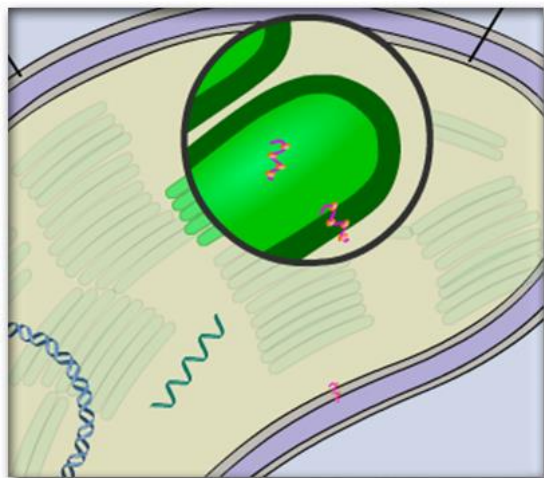


# Bi8240 GENETIKA ROSTLIN

## Prezentace 01 Rostlinný genom

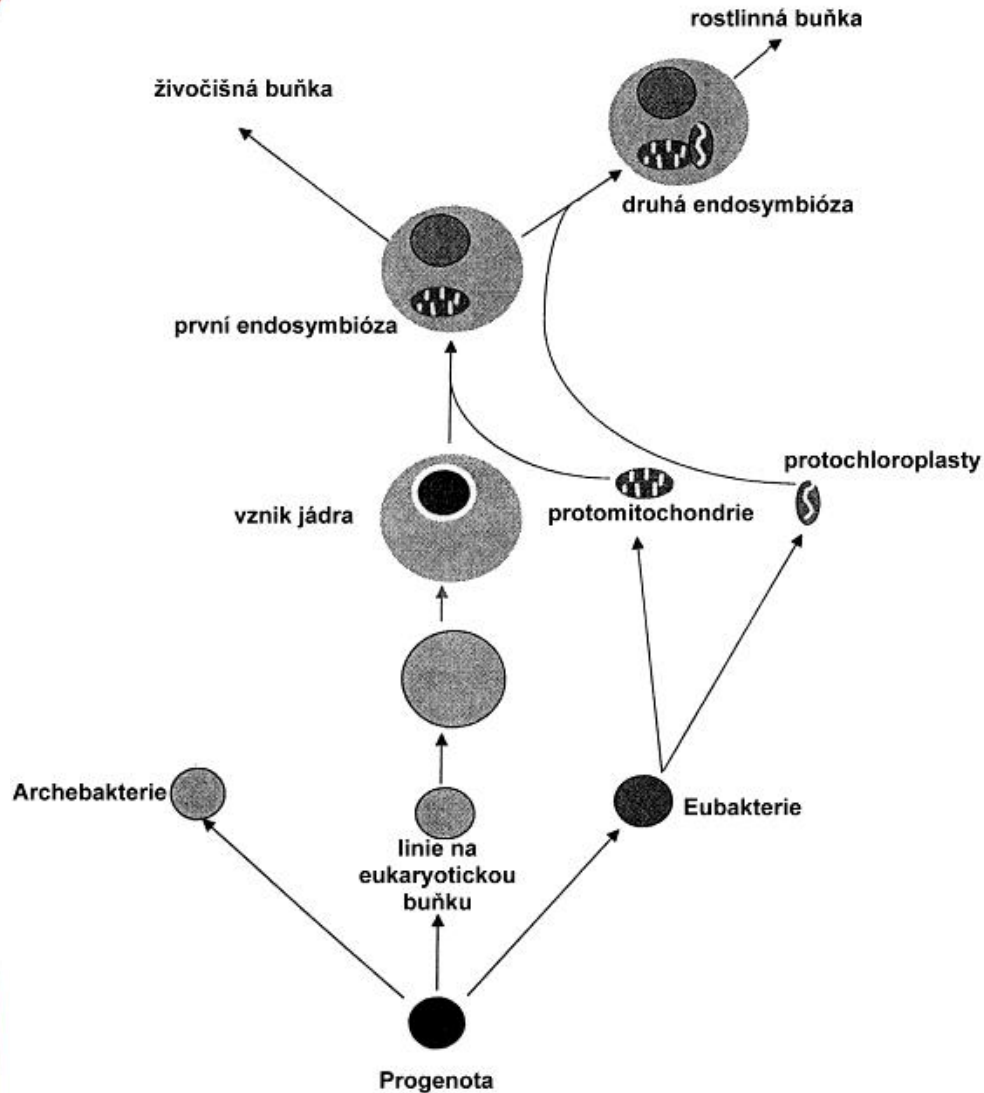


doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.  
[repkova@sci.muni.cz](mailto:repkova@sci.muni.cz)

## 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



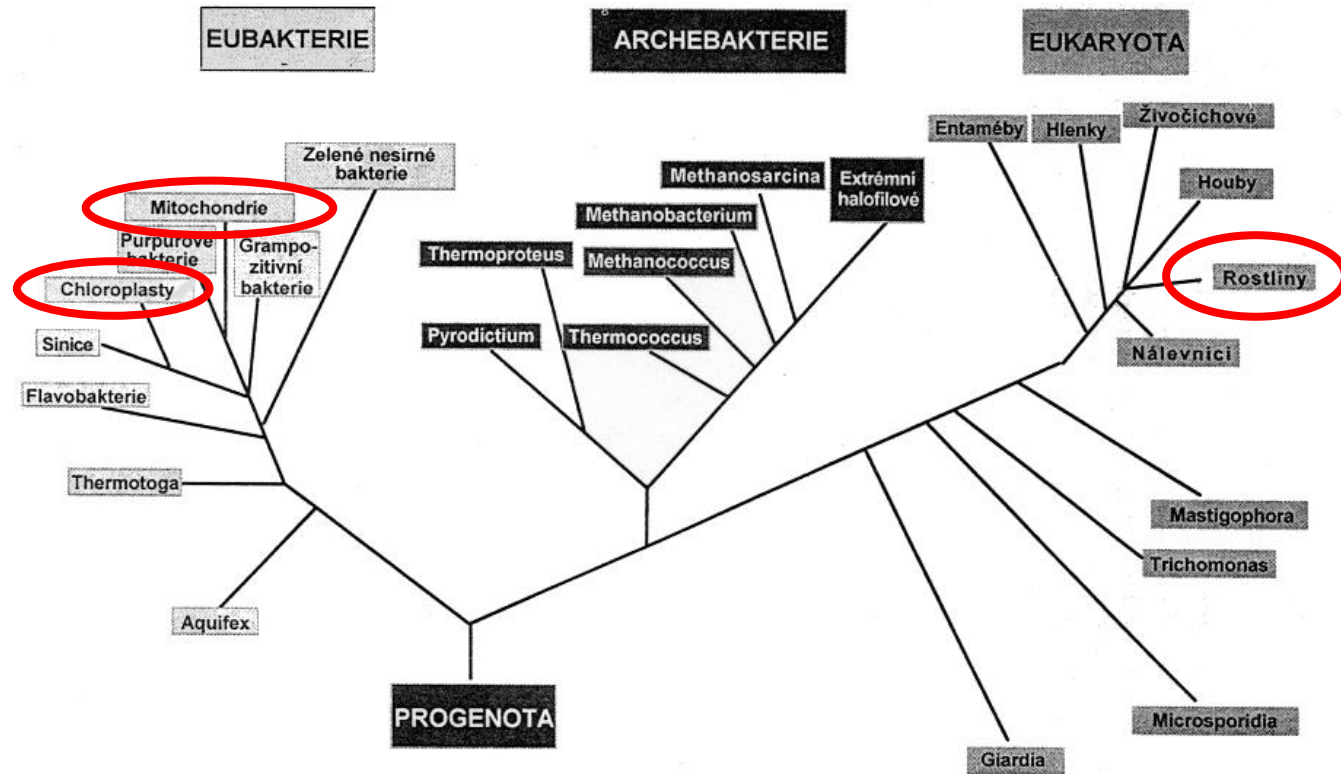
➤ 800 mil. let  
mnohobuněčné  
organizmy

➤ 1. a 2. endosymbióza  
1,2 miliardy let

**a důsledek!**

➤ 3,8–4,2 miliardy let

## Evoluční linie rostlin

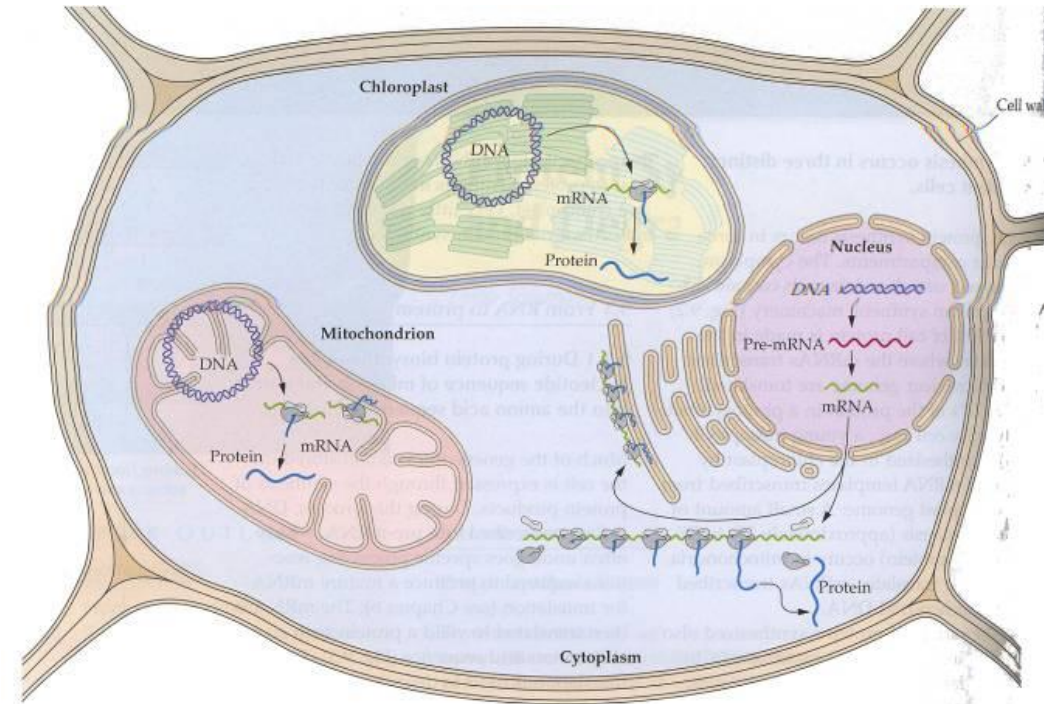


- Eukaryotické organizmy jsou stejně staré jako prokaryotické.
- Podstatná část genů člověka a jiných savců vykazuje vysokou homologii.
- Existuje určitý stupeň homologie mezi genomy různých organismů
- Stupeň homologie závisí na jejich evoluční příbuznosti.



## Genetická informace rostlin

- ➔ Jaderná
- ➔ Chloroplastová
- ➔ Mitochondriální

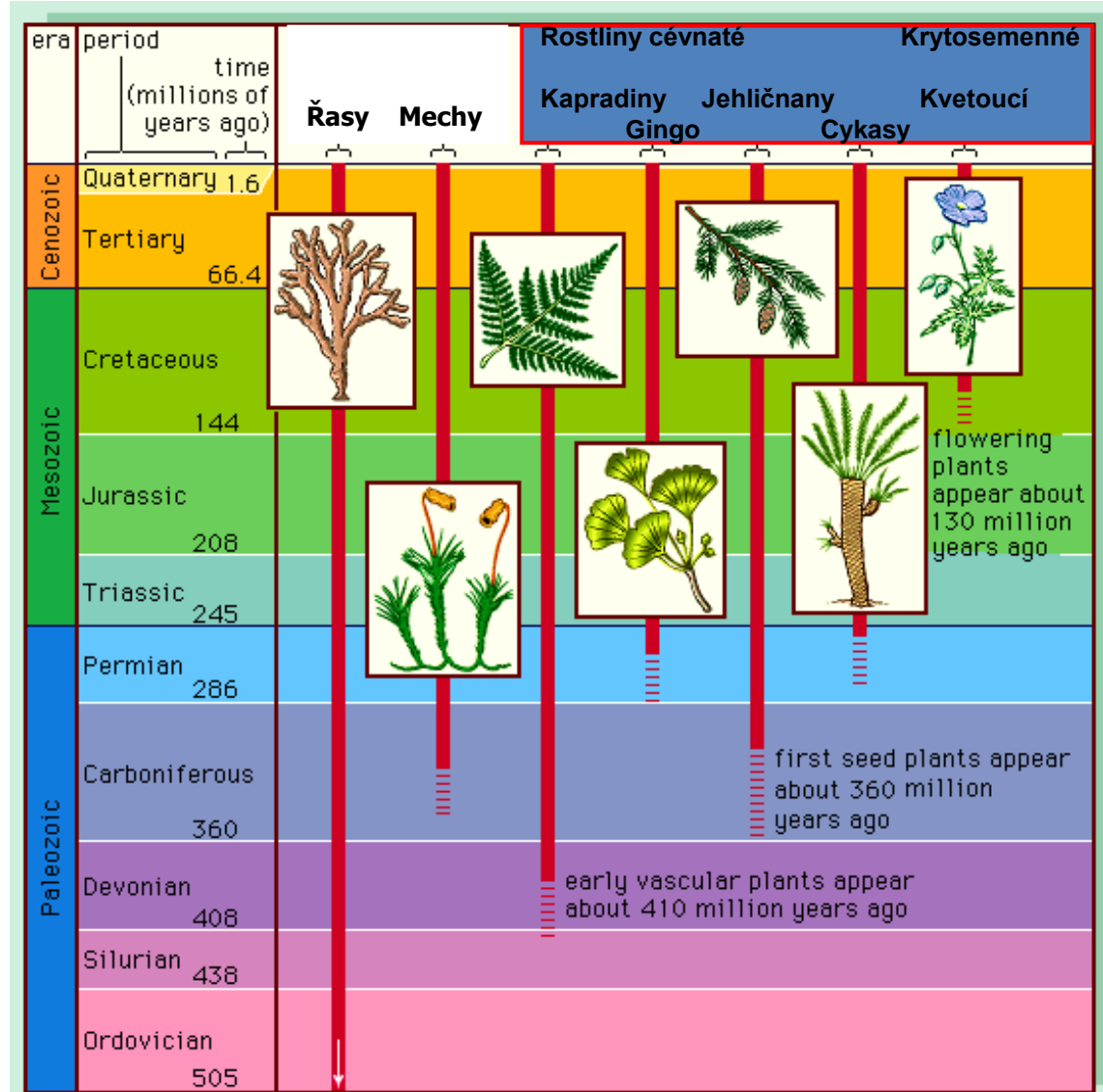


### Specifické rysy

- ➔ Evoluční původ genomů
- ➔ Komunikace tří složek genetického aparátu

## Evoluce rostlin a rostlinných genomů

- Nejstarší fosilie rostlin cévnatých – 410 mil. let
- Původ krytosemenných – 200 až 250 mil. let



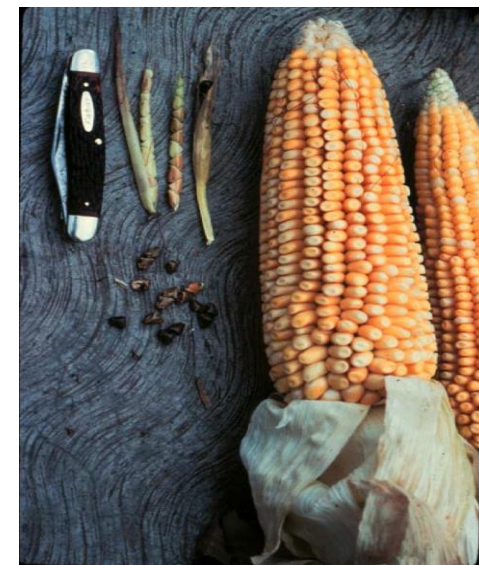
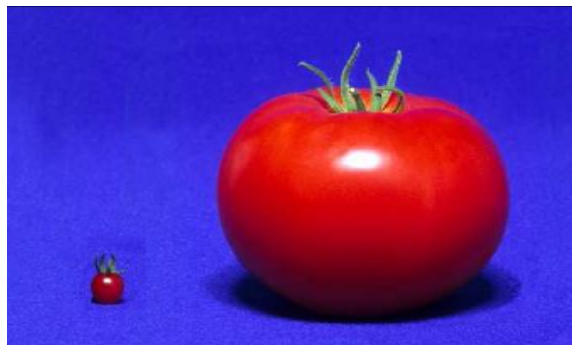
## Evoluce rostlin a rostlinných genomů

- Divergence 2 a 1děložné
  - *Arabidopsis* a rýže 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

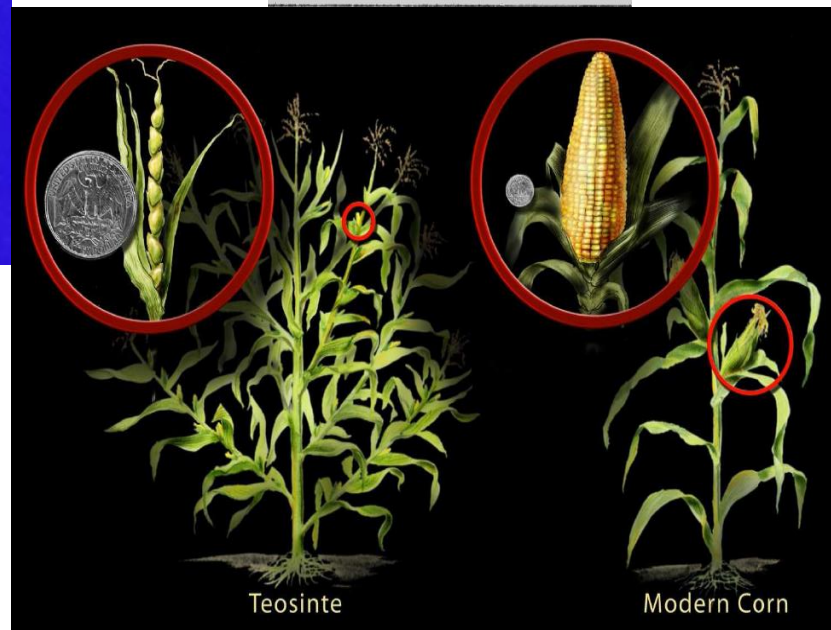
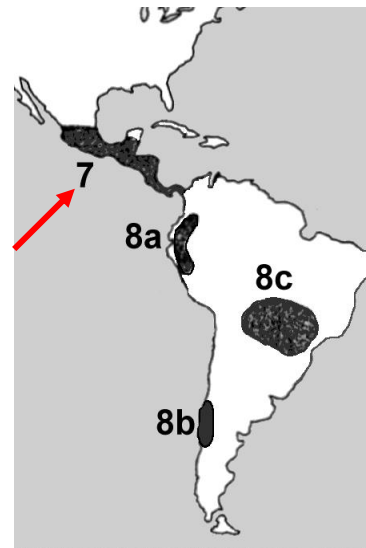
➔ Kukuřice *Zea mays*



teosinte

kukuřice

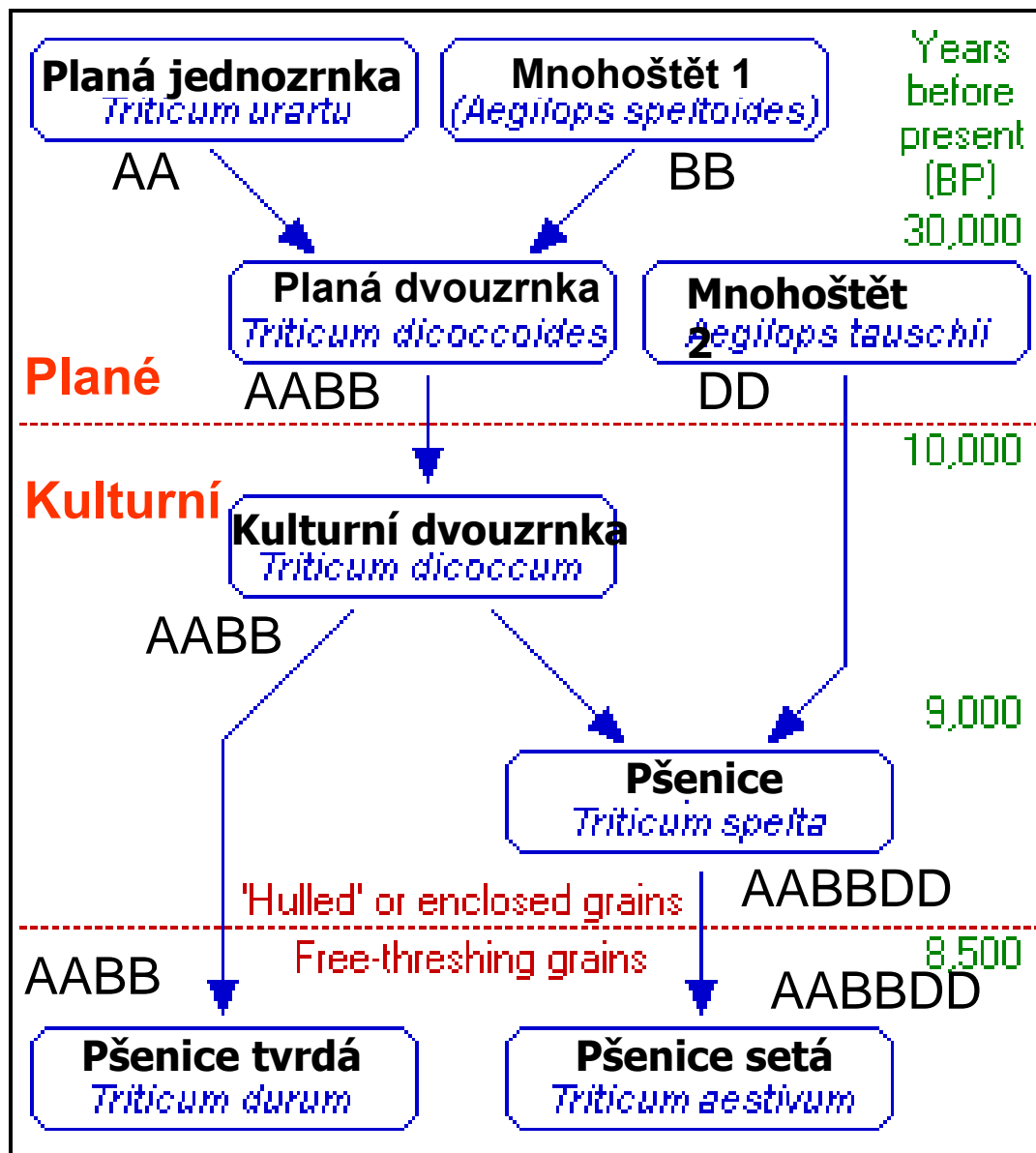
*Z. mays ssp. parviglumis*



Teosinte

Modern Corn

# Pšenice *Triticum aestivum*



Planá jednozrnka

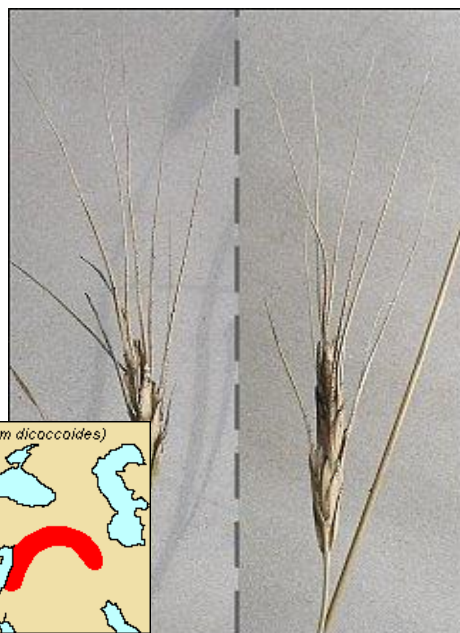


X

Mnohošět 1



Planá dvouzrnka



X

Mnohošět 2





Kulturní  
dvouzrnka



Pšenice  
tvrdá



Pšenice setá



# Šlechtění kulturních druhů je pokračující evoluce



*T. aestivum*  
AABBDD  
AABB

x



*Secale cereale* (RR)



