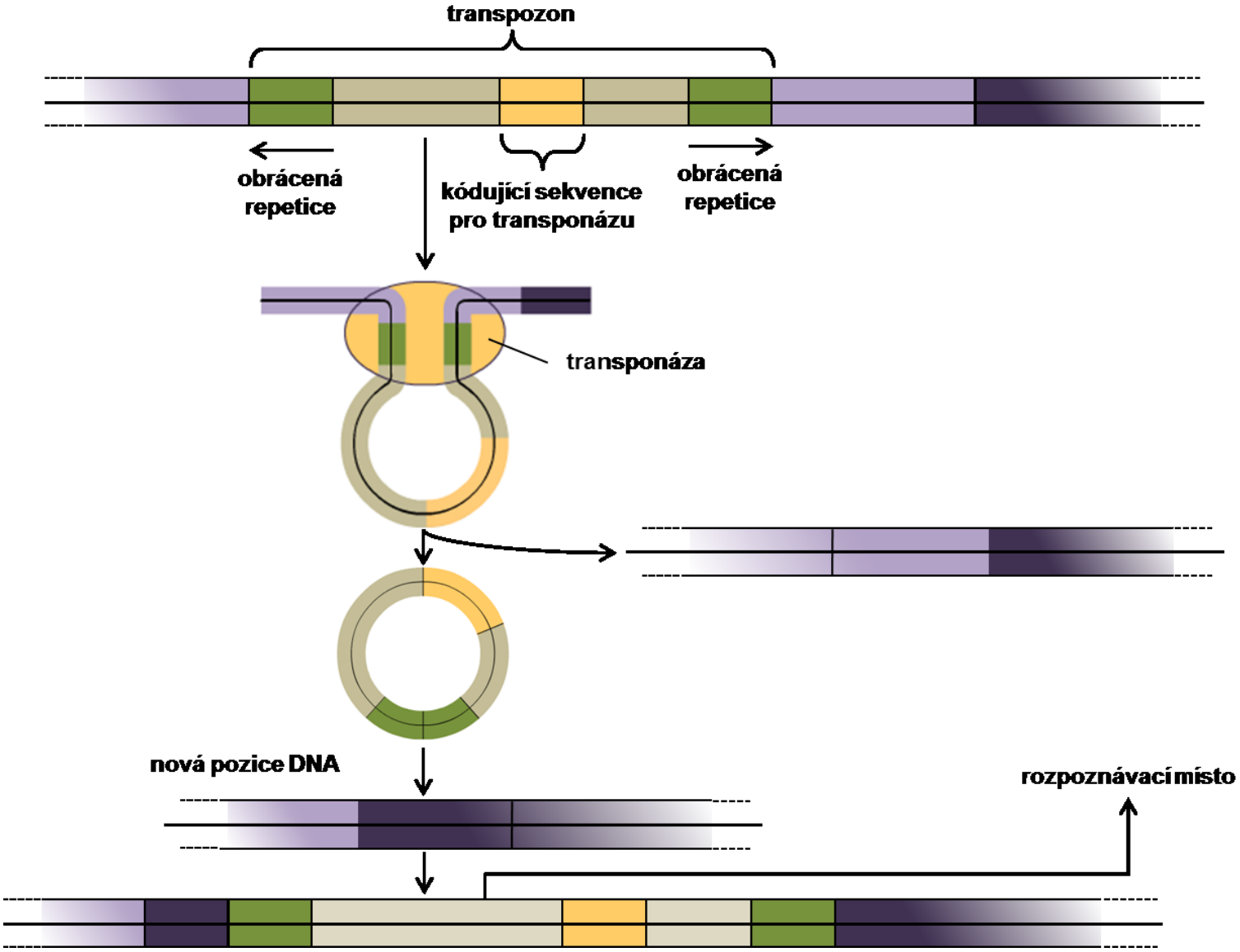
Struktura elementu *Ac* u kukuřice



Porovnání struktury elementu *Ac* s elementy *Ds*

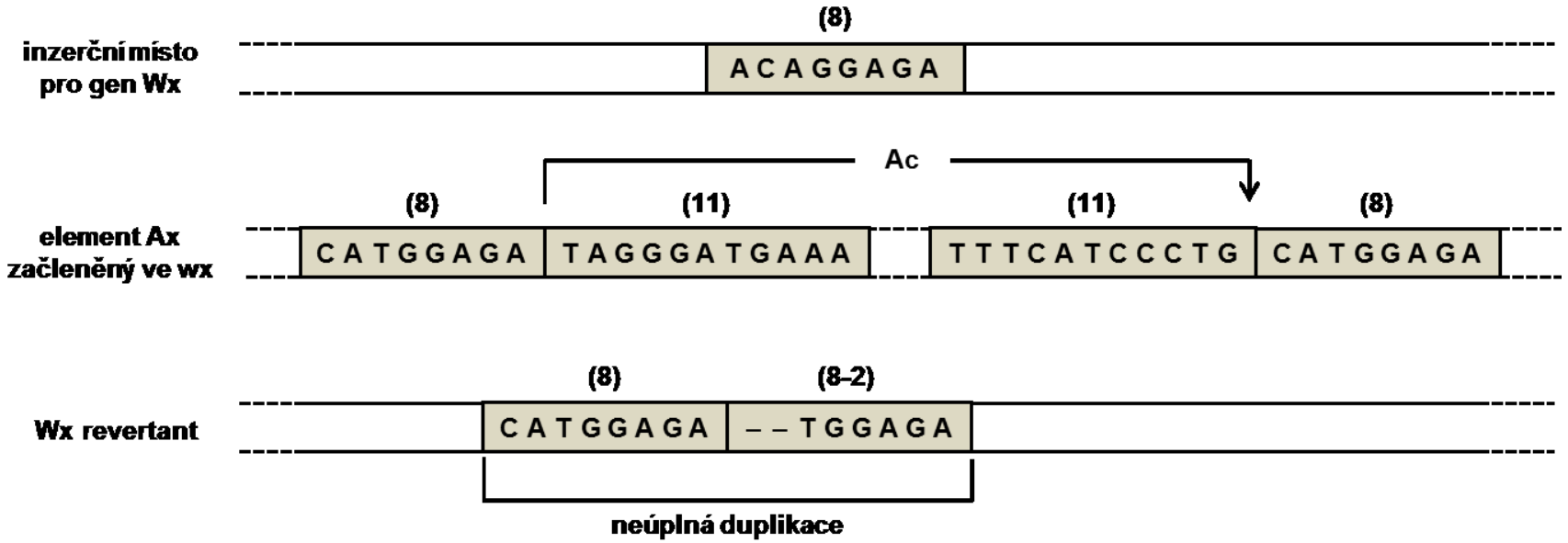


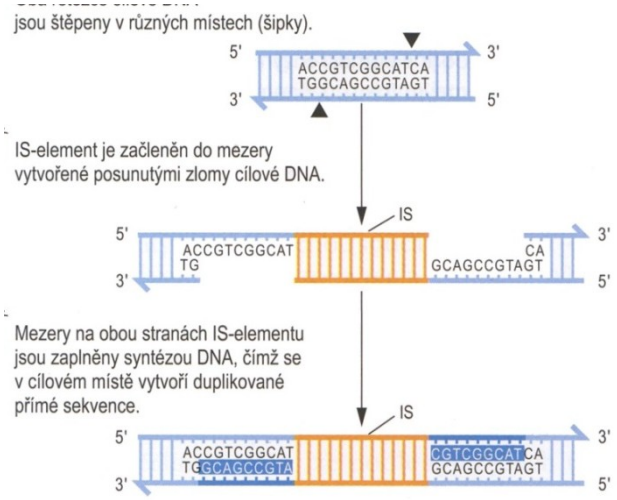
Mechanismus transpozice



Cílové inzerční místo v genu *Wx*

Přítomnost duplikace po excizi elementu *Ac*



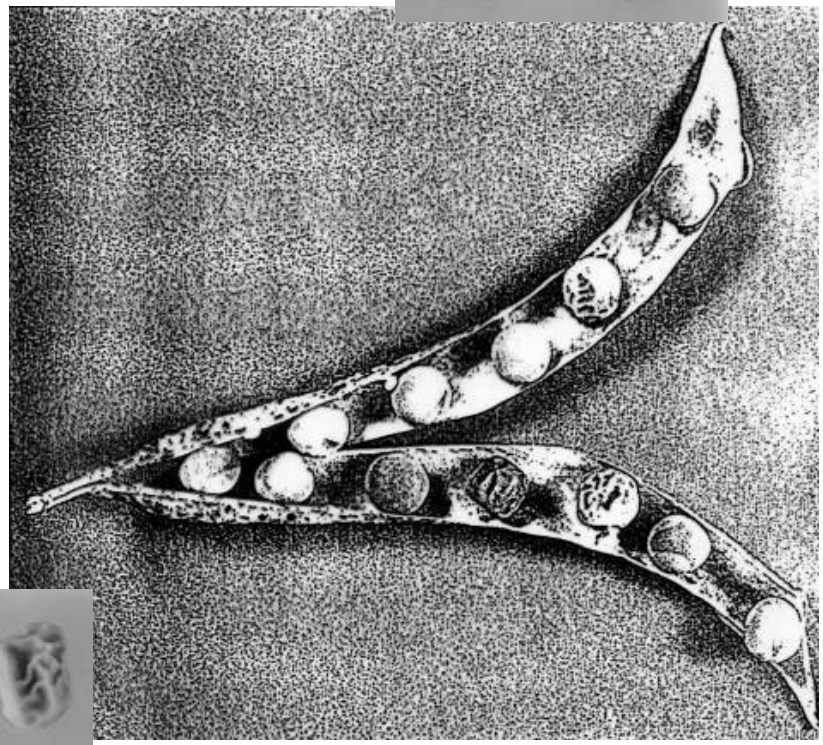


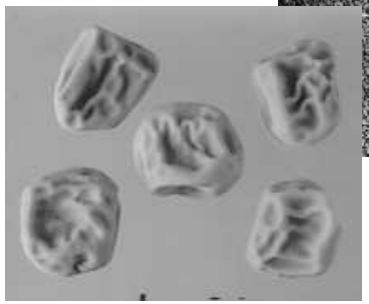
Kukuřice *Zea mays*

- Další identifikované transpozony
- *Sp/m* = *En/I* (rodina transpozonů CACTA)
- *Mu* (rodina TE Mutator)

Hrách *Pisum sativum*

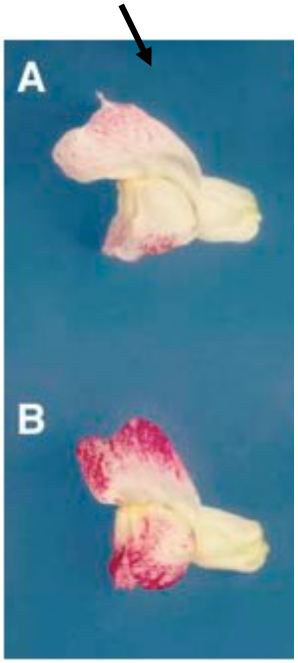
- Gen *RUGOSUS*
- Produkt genu enzym
- SBEI (Starch Branching Enzyme)





Hledík *Antirrhinum majus* (rodina transpozonů *hAT*)

- Transpozony v genech *pallida*, *nivea*
  - *Tam1* bílé pozadí, červené skvrny
  - *Tam2* bílé
  - *Tam3* slonovinové pozadí, červené skvrny
  - *Tam7* regulační gen *Deficiens*

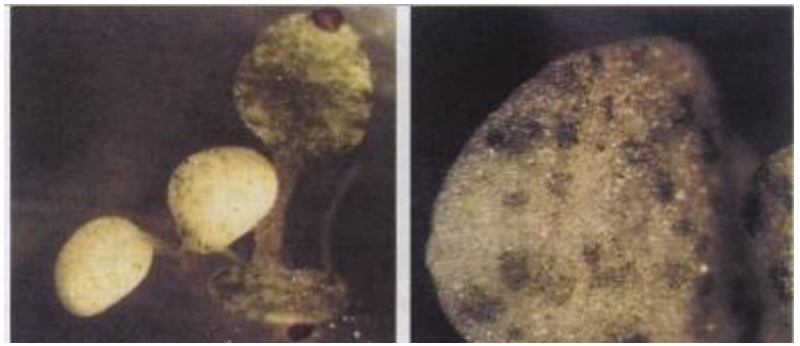


Heterologní transpozice

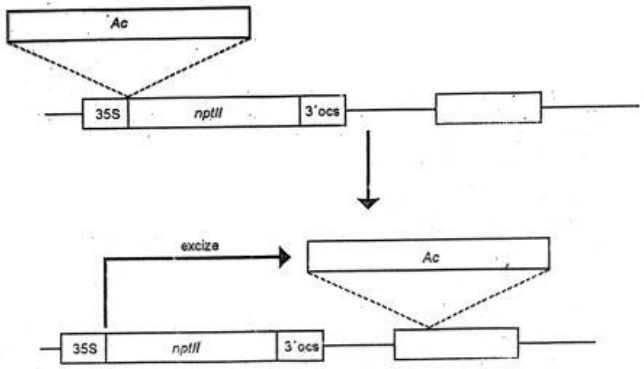
- *Arabidopsis*, rýže, tabák, rajče, petúnie, len, mrkev, brambor, sója

Význam a využití transpozonů

- Transpozonová inzerční mutageneze
- Transpozonový tagging

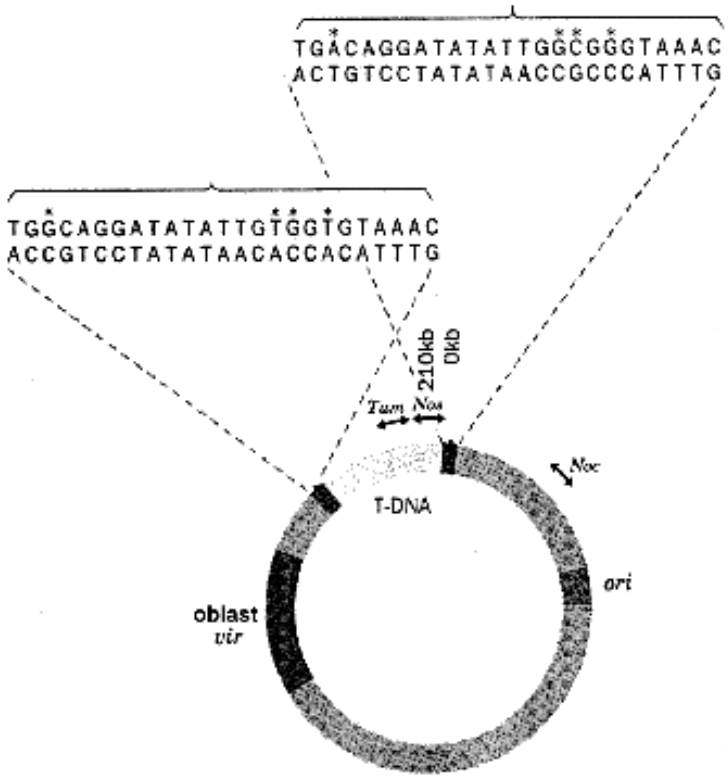


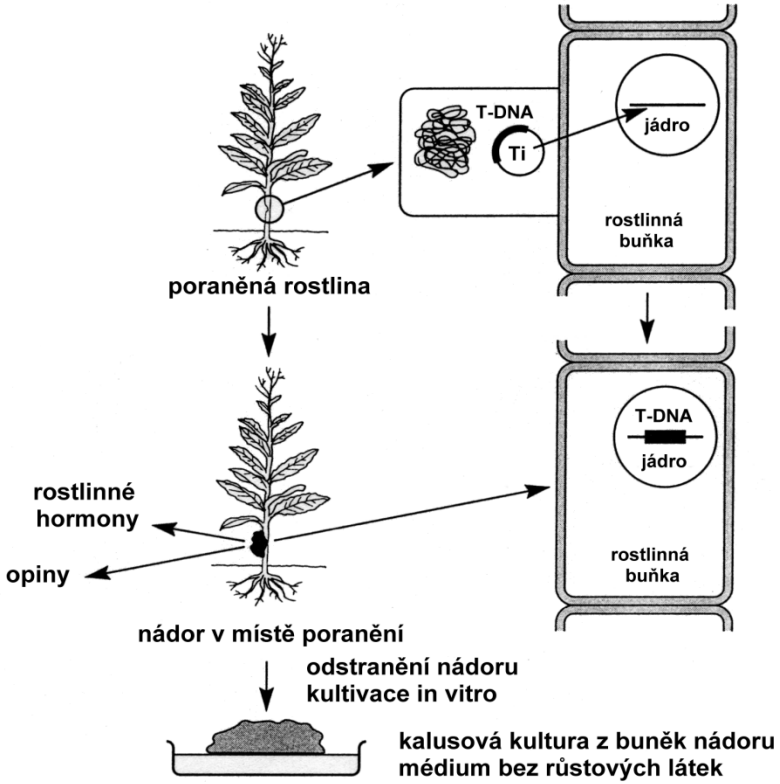
Využití elementu *Ac*



- Transformace *A. thaliana*
  - gen pro rezistenci k streptomycinu inaktivován *Ac*. Po somatickém vyčlenění *Ac* – aktivace genu – zelené sektory.

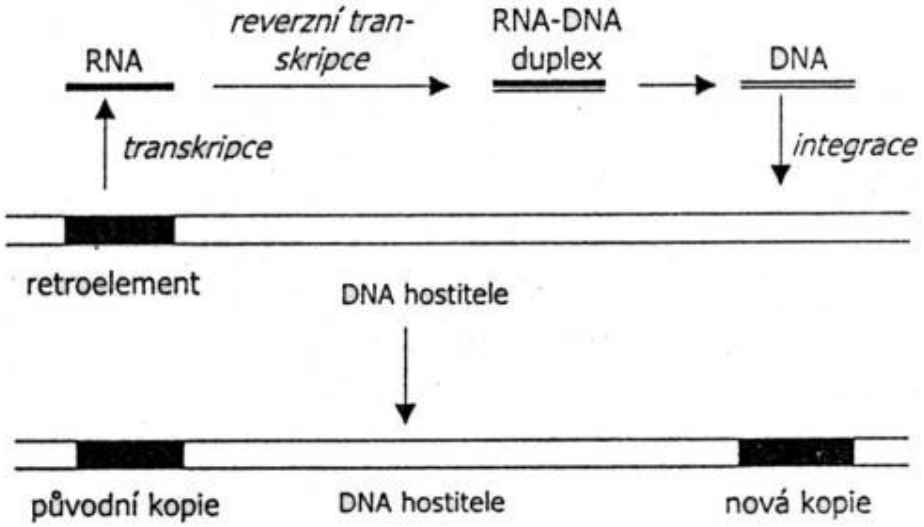
Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens* a infekce rostlinné buňky



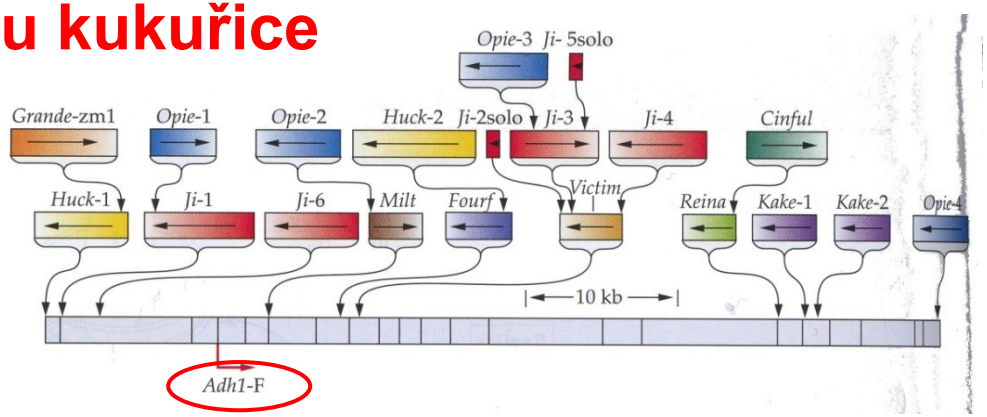


Retroelementy

Schéma retropozice

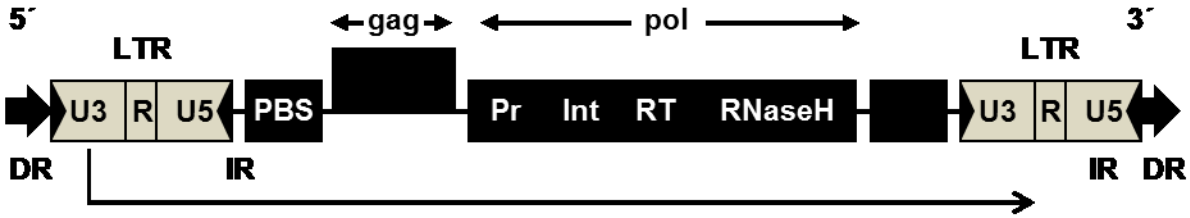


Gen *Adh* u kukuřice

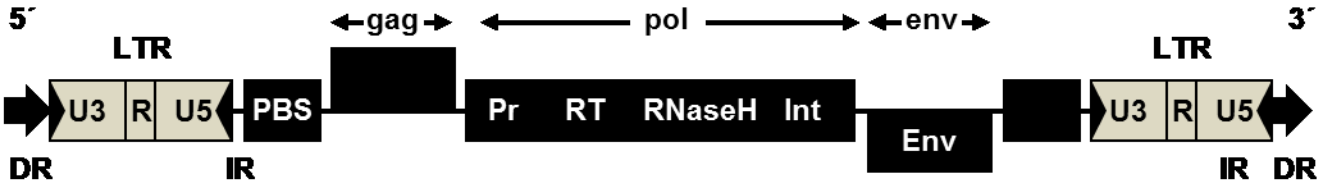


Srovnání struktury jednotlivých skupin retroelementů

(a) Retrotranspozon Tyl-copia

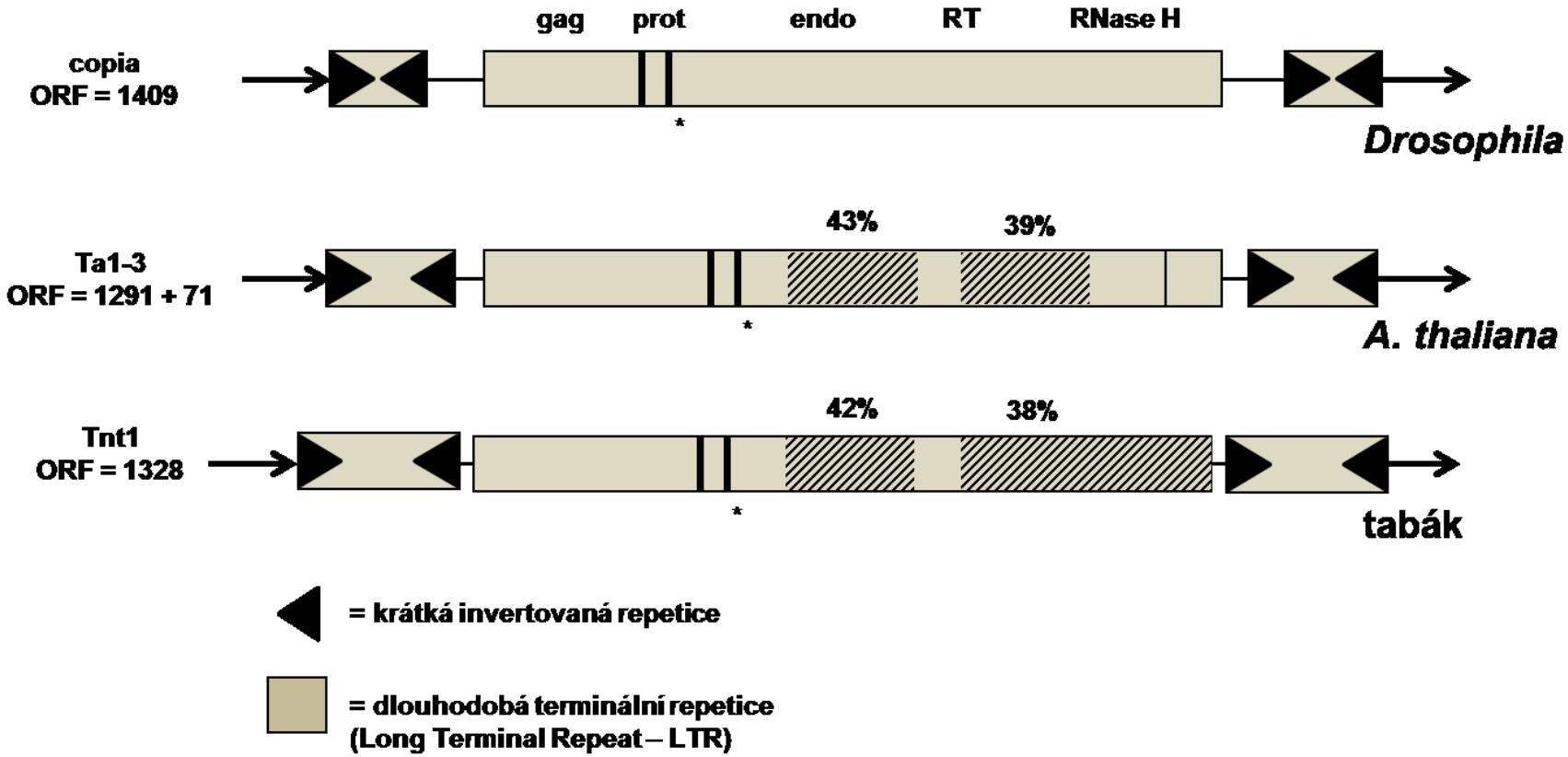


(b) Retrotranspozon *gypsy* a retroviry



(c) Retropozony bez LTR

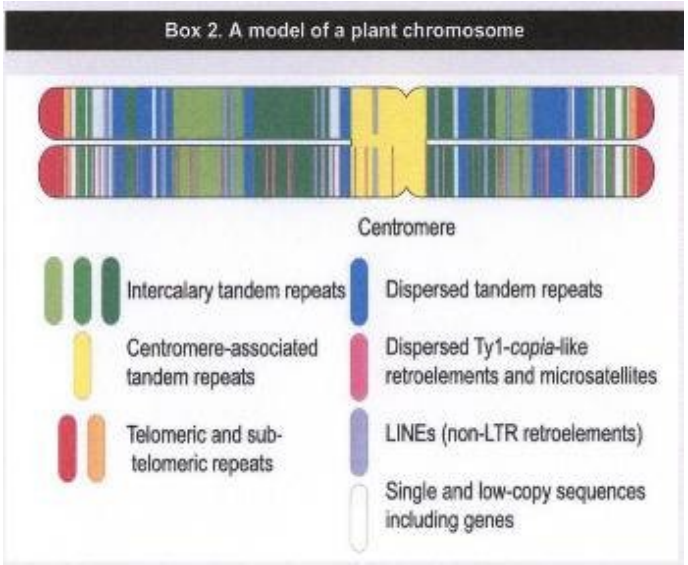
Struktura retrotranspozonů typu *copia*



Výskyt retrotranspozonů a retropozonů

- **Výskyt retrotranspozonů**
  - Tabák *Tnt1* počet kopií 100
  - Huseníček *Ta1 copia* 100
  - Kukuřice *Ty1 copia* 100 tis. 50–80 % genomu
  - Rýže *Tos17*
  - Bob setý *Ty1 copia* 1 mil.
  - Hrách setý *Ty3 gypsy* 5 tis.