Triticale  
(AABBDDRR)  
(AABBRR)

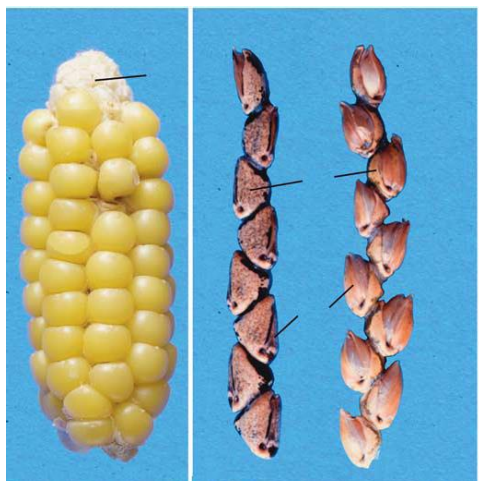
## Hlavní domestikační znaky

1. Omezení vypadávání semen
  - nerozpadavá větvena klasu, nepukavost lusků
2. Synchronizace dozrání
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

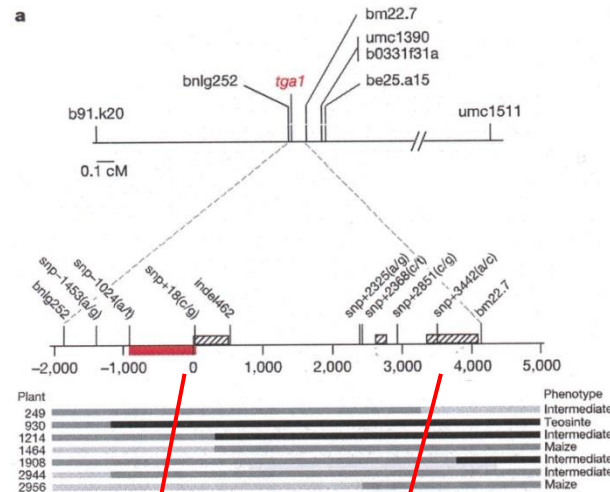


Tga1

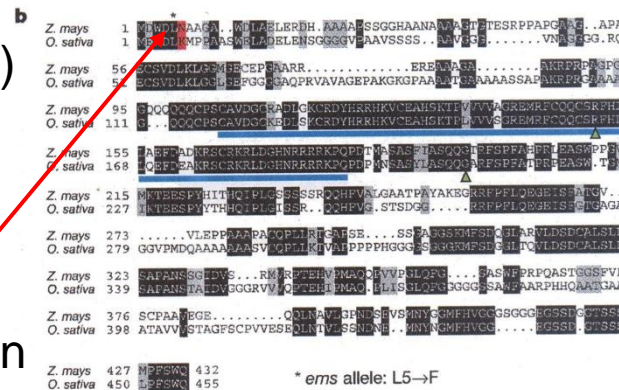
tga1

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

Protein teosinta vs. kukuřice  
Záměna K → N  
lysine asparagine

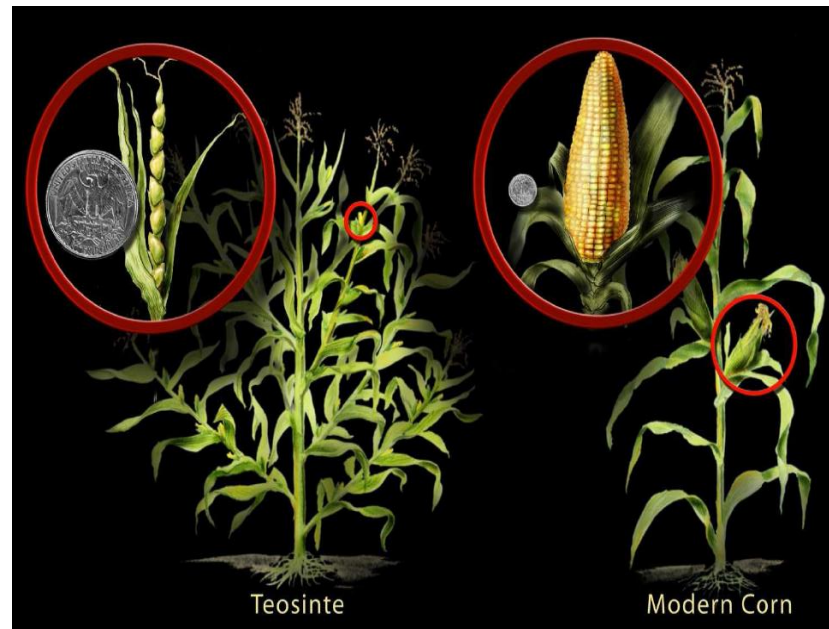


promotor 3 exony



\* *ems* allele: L5→F

- *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

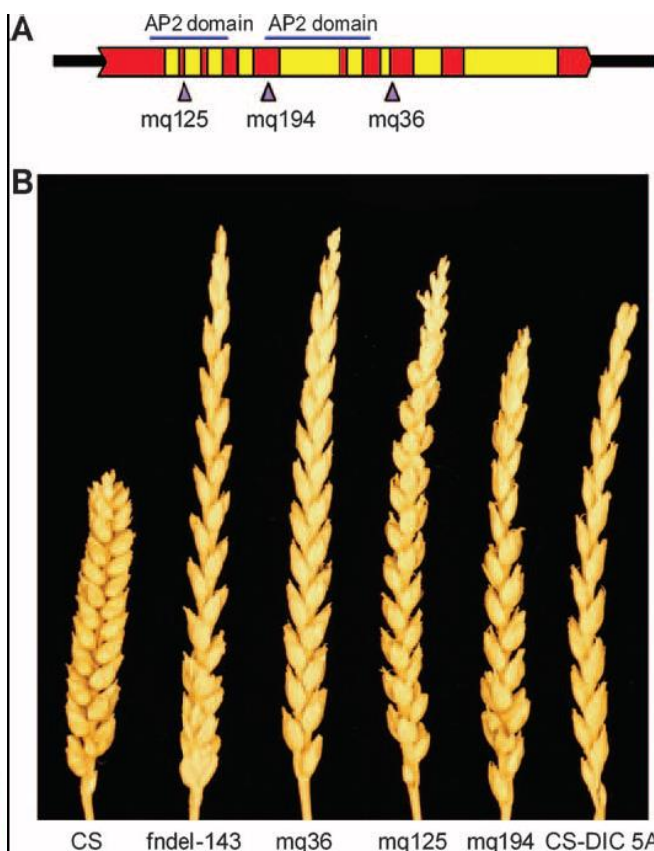




# Některé geny pro domestikační znaky

## 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
<i>T. aestivum</i> cv. CS (Q)	▼	▼	▼	▼	█	▼
<i>T. durum</i> (Q)						
<i>T. carthlicum</i> (Q)						
<i>T. polonicum</i> (Q)						
<i>T. spelta</i> (DS5A Iran) (Q)						
<i>T. spelta</i> (DS5A Euro) (q)						
<i>T. spelta</i> (Eur; TA2603) (q)						
<i>T. macha</i> (q)						
<i>T. dicoccoides</i> (q)						
<i>T. dicoccum</i> (q)						
<i>T. urartu</i> (q)						
<i>T. monococcum</i> (q)						

### Pleiotropie genu Q

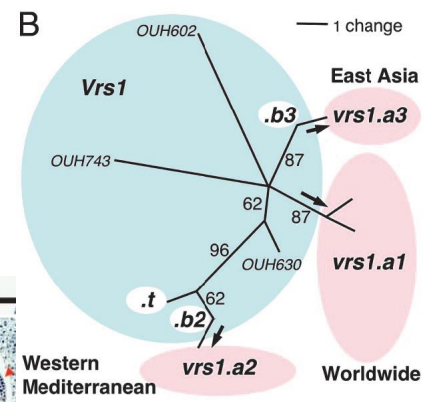
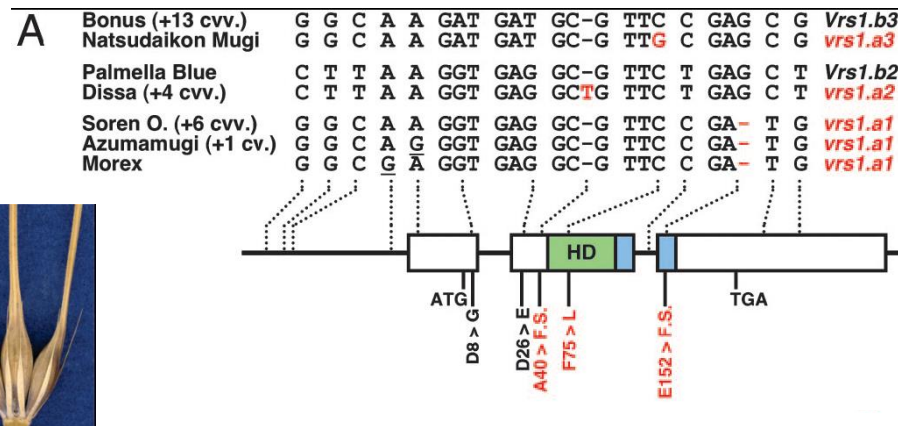
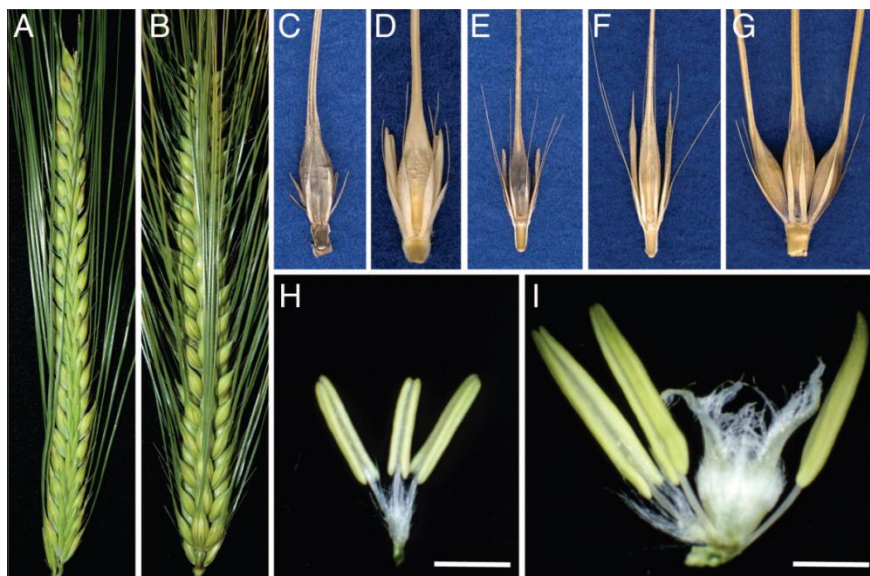
- ➔ Rozpadavost vřetene klasu
- ➔ Tvar a pevnost plevy
- ➔ Délka klasu
- ➔ Výška rostliny
- ➔ Doba metání

## Některé geny pro domestikační znaky

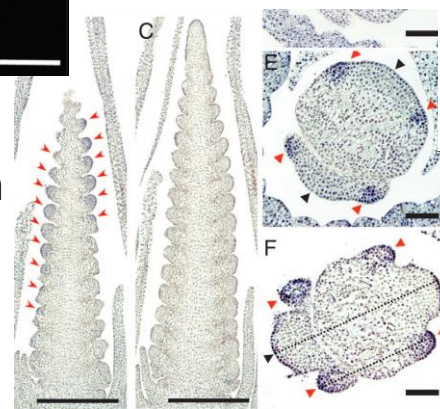
### Ječmen

➔ 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 fertlních klásků v šestiřadém fenotypu

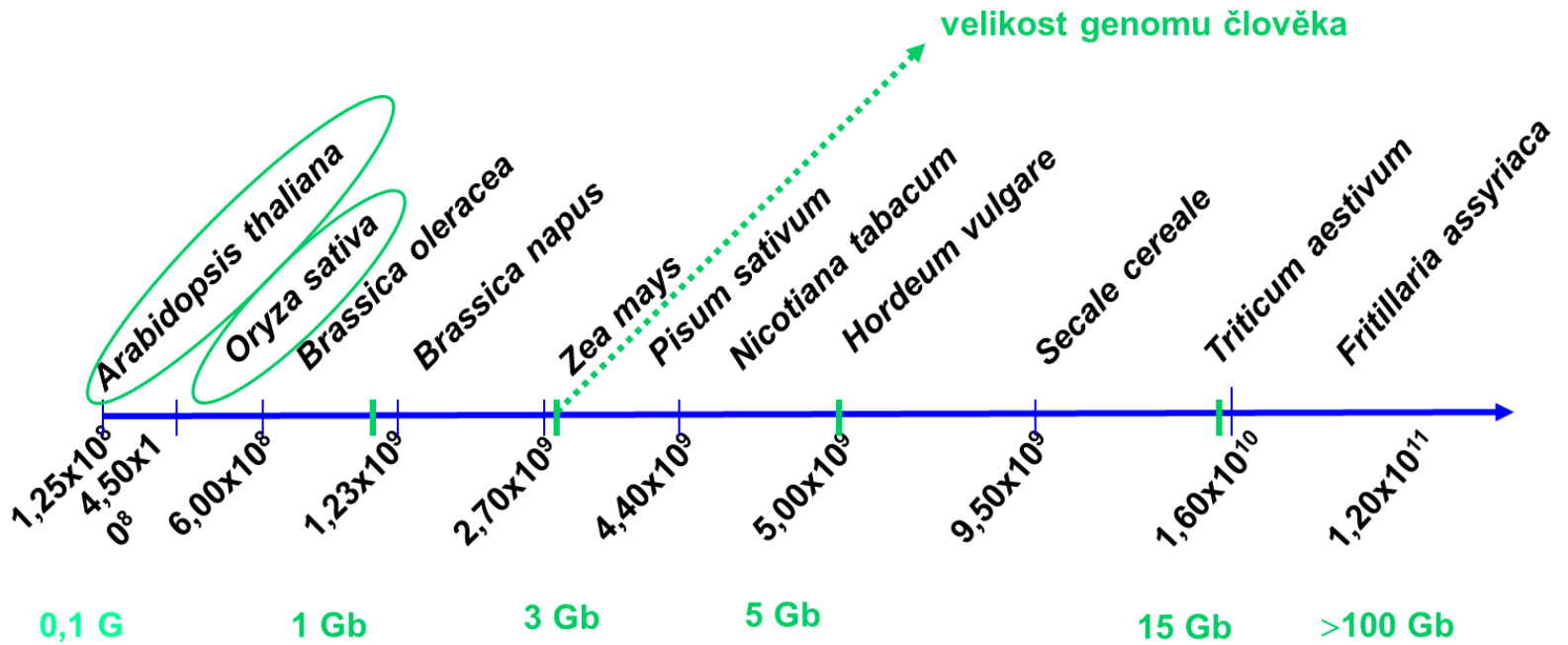






# Rostlinné genomy

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

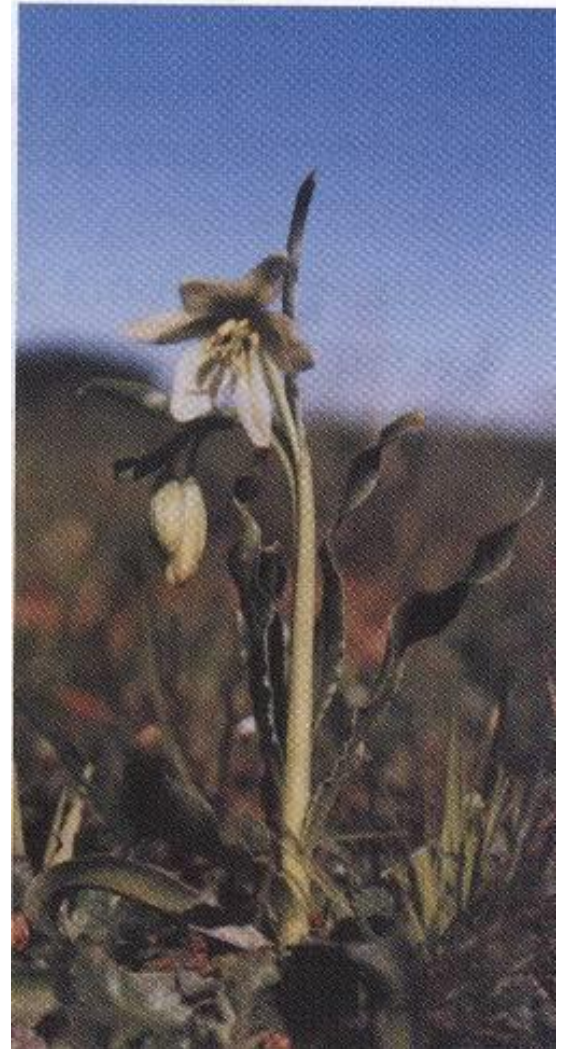




➤ *Arabidopsis thaliana*



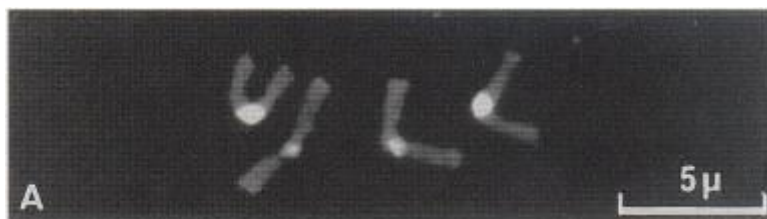
➤ *Fritillaria assyriaca*



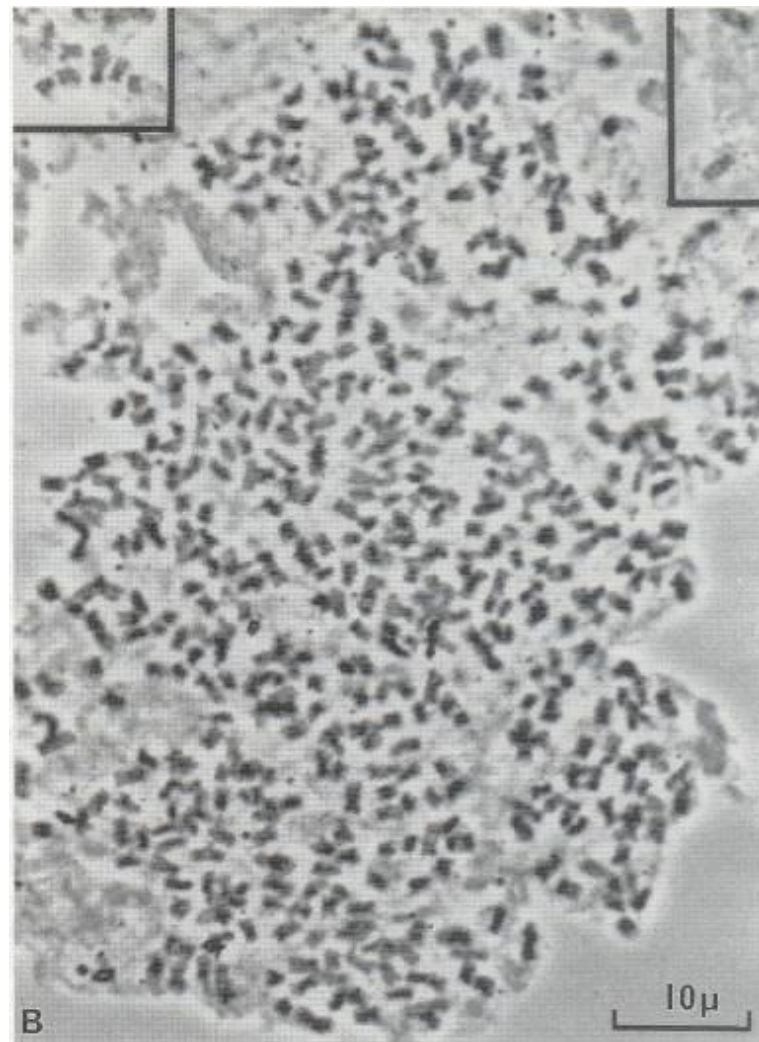
Druh	J/D	n	ploidie	bp
<i>Arabidopsis thaliana</i>	D	5	2	$1,25 \times 10^8$
<i>Oryza sativa</i>	J	12	2	$4,50 \times 10^8$
<i>Brassica oleracea</i>	D	9	2	$6,00 \times 10^8$
<i>Lycopersicon esculentum</i>	D	12	2	$1,00 \times 10^9$
<i>Brassica napus</i>	D	19	2	$1,23 \times 10^9$
<i>Antirrhinum majus</i>	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	$4,40 \times 10^9$
<i>Nicotiana tabacum</i>	D	24	4	$4,40 \times 10^9$
<i>Hordeum vulgare</i>	J	7	2	$4,90 \times 10^9$
<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			$1,20 \times 10^{11}$

**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*:  $2n = \text{cca } 640$
- Velikost chromozomů se mezi druhy liší až 60x





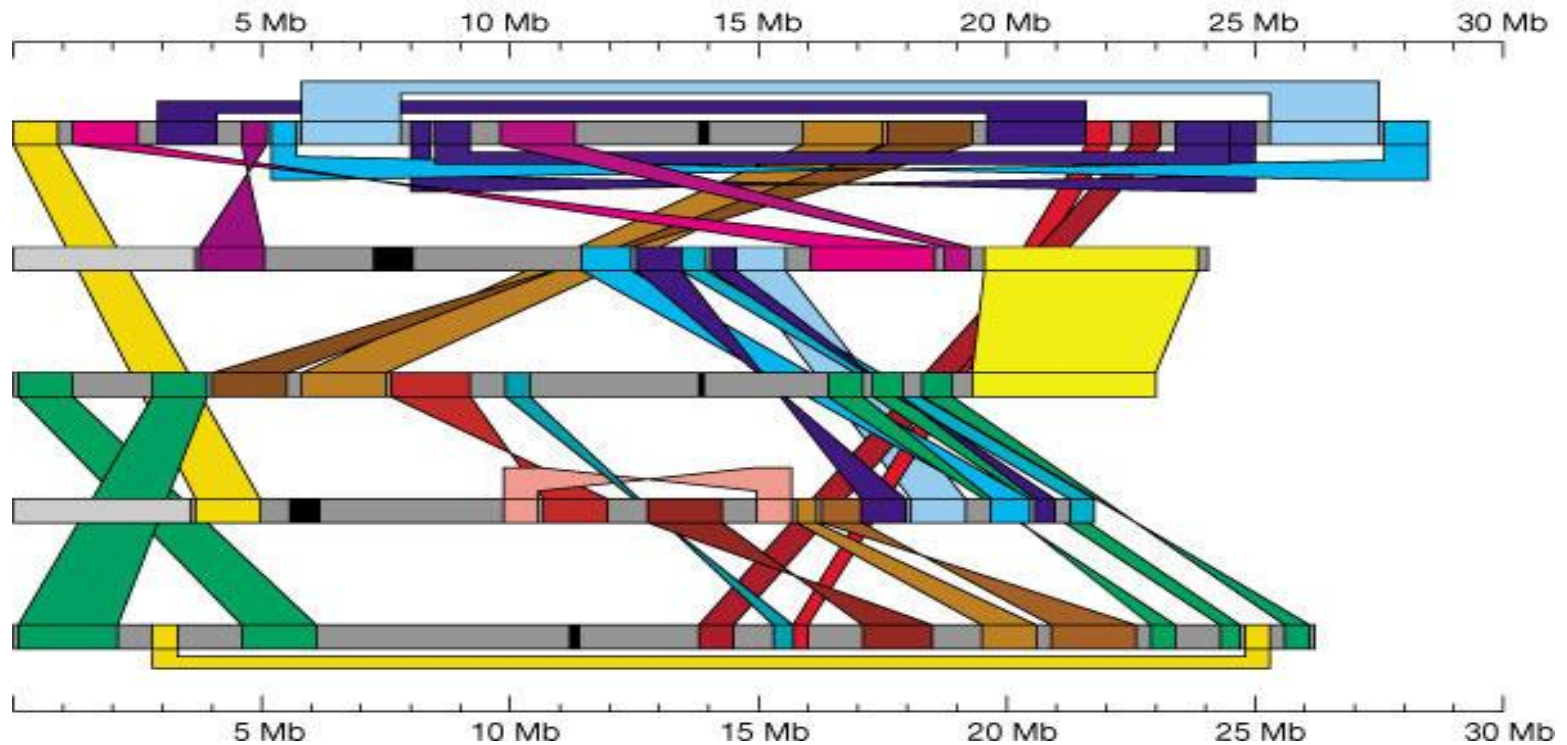
## Evoluční mechanismy ovlivňující velikost genomů rostlin

- ➔ Duplikace
- ➔ Spontánní delece a inserce
- ➔ Aktivita transpozonů
- ➔ Přídavné chromozomy
- ➔ Expanze mikrosatelitů
- ➔ Expanze heterochromatinu (např. centromer)

**Důsledky → redundance genů u rostlin**

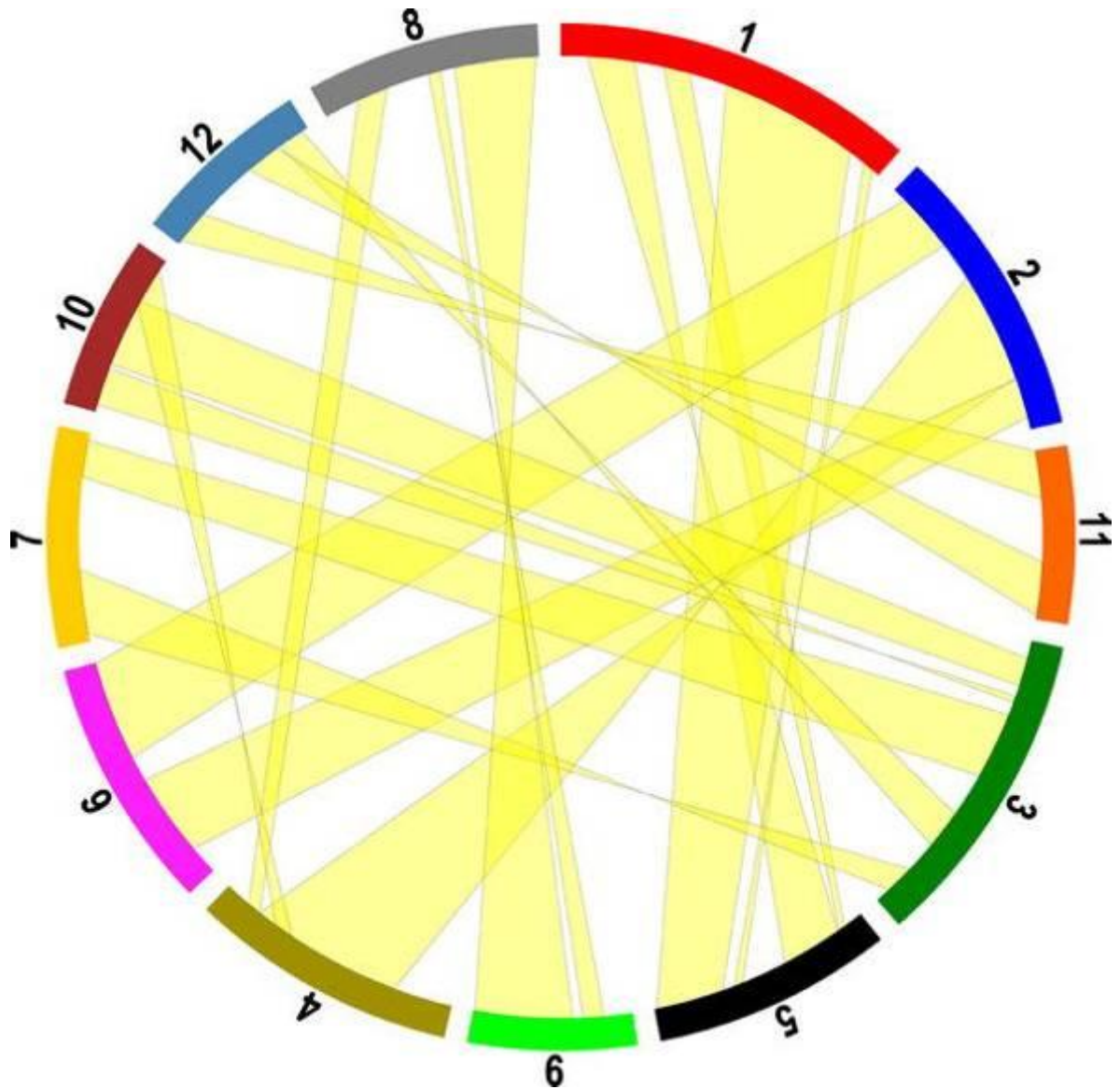
## Arabidopsis je dávný tetraploid

- Jako zřejmě většina rostlin



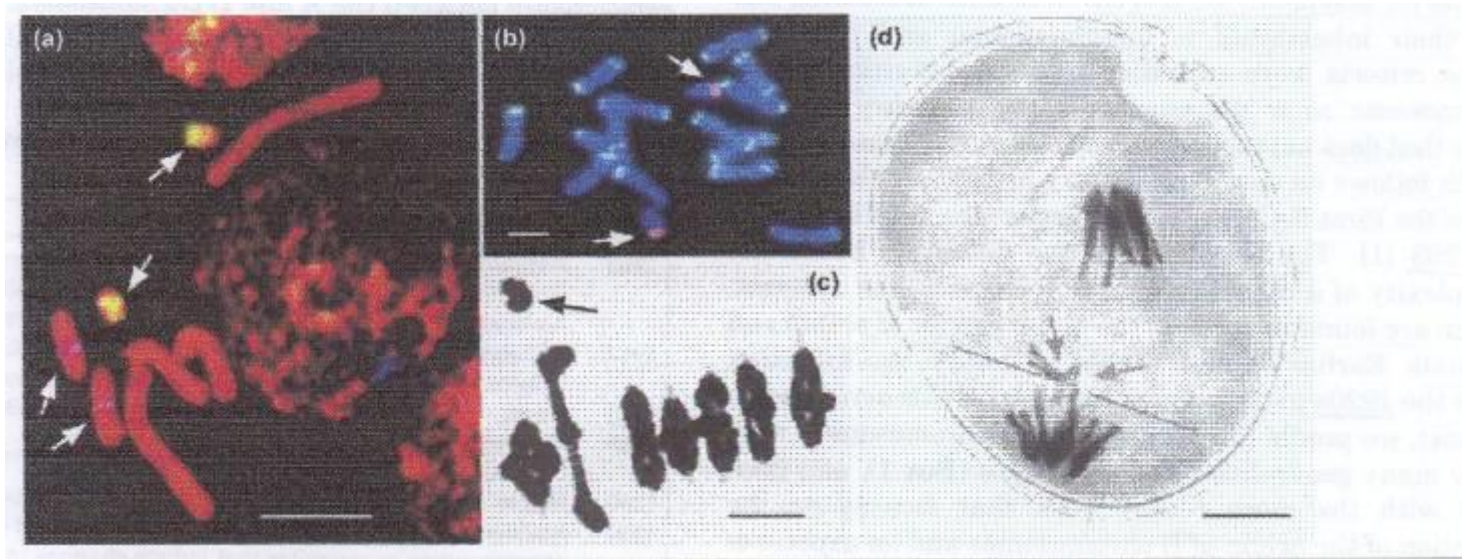
- Duplikované úseky chromozomů tvoří 60 % genomu (67.9 Mb)
- Polyploidizace výrazně zvyšuje plasticitu genomu a zřejmě hrála významnou roli v evoluci rostlin (rostlinných genomů)

Četné duplikace jsou i v genomu rýže

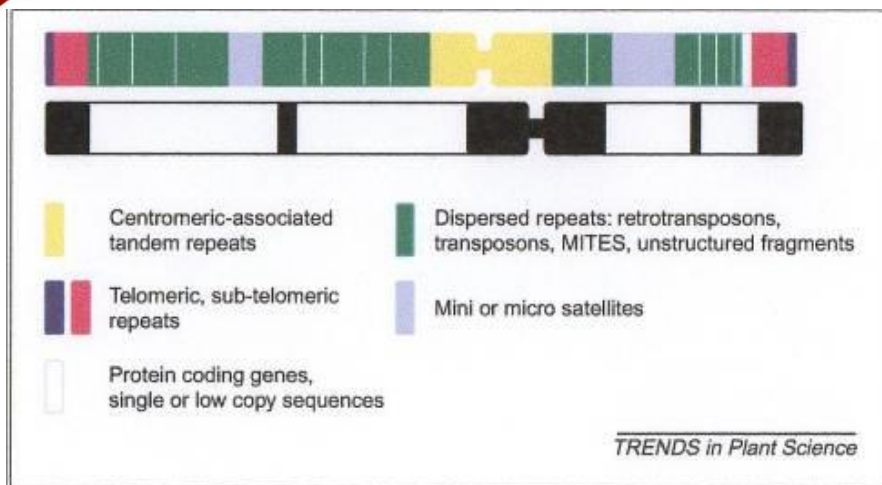




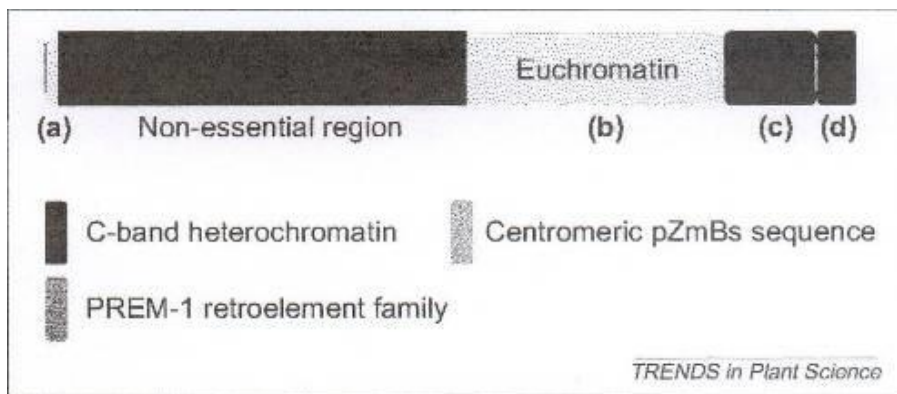
## B chromozomy



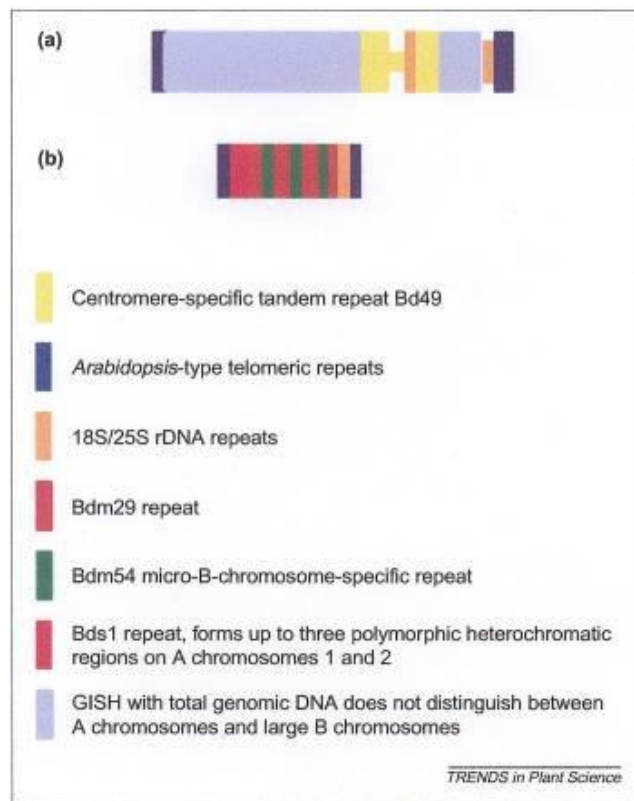
- a) *Brachycoma dichromosomatica* (mitóza, 2 B a 2 mikro-B chromozomy)
- b) *Secale cereale* (metafáze, 2 B chromozomy)
- c) *Secale cereale* (metafáze I meiózy, 1 B chromozom, 7 bivalentů)
- d) *Secale cereale* (1. mitóza v pylovém zrně, nondisjunkce B chromozomu)



## ➤ B chromozom – struktura



- B chromozom *Zea mays*
- 4 oblasti nezbytné pro nondisjunkci



## *Brachycoma dichromosomatica*

- a) B chromozom
- b) Mikro-B chromozom

# 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](http://www.nature.com)
  - *Arabidopsis thaliana* ( $1,25 \times 10^8$ )
- Projekt **International Rice Genome Sequencing Project**
  - *Oryza sativa* ( $4,50 \times 10^8$ )
- *Populus trichocarpa*
- *Vitis vinifera*
- *Zea mays*



## Genom *Arabidopsis thaliana*

Projekt **The *Arabidopsis* Genome Initiative** 1996–2000

– Nature, December 2000, Vol. 408, pp. 796-815,  
[www.nature.com](http://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)

➔ Repetitivní

– centromery

– telomery

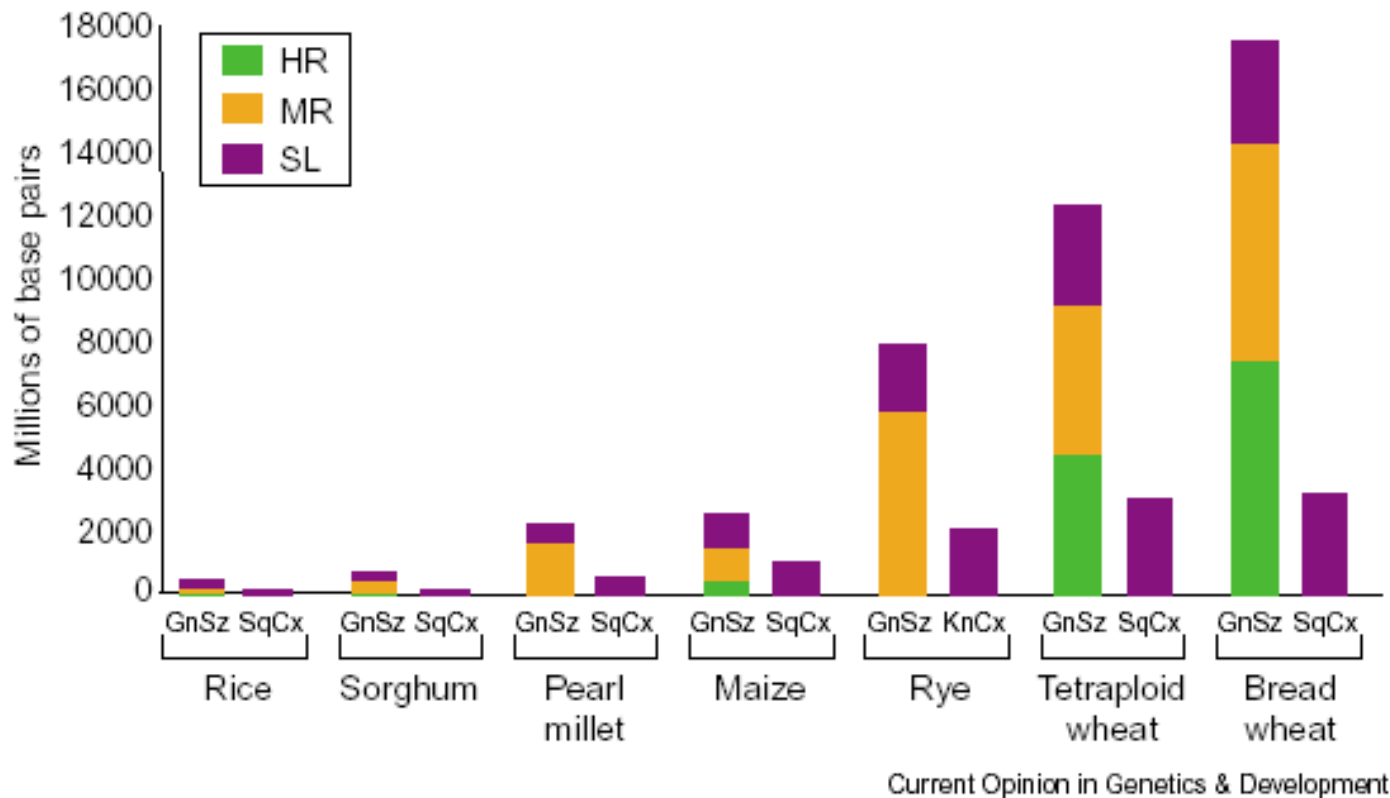
– satelity – tandemové repetice

▪ minisatelity (motiv 9 až 20 bp)

▪ mikrosatelity (motiv 1 až 5bp)



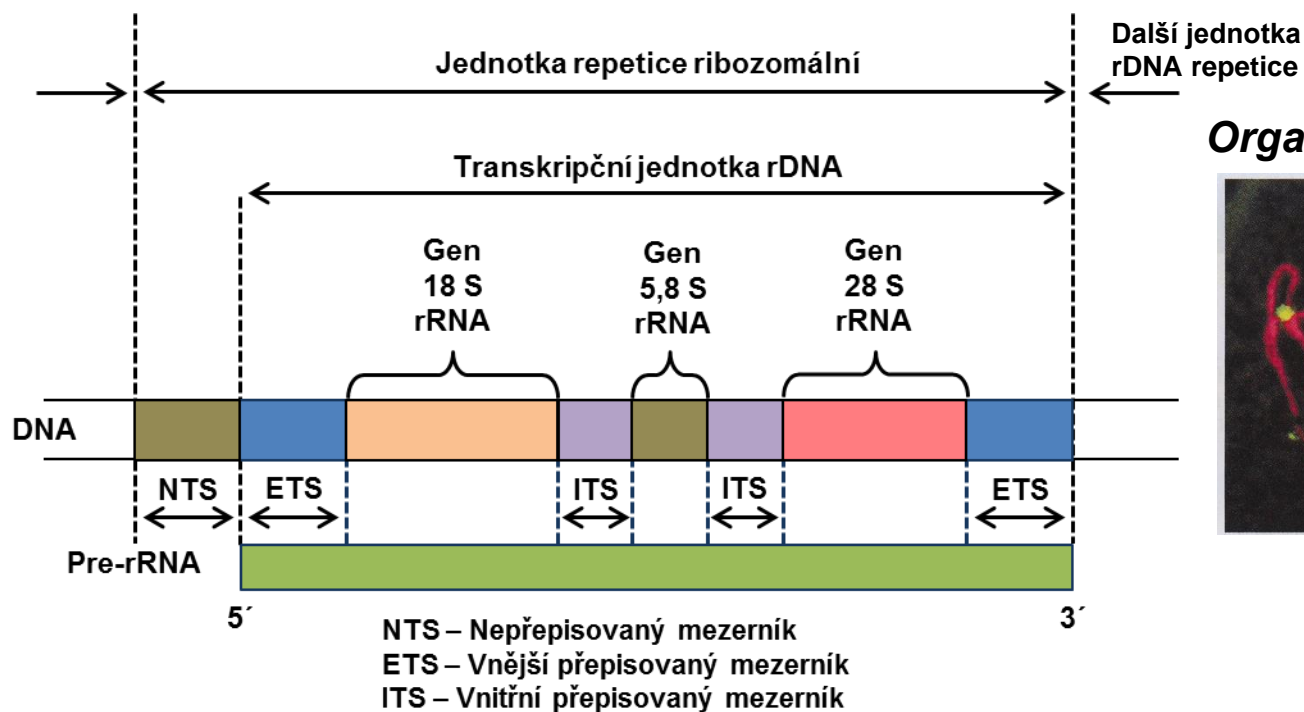
# Zastoupení repetitivní DNA v rostlinných genomech



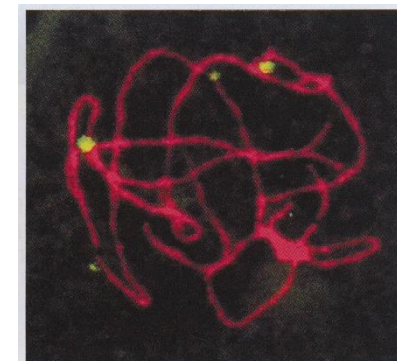
# Geny rostlinného genomu

## Geny složek genetického aparátu

### Geny kódující 18S – 5,8S – 28S rRNA



Organizátor jadérka

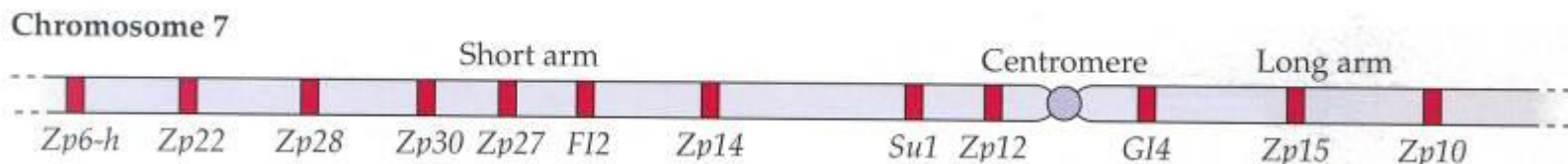


- Geny pro 5S rRNA
- Geny tRNA
- Geny pro histony
- 1 blok genů  $10^3$  až  $10^4$  kopií, 7800 až 185 tis. bp
- transkripce jako 1 prekurzor
- postranlačními úpravami 3 typy rRNA
- pomerančovník 125 kopií, hyacint 32 tis. kopií

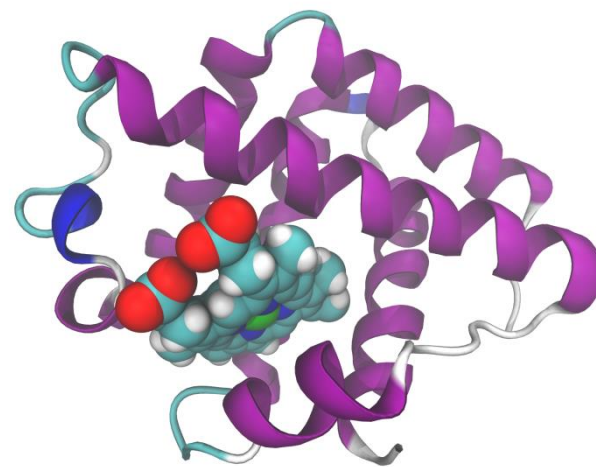
# Geny rostlinného genomu

## Geny kódující proteiny

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



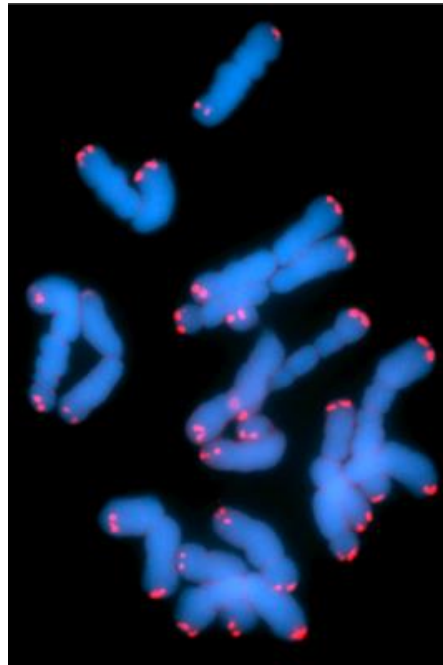
- ➔ Geny pro enzymy fotosyntézy
- ➔ Geny pro stresové proteiny
- ➔ Geny pro leghemoglobin