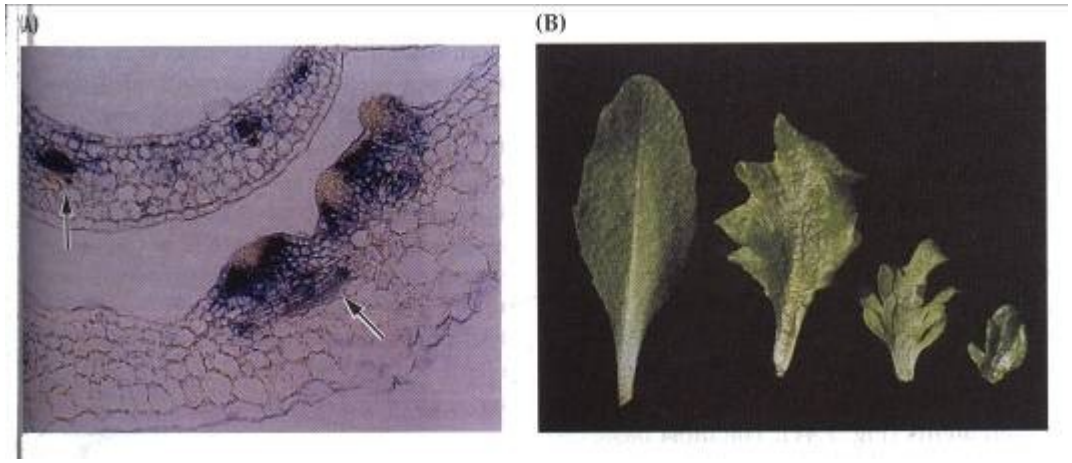
- **Výskyt retropozonů**
  - LINE – long interspersed nuclear element
  - kukuřice, rýže, pšenice, huseníček, tabák
  - SINE – short interspersed nuclear element



Regulace exprese genů u rostlin

- **Podle vývojového programu**
  - geny jsou aktivní pouze v určitých pletivech a orgánech – orgánová a buněčná regulace
- **Vlivy prostředí**
  - geny jsou aktivní na základě určitého podnětu

Orgánová a buněčná regulace



- ***Knat1*** *Arabidopsis*

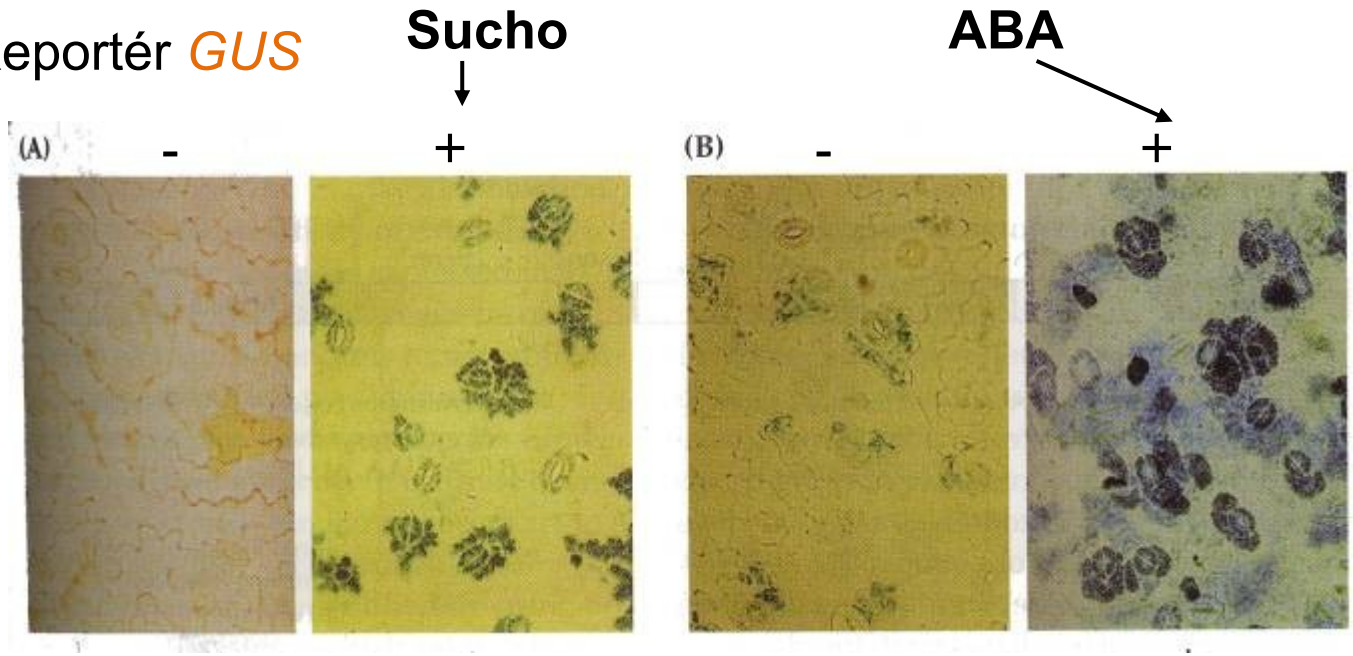
- ***Knotted1*** kukuřice

Rostlinné hormony

- **Auxiny** – buněčné dělení, prodlužování a diferenciace buněk
- **Cytokininy** – buněčné dělení, růst buněk, oddalují stárnutí buněk, otevírání průduchů
- **Gibereliny** – růst rostlin, regulace klíčení semen a kvetení
- **Kyselina abscisová** – regulace vývoje a klíčení semen, funkce průduchů, odpověď na vodní deficit
- **Etylén** – klíčení semen, růst klíčních rostlin, odpověď na poranění, zrání plodů

Podněty z prostředí

- Charakterizace sekvencí potřebných pro expresi genu
- Reportér *GUS*



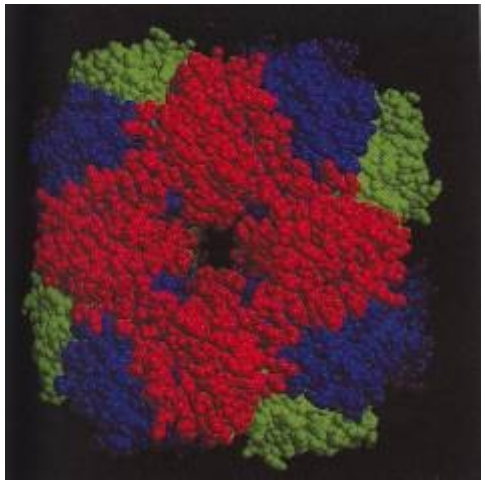
Transgenní *A. thaliana*

- Exprese transgenu responzivního na podněty sucha – fúze promotoru genu s reportérovým genem *GUS* (detekovaný signál v průduchách).
- Exprese tohoto transgenu je indukována také ABA, která je součástí dráhy přenosu signálu z jádra do průduchů v podmínkách sucha.

Světlo

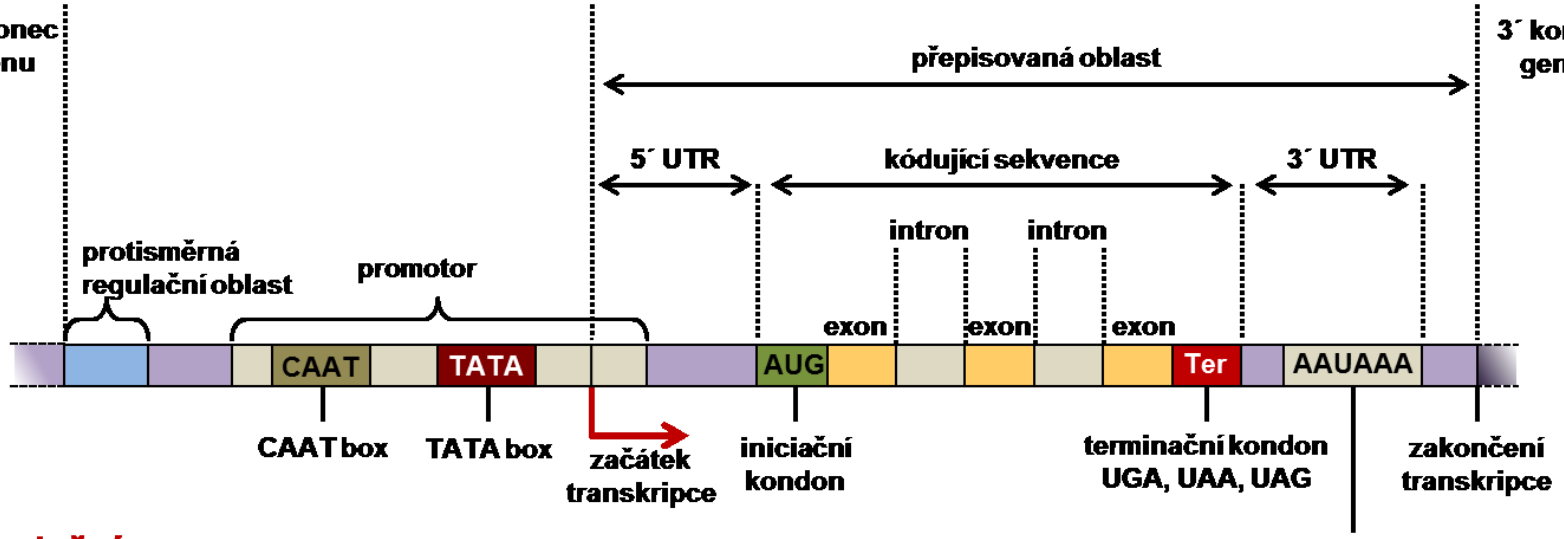
- **Funkce**: absorbce světla cytoplazmatickým proteinem fytochromem
- Konformační změny fytochromu – biologická aktivace a změny v dalších proteinech, některé z nich aktivují gen *rbcS*
- Aktivace genů pro klíčové enzymy fotosyntézy

- RBC
  - Enzym ribulózo-1,5-bifosfát karboxyláza
  - Rubisco
  - Multiproteinový komplex
  - Geny *rbcS*, *rbcL*

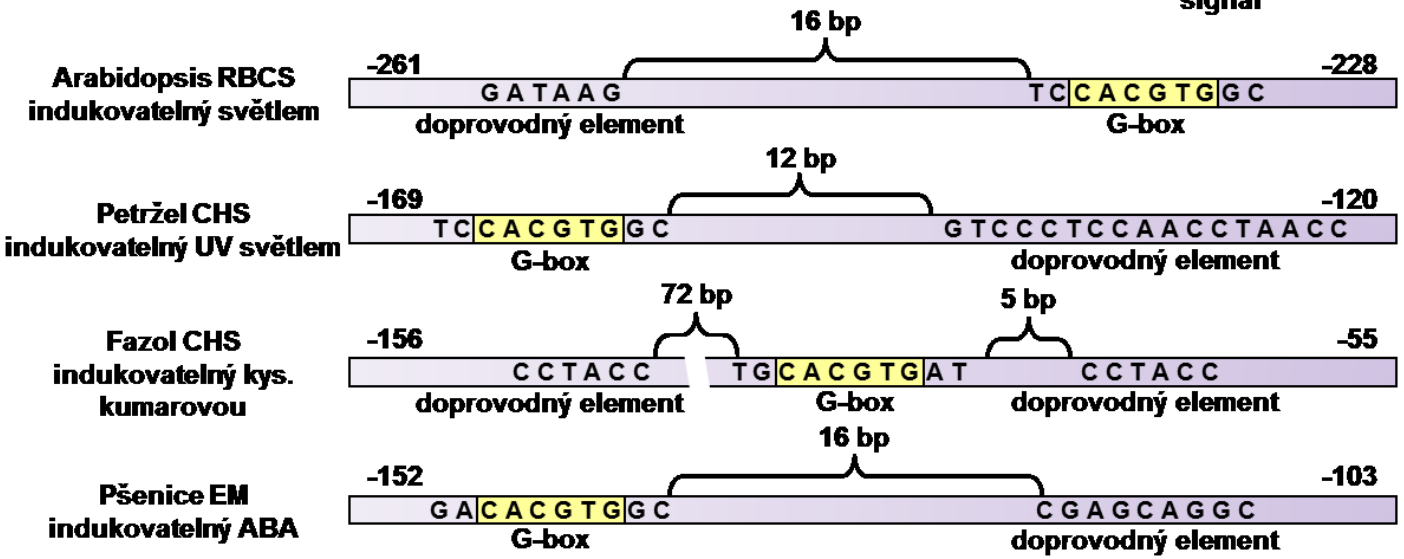


GENETIKA ROSTLIN

Molekulární řízení transkripce genů

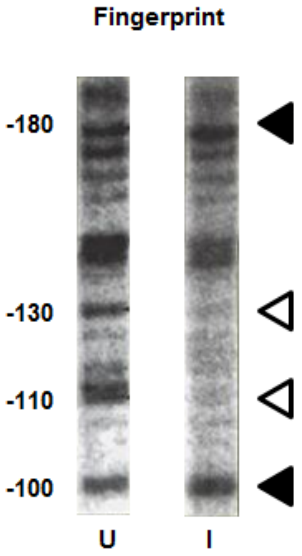


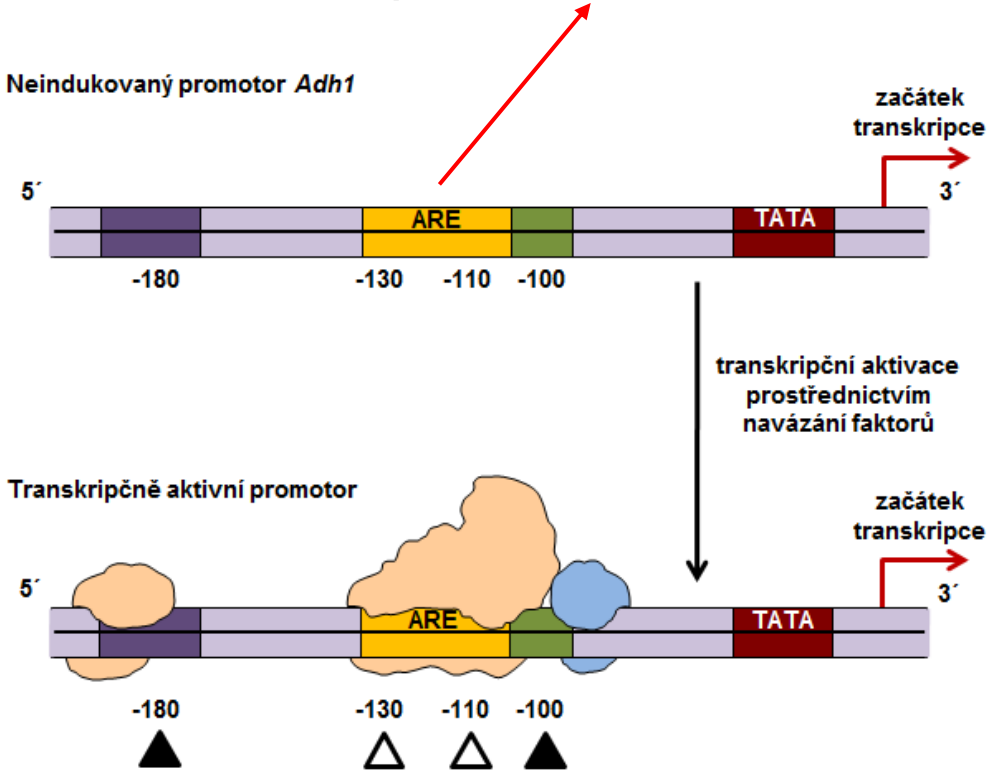
Regulační elementy promotorů rostlin



- Několik cis-elementů promotoru genu *Adh1* kukuřice
- Regulují transkripci genu jako odpověď na nedostatek kyslíku v prostředí

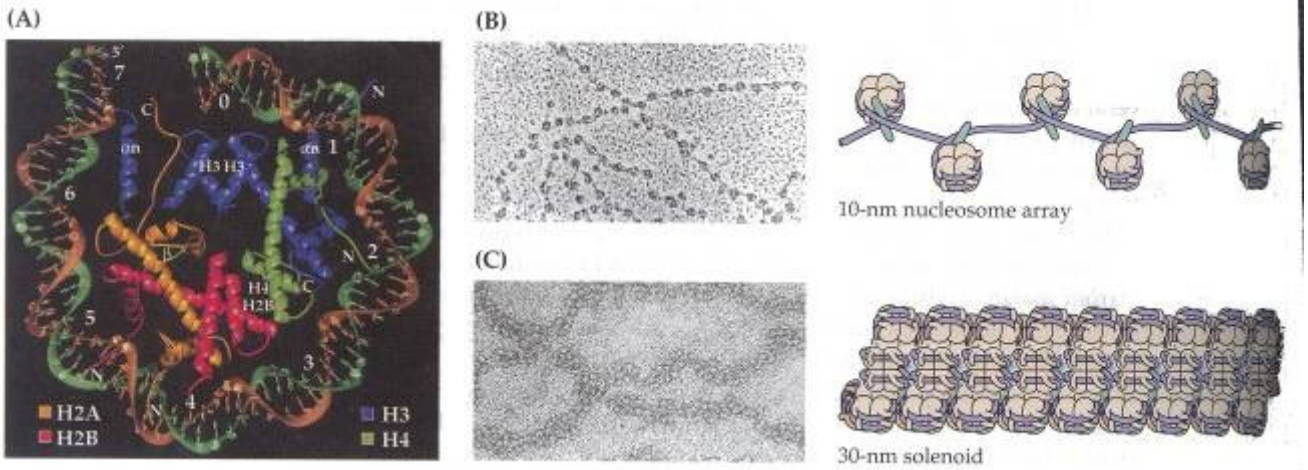
Element ARE (anaerobic response element)

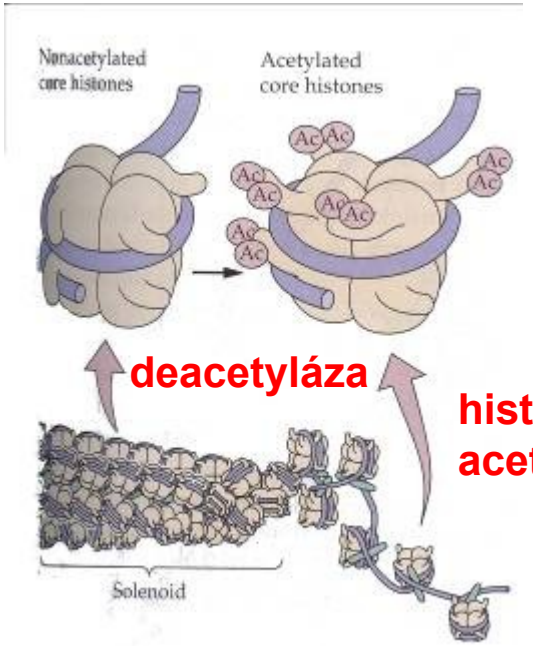


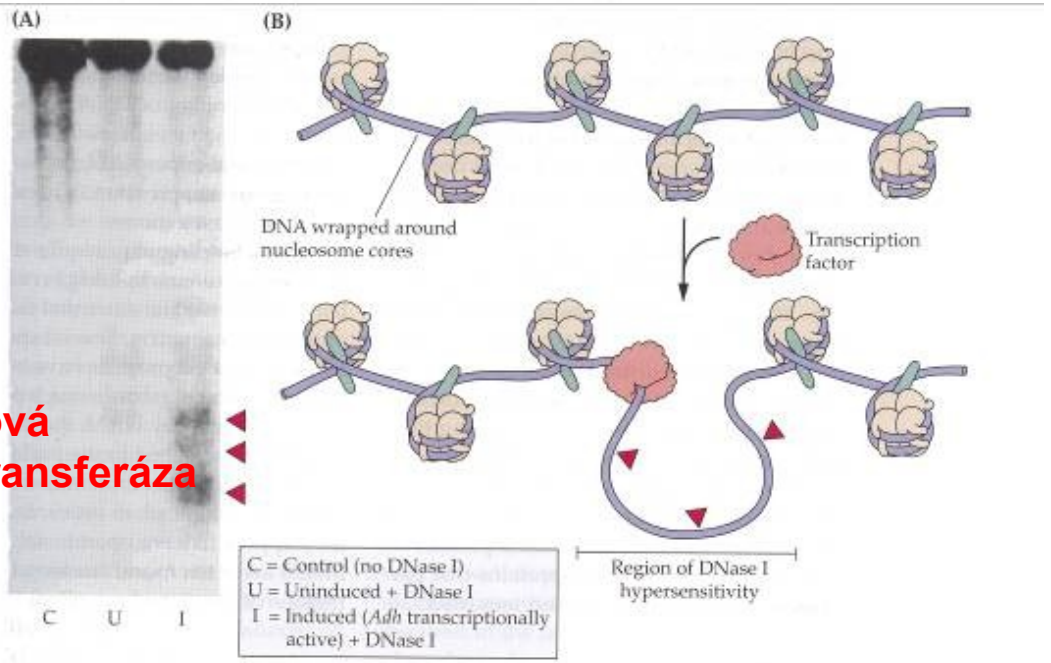


Transkripční faktory

Funkce chromatinu v genové expresi

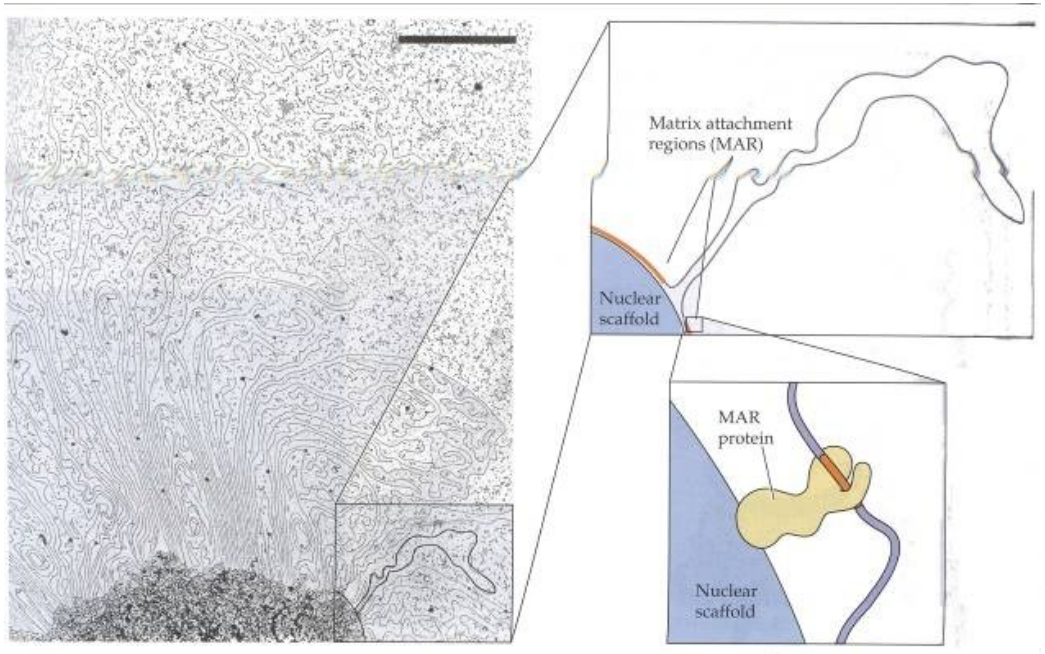




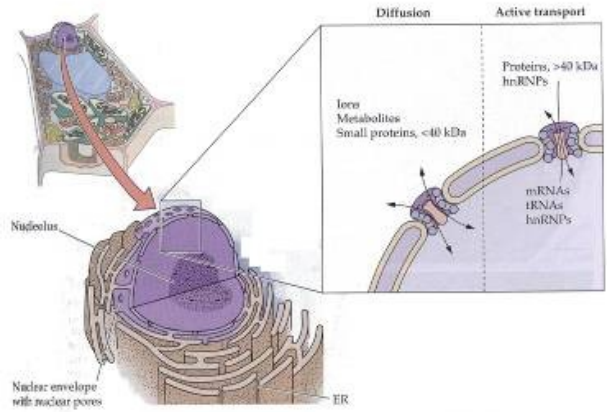


Matrix attachement regions

- Smyčkové domény chromatinu 5 až 200 kb
- MAR bohaté na motiv AT (200 až 1000 bp)
- Funkce ve strukturní organizaci genomu
- Usnadňují transkripci genů nebo skupin genů prostřednictvím tvorby méně kondenzované struktury chromatinu