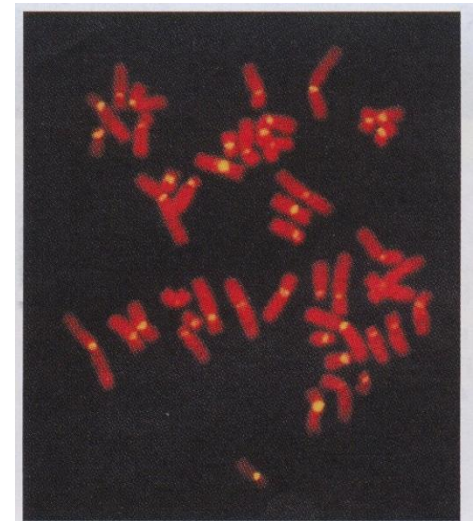
## Telomery

- 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

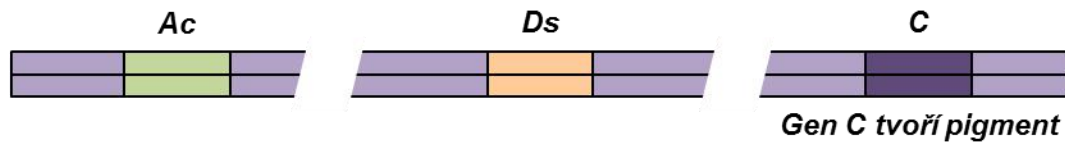


# DNA transpozony

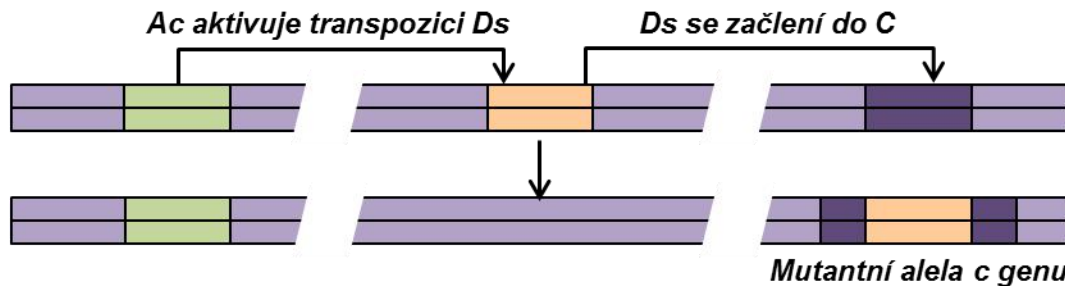
## Kukuřice *Ac/Ds* (rodina transpozonů hAT)

### ➔ Mechanismus transpozice

#### A) Fialové zrno



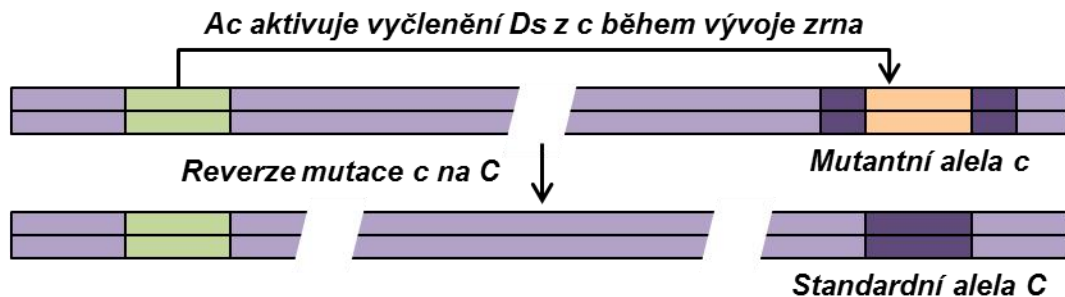
#### B) Bílé zrno



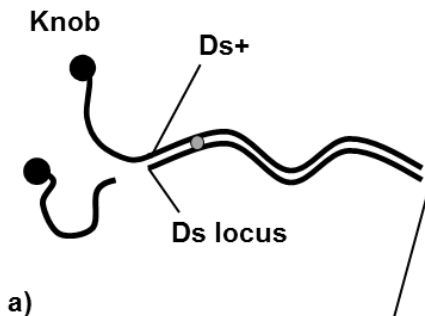
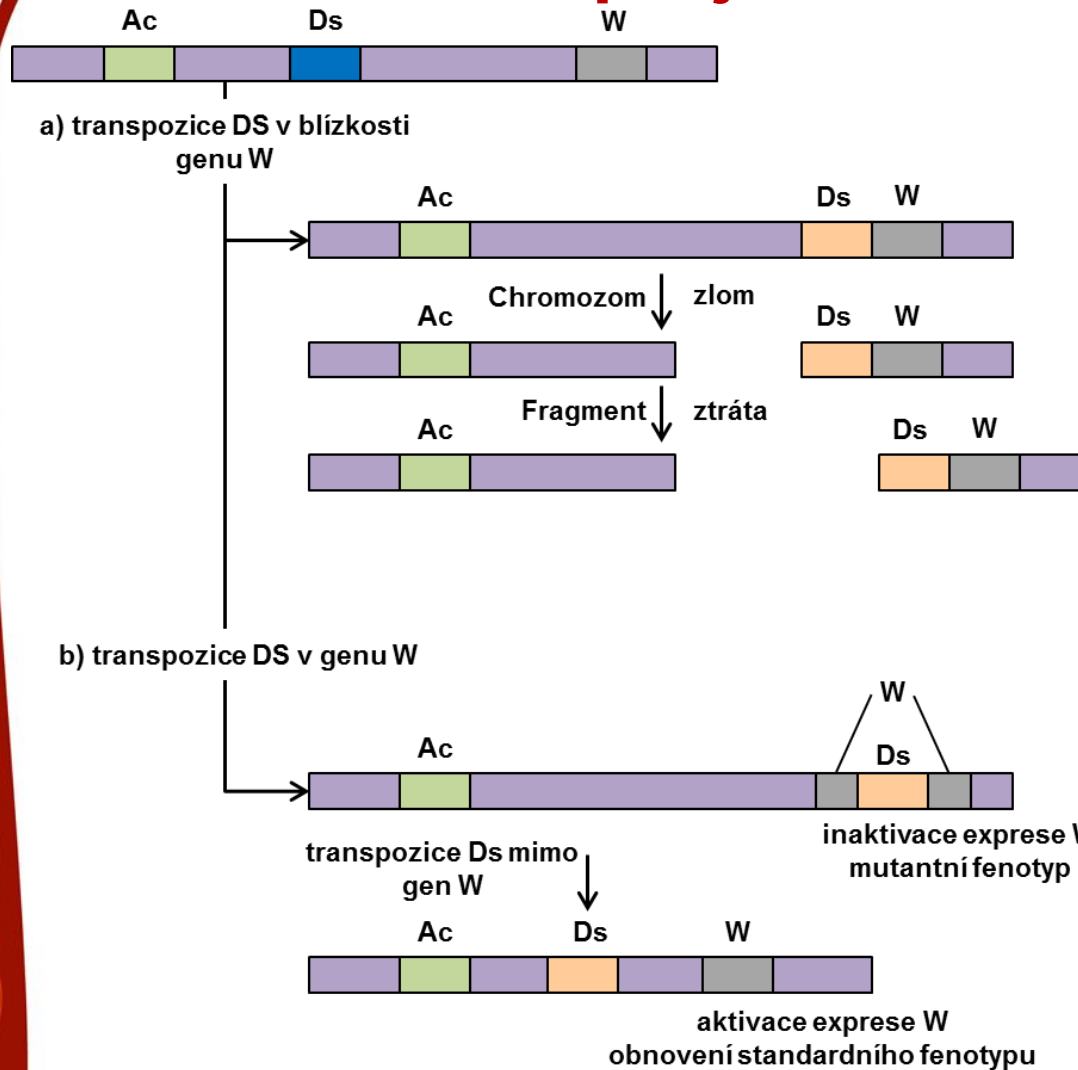
Gen *Colorless* chromozom 9



#### C) Skvrnité zrno

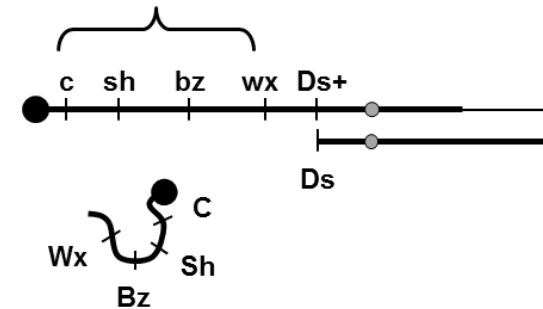


## Příčiny nestability fenotypového projevu – shrnutí



Pár homologických chromozomů 9 v meiozi (kukuřice)

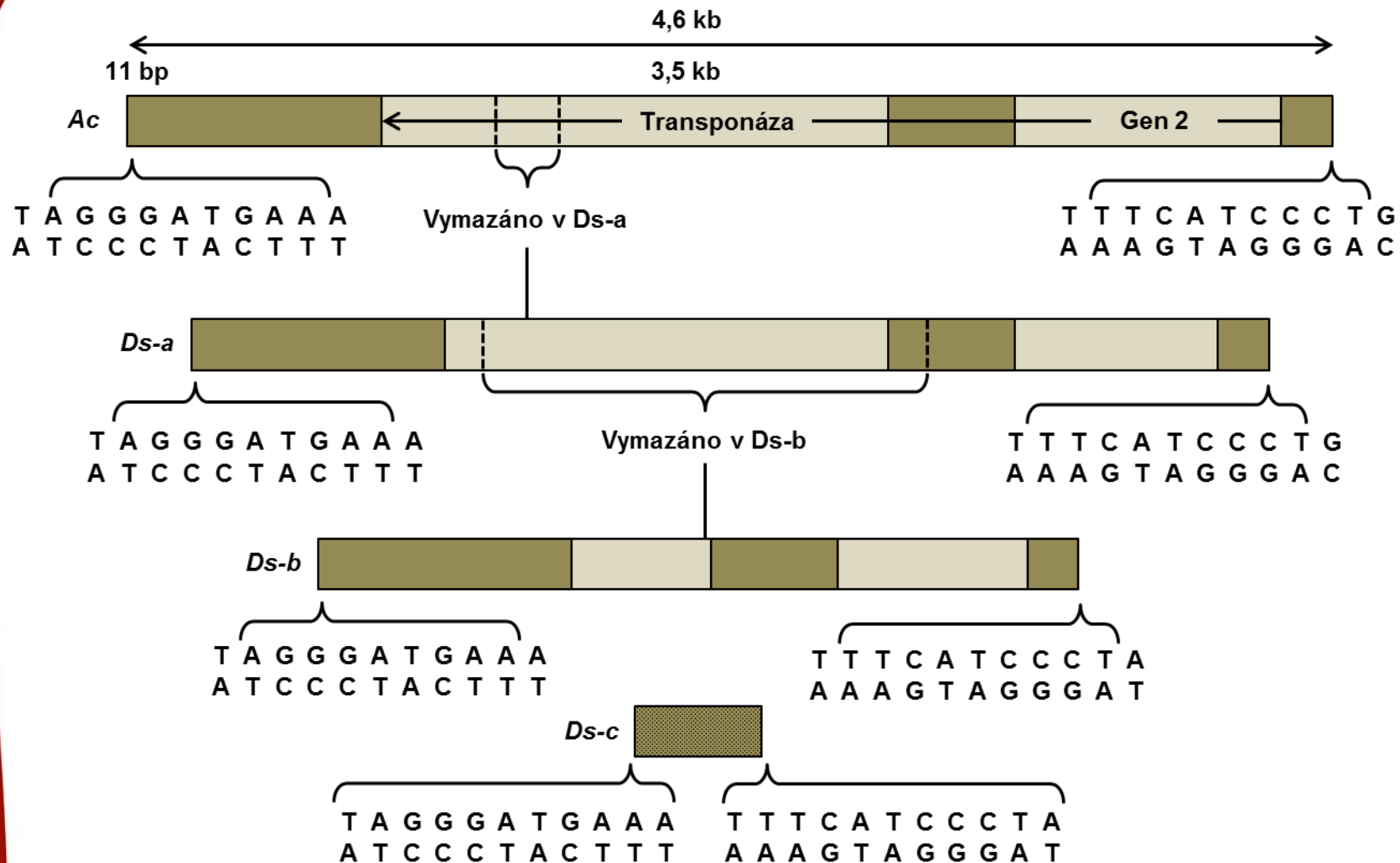
Recesivní fenotyp se projeví



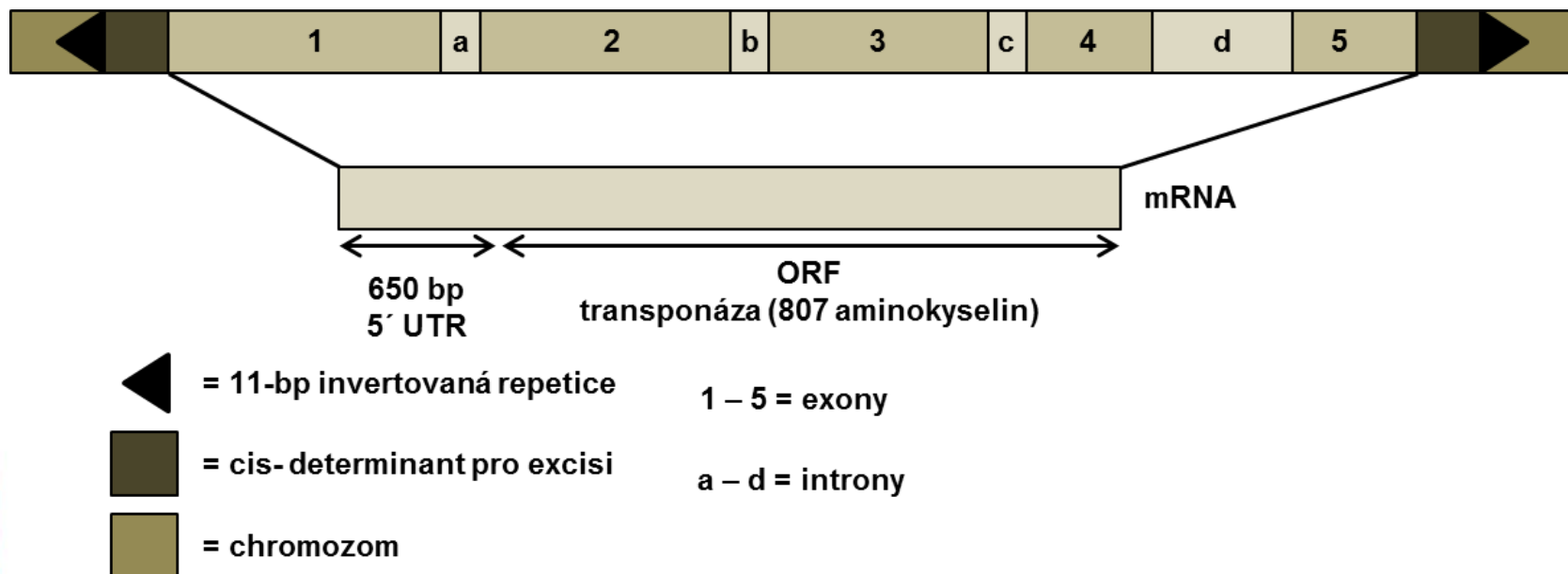
Výsledné pletivo: c (colourless)  
sh (shrunken)  
bz (brnoze)  
wx (waxy)



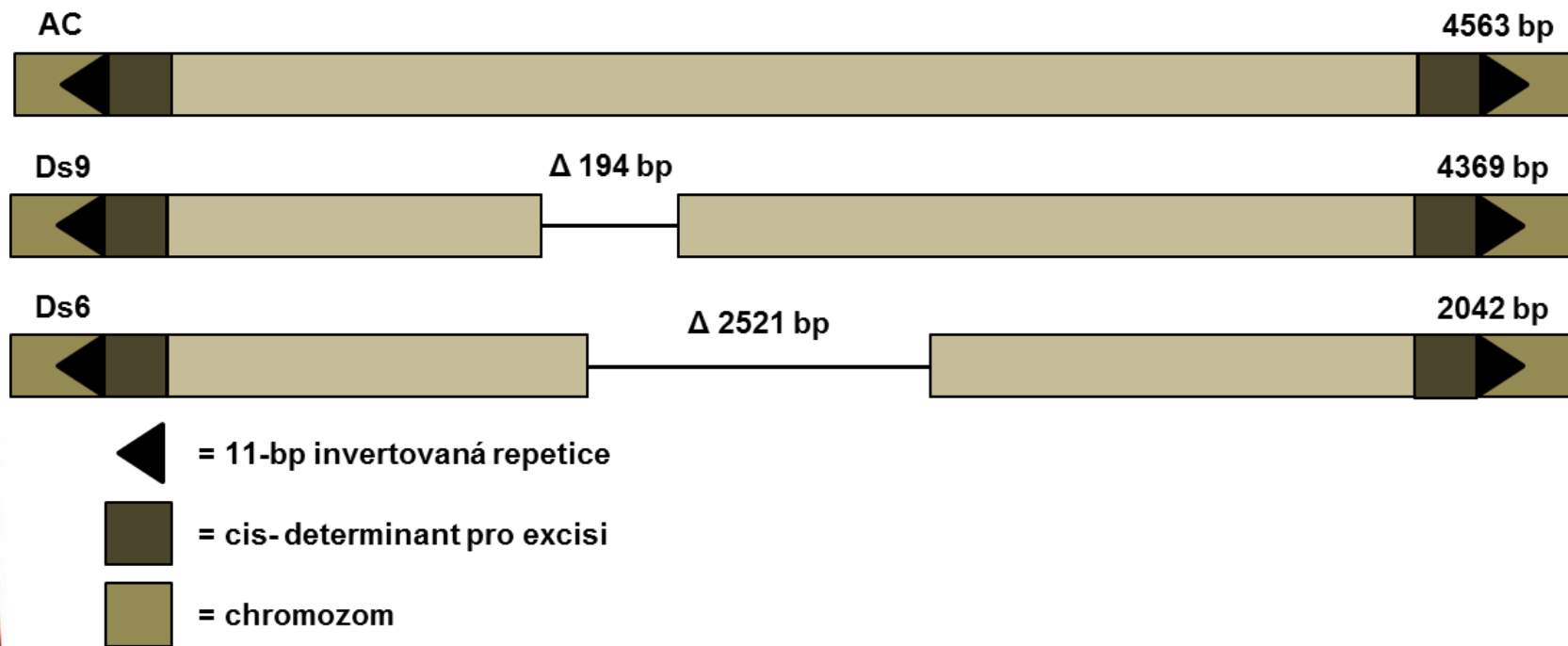
# Struktura elementů Ac a Ds u kukuřice



## Struktura elementu Ac u kukuřice

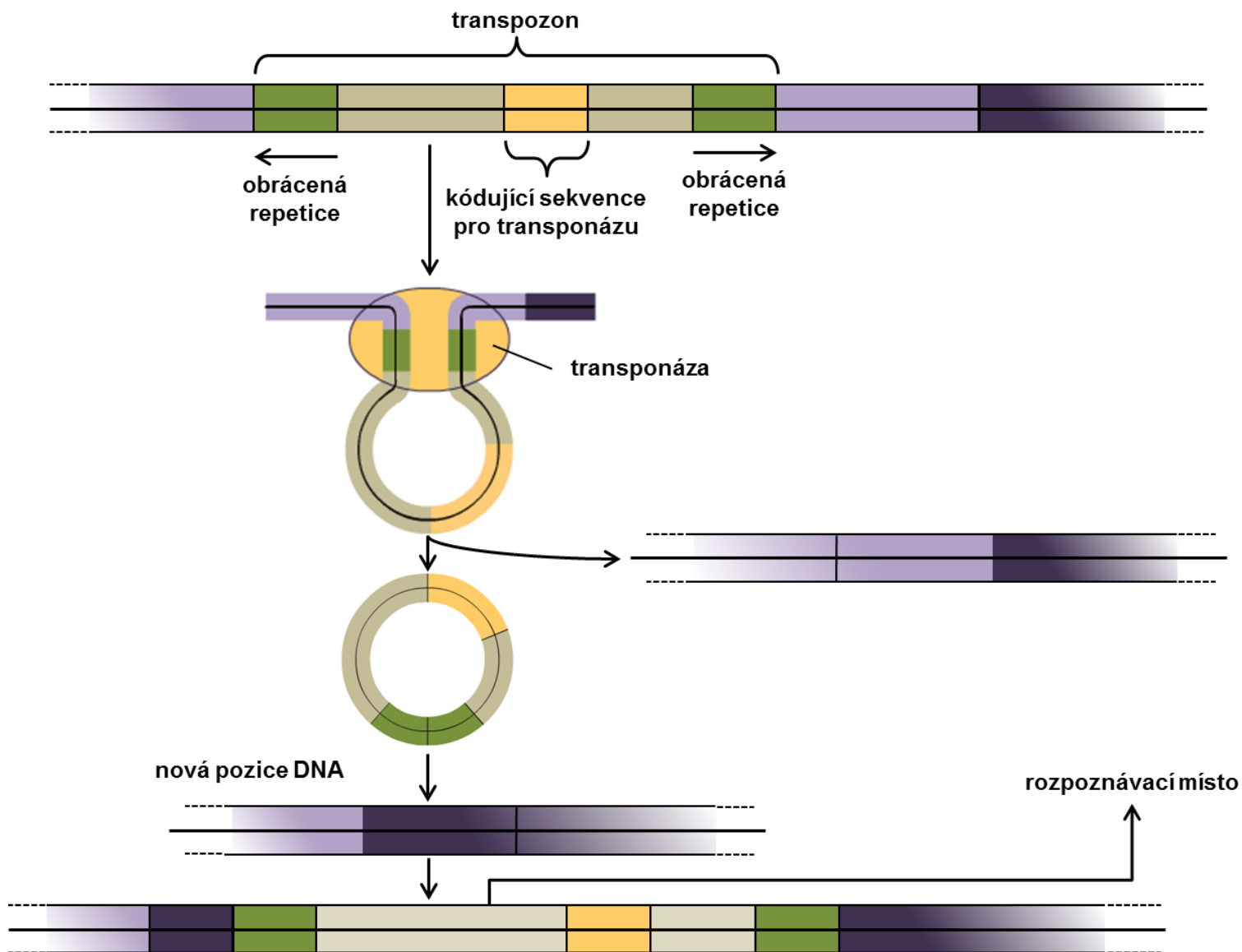


# Porovnání struktury elementu Ac s elementy Ds



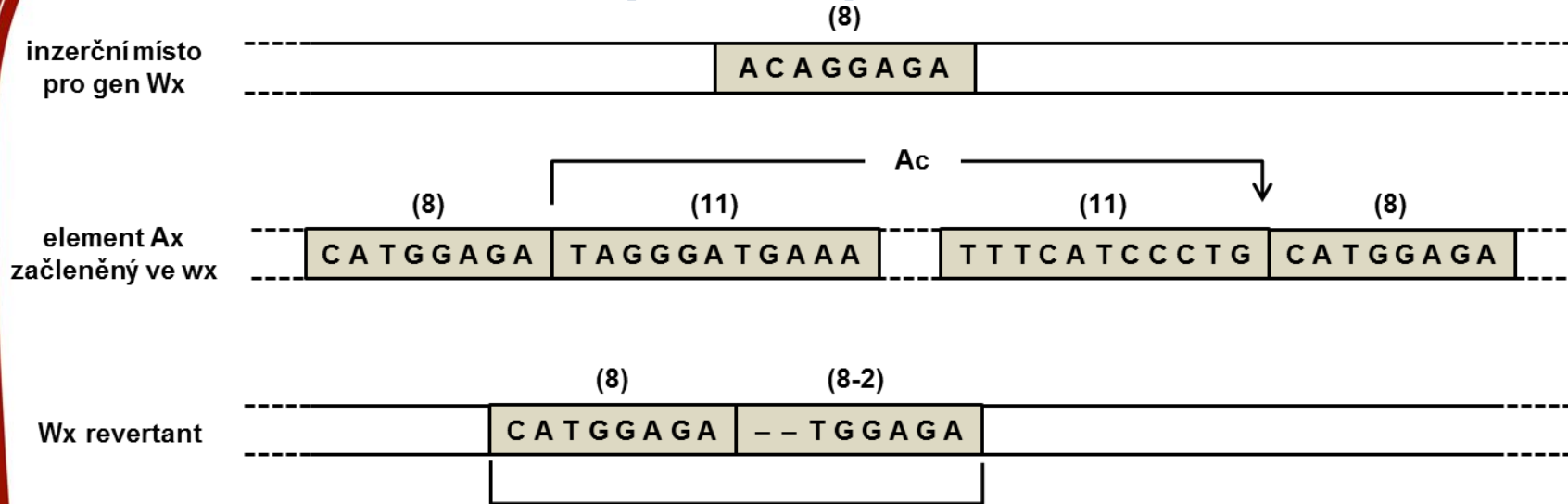


# Mechanismus transpozice



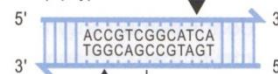
# Cílové inzerční místo v genu Wx

## Přítomnost duplikace po excizi elementu Ac

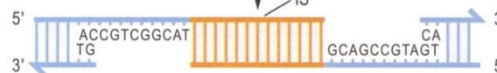


### neúplná duplikace

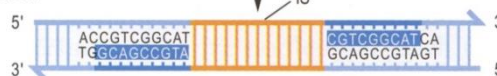
Oba řetězce cílové DNA jsou štěpeny v různých místech (šipky).



IS-element je začleněn do mezery vytvořené posunutými zlomy cílové DNA.



Mezery na obou stranách IS-elementu jsou zaplněny syntézou DNA, čímž se v cílovém místě vytvoří duplikované přímé sekvence.

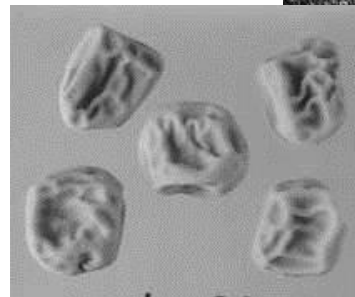
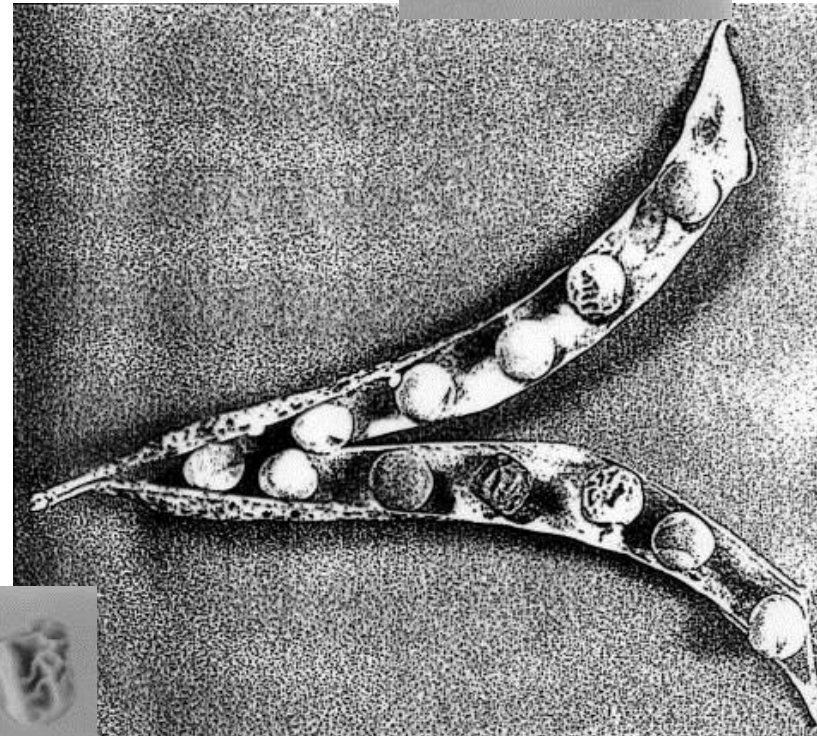
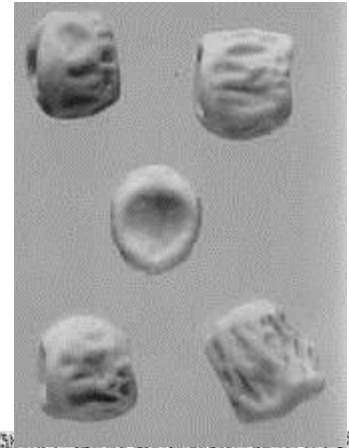


## Kukuřice *Zea mays*

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

## Hrách *Pisum sativum*

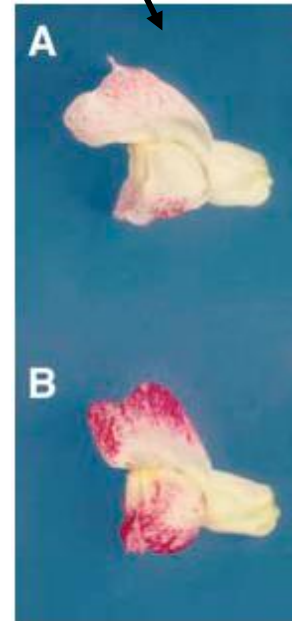
- Gen *RUGOSUS*
- Produkt genu enzym
- SBEI (Starch Branching Enzyme)





## 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*

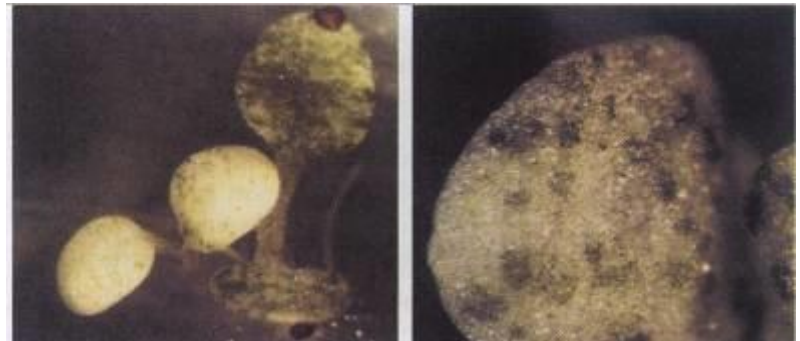


## Heterologní transpozice

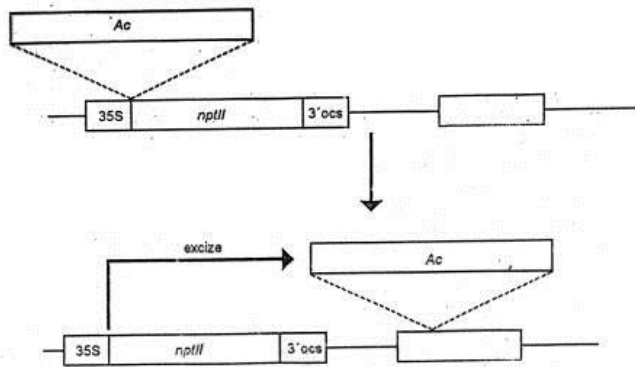
- *Arabidopsis*, rýže, tabák, rajče, petúnie, len, mrkev, brambor, sója

## Význam a využití transpozonů

- ➔ Transpozonová inzerční mutageneze
- ➔ Transpozonový tagging

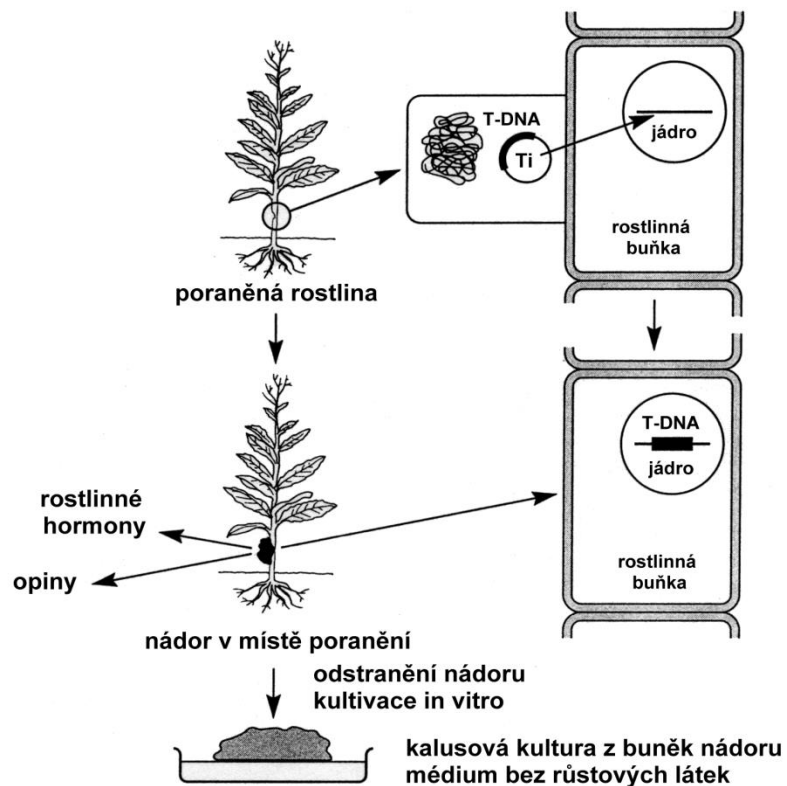
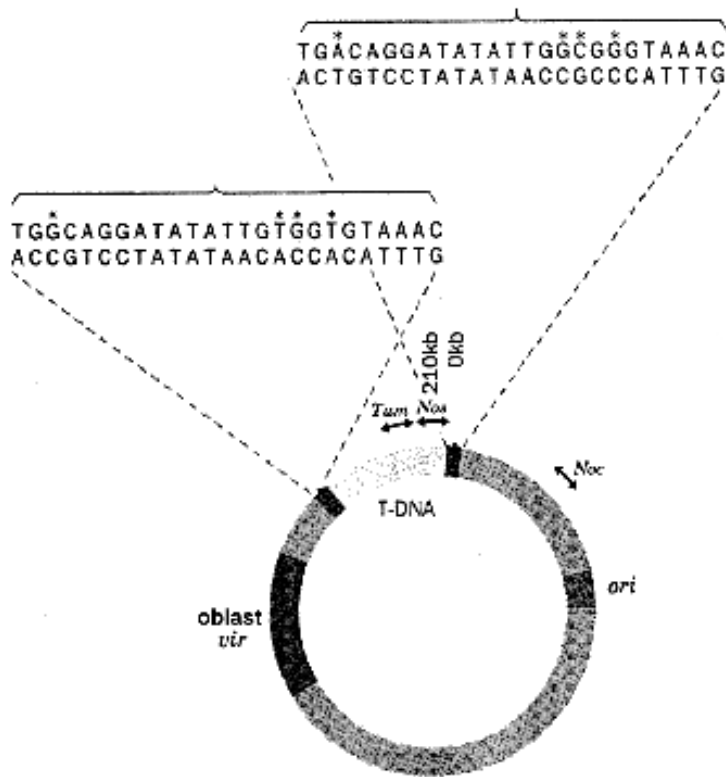


### Využití elementu Ac



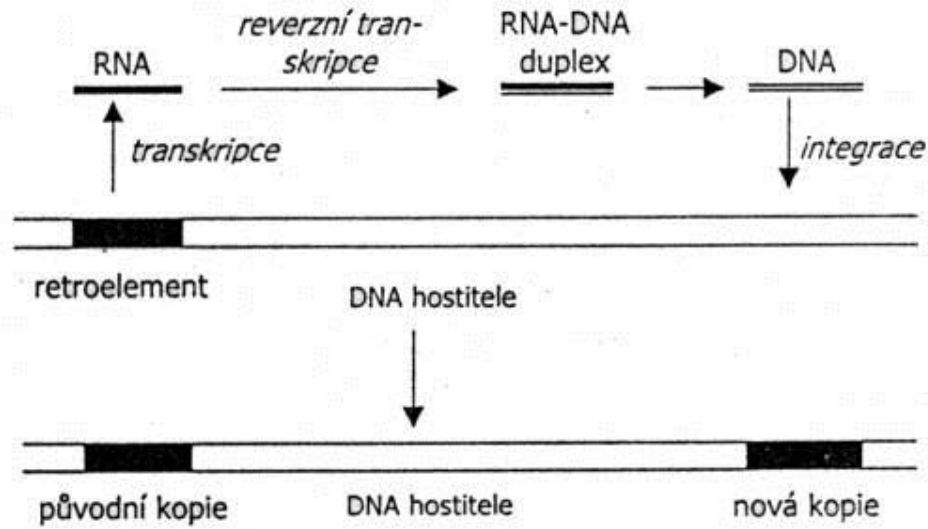
- ➔ Transformace *A. thaliana*
  - gen pro rezistenci k streptomycinu inaktivován Ac. Po somatickém vyčlenění Ac – aktivace genu – zelené sektory.

# Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens* a infekce rostlinné buňky

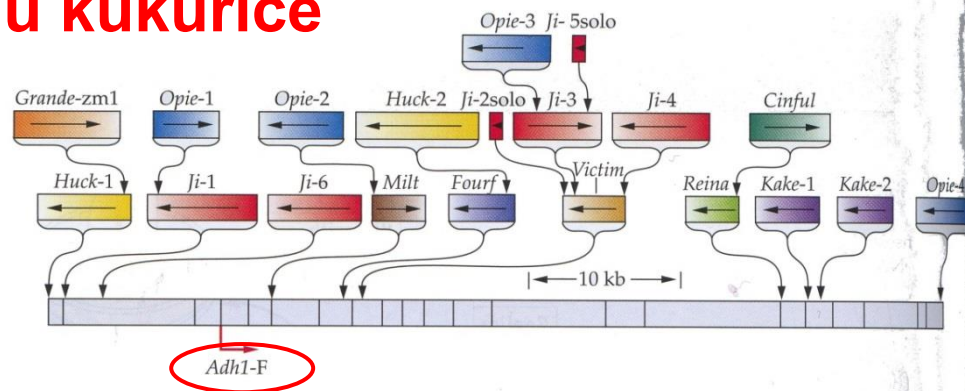


# Retroelementy

## Schéma retropozice



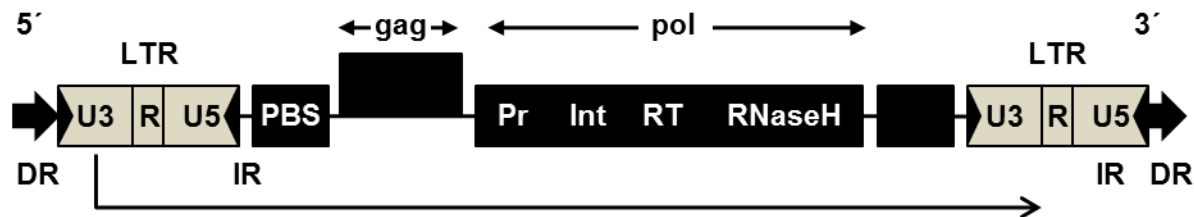
## Gen *Adh* u kukuřice



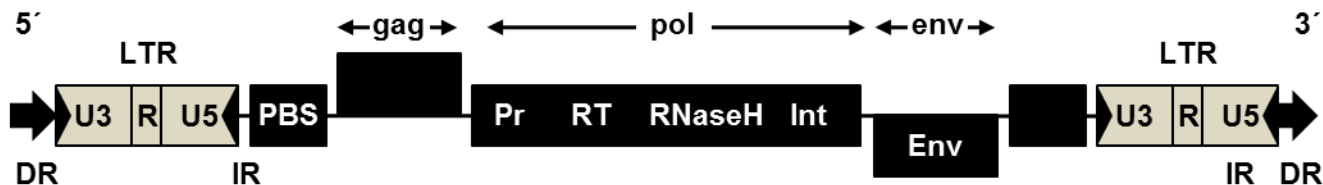


# Srovnání struktury jednotlivých skupin retroelementů

(a) Retrotranspozon Tyl-copia



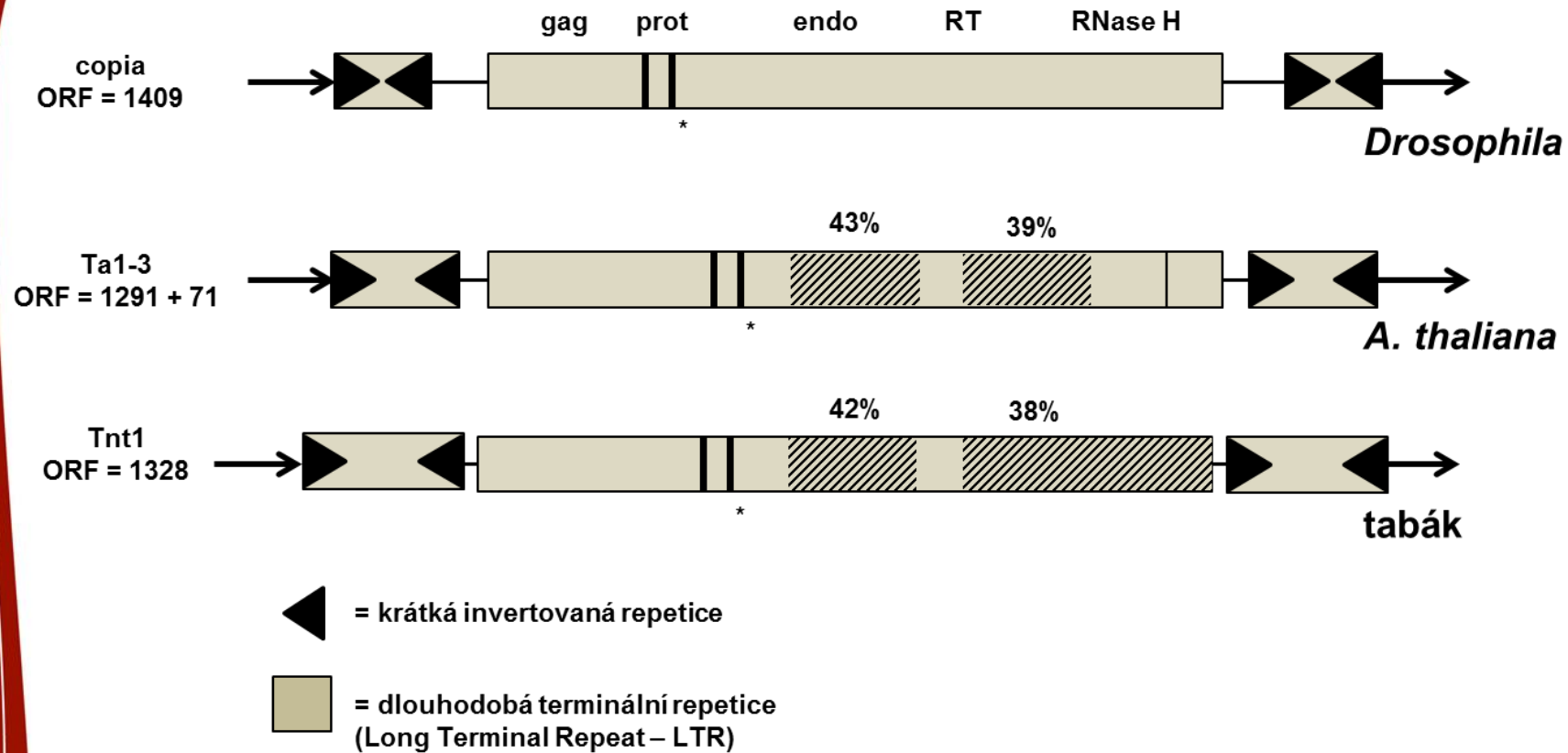
(b) Retrotranspozon gypsy a retroviry



(c) Retropozony bez LTR



# Struktura retrotranspozonů typu *copia*



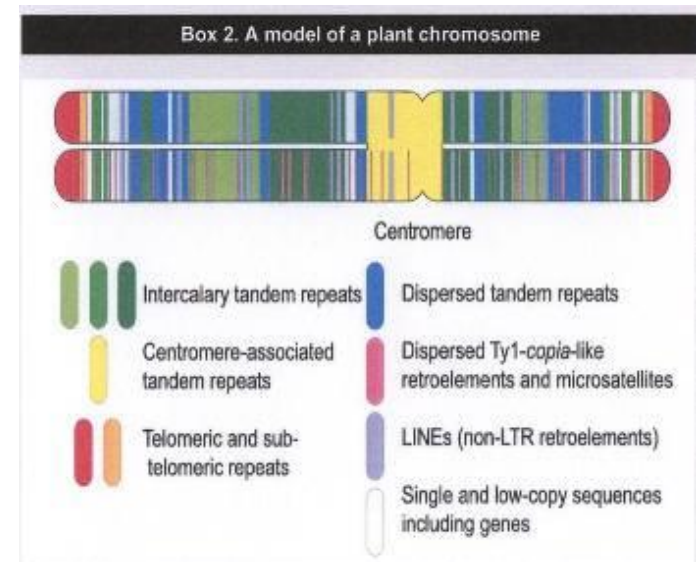
## Výskyt retrotranspozonů a retropozonů

### ➔ Výskyt retrotranspozonů

– Tabák	<i>Tnt1</i>	počet kopií 100
– Huseníček	<i>Ta1 copia</i>	100
– Kukuřice	<i>Ty1 copia</i>	100 tis. 50–80 % genomu
– Rýže	<i>Tos17</i>	
– Bob setý	<i>Ty1 copia</i>	1 mil.
– Hrách setý	<i>Ty3 gypsy</i>	5 tis.