MAR obklopují kódující oblasti genů, jsou spojeny s regulačními elementy

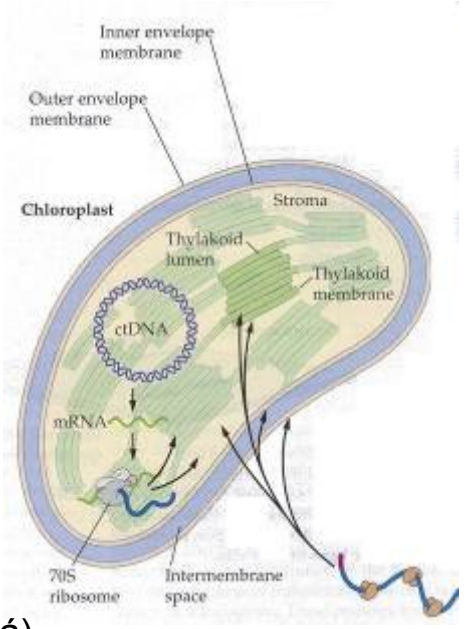


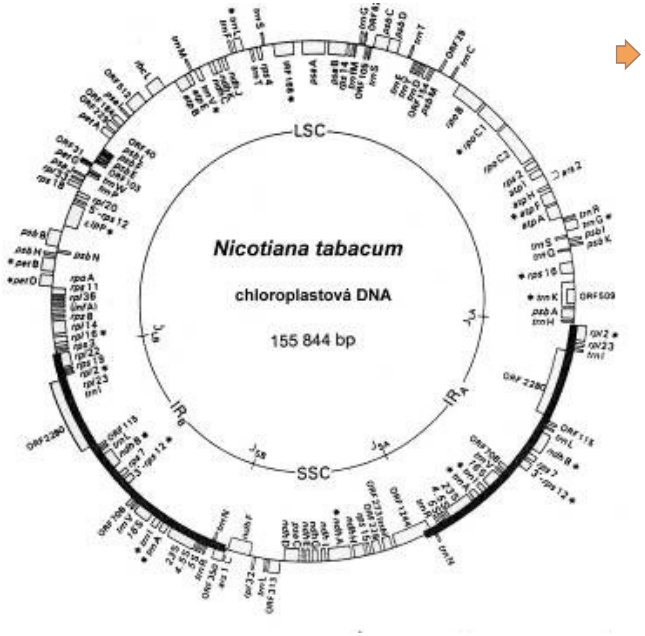
GENETIKA ROSTLIN

Mimojaderný genom

Chloroplastová DNA (cpDNA)

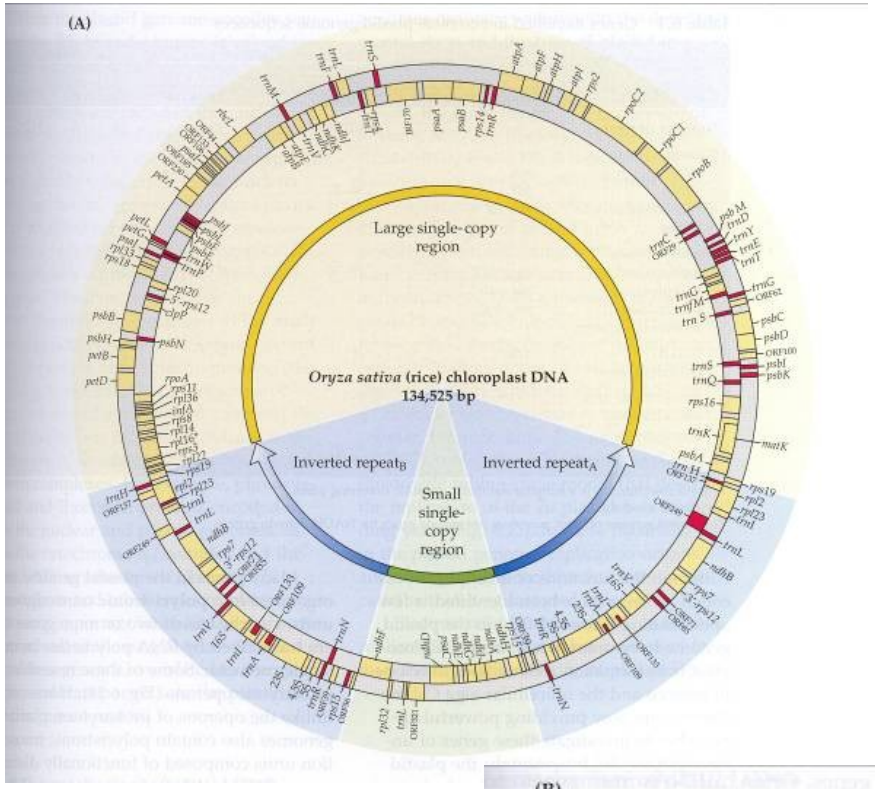
- Dvouřetězcový kružnicový chromozom
- Lokalizace – chloroplasty v mnoha kopiích
- Velikost 120 až 160 kb
- Struktura



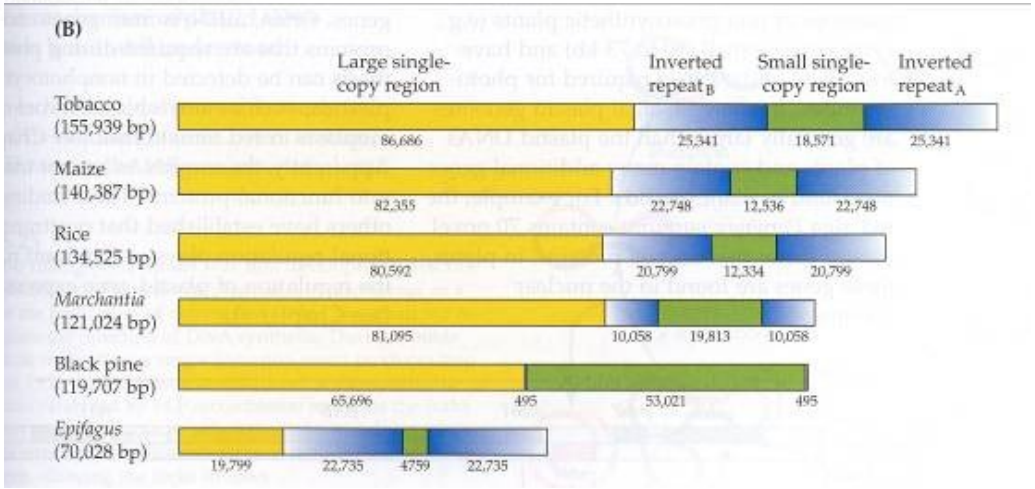


- Sekvenovaná cpDNA
  - *Nicotiana tabacum*
  - *Marchantia polymorpha* (porostnice mnohotvárná)
  - *Oryza sativa*
  - *Triticum aestivum*
  - *Zea mays*
  - *Pinus thumbergii*
  - *Spinacia oleracea*
  - *Medicago truncatula*
  - *Lotus japonicus*

GENETIKA ROSTLIN



Epifagus



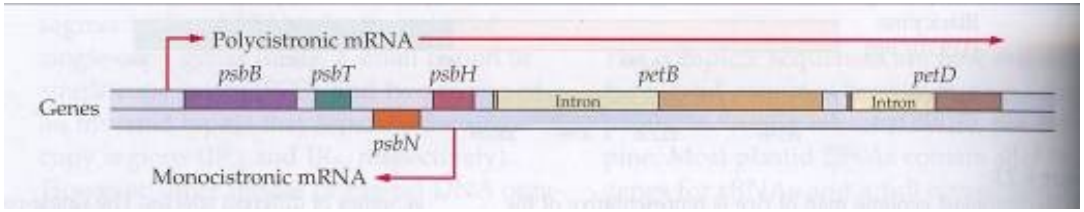
Organizace cpDNA

Table 6.1 Genes identified in complete plastid genome sequences

Gene products	Gene acronym	Plants		Algae	
		Photosynthetic plants	*Epifagus*[a]	*Euglena*	*Porphyra*[b]
Number of genes		101–150	40	82	182
Genetic system					
rRNA	*rrn*	4	4	3	3
tRNA	*trn*	30–32	17	27	35
Ribosomal protein	*rps, rpl*	20–21	15	21	46
Other		5–6	2	4	18
Photosynthesis					
Rubisco and complexes of the thylakoid membrane system	e.g., *rbcL, psa, psb, pet, atp*	29–30	0	26	40
NADH dehydrogenase[c]	*ndh*	11	0	0	0
Biosynthesis and miscellaneous functions		1–5	2	1	40
Number of introns		18–21	6	155	0

[a] *Epifagus* (beechdrops) is a nonphotosynthetic, parasitic flowering plant.
[b] *Porphyra* is a red alga.
[c] The plastid genome of black pine does not encode genes for NADH dehydrogenase.

- Uspořádání genů chloroplastového operonu a transkripce

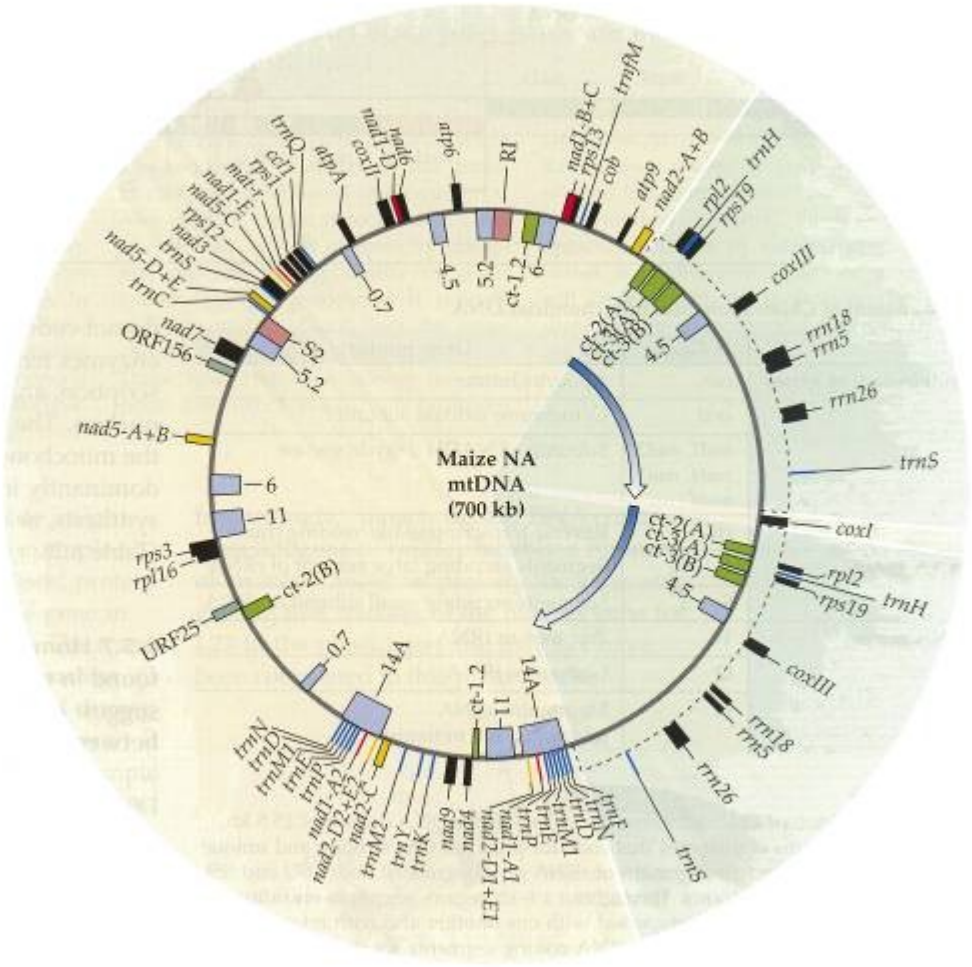


Koordinace buněčných kompartmentů

GENETIKA ROSTLIN

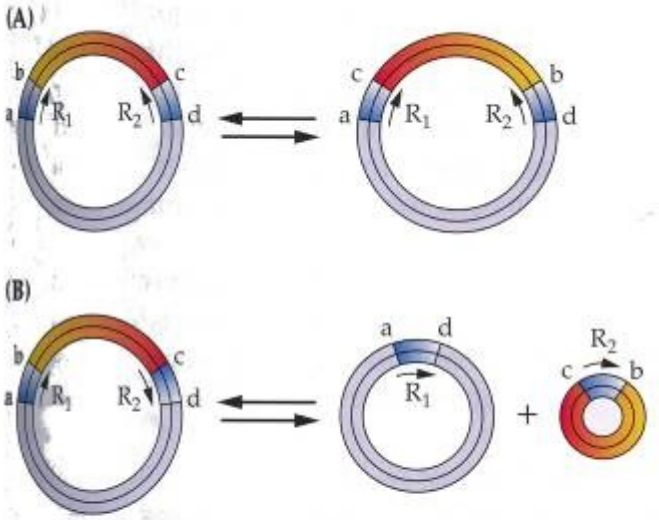
Mitochondriální DNA (mt DNA)

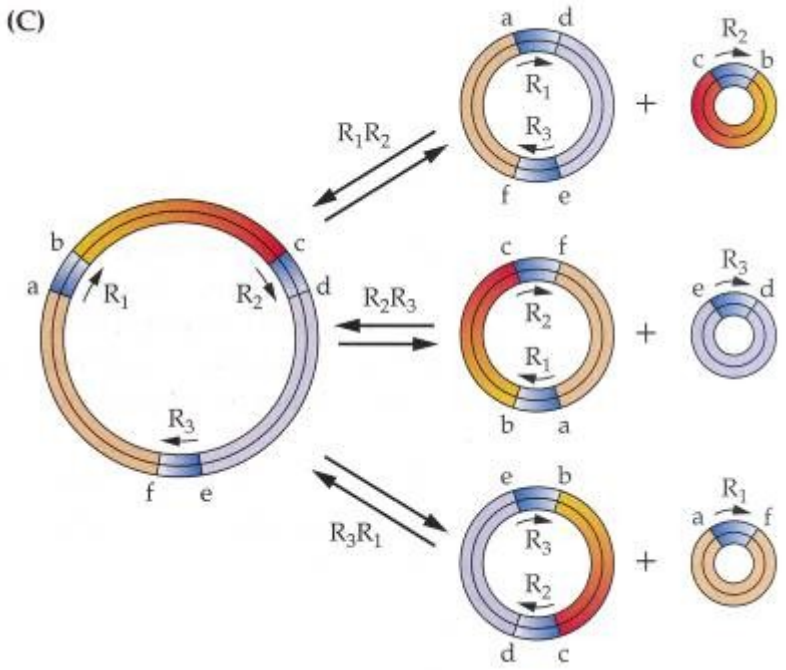
- Několik subgenomových kružnicových struktur
- Velikost
- Lokalizace
- Struktura



Subgenomové struktury a jejich tvorba

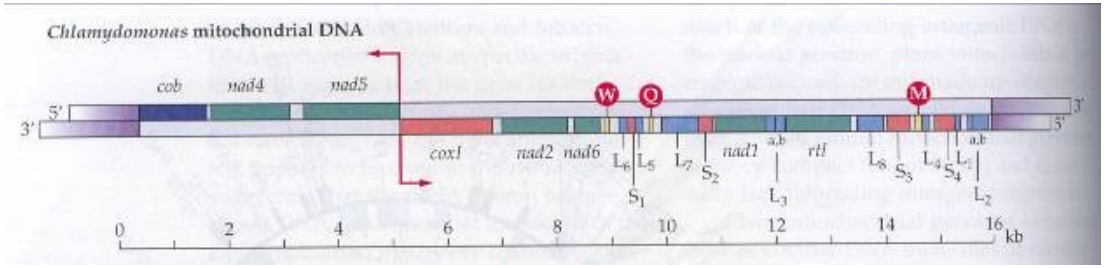
- Tři typy tvorby subgenomových struktur





GENETIKA ROSTLIN

Geny mt genomu



- První osekvenovaná mt DNA
- Rýže
  - cp DNA
  - mt DNA

Gene content of *Chlamydomonas* mitochondrial DNA

	Gene	Gene product
Protein-coding genes	*cob*	Apocytochrome
	cox1	Cytochrome oxidase subunit I
	nad1, nad2, nad4, nad5, nad6	Subunits of NADH dehydrogenase
	rtl	Reverse transcriptase-like reading frame
rRNA genes	$L_1 - L_8$	Segments encoding large subunit of rRNA
	$S_1 - S_4$	Segments encoding small subunit of rRNA
tRNA genes	W	Tryptophan tRNA
	Q	Glutamine tRNA
	M	Methionine tRNA (elongator, not initiator)

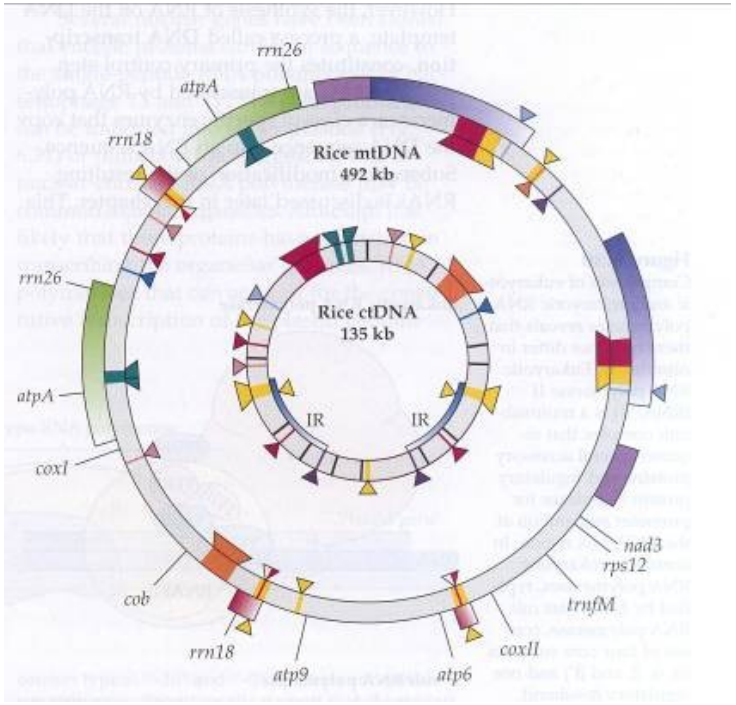
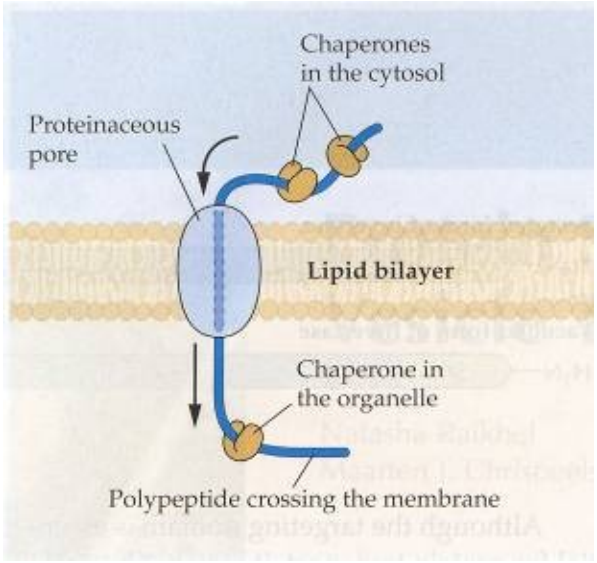
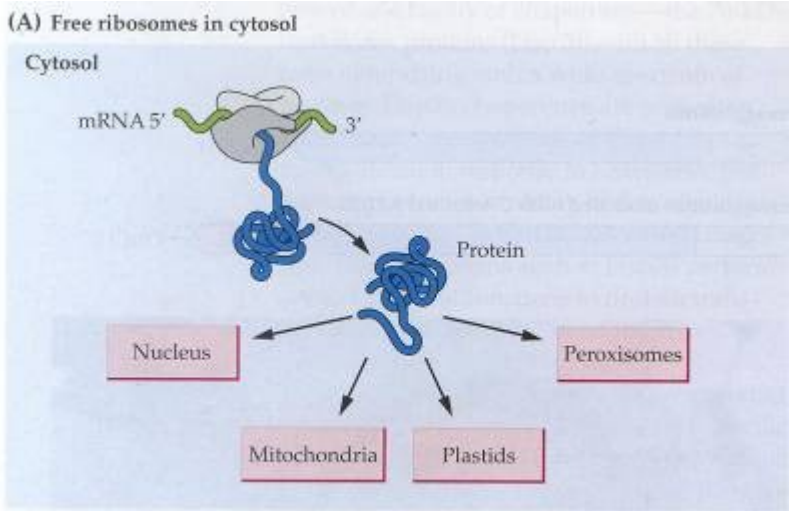


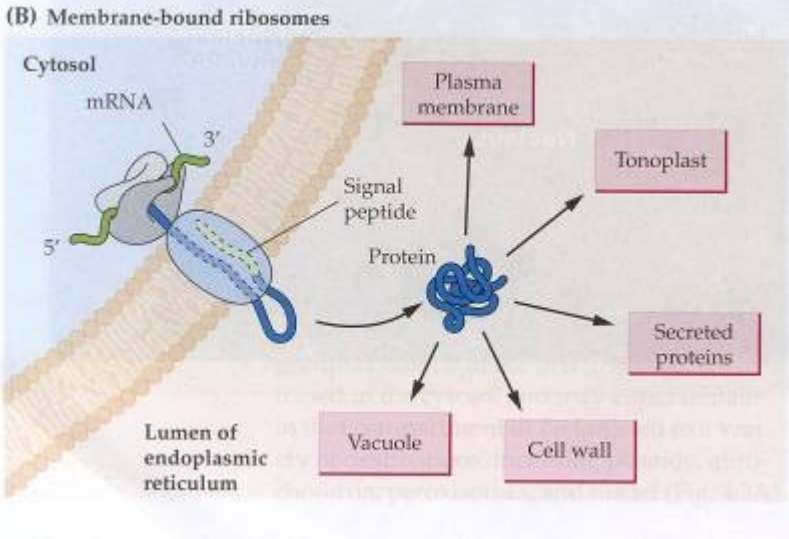
Table 6.2 Types of genes identified in the maize mitochondrial genome

Gene products	Gene abbreviations	Function
rRNAs	*rrn18, rrn26, rrn5*	Protein synthesis
tRNAs	*trn*	Protein synthesis
Ribosomal proteins	*rps, rpl*	Protein synthesis
NADH dehydrogenase	*nad*	Respiratory electron transport
Cytochrome *c* oxidase	*cox*	Respiratory electron transport
Apocytochrome	*cob*	Respiratory electron transport
F_0F_1-ATPase proteins	*atp*	ATP synthesis

Transport proteinů do organel



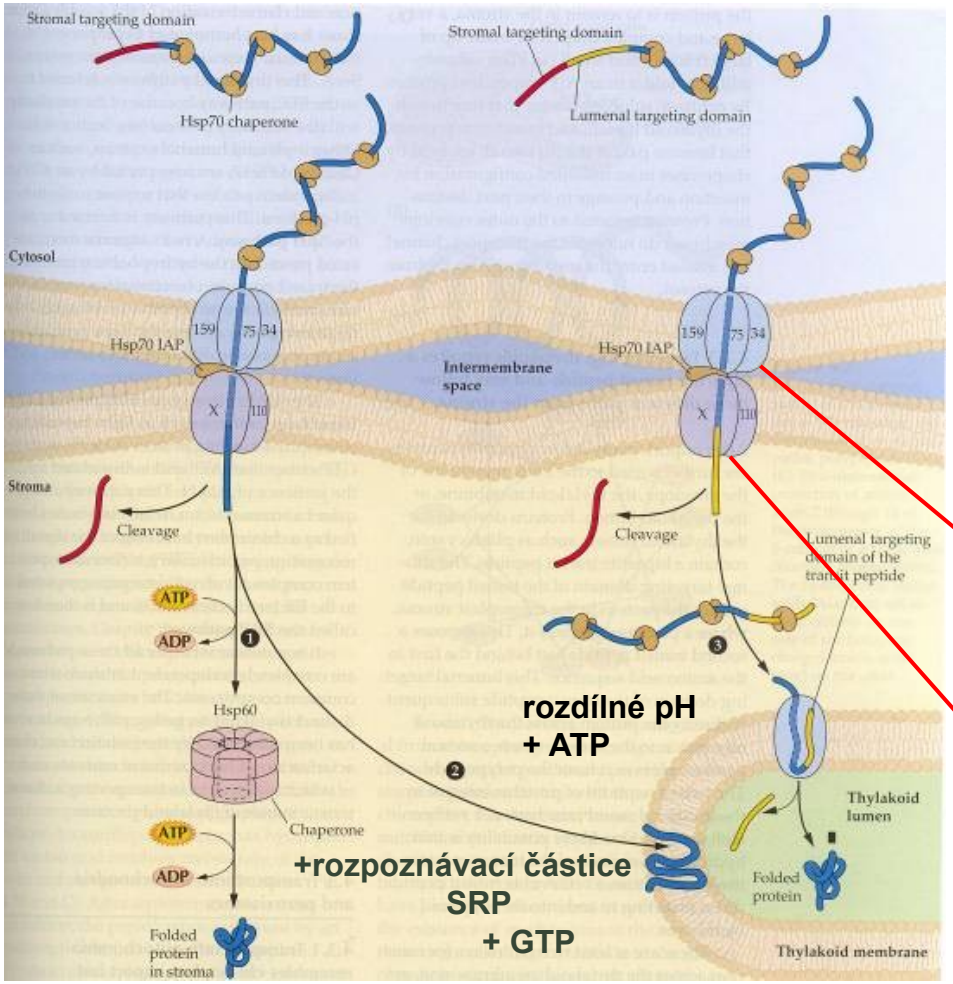




- Transport proteinů přes lipidické dvojvrstvy umožňují chaperony.
- Vážou polypeptidy a transportují je přes póry v cytoplazmatické membráně.
- Udržují proteiny v rozmotaném stavu na jedné straně membrány a pomáhají jim vytvářet prostorovou strukturu na straně druhé.

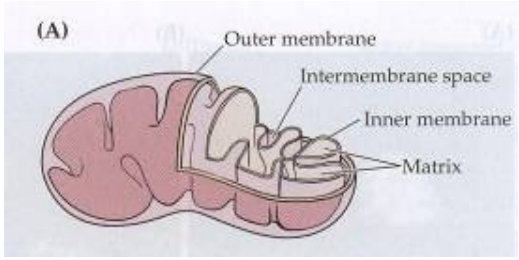
Proteiny kódované cpDNA i jadernými geny a transport v rámci chloroplastů

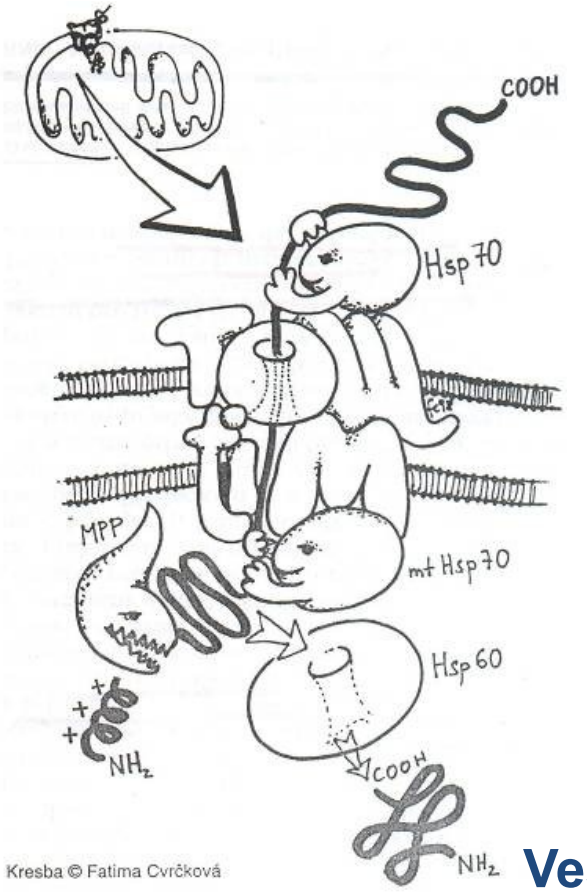
Mechanizmus transportu proteinů z cytoplazmy do chloroplastů



- Chaperony v cytosolu + signální sekvence
- Transport do stromatu a do lumen thylakoidů
- Transportní aparát přes
- Membrány:
  - TOC *Translocon of the outer membrane of the chloroplast*
  - TIC *Translocon of the innermembrane of the chloroplast*

Transport proteinů do mitochondrií



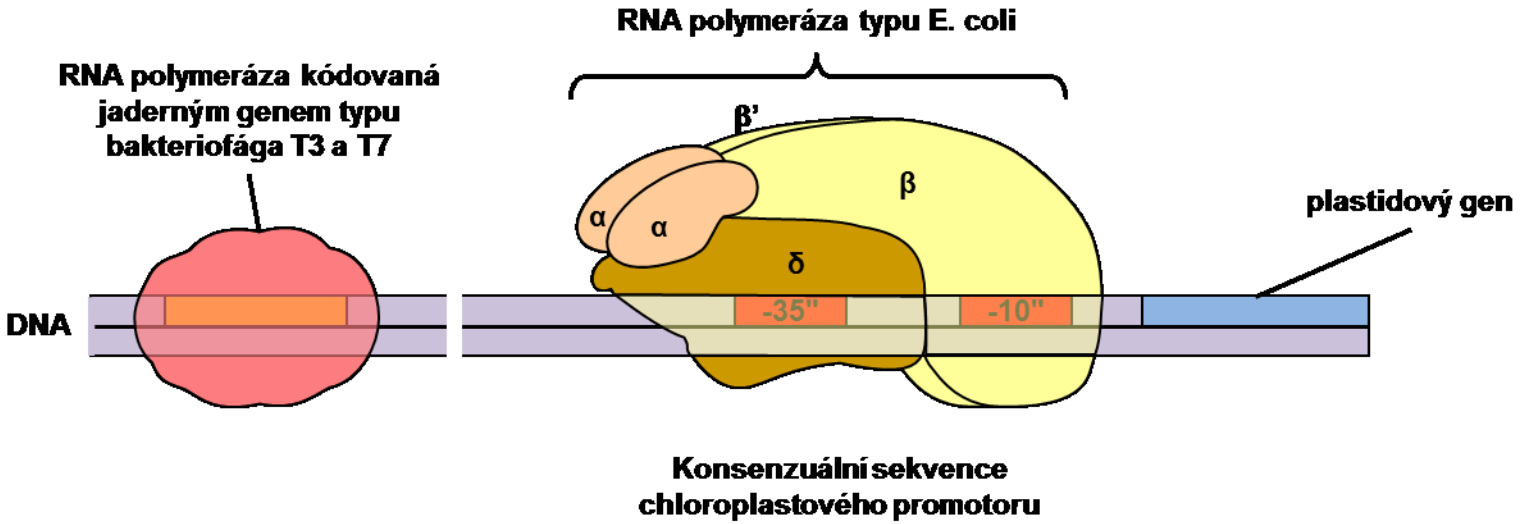


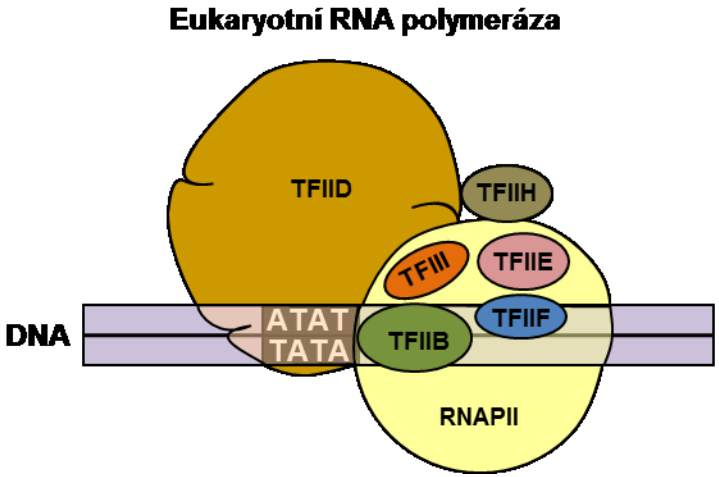
Kresba © Fatima Cvrčková

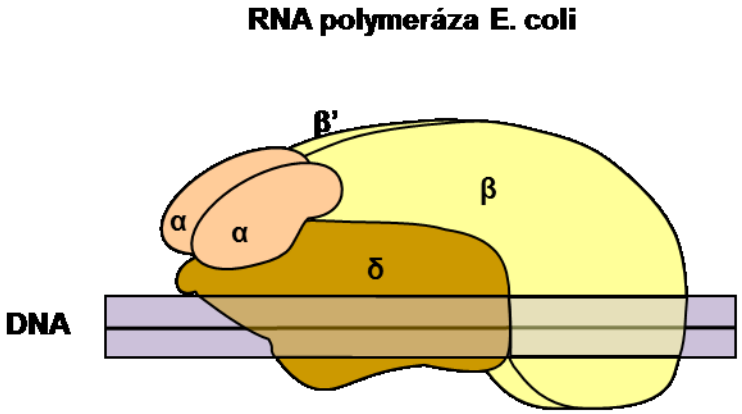
- Cytoplazma: preprotein + signální sekvence uchopeny systémem chaperoninů a pomocných proteinů, dopraveny k vnější mit. mem.
- TOM (Translocase of the Outer Membrane)/TIM (Translocase of the Inner Membrane)
- Vnitřní strana: chaperonin HSP70, odštěpení signální sekvence pomocí proteinázy

Vesmír 2000

Srovnání chloroplastové RNA polymerázy eukaryot a prokaryot



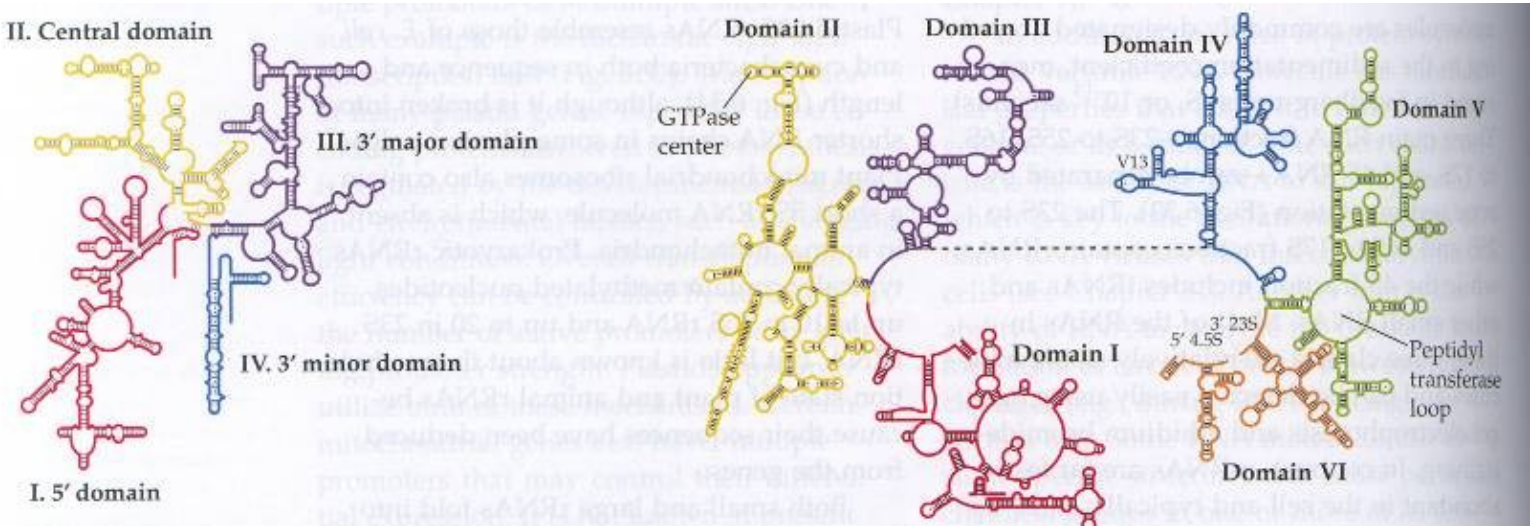




rRNA chloroplastů

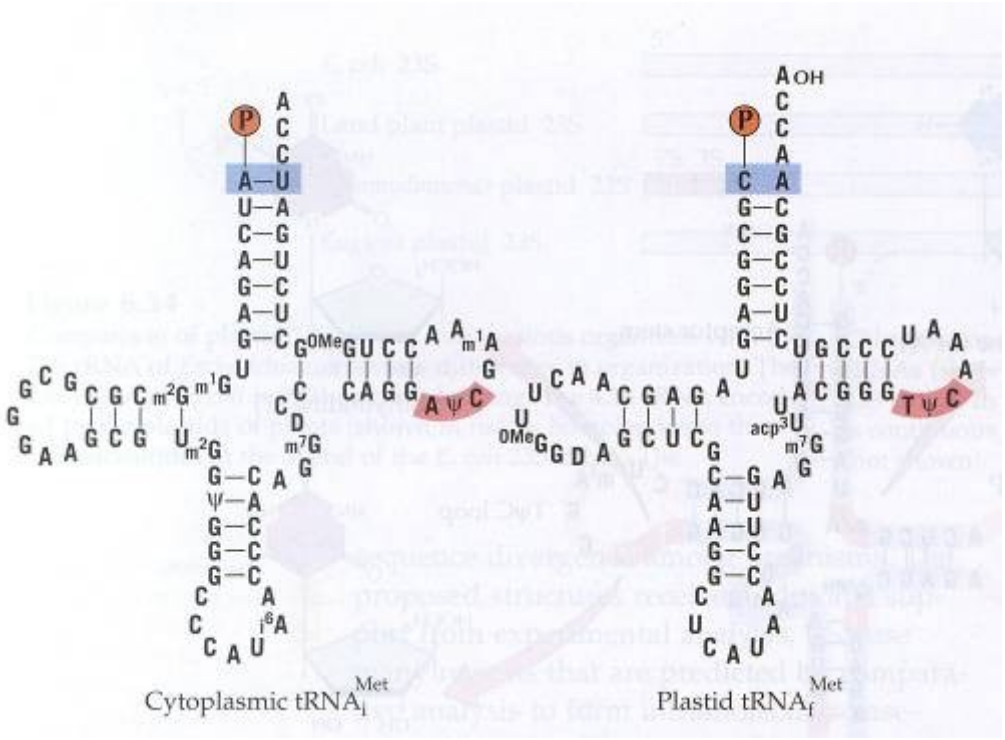
Sekundární struktura rRNA v chloroplastech tabáku

- Menší podjednotka ribozomů
- 16S rRNA se 4 doménami
- Větší podjednotka ribozomů
- 23S a 4,5S rRNA se 6 doménami; doména V je místem pro tRNA k podjednotce 50S

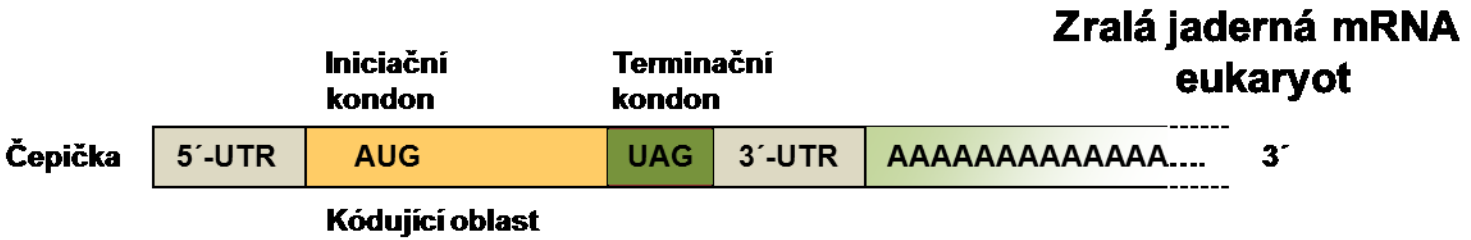


tRNA chloroplastů

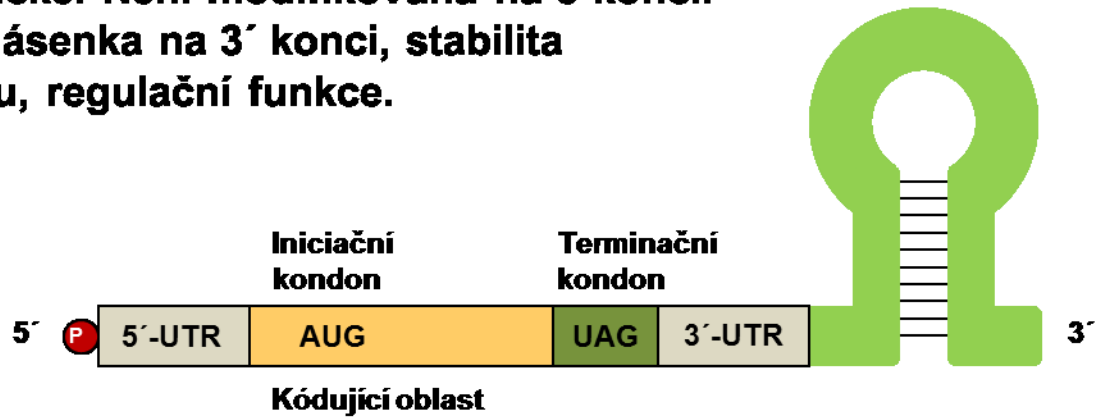
- Cytoplazmatická tRNA^{Met} fazolu
- Chloroplastová tRNA^{Met}



Zralá chloroplastová mRNA



Chloroplastová mRNA je podobná prokaryotické. Není modifikována na 5´konci. Typická vlásenka na 3´ konci, stabilita transkriptu, regulační funkce.



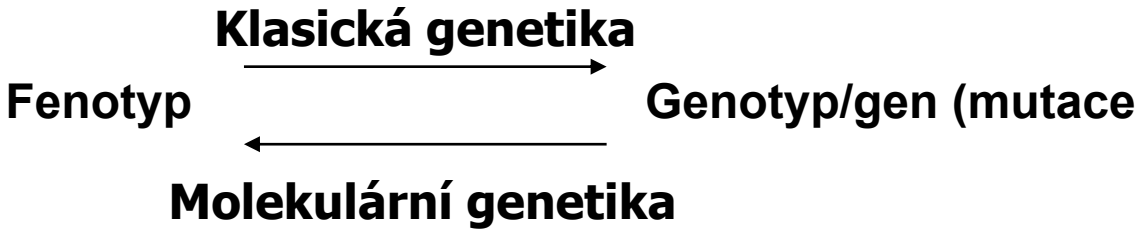
Genomika rostlin

Funkce genů

- **Funkční genomika**
  - Projekt „Arabidopsis 2010 Program“ 2001–2010
  - Plant Physiology, June 2002, Vol. 129, pp. 394-437, www.plantphysiol.org
  - Nástroje studia funkcí rostlinných genů

Nástroje funkční genomiky

Mutageneze

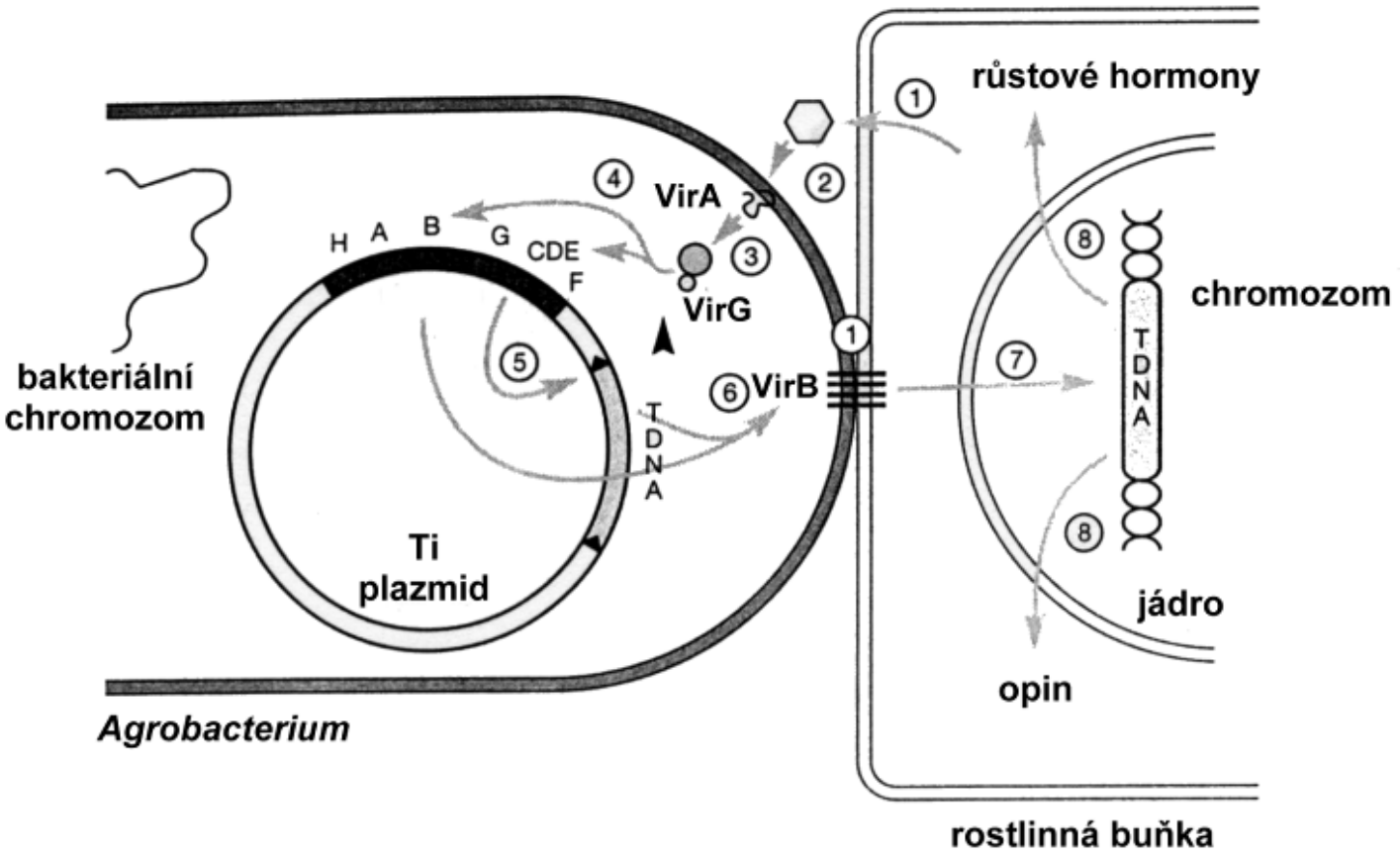


- **Typy mutagenů**
  - chemomutageny
    - přístupy přímé i reverzní genetiky
  - fyzikální mutageny
  - biologické mutageny
    - T-DNA
    - transpozony
    - přístupy reverzní genetiky
    - retroelementy