### ➔ Výskyt retropozonů

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

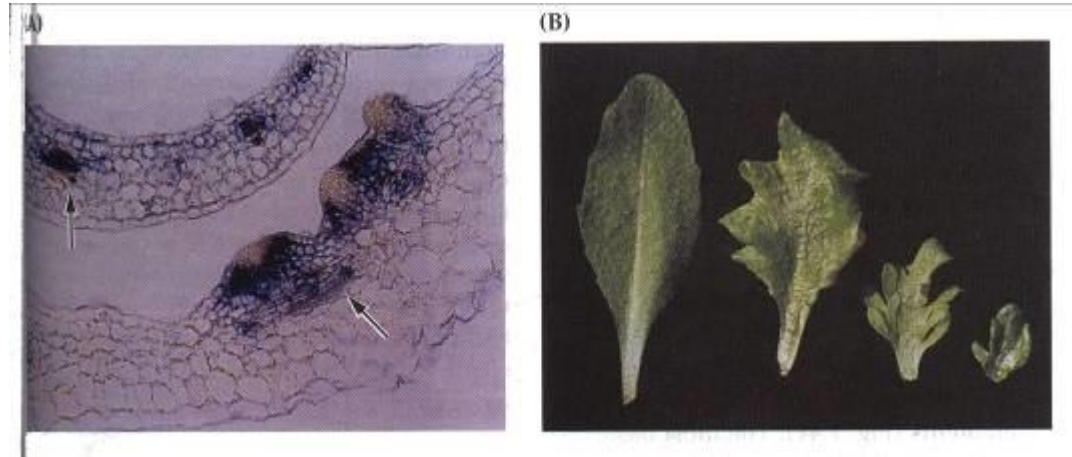


## Regulace exprese genů u rostlin

- ➔ **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

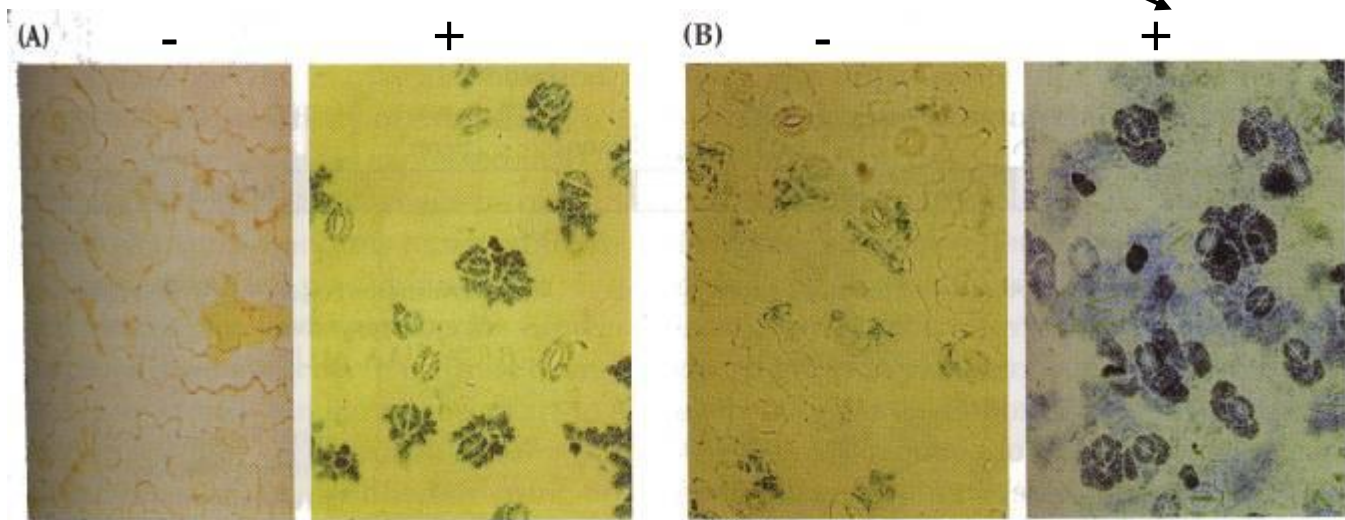
## Rostlinné hormony

- **Auxiny** – buněčné dělení, prodlužování a diferenciaci 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 klíčnicích rostlin, odpověď na poranění, zrání plodů

## Podněty z prostředí

- Charakterizace sekvencí potřebných pro expresi genu

- Reportér *GUS*
- Sucho**
**ABA**
- ↓
↘

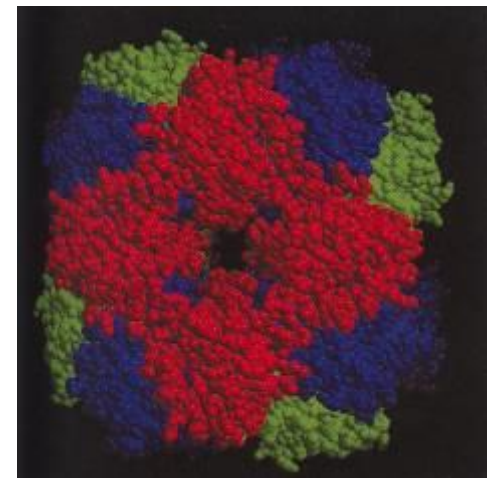


### Transgenní *A. thaliana*

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

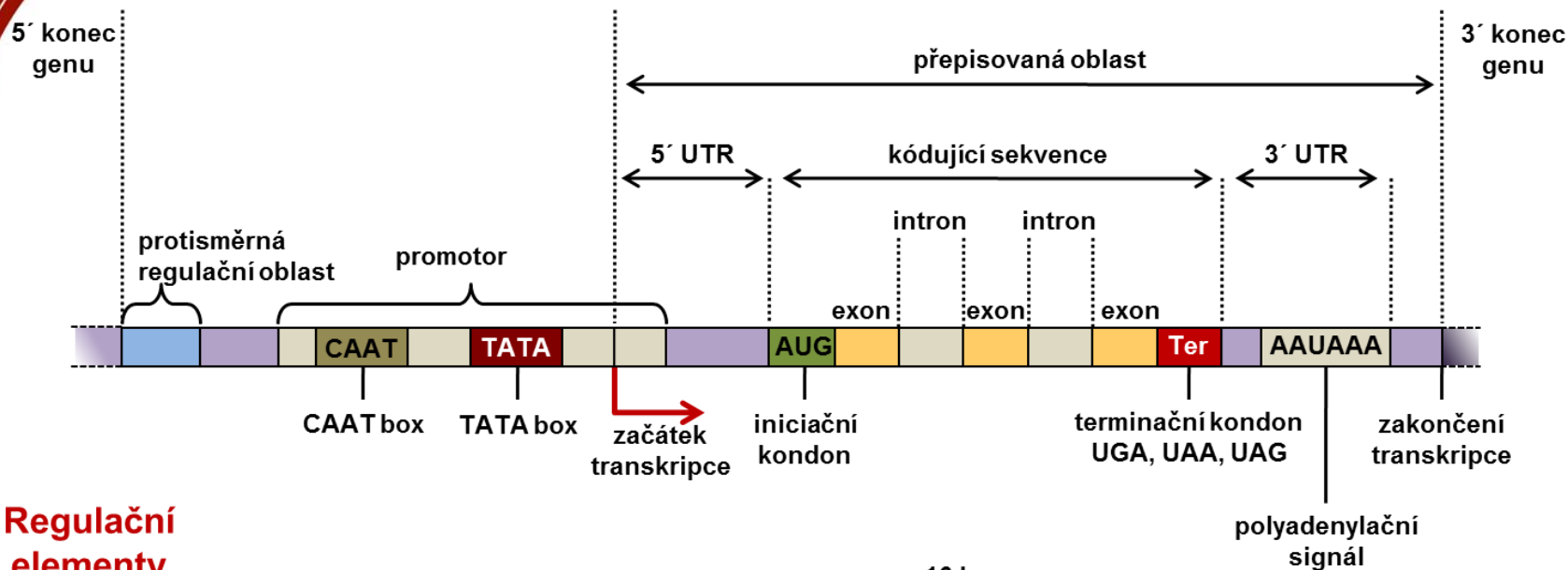
## Světlo

- ➔ **Funkce:** absorpce 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*

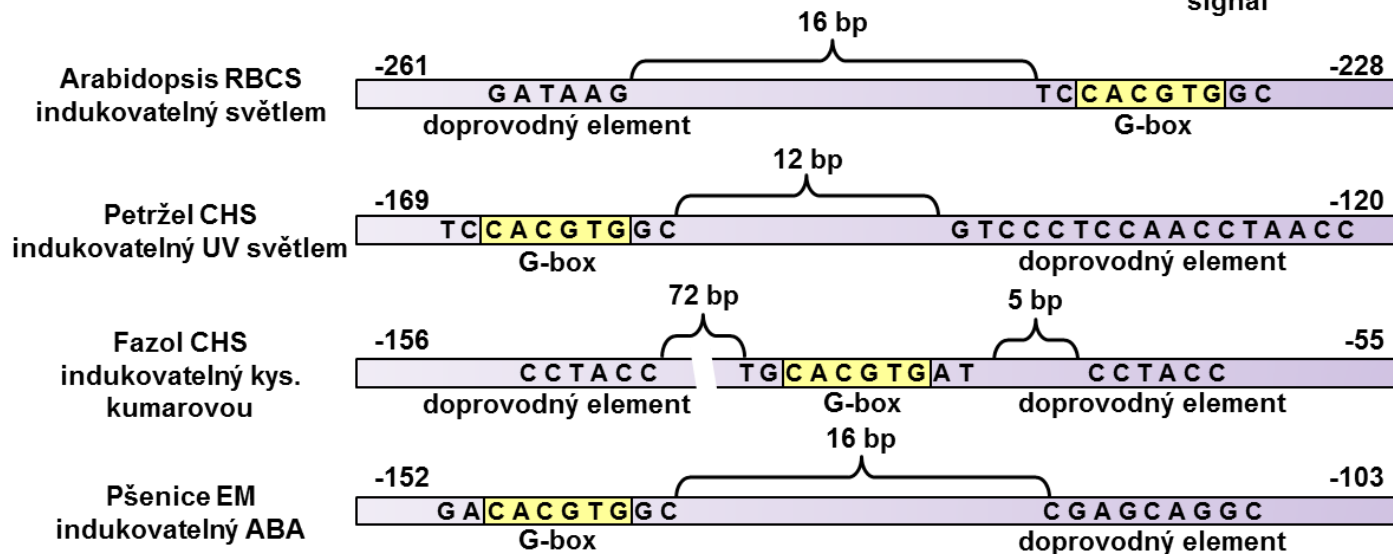




## Molekulární řízení transkripce genů

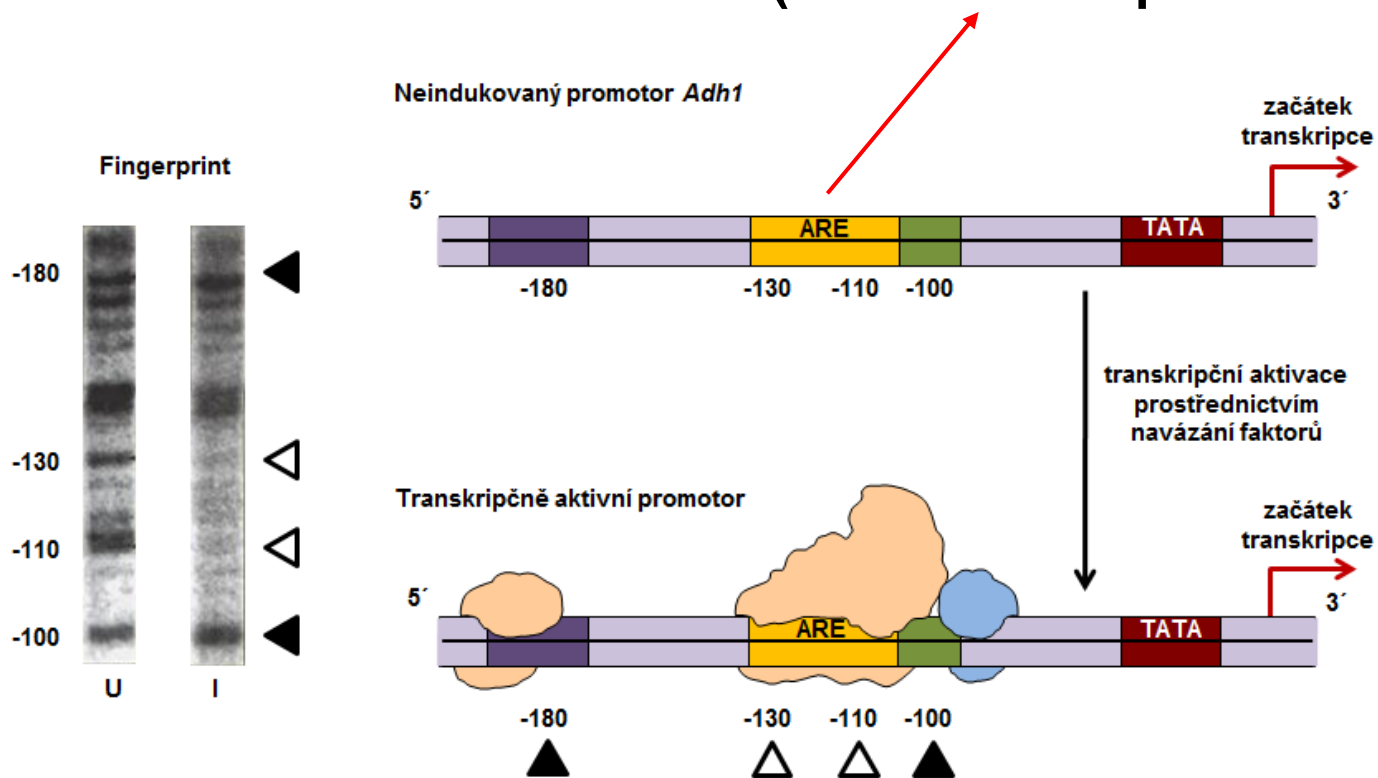


### Regulační elementy promotorů rostlin

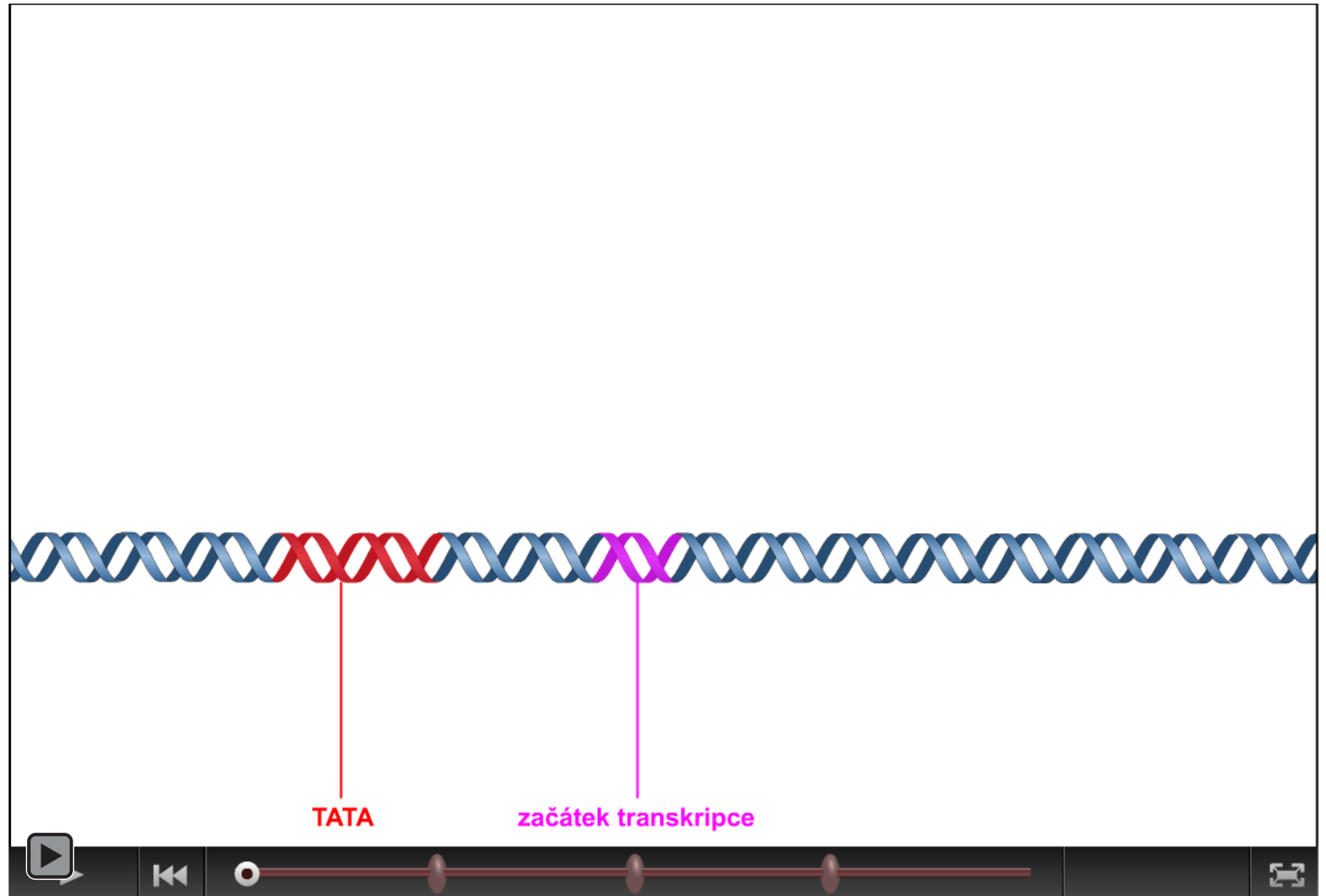


- Několik cis-elementů promotoru genu *Adh1* kukuřice
- Regulují transkripci genu jako odpověď na nedostatek kyslíku v prostředí

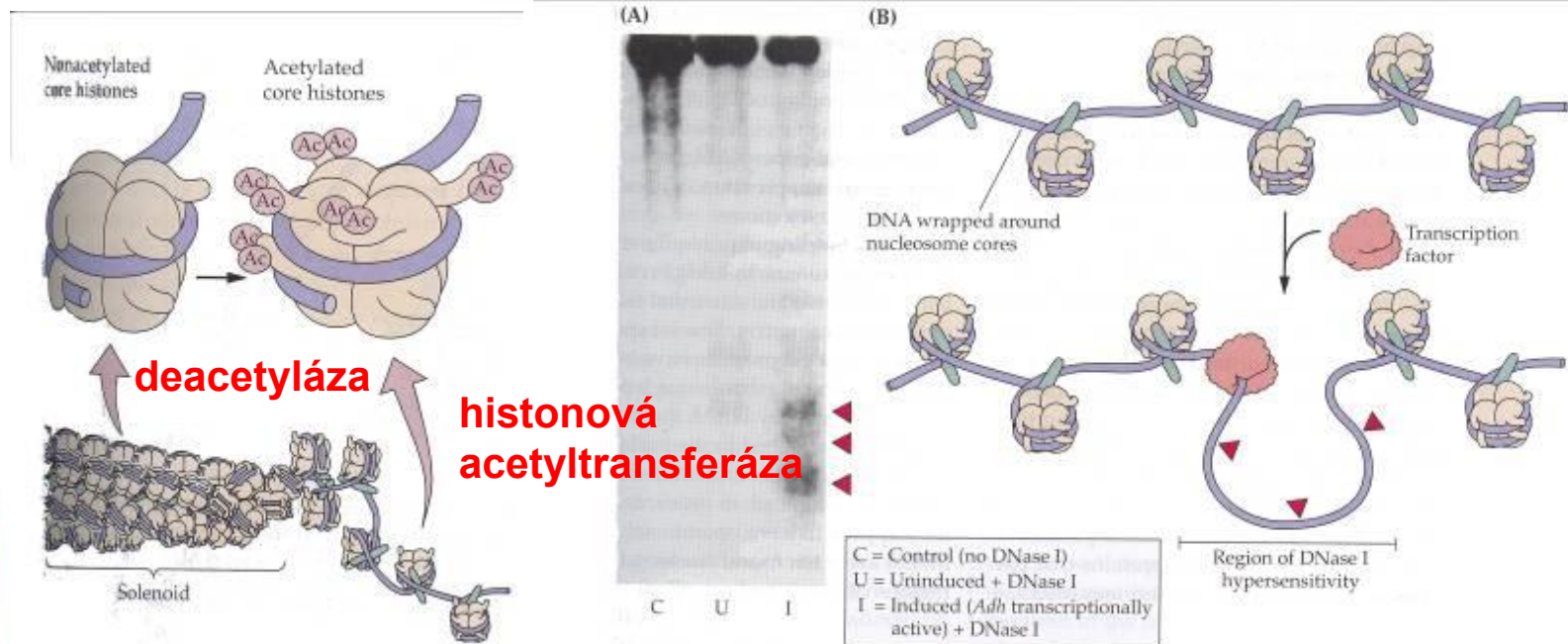
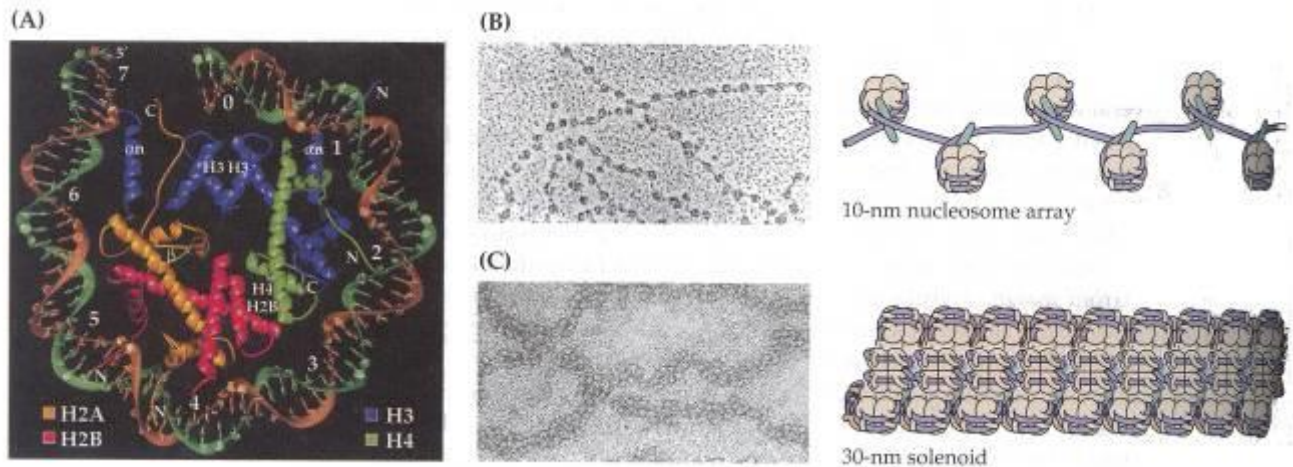
## Element ARE (anaerobic response element)



# Transkripční faktory



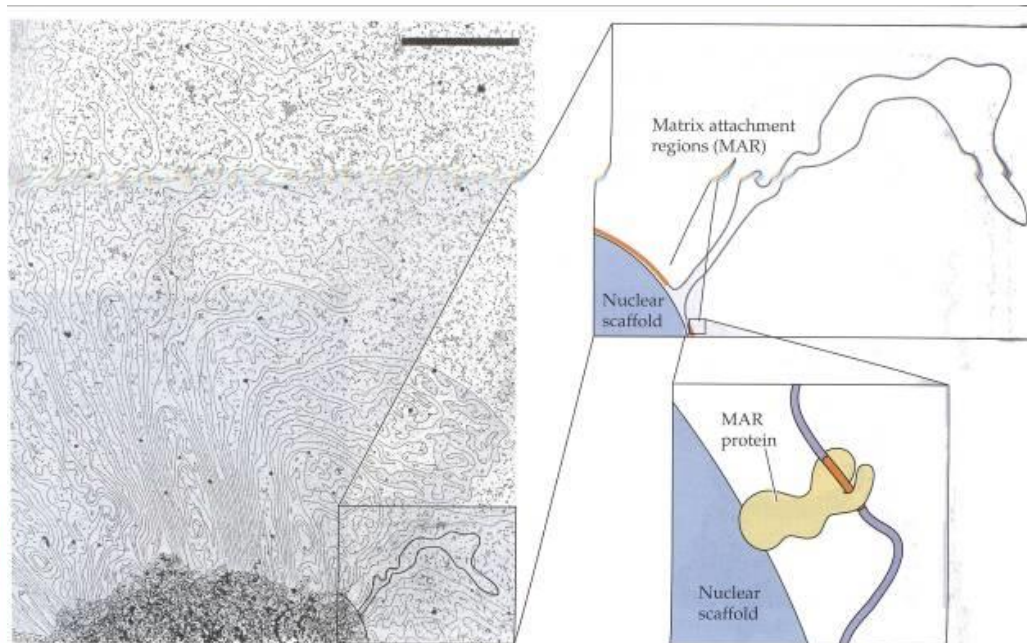
## Funkce chromatinu v genové expresi



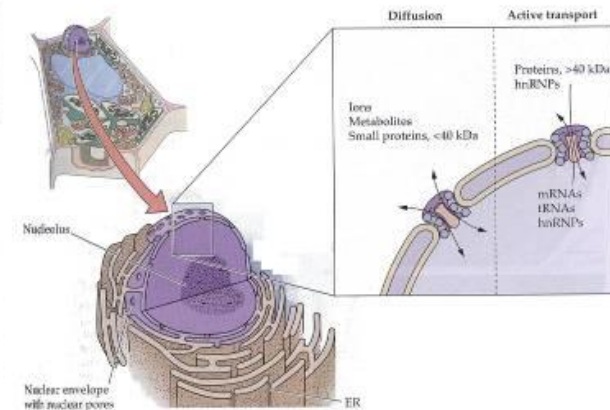


## Matrix attachment regions

- 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



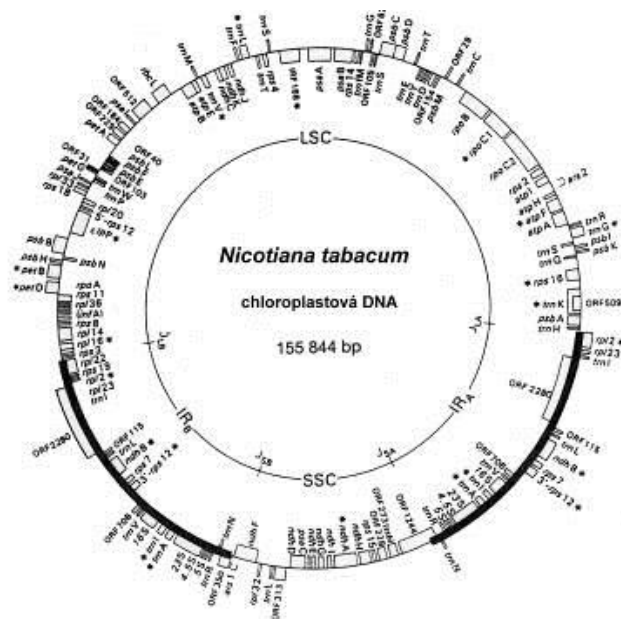
MAR obklopují kódující oblasti genů, jsou spojeny s regulačními elementy