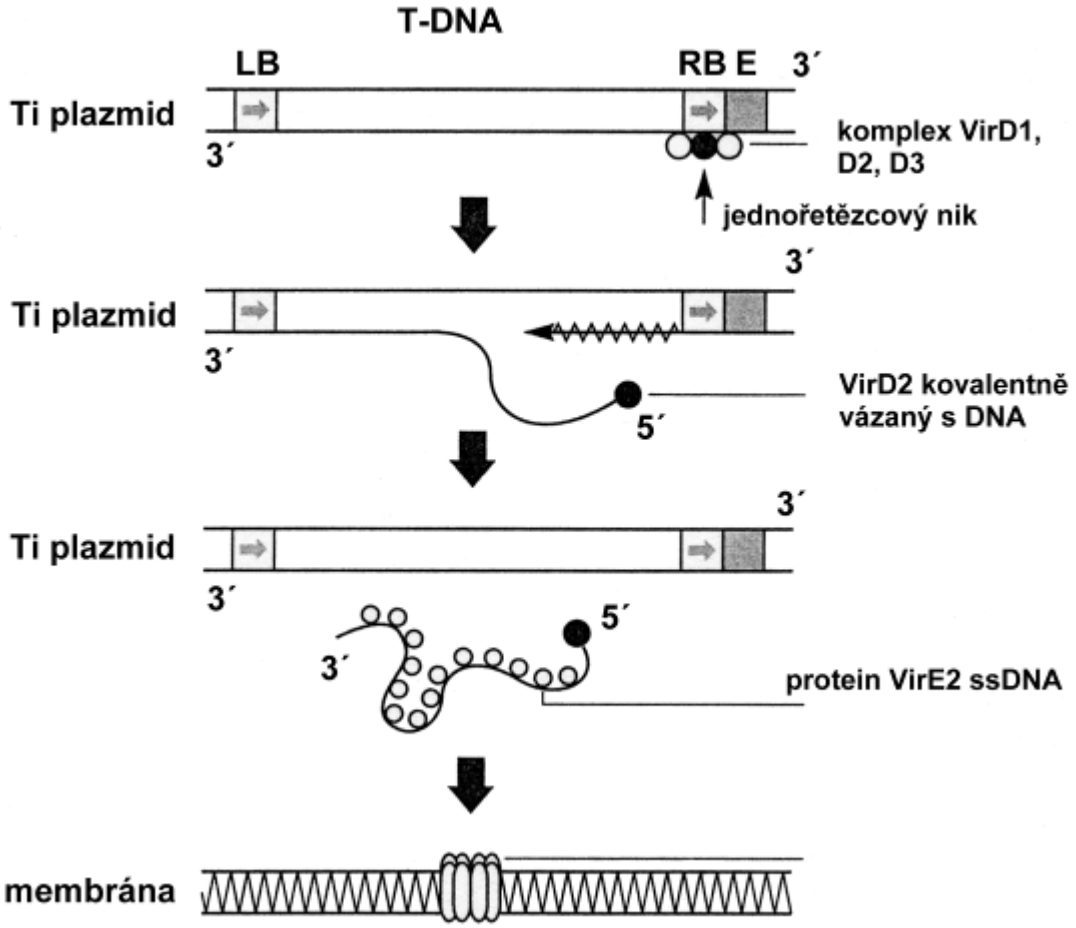
Inzerční mutageneze

T-DNA tagging

- **Infekce rostlinné buňky při transformaci *A. tumefaciens***



Model tvorby jednořetězcové T-DNA
A. tumefaciens



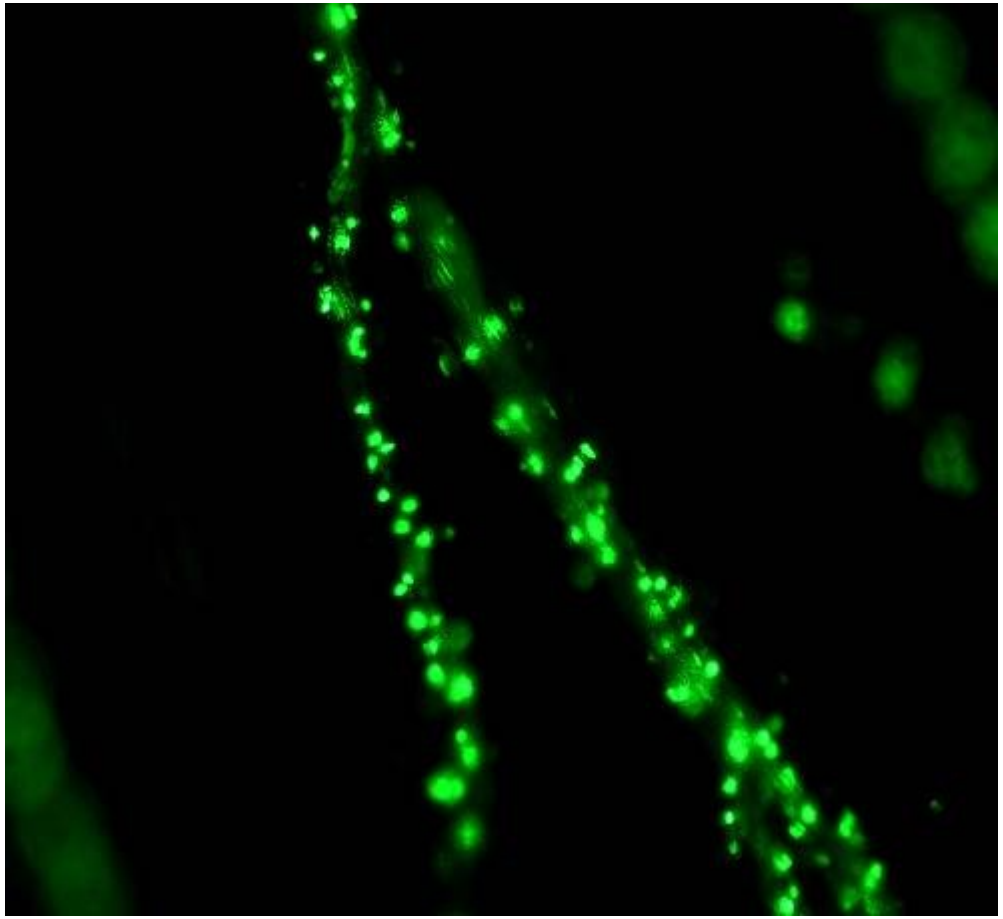
Metody transformace rostlinných pletiv

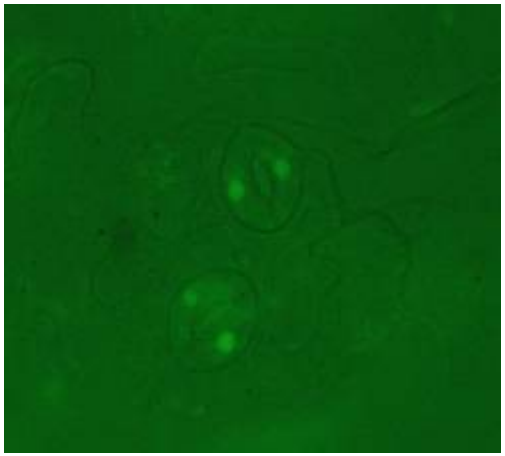
- Semena, embrya, listové disky, kořeny, protoplasty
  vakuová infiltrace
  - *Arabidopsis thaliana*
  - *Medicago truncatula*

Markerové geny

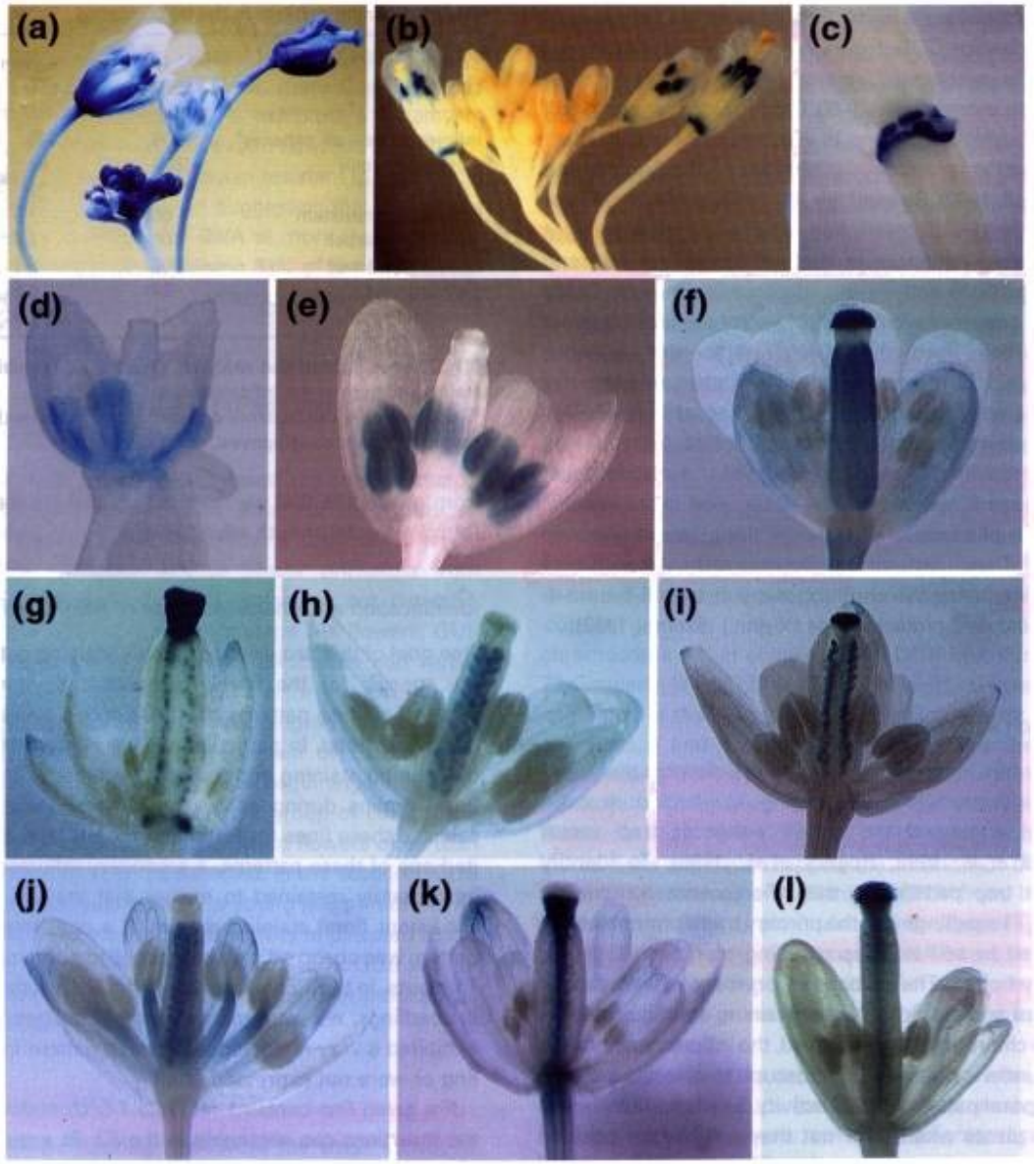
- Selektovatelné
  - *NPT* (*neomycin fosfotransferáza*)
  - *HPT* (*hygromycin fosfotransferáza*)
  - *BAR* (rezistence k herbicidu fosfinotricinu)
- Signální = reportérové
  - *GUS*, *GFP*

Exprese GFP



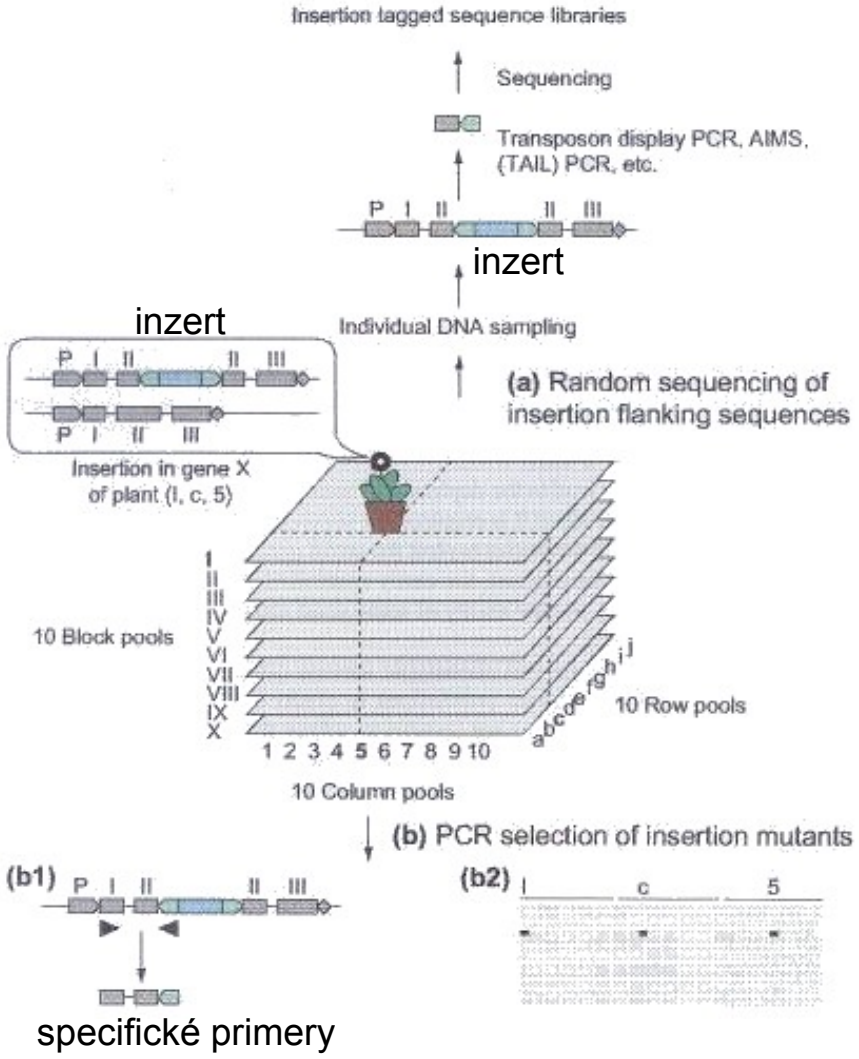


Funkce genu GUS



GENETIKA ROSTLIN

Identifikace inzerčních míst přístupem reverzní genetiky

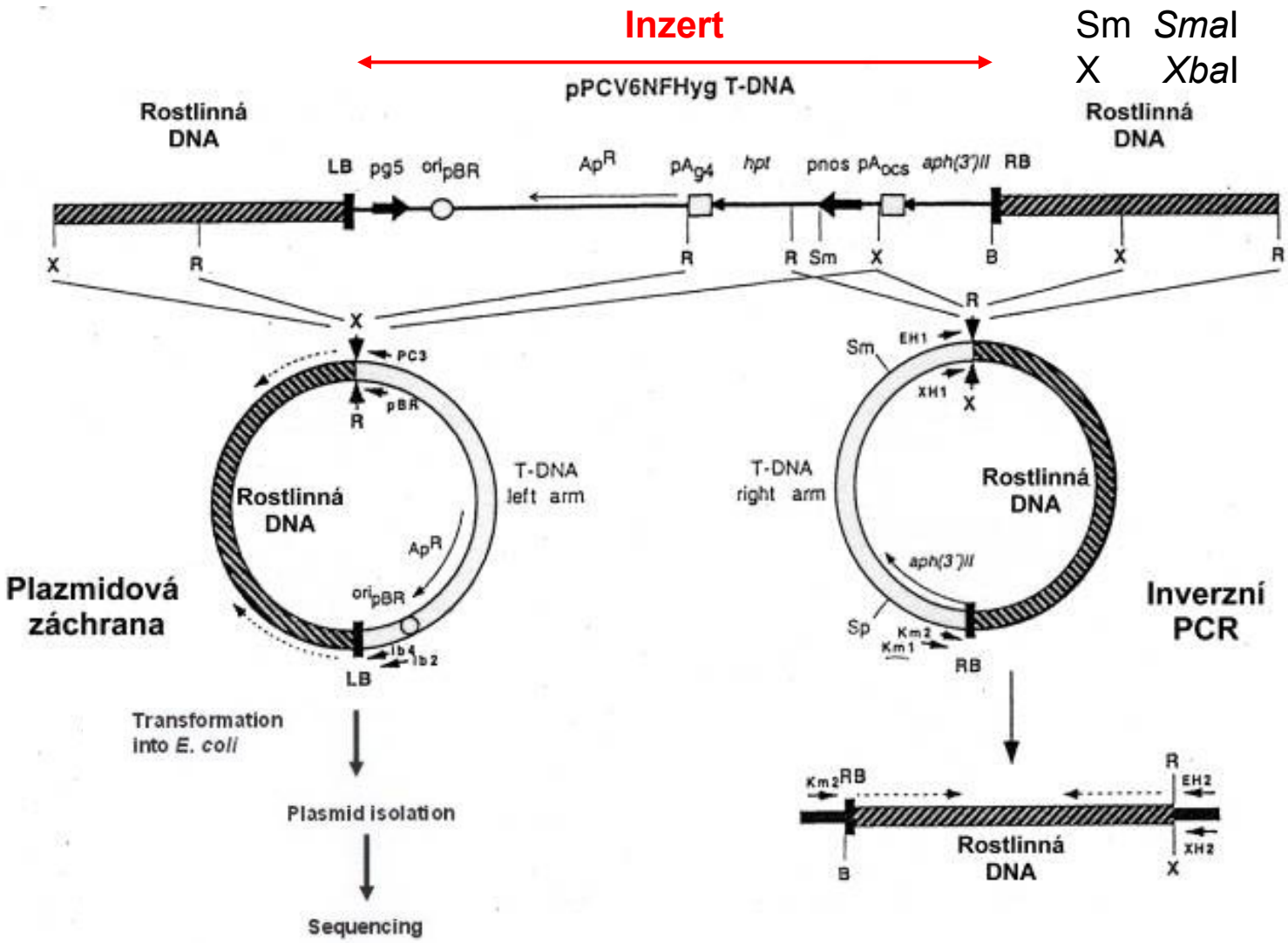


1. Inzerční mutageneze
2. Organizace rostlin
3. Izolace DNA
4. Specifická PCR
5. Inzerce v genu X rostliny I, c, 5
6. Klonování genu

Ad 6) Izolace rostlinného genu

Zkratky restriktáz

R *Eco*RI
Sm *Sma*I
X *Xba*I



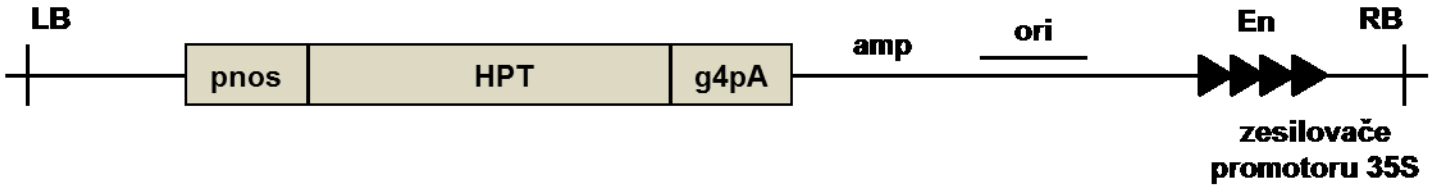
Využití T-DNA mutageneze

Vektory

Nespecializovaný vektor

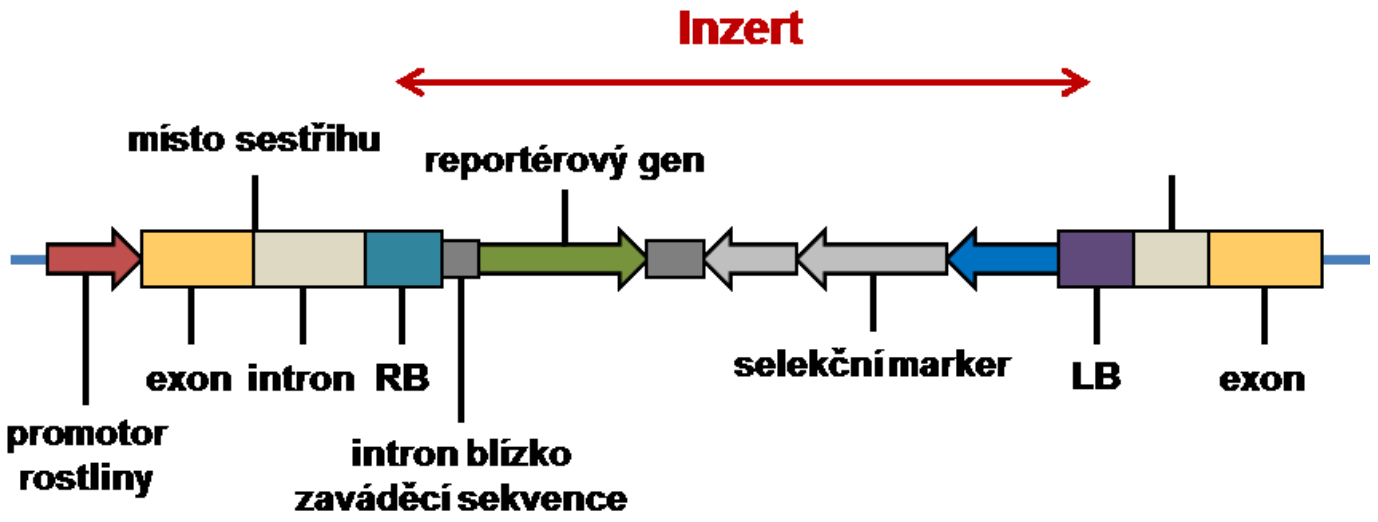
Specializovaný vektor – pasivní

Specializovaný vektor – aktivní



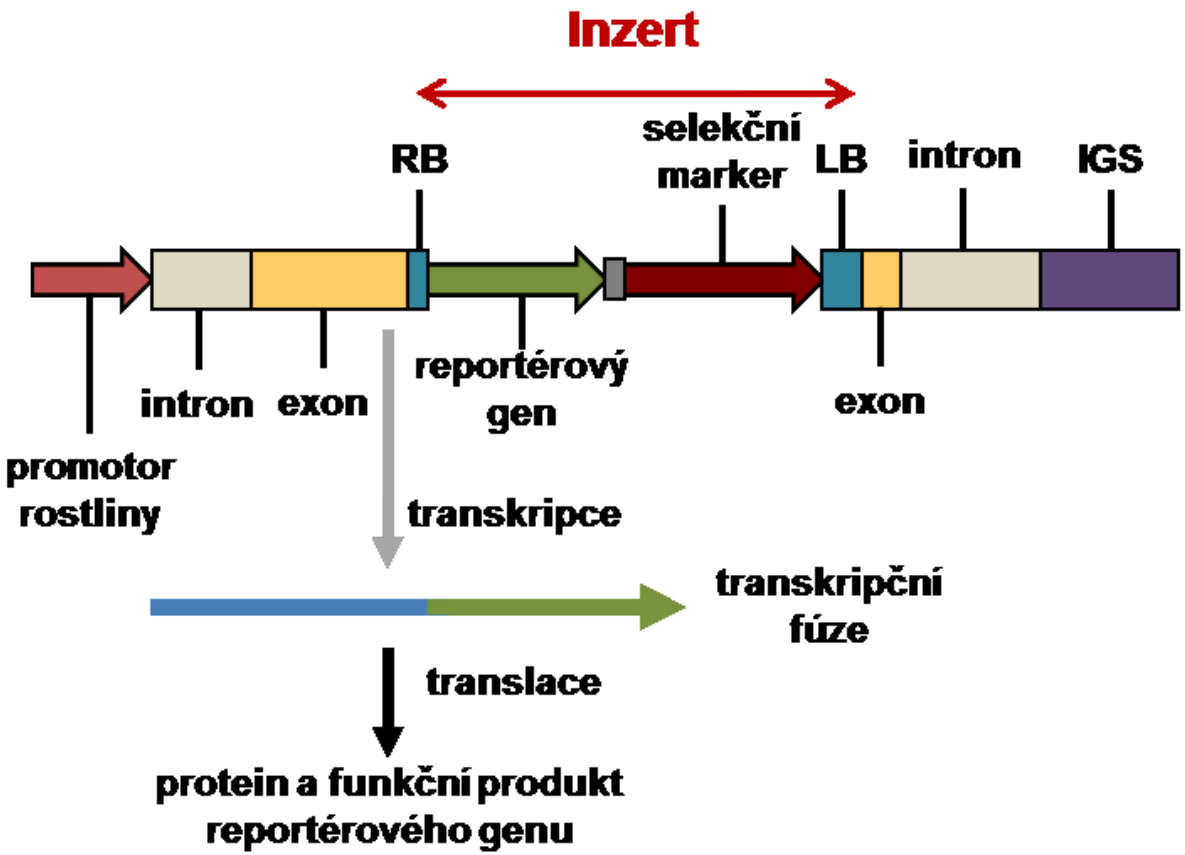
Specializované vektory

Past na geny



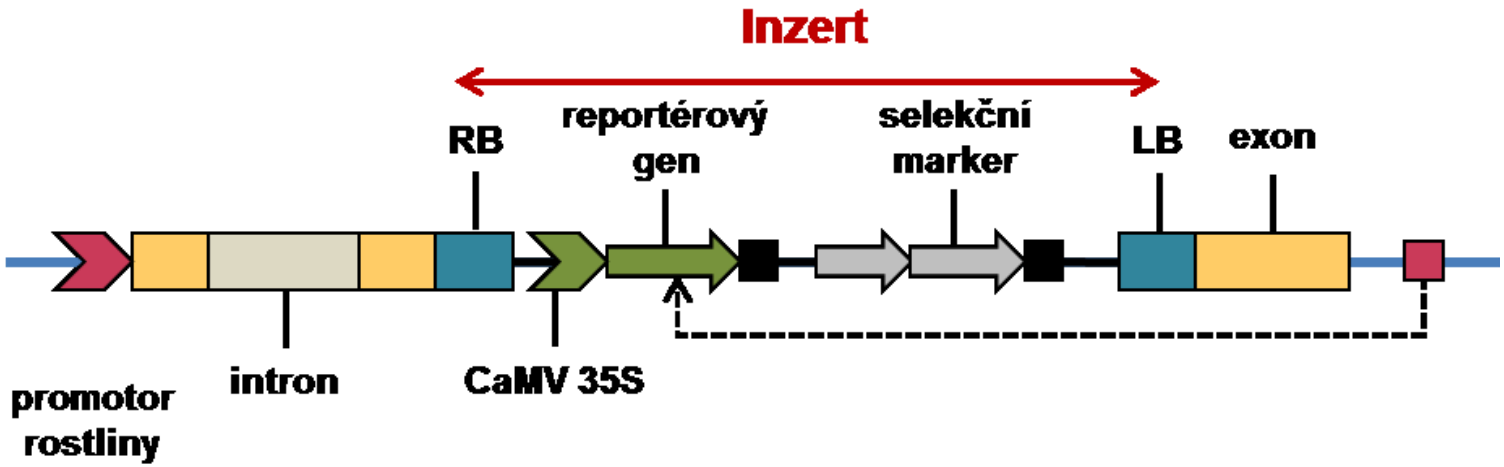
Specializované vektory

Past na regulační sekvence – promotor



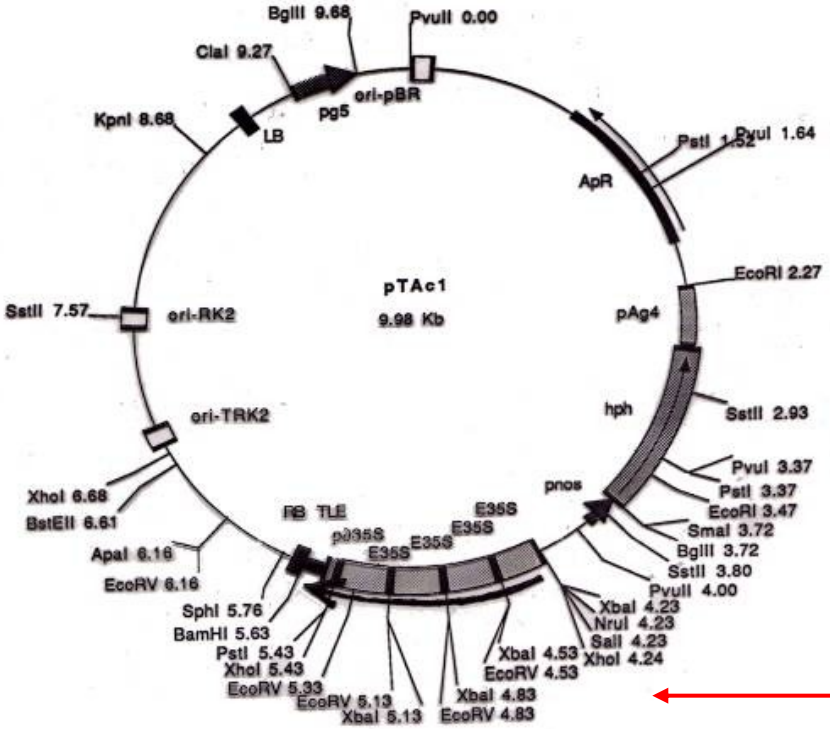
Specializované vektory

Past na regulační sekvence – zesilovač

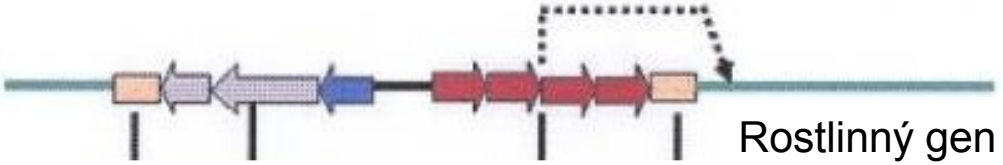


Specializovaný vektor

Aktivační vektor pPCV6NFHyg



Inzert



Rostlinný gen

RB Selekční marker Zesilovač LB

Výsledky inzerční mutageneze

Modelové druhy

- *Arabidopsis* – velké kolekce inz. mutací od 90. let
  - SALK: asi 150 tis. T-DNA linií (ekotyp Columbia)
  - GABI: 60 tis. (ekotyp Columbia)
  - Feldmann: 4,9 tis. (ekotyp Wassilevskaja)
  - Semenná banka ABRC: 175 tis. (ekotyp Columbia)
- Teoreticky **180 tisíc nezávislých inzercí** s 95% pravděpodobností detekce určité specifické inaktivované alely genu o velikosti 2,1 kb.
- Redundance genů v genomu
- Mutace letální, nebo vedou ke sterilitě v homozygotní konstituci. Proto je tato pravděpodobnost jen 80%. Doposud nebylo asi **2000 genů zasaženo žádnou inzercí**.