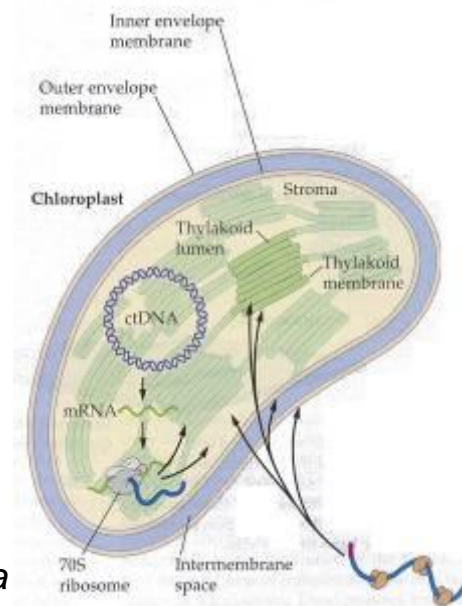
# Mimojaderný genom

## Chloroplastová DNA (cpDNA)

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

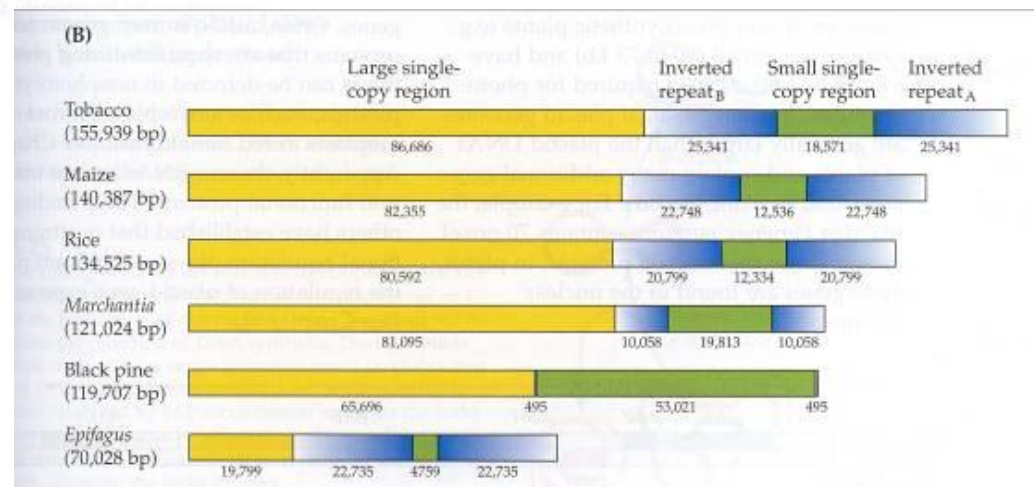
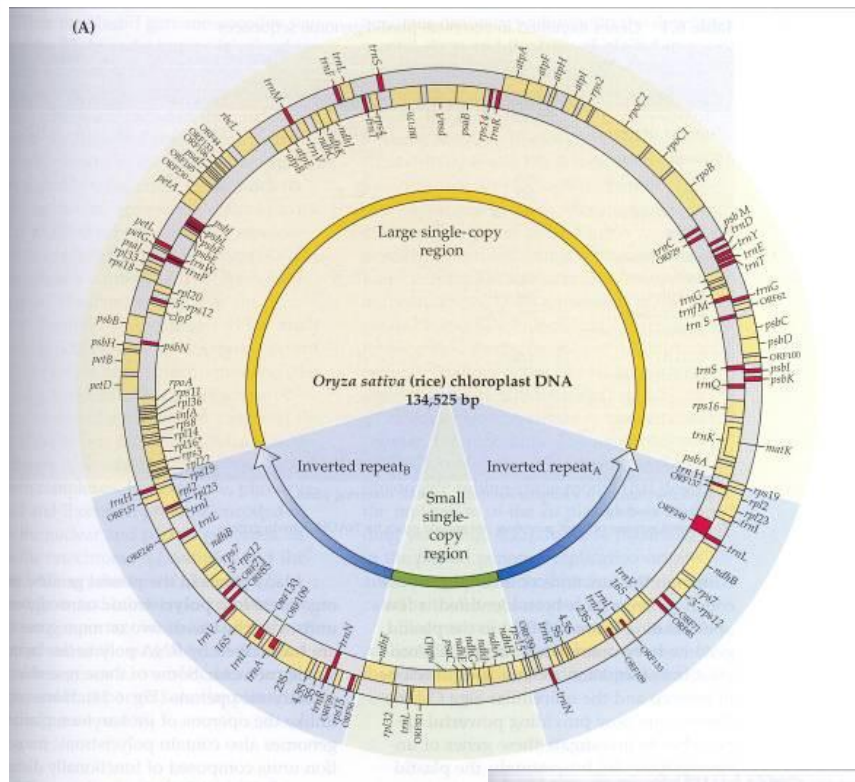


- Sekvenovaná cpDNA
  - *Nicotiana tabacum*
  - *Marchantia polymorpha* (porostnice mnohotvárná)
  - *Oryza sativa*
  - *Triticum aestivum*
  - *Zea mays*
  - *Pinus thumbergii*
  - *Spinacia oleracea*
  - *Medicago truncatula*
  - *Lotus japonicus*





## Epifagus



# Organizace cpDNA

**Table 6.1** Genes identified in complete plastid genome sequences

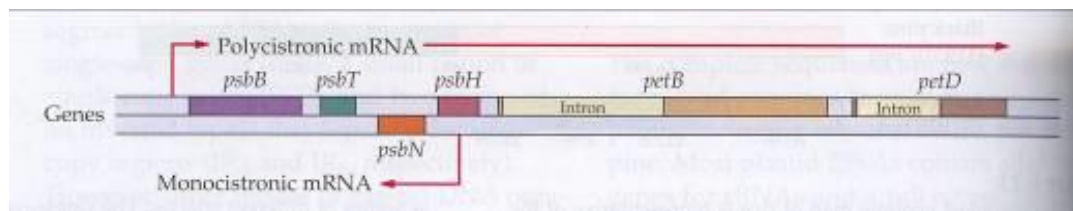
Gene products	Gene acronym	Plants		Algae	
		Photosynthetic plants	<i>Epifagus</i> <sup>a</sup>	<i>Euglena</i>	<i>Porphyra</i> <sup>b</sup>
Number of genes		101-150	40	82	182
Genetic system					
rRNA	<i>rrn</i>	4	4	3	3
tRNA	<i>trn</i>	30-32	17	27	35
Ribosomal protein	<i>rps, rpl</i>	20-21	15	21	46
Other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

<sup>a</sup>*Epifagus* (beechdrops) is a nonphotosynthetic, parasitic flowering plant.

<sup>b</sup>*Porphyra* is a red alga.

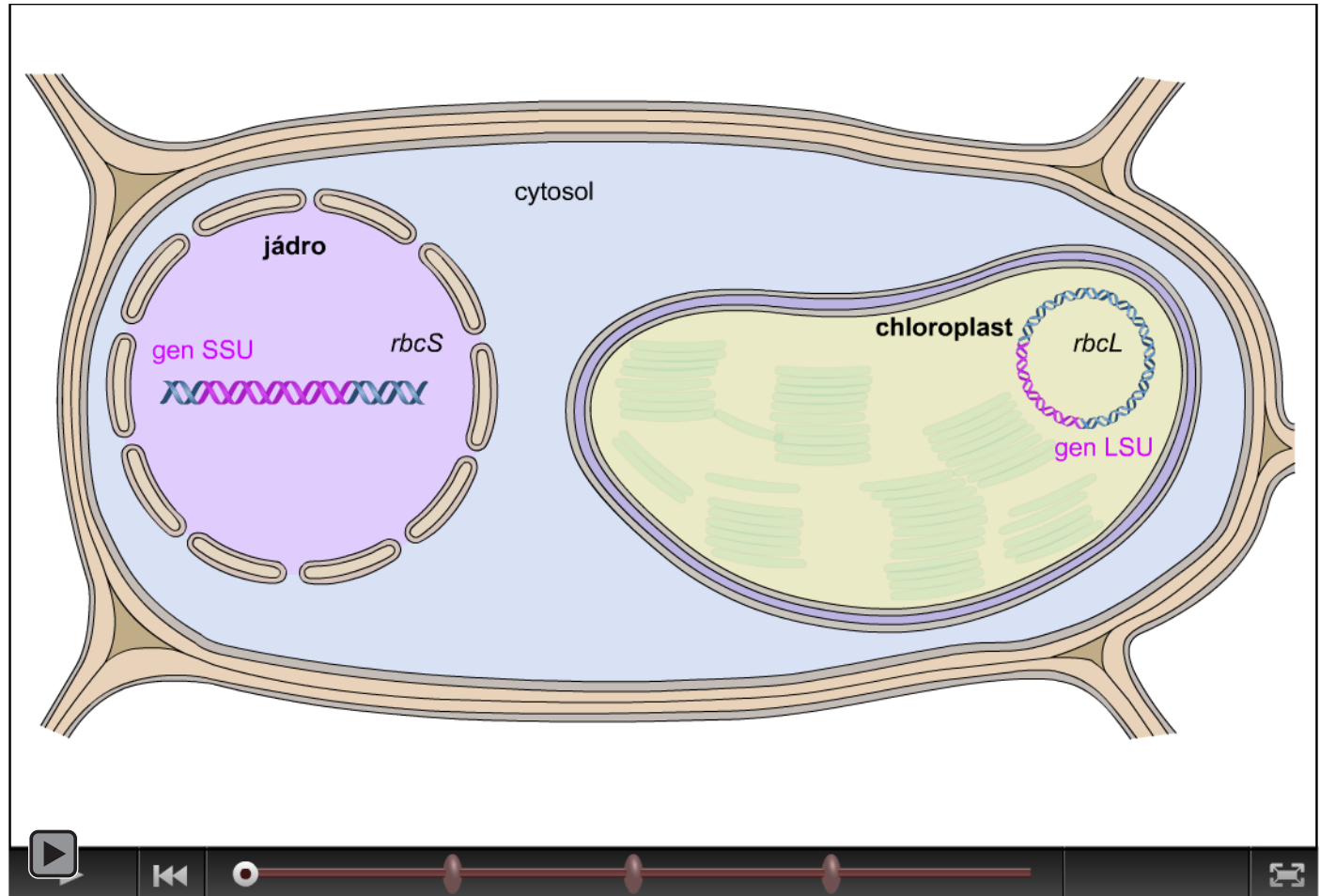
<sup>c</sup>The plastid genome of black pine does not encode genes for NADH dehydrogenase.

- ➔ Uspořádání genů chloroplastového operonu a transkripce



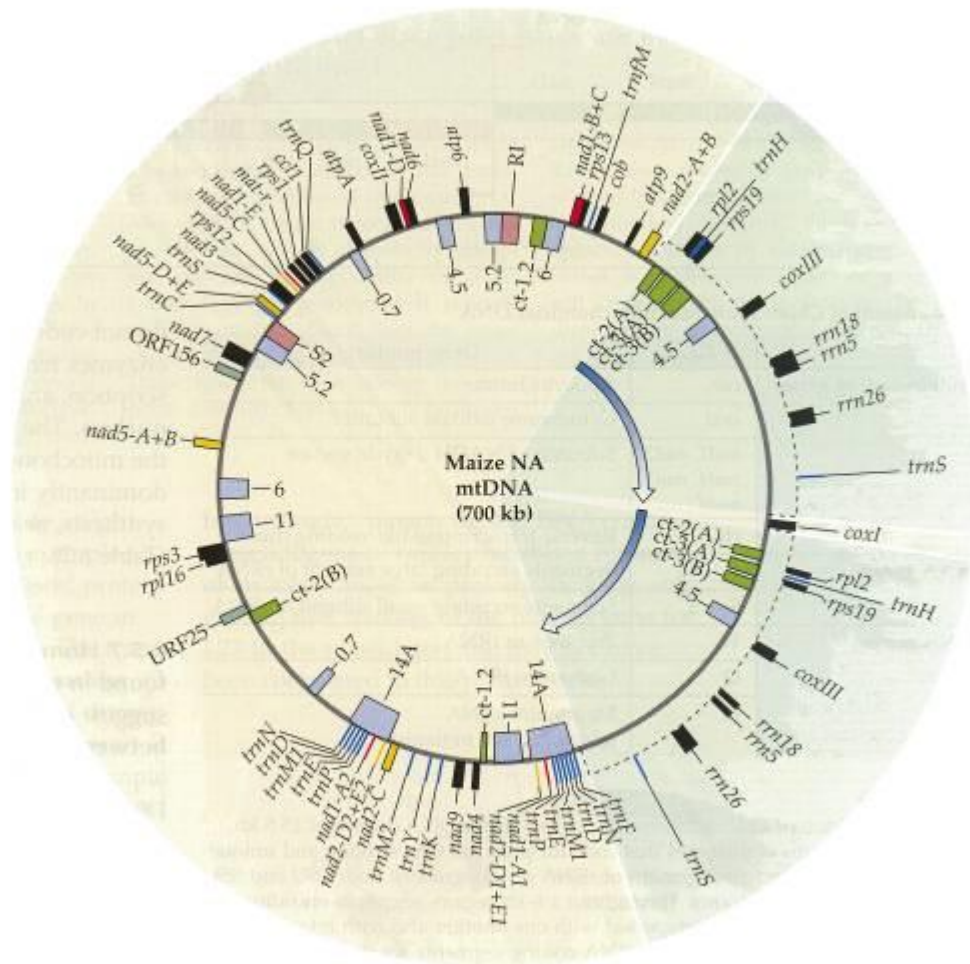


# Koordinace buněčných kompartmentů



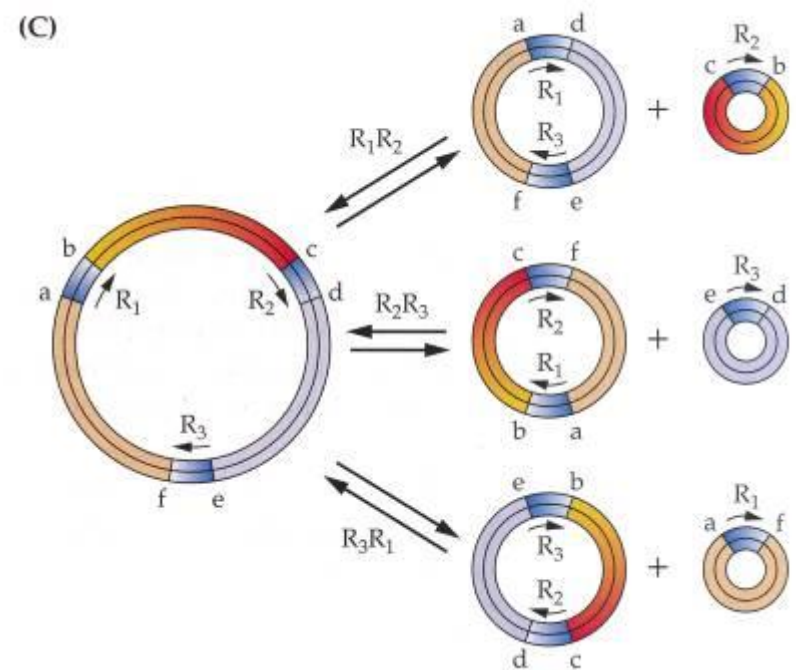
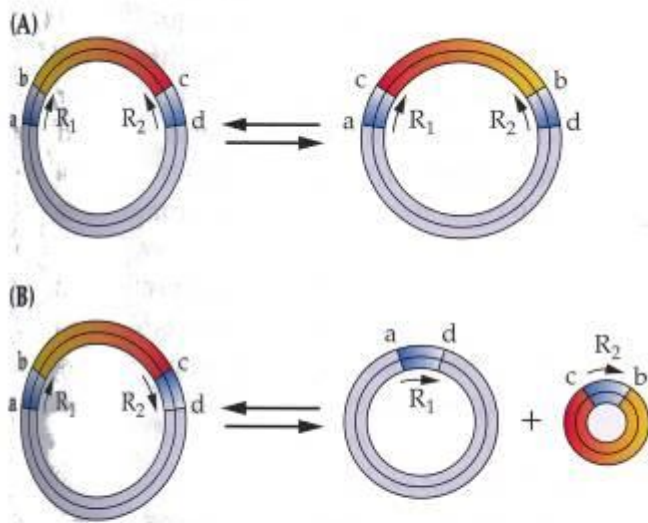
## Mitochondriální DNA (mt DNA)

- ➔ Několik subgenomových kružnicových struktur
- ➔ Velikost
- ➔ Lokalizace
- ➔ Struktura



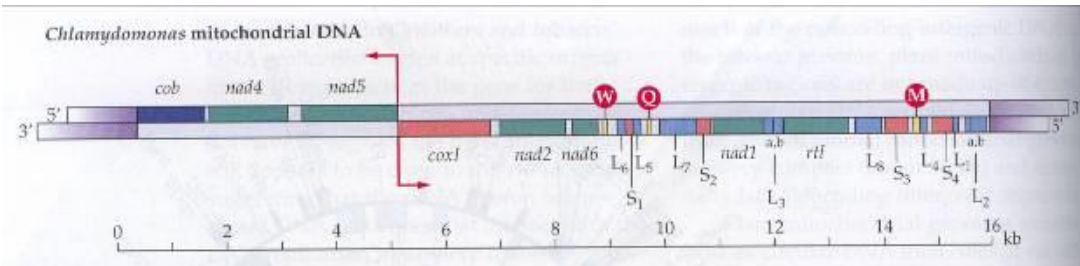
# Subgenomové struktury a jejich tvorba

➔ Tři typy tvorby subgenomových struktur





## Geny mt genomu



Gene content of *Chlamydomonas* mitochondrial DNA

	Gene	Gene product
Protein-coding genes	<i>cob</i>	Apocytochrome
	<i>coxI</i>	Cytochrome oxidase subunit I
	<i>nad1, nad2, nad4, nad5, nad6</i>	Subunits of NADH dehydrogenase
	<i>rnl</i>	Reverse transcriptase-like reading frame
	rRNA genes	<i>L<sub>1</sub> - L<sub>8</sub></i>
	<i>S<sub>1</sub> - S<sub>4</sub></i>	Segments encoding small subunit of rRNA
tRNA genes	W	Tryptophan tRNA
	Q	Glutamine tRNA
	M	Methionine tRNA (elongator, not initiator)

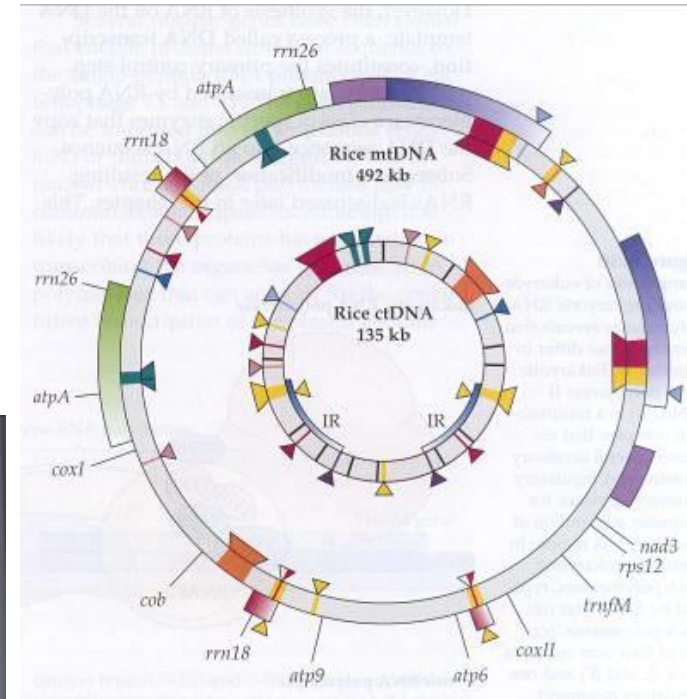
Table 6.2 Types of genes identified in the maize mitochondrial genome

Gene products	Gene abbreviations	Function
rRNAs	<i>rrn18, rrn26, rrn5</i>	Protein synthesis
tRNAs	<i>trn</i>	Protein synthesis
Ribosomal proteins	<i>rps, rpl</i>	Protein synthesis
NADH dehydrogenase	<i>nad</i>	Respiratory electron transport
Cytochrome c oxidase	<i>cox</i>	Respiratory electron transport
Apocytochrome	<i>cob</i>	Respiratory electron transport
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase proteins	<i>atp</i>	ATP synthesis