Izolace genů a jejich funkční charakterizace

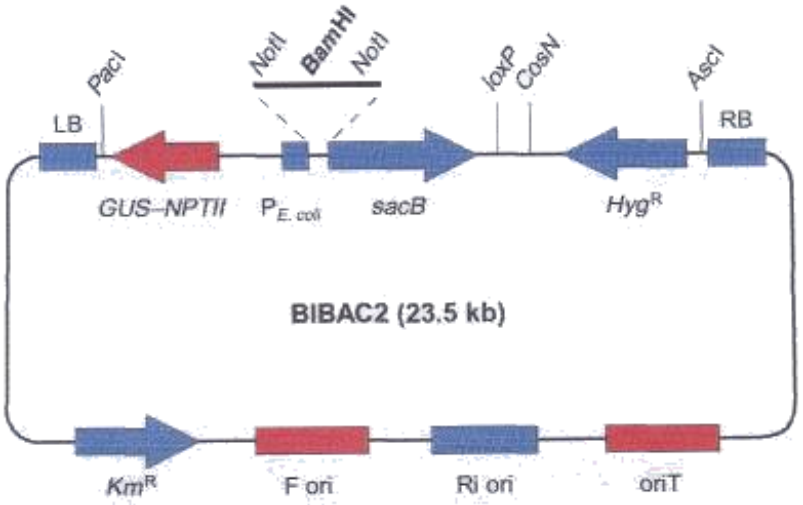
Přímá genetika – několik desítek genů

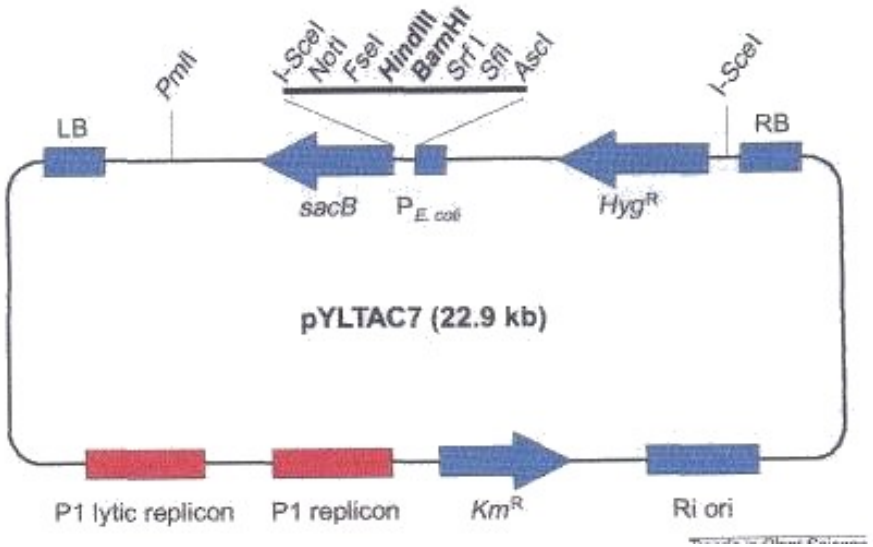
- *Gl1* vývoj trichomů 1989
- *Gi* signály fytochromů 2000
- *Dfl1* kontrola auxinů

Reverzní genetika – hlavní podíl identifikovaných genů

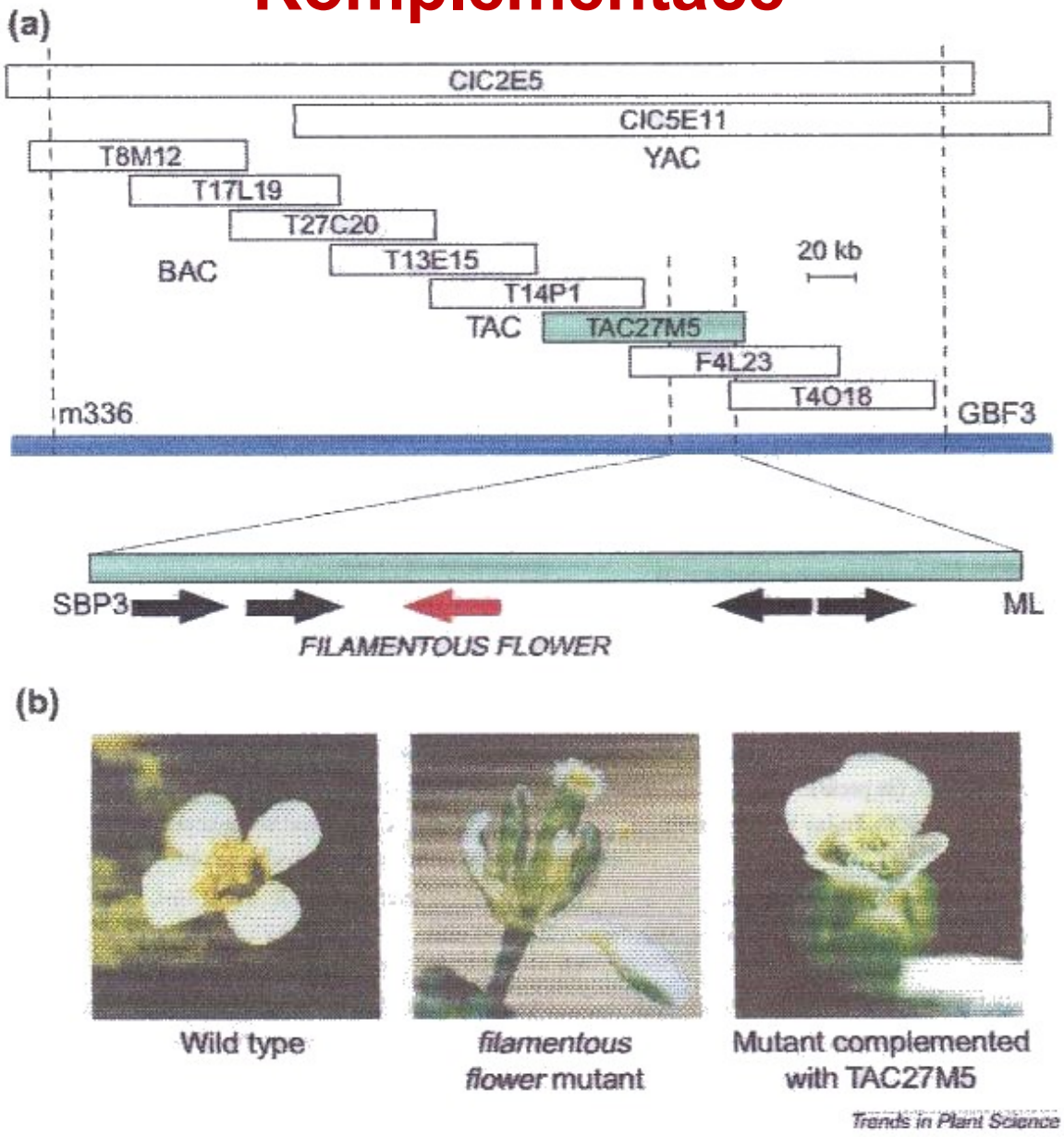
- Genová rodina *ACTIN* celkem 63 genů
- Aktivační tagging - asi 20 genů

Speciální typy vektorů





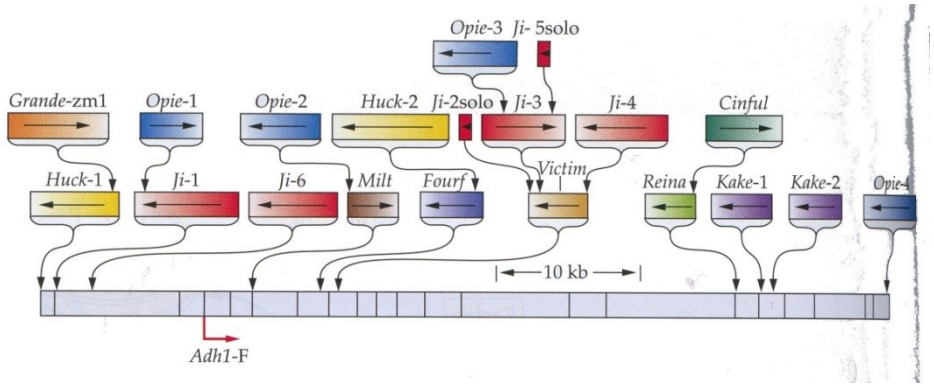
Komplementace



Kulturní duhy

Kukuřice

- čtyři rodiny retrotranspozonů: *Huck*, *Ji*, *Opie* a *Zeon*.



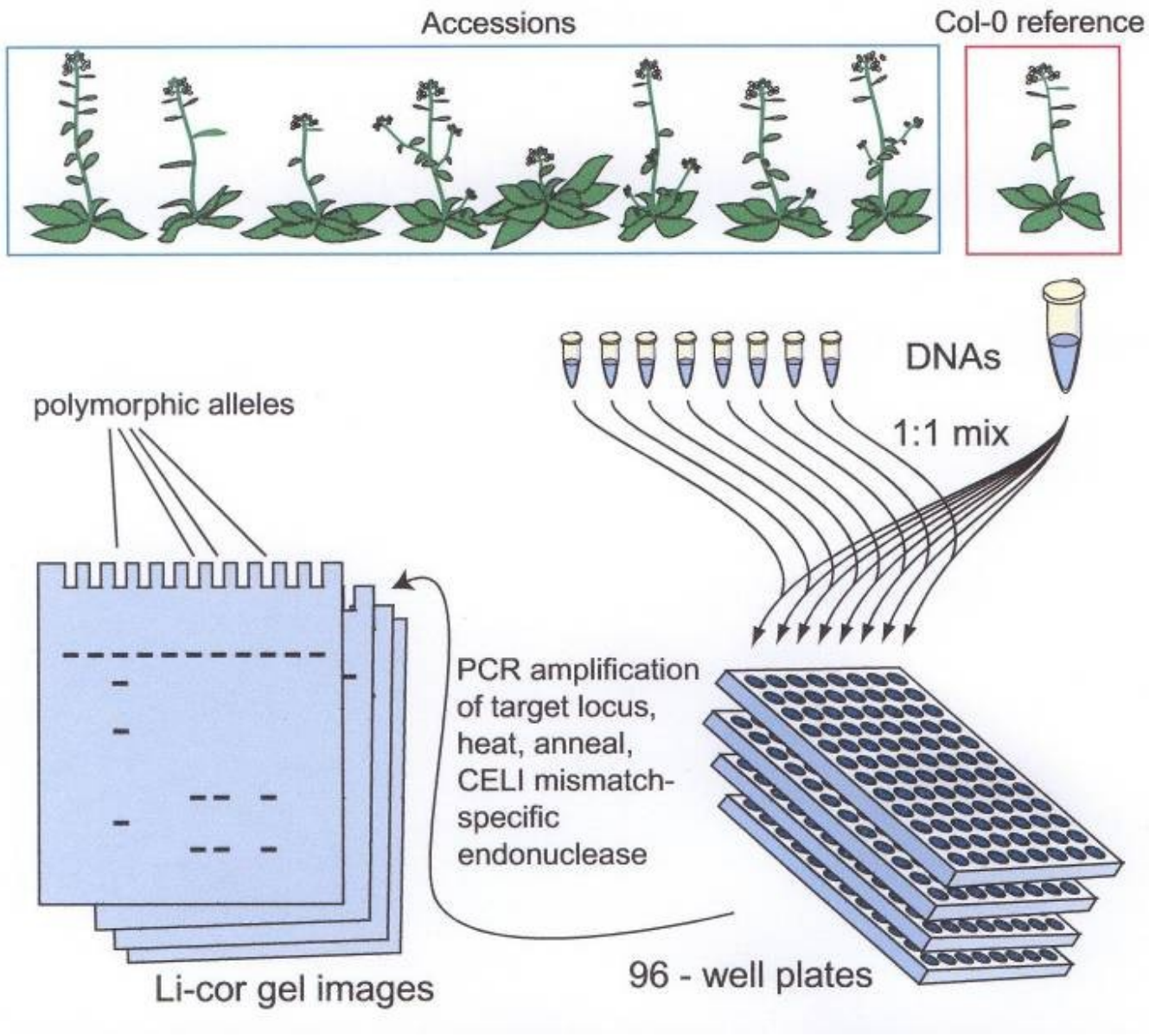
- **Transpozony** – *Ac*/*Ds*, *Mu* více než 100 kopií – kolekce inz. linií (45 tis.)
- Izolace genů
- 1. gen *bronze* – pro klíčový enzym syntézy antokyanů
- *An1*, *Zag1* – vývoj květů

Rýže

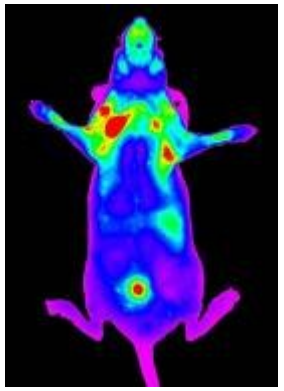
- Transpozony *Ac/Ds* kukuřice
- T-DNA 20 tis. linií, 25 tis. inzercí v genech
- Retrotranspozony
  - *Tourist*, *Stowaway*, *Gaijin*, *Tos17*

Klasická mutageneze – chemomutageny

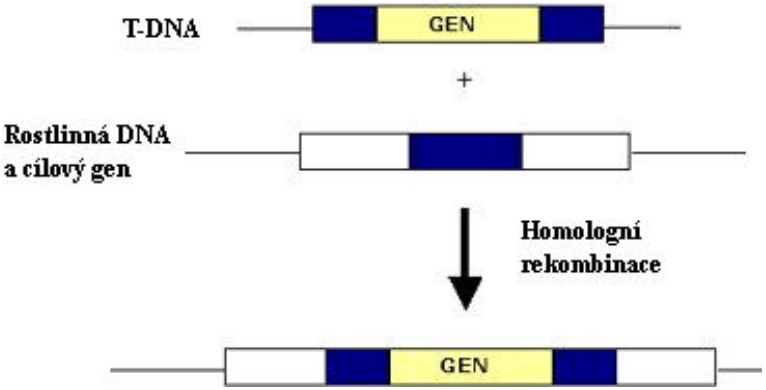
- **TILLING** (*Targeting Induced Local Lesions in Genome*)
- **Detekce bodových mutací**
- **Detekce konkrétních genů**
- **Metodický přístup reverzní genetiky**
- **Detekce polymorfizmů v přírodních populacích (ekotilling)**
- ***Arabidopsis thaliana*, kulturní plodiny (ječmen)**

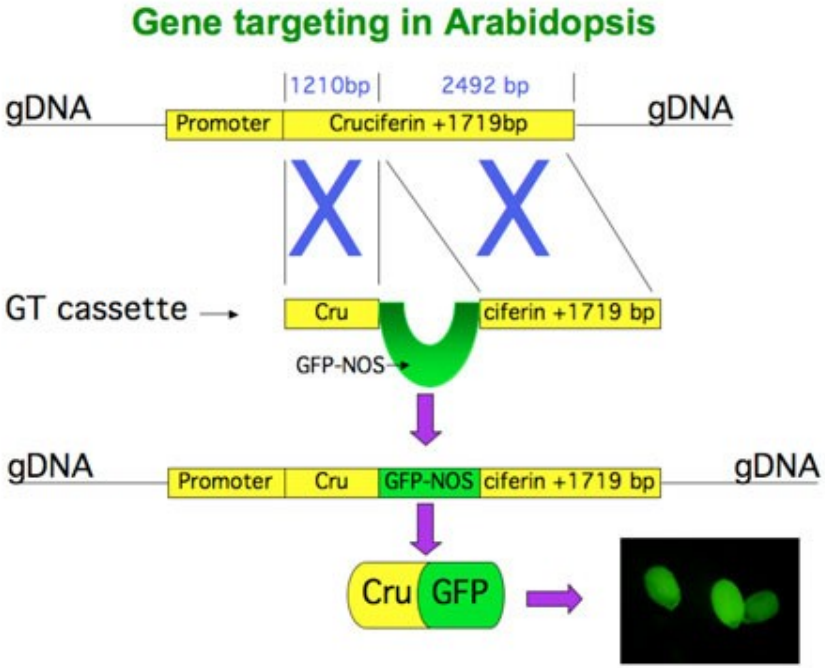

Accessions
Col-0 reference
DNAs
1:1 mix
polymorphic alleles
PCR amplification of target locus, heat, anneal, CELI mismatch-specific endonuclease
Li-cor gel images
96 - well plates

Další metody identifikace funkcí rostlinných genů



- Homologní rekombinace „*Gene targeting*“
- U rostlin se využívá v menším rozsahu

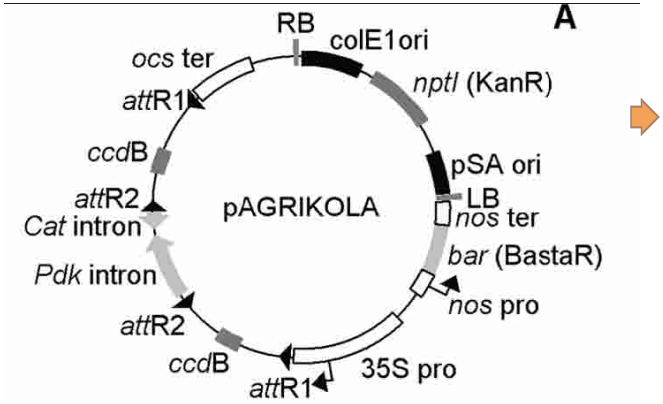




Techniky založené na umlčování specifických genů

- **Především RNA interference**

- *A. thaliana* – Projekt AGRIKOLA
  - *Arabidopsis*
  - Genomic
  - RNA Interference
  - Knock-Out
  - Line Analysis



- Tvorba 20 tisíc RNAi konstruktů
- Z kolekce 21 120 GST (Gene Specific Tag) Arabidopsis

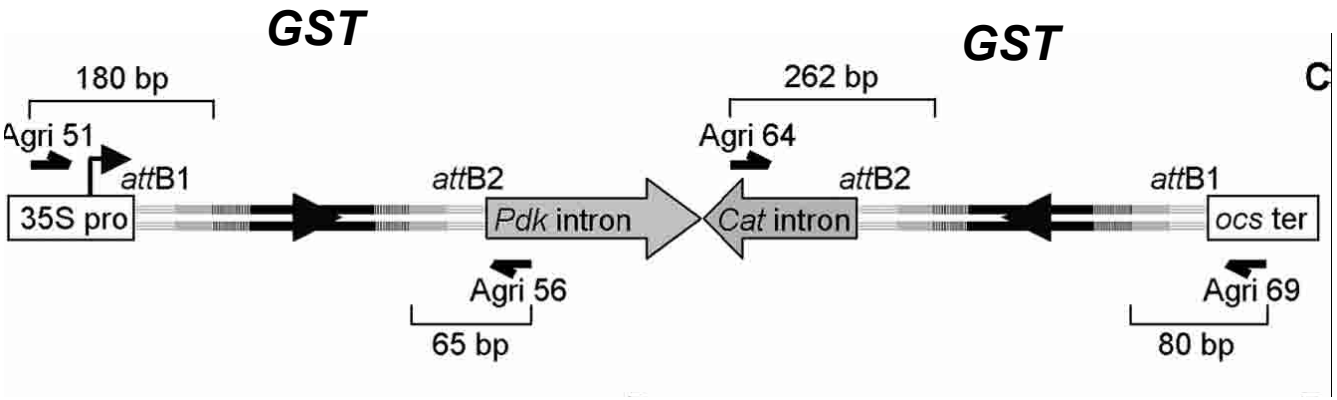
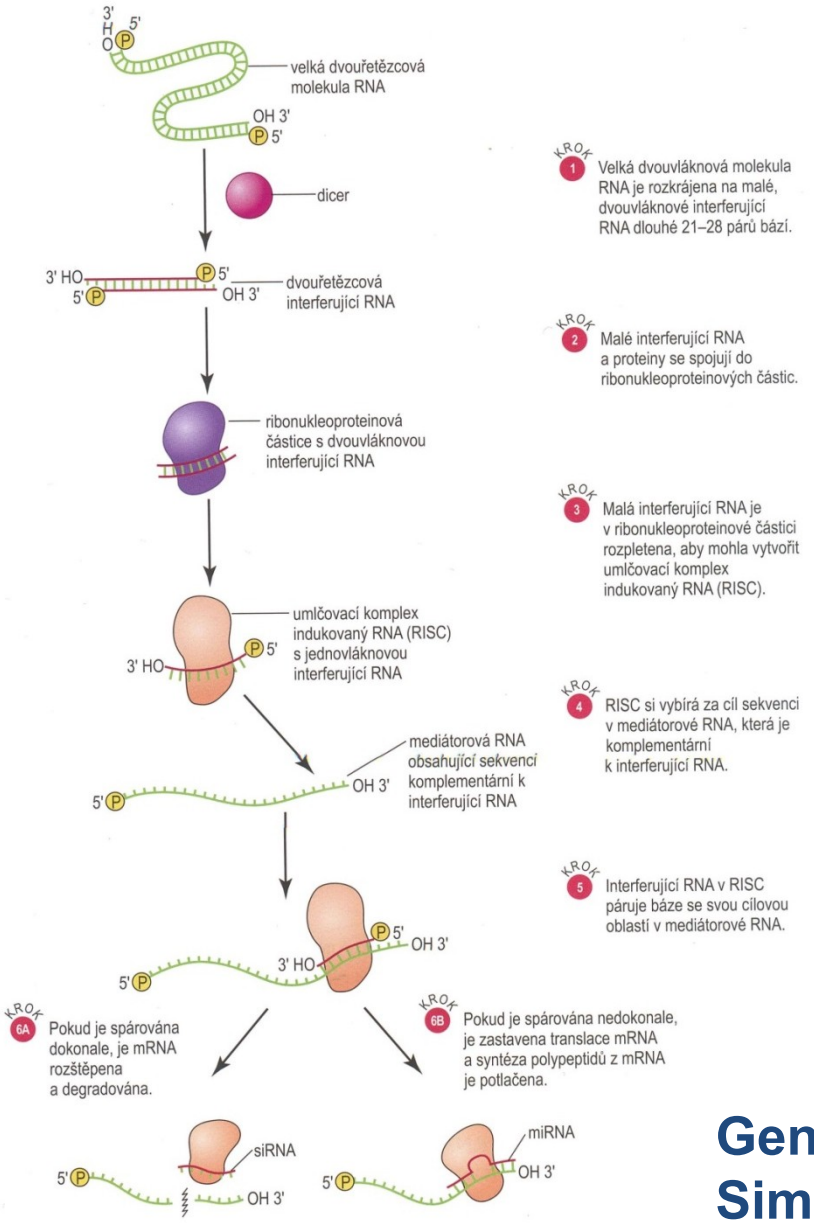
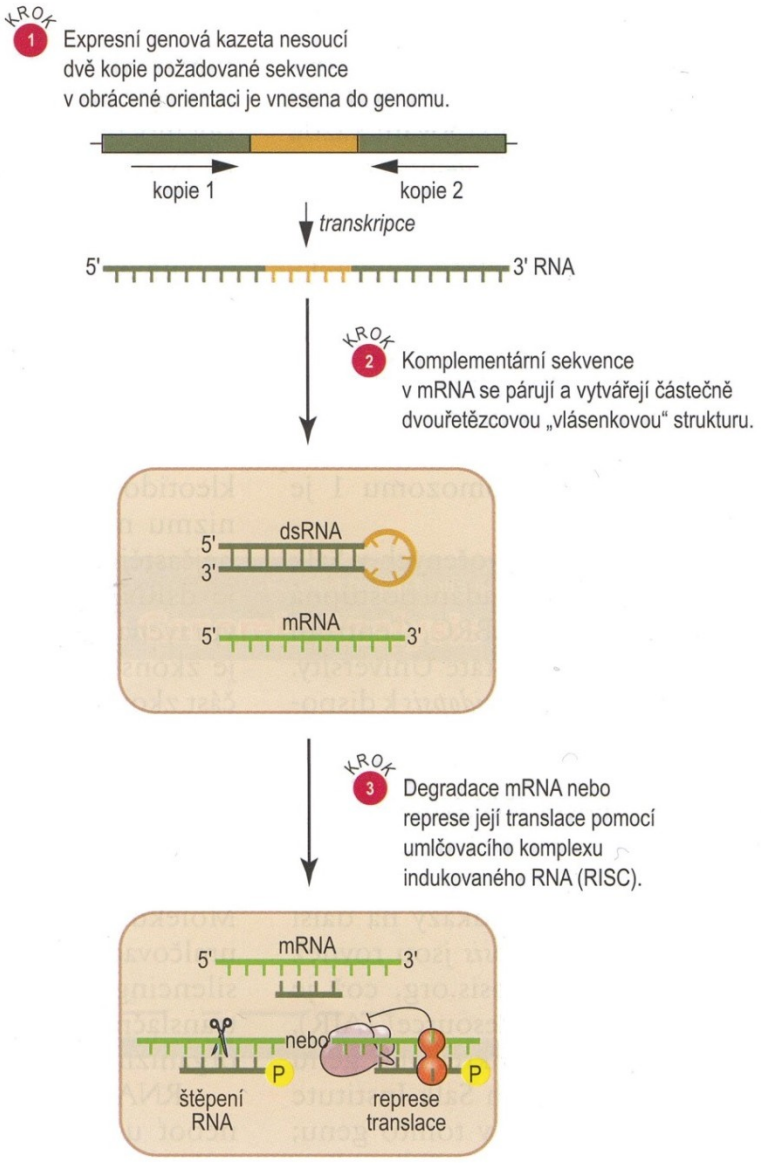


Schéma RNA interference



Genetika: Snustad, Simmons, Kap. 20

zahájení RNAi vnesením transgenu kódujícího komplementární RNA

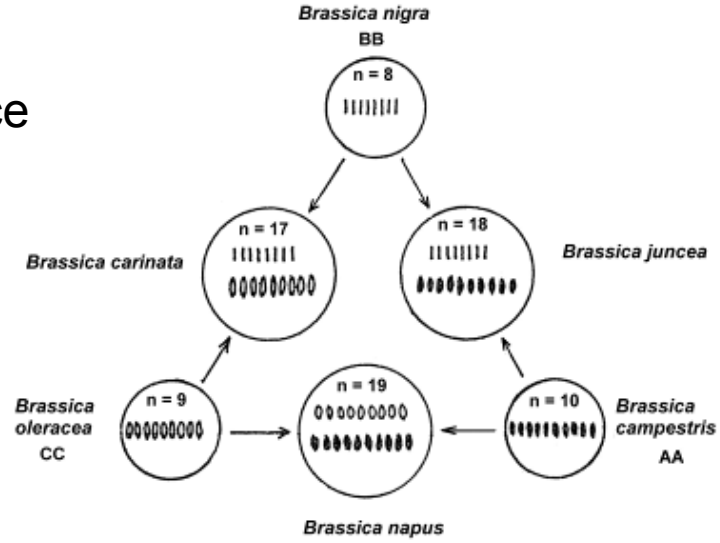


(b)

Genomika rostlin

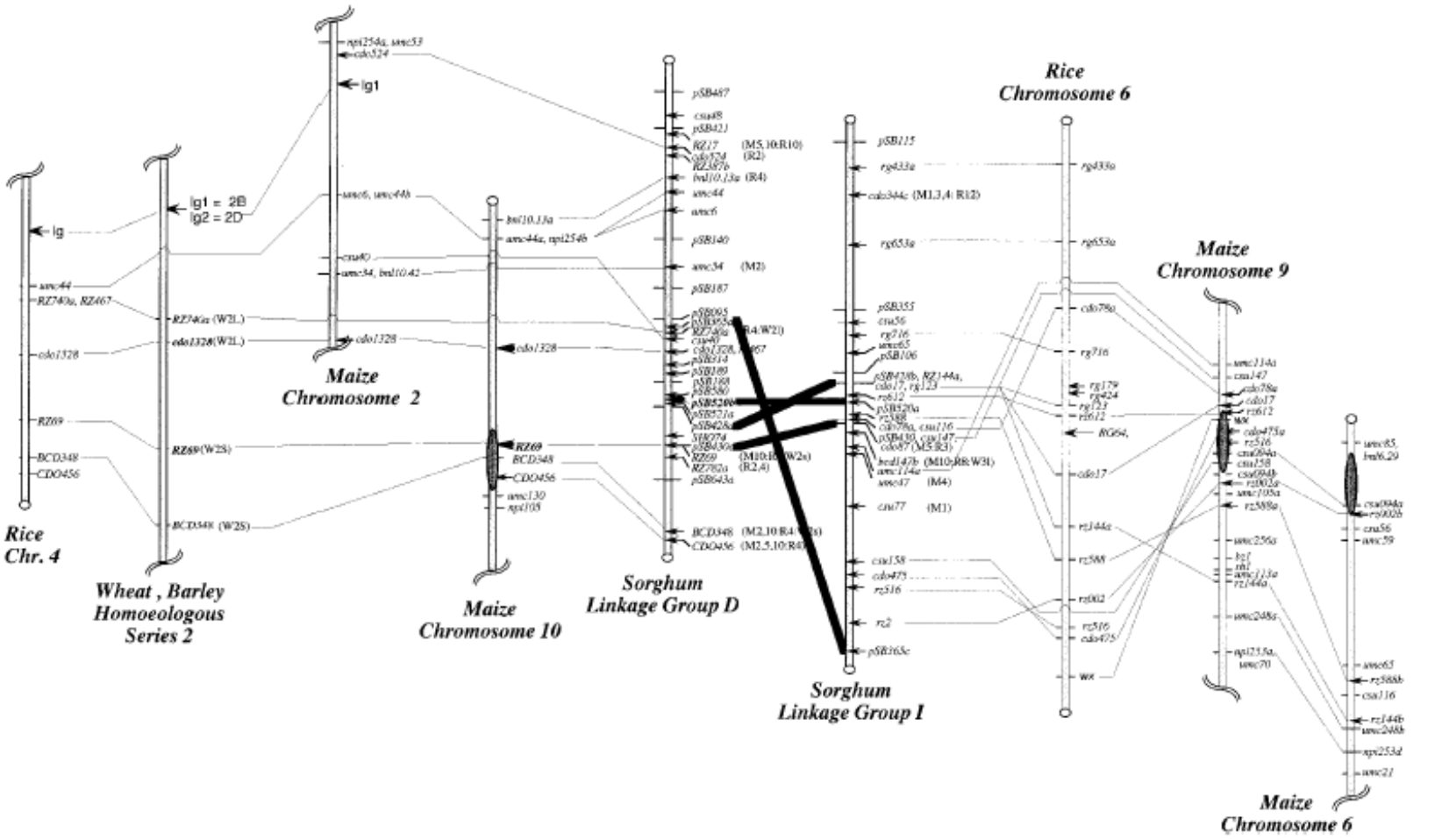
Srovnávání genomů

- **Srovnávací genomika:**
  - *Brassicaceae*:
    - *Arabidopsis*
      - *Brassica oleracea* 57%
      - *Capsella rubella* 85%
  - *Solanaceae*:
    - rajče – brambor, také tabák, paprika
  - *Poaceae*:
    - rýže – ječmen, pšenice, kukuřice
  - *Fabaceae*
  - *Malvaceae*



GENETIKA ROSTLIN

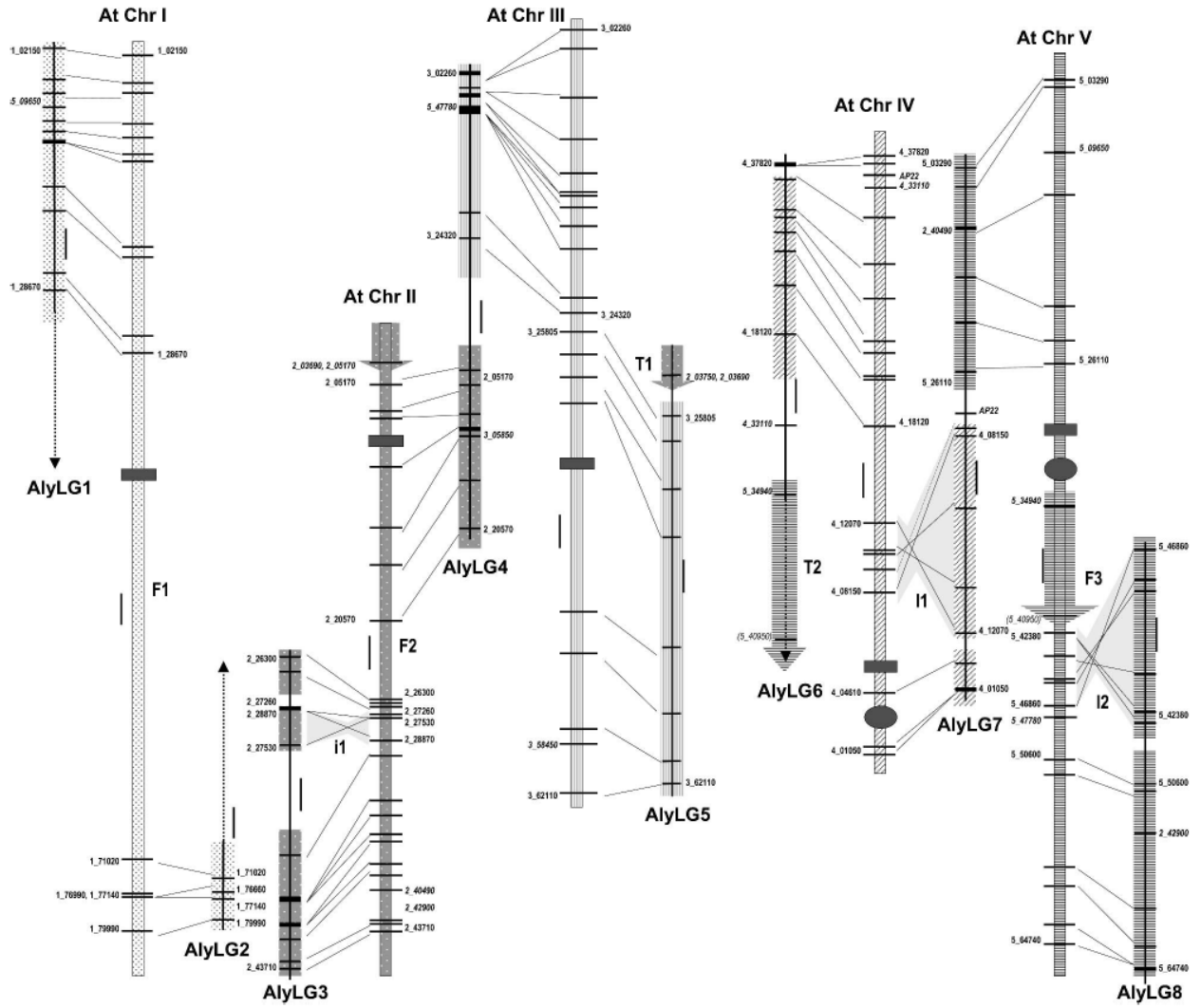
Genomy rostlin se podobají



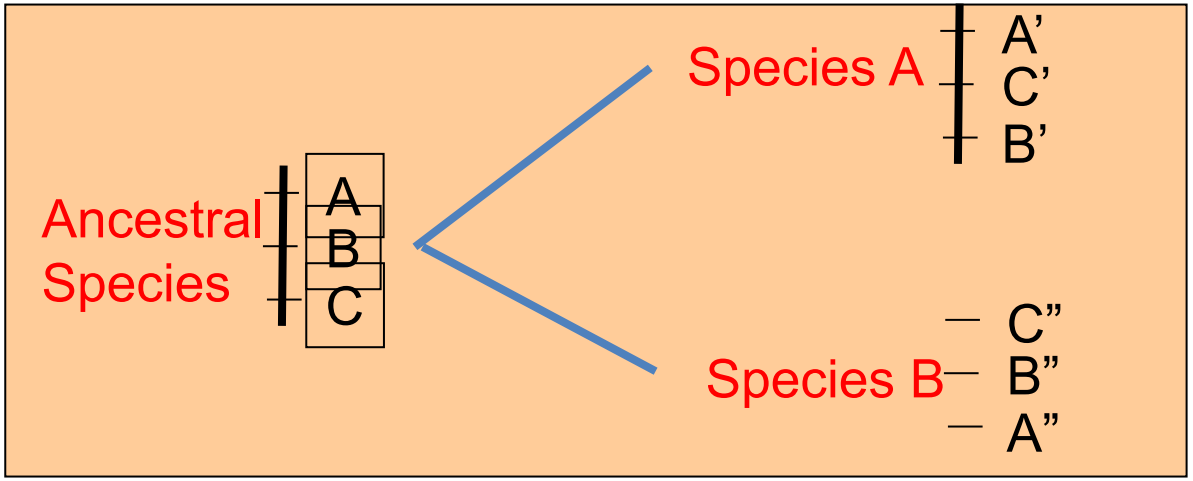
Paterson et al., Plant Cell 12: 1523–1539, 2000

GENETIKA ROSTLIN

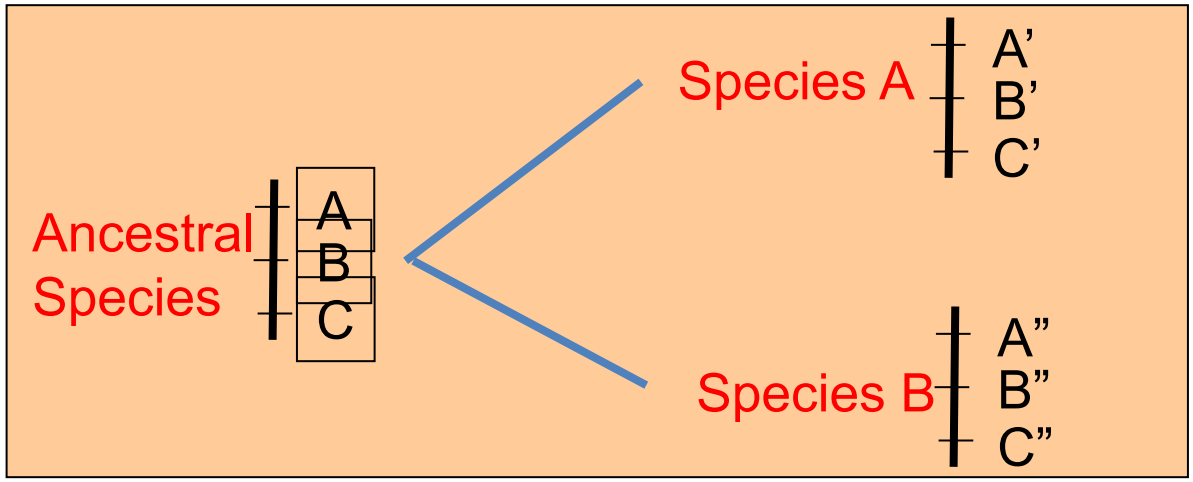
Kolineární oblasti genomů *Arabidopsis thaliana* a *A. lyrata*



Syntenie = přítomnost orthologních lokusů u dvou druhů na stejném chromozomu

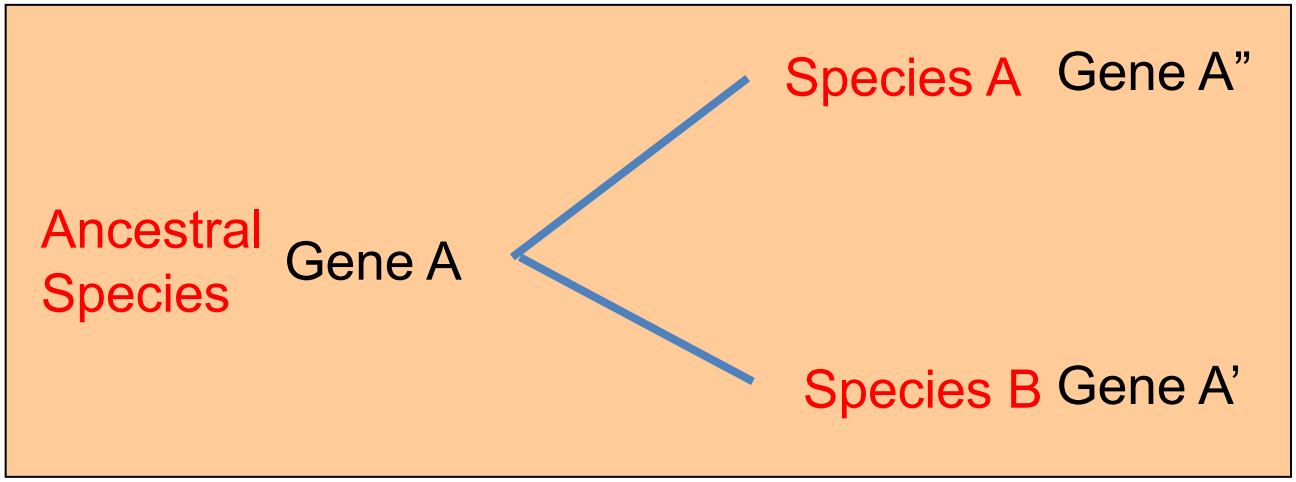


Kolinearita = skupina lokusů je u dvou druhů přítomna ve stejném pořadí

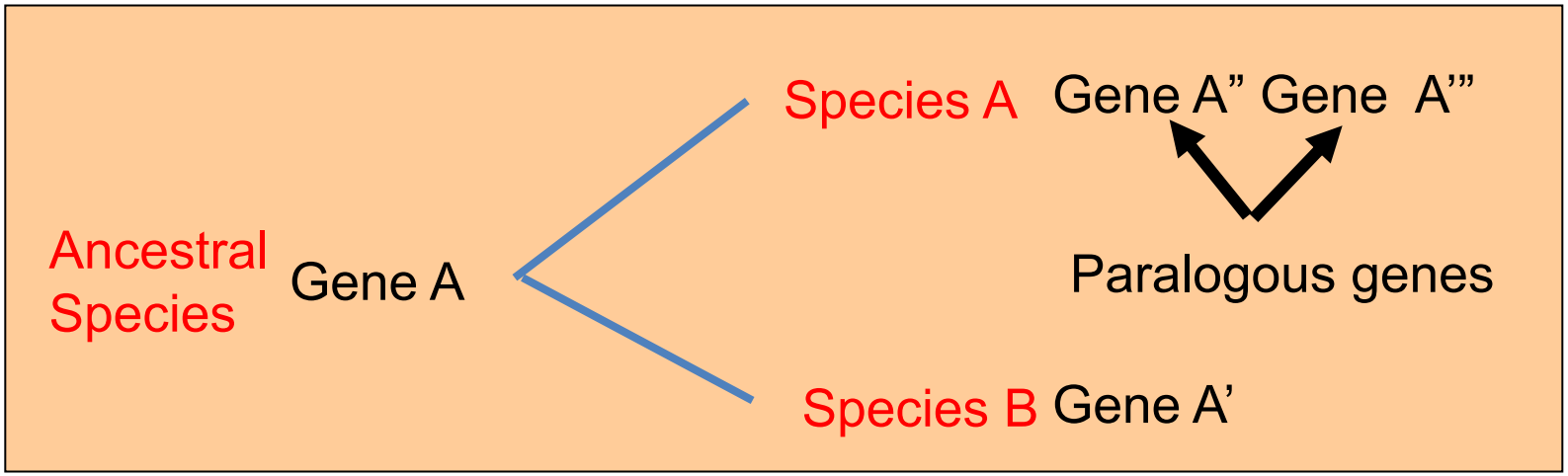


Orthology vs. paralogy

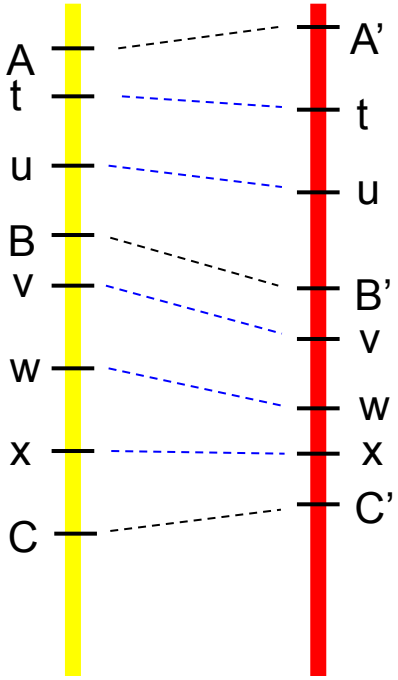
Orthologní geny = geny u různých organismů, které jsou přímými potomky genu přítomného u společného předka těchto organismů



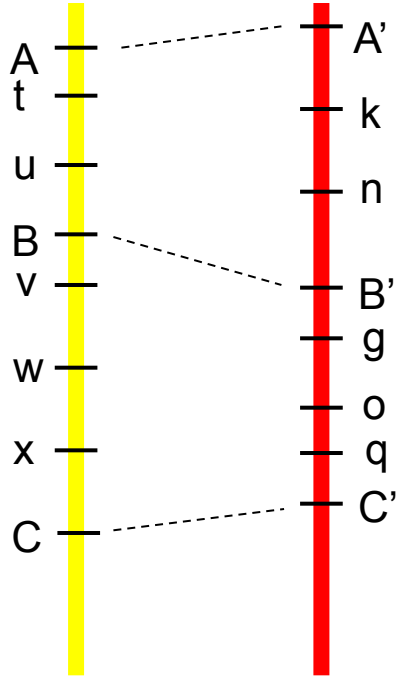
Paralogní geny = geny, které se duplikovali u daného druhu



Makrosyntenie vs. microsyntenie

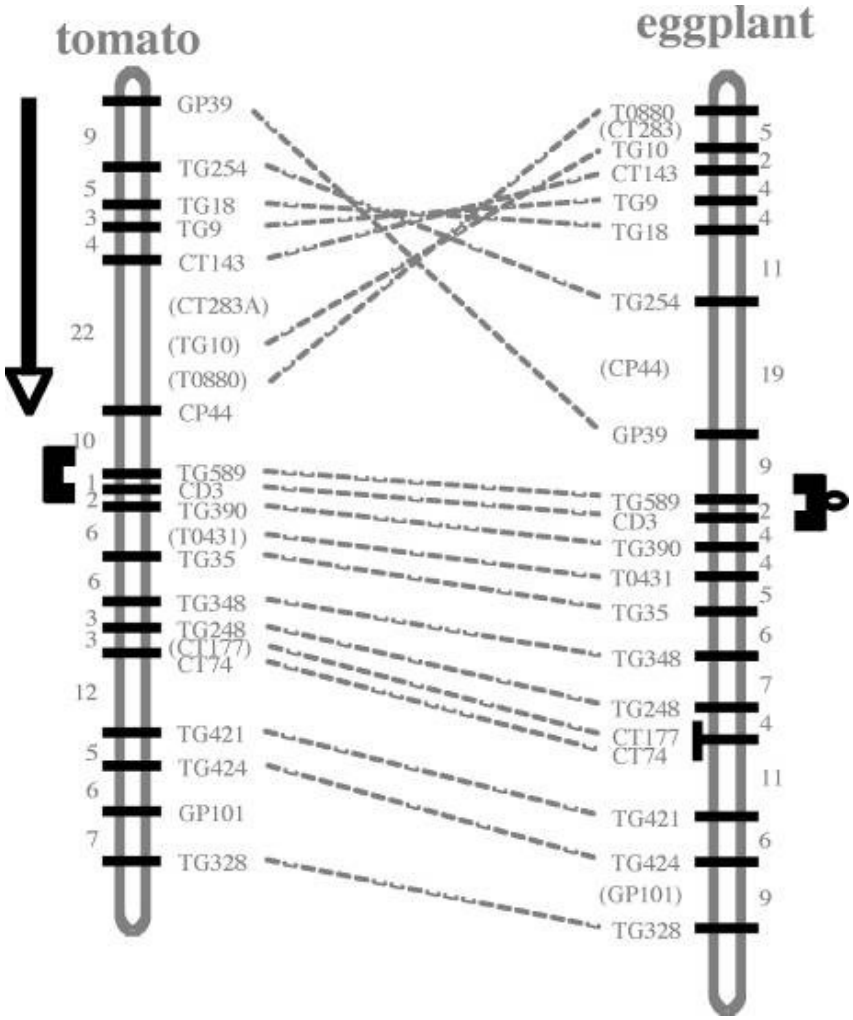


- **Vlevo:**
  - nejen geny A, B, C syntenní,
  - mikrosyntenie
- **Vpravo:**
  - pouze geny A, B, C syntenní
  - mikrosyntenie není



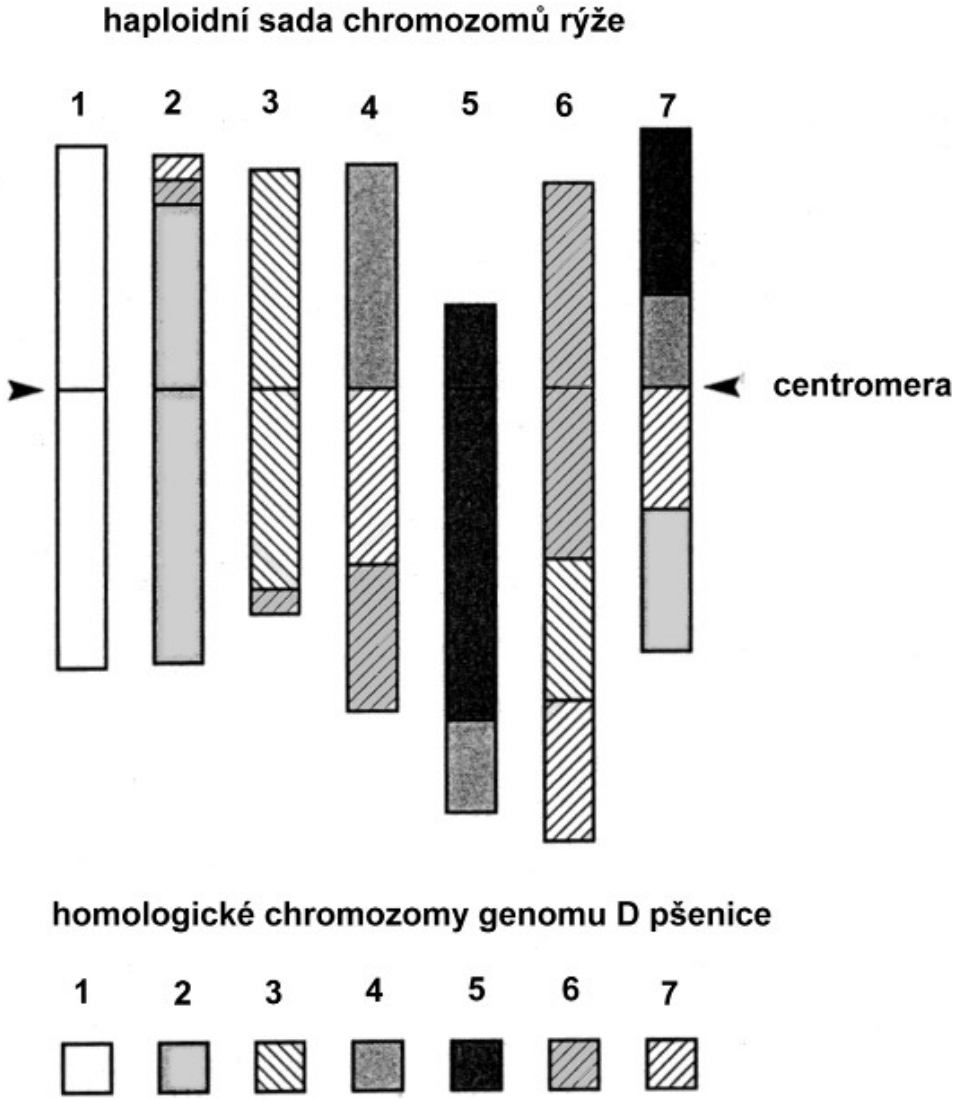
- **Makrosyntenie** (daná společným původem), **makrokolinearita**
  - konzervativní uspořádání genů v určité oblasti chromozomu v rozsahu mnoha Mb, geny A, B, C
  - může být maskována výraznými lokálními změnami v pořadí i zastoupení genů (**mikrosyntenie** není detekována), **mikrokolinearita**

Porovnání genetické mapy rajčete a lilku



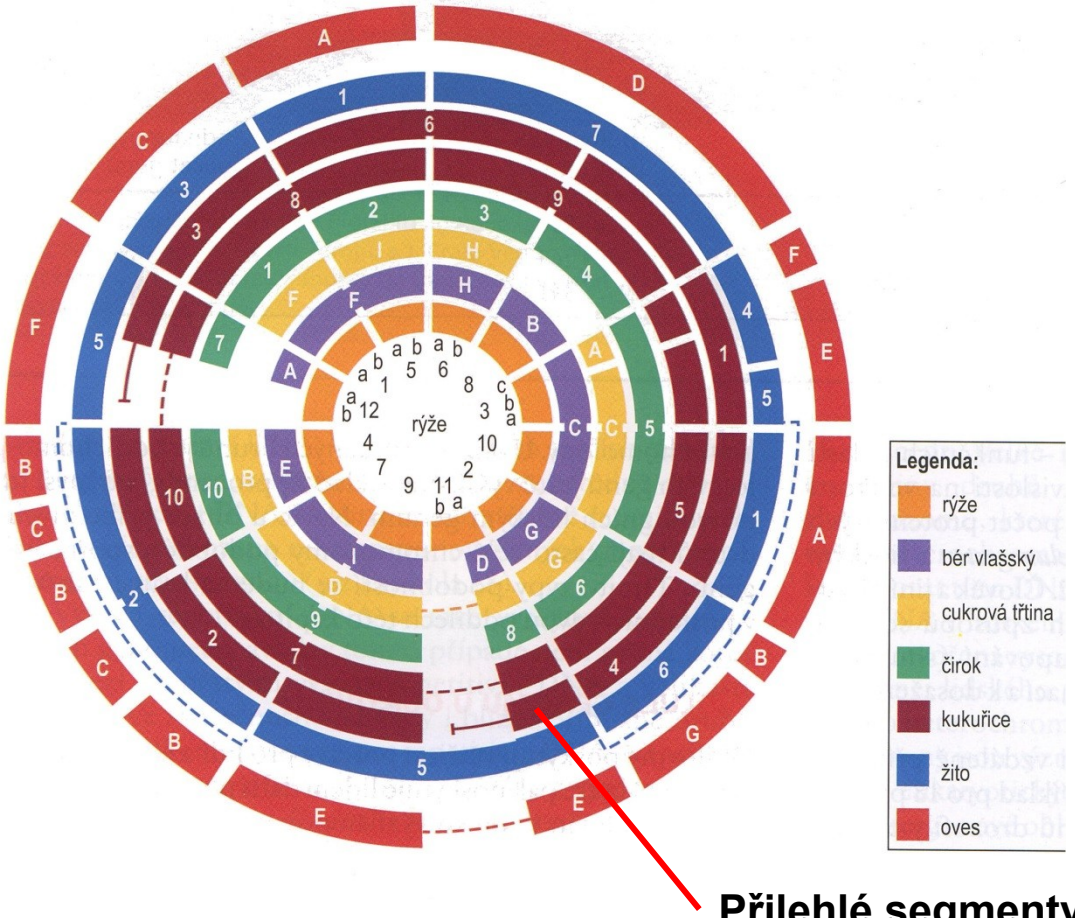
- Syntenní mapy rajčete a bramboru se liší 5 paracentrickými inverzemi

Srovnávací genomika - obiloviny



Srovnávací mapa genomů 7 obilovin

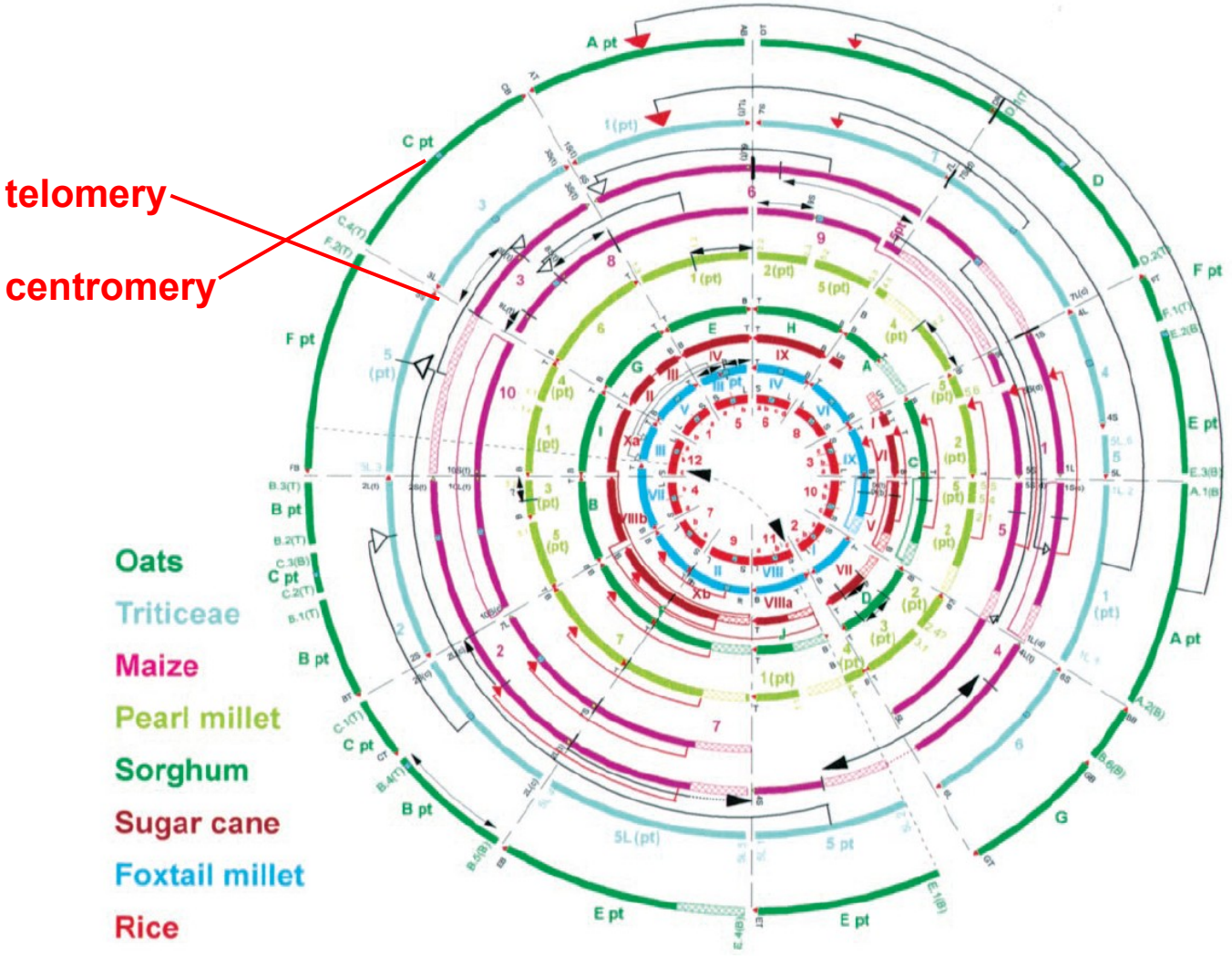
Názorné přiřazení homologních bloků



Přilehlé segmenty chromozomů žita

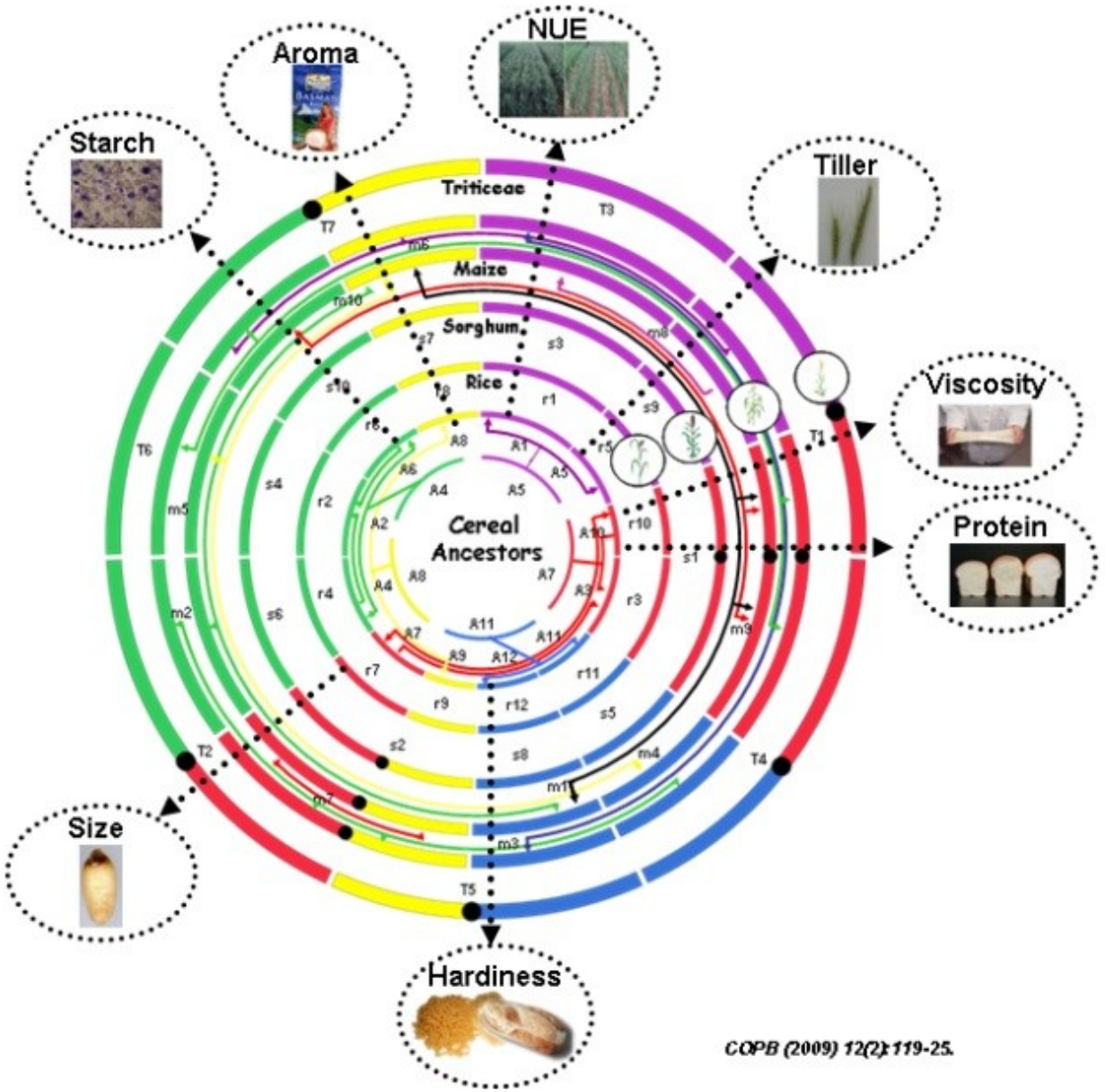
- Vysoce konzervovaná struktura genomů obilovin

Kolinearita (syntenie) genomů lipnicovitých

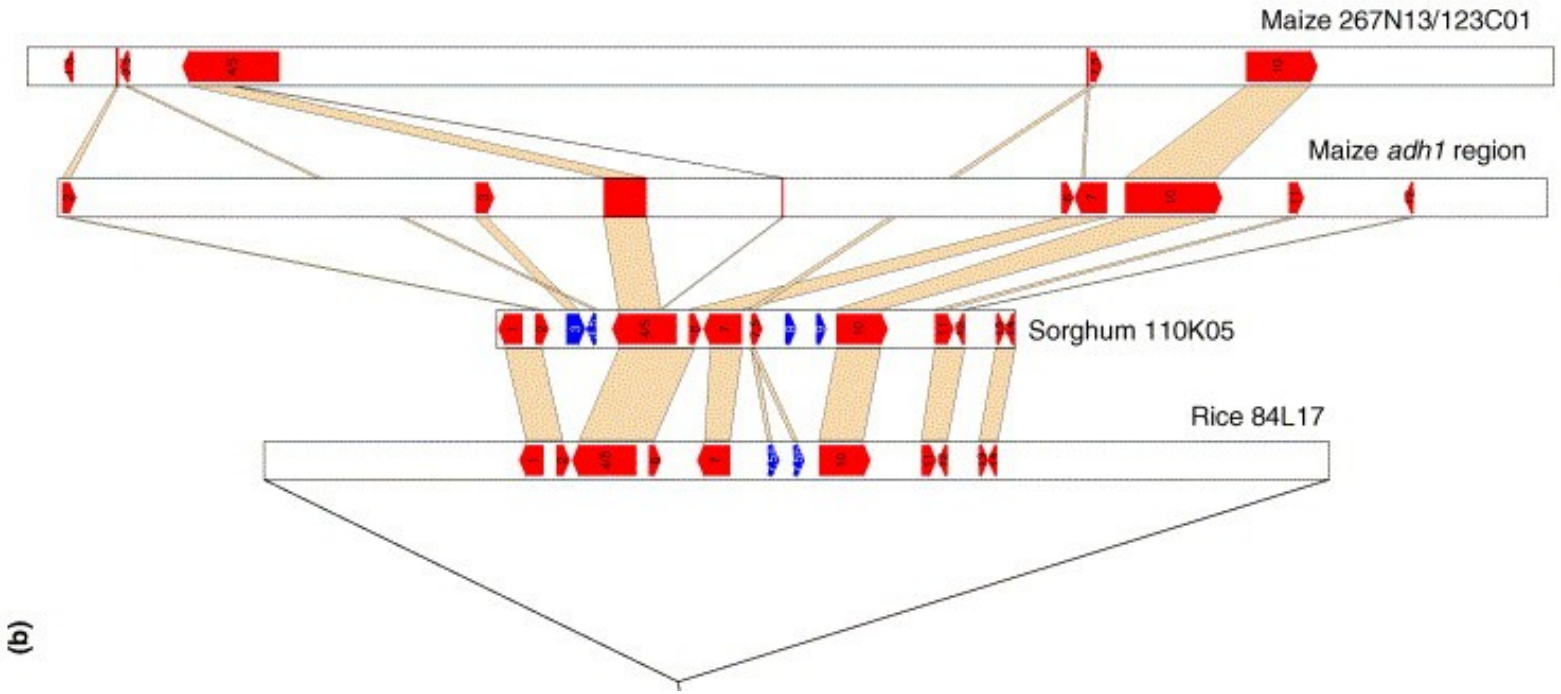


GENETIKA ROSTLIN

Genomy obilovin a asociované znaky

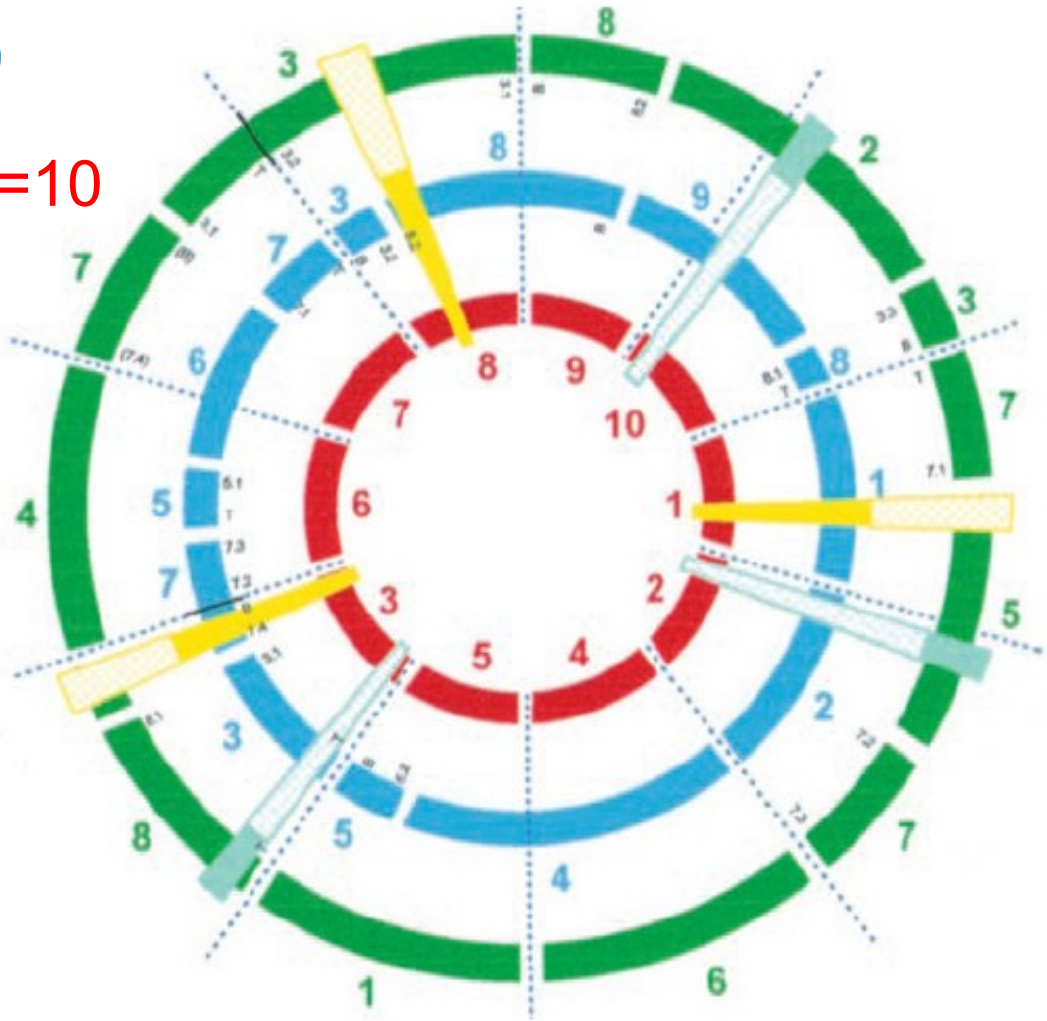


Kolineární úseky se liší především zastoupením repetitivní DNA



Genomy „brasik“

- B. nigra n=8
- B. oleracea n=9
- B. campestris n=10

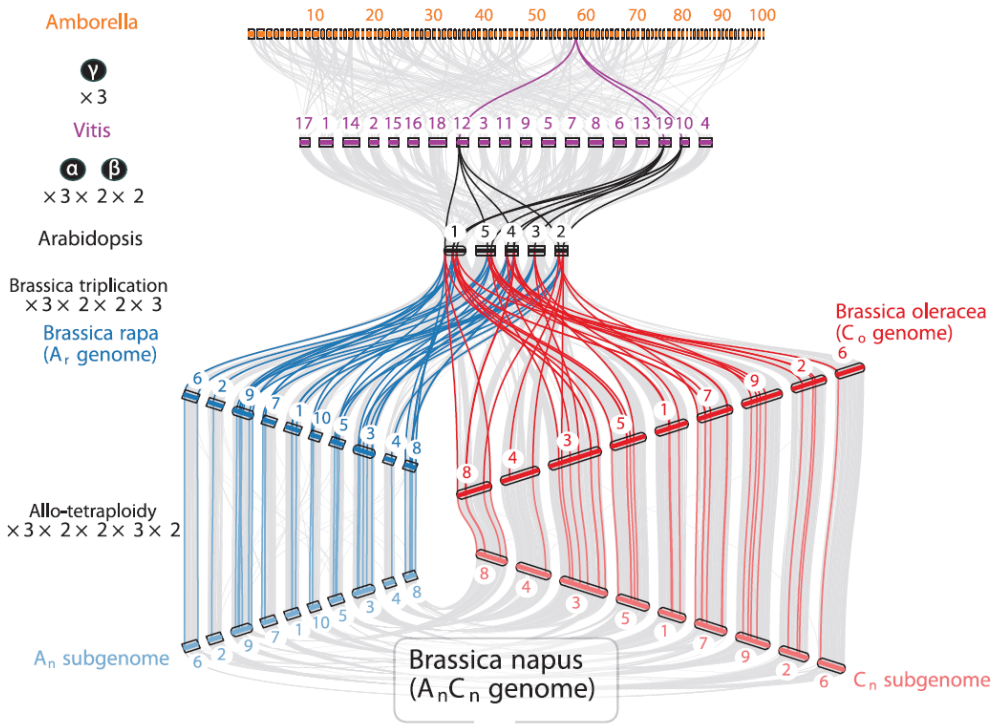


GENETIKA ROSTLIN

Genom řepky olejky *B. napus*

Science
AAAS

Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome
Boulos Chalhoub *et al.*
Science **345**, 950 (2014);
DOI: 10.1126/science.1253435



GENETIKA ROSTLIN

Výukovou pomůcku zpracovalo

Servisní středisko pro e-learning na MU

http://is.muni.cz/stech/

CZ.1.07/2.2.00/28.0041
Centrum interaktivních a multimediálních studijních opor pro inovaci výuky a efektivní učení

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