➤ První osekvenovaná mt DNA

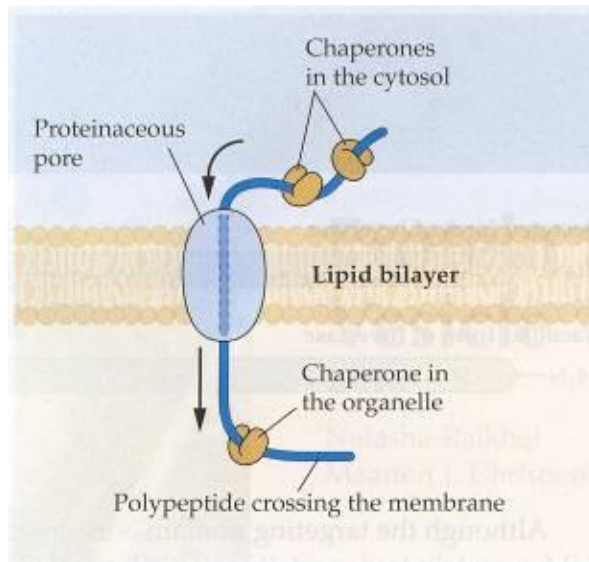
➤ Rýže

- cp DNA
- mt DNA

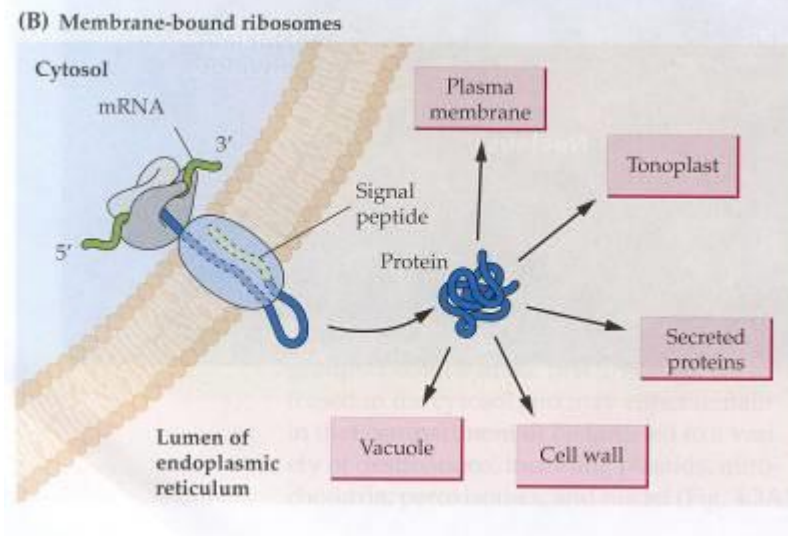
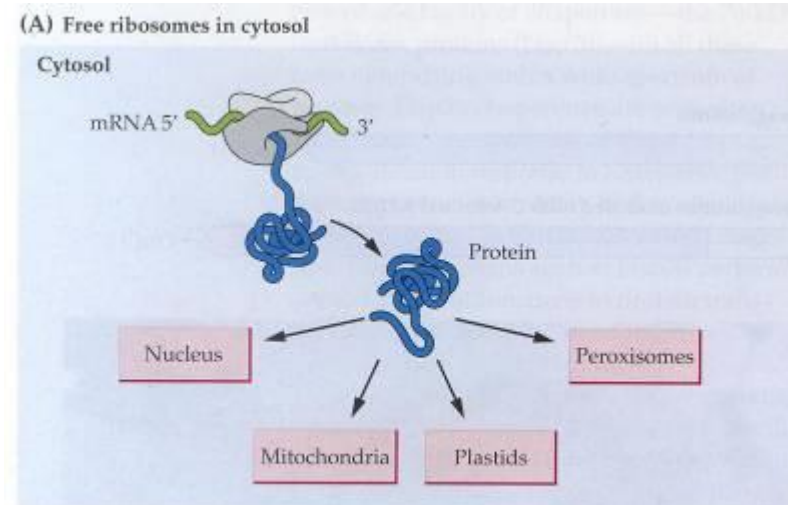




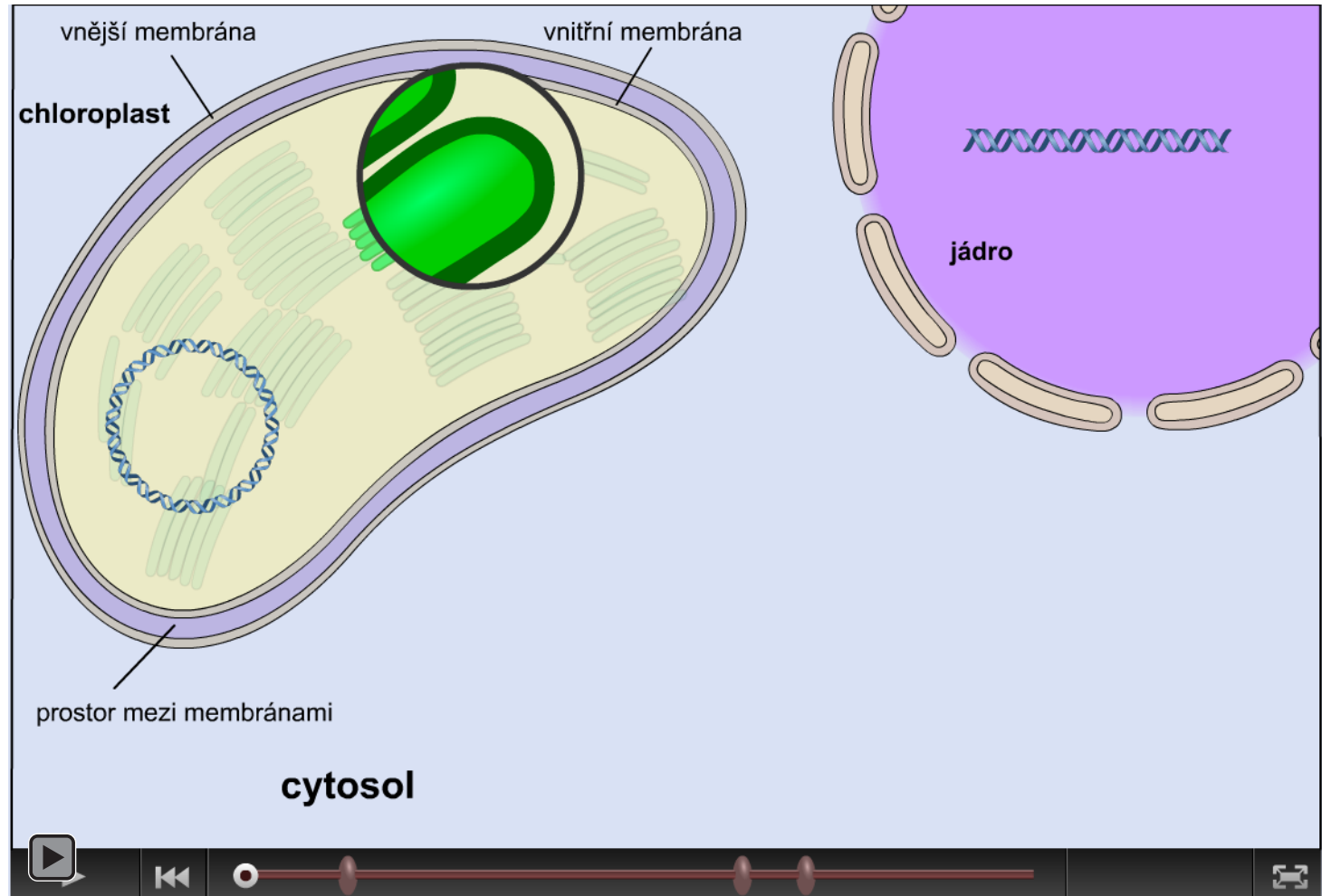
## Transport proteinů do organel



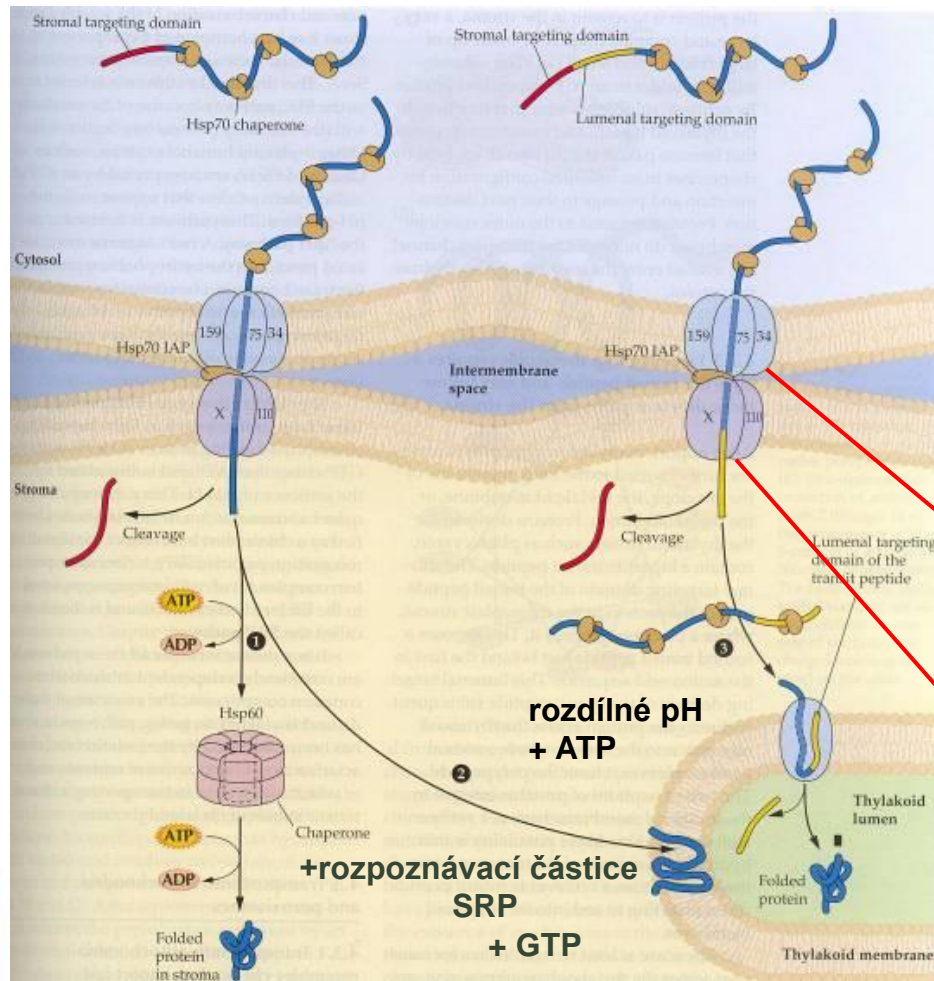
- Transport proteinů přes lipidické dvojvrstvy umožňují chaperony.
- Vážou polypeptidy a transportují je přes póry v cytoplazmatické membráně.
- Udržují proteiny v rozmotaném stavu na jedné straně membrány a pomáhají jim vytvářet prostorovou strukturu na straně druhé.



# Proteiny kódované cpDNA i jadernými geny a transport v rámci chloroplastů



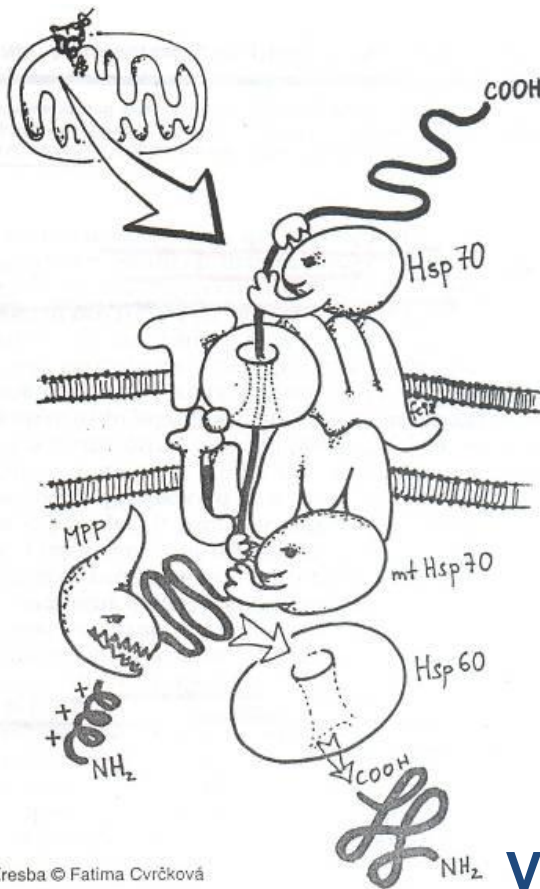
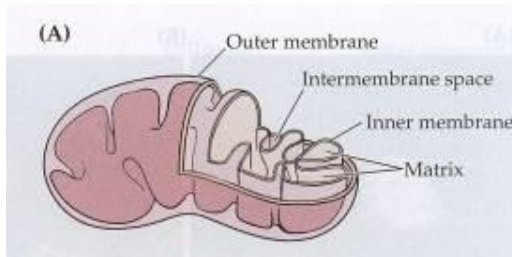
## Mechanismus transportu proteinů z cytoplazmy do chloroplastů



- 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*



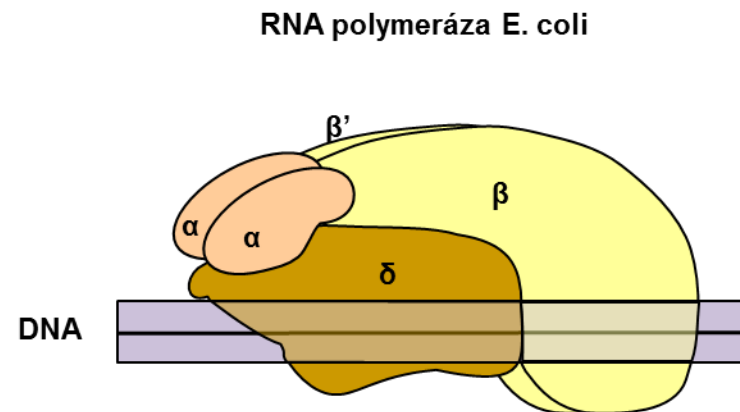
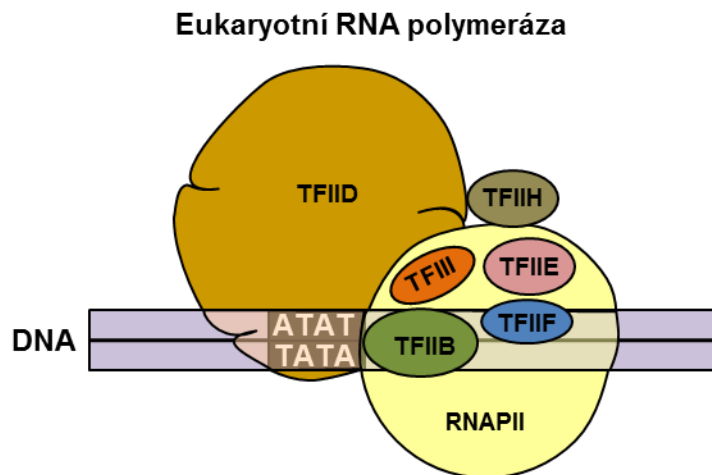
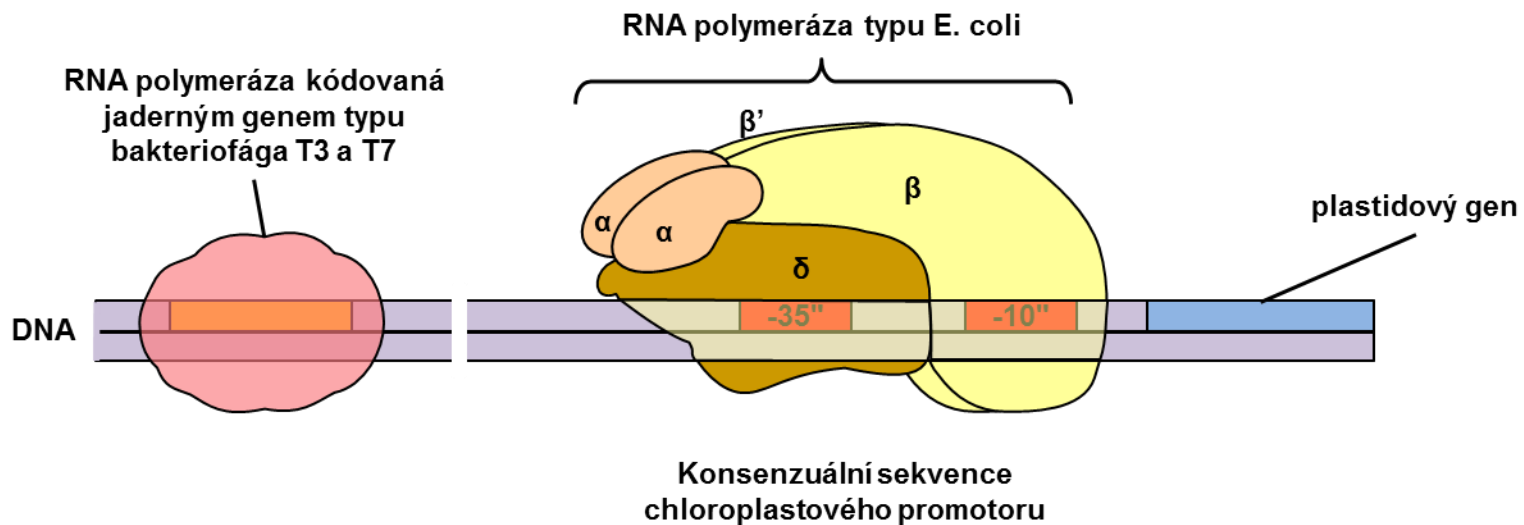
# Transport proteinů do mitochondrií



- 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



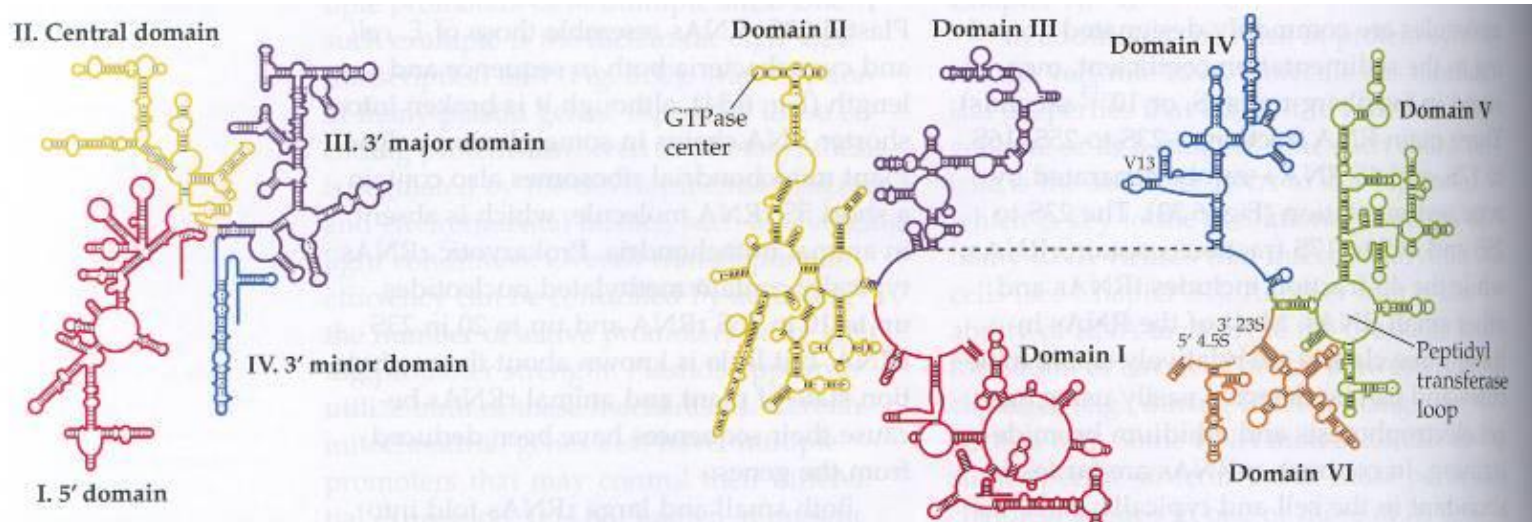
# Srovnání chloroplastové RNA polymerázy eukaryot a prokaryot



# rRNA chloroplastů

## Sekundární struktura rRNA v chloroplastech tabáku

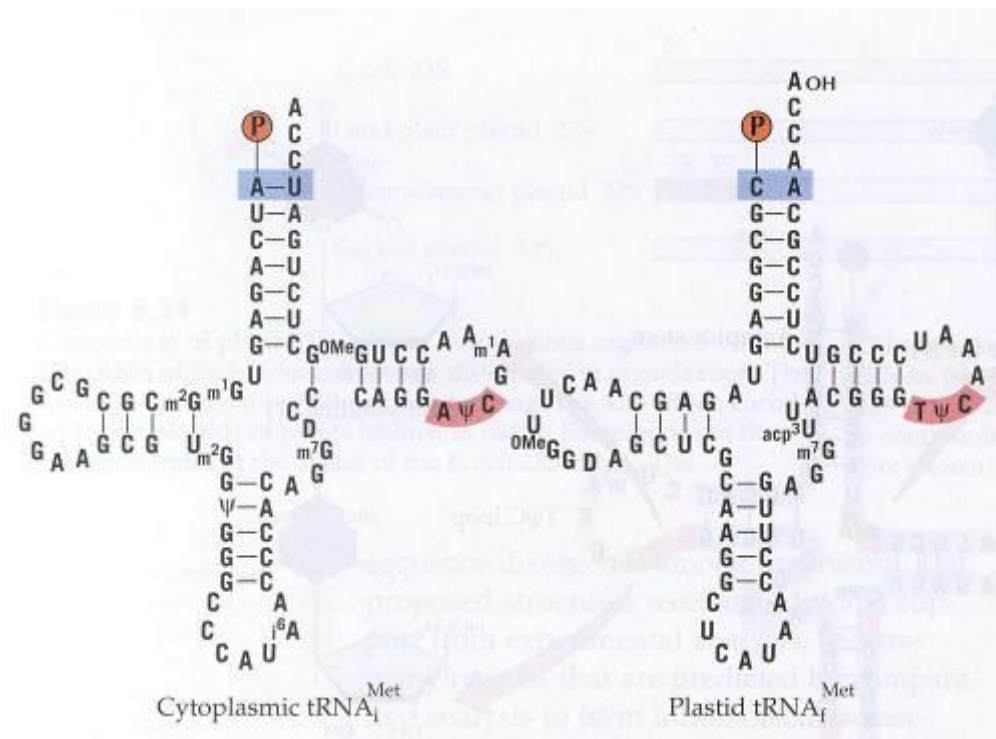
- Menší podjednotka ribozomů
- Větší podjednotka ribozomů
- 16S rRNA se 4 doménami
- 23S a 4,5S rRNA se 6 doménami; doména V je místem pro tRNA k podjednotce 50S



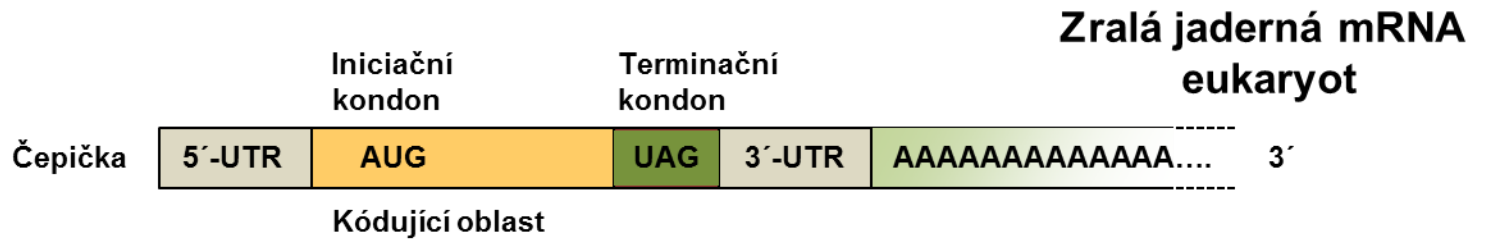
## tRNA chloroplastů

➔ Cytoplazmatická tRNA<sup>Met</sup> fazolu

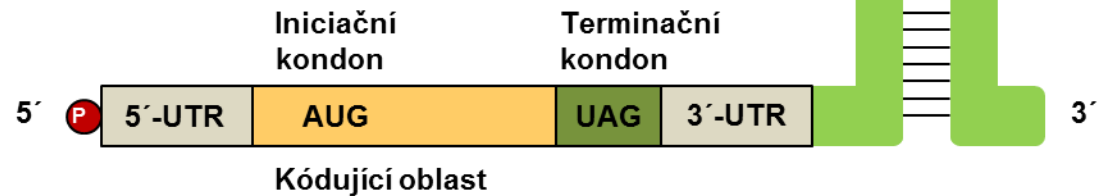
➔ Chloroplastová tRNA<sup>Met</sup>



# Zralá chloroplastová mRNA



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





# Genomika rostlin

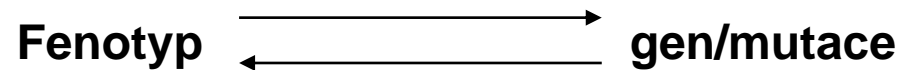
## Funkce genů

### ➔ Funkční genomika

- Projekt „Arabidopsis 2010 Program“ 2001–2010
- Plant Physiology, June 2002, Vol. 129, pp. 394-437,  
[www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)
- Nástroje studia funkcí rostlinných genů

# Nástroje funkční genomiky

## Mutagenese



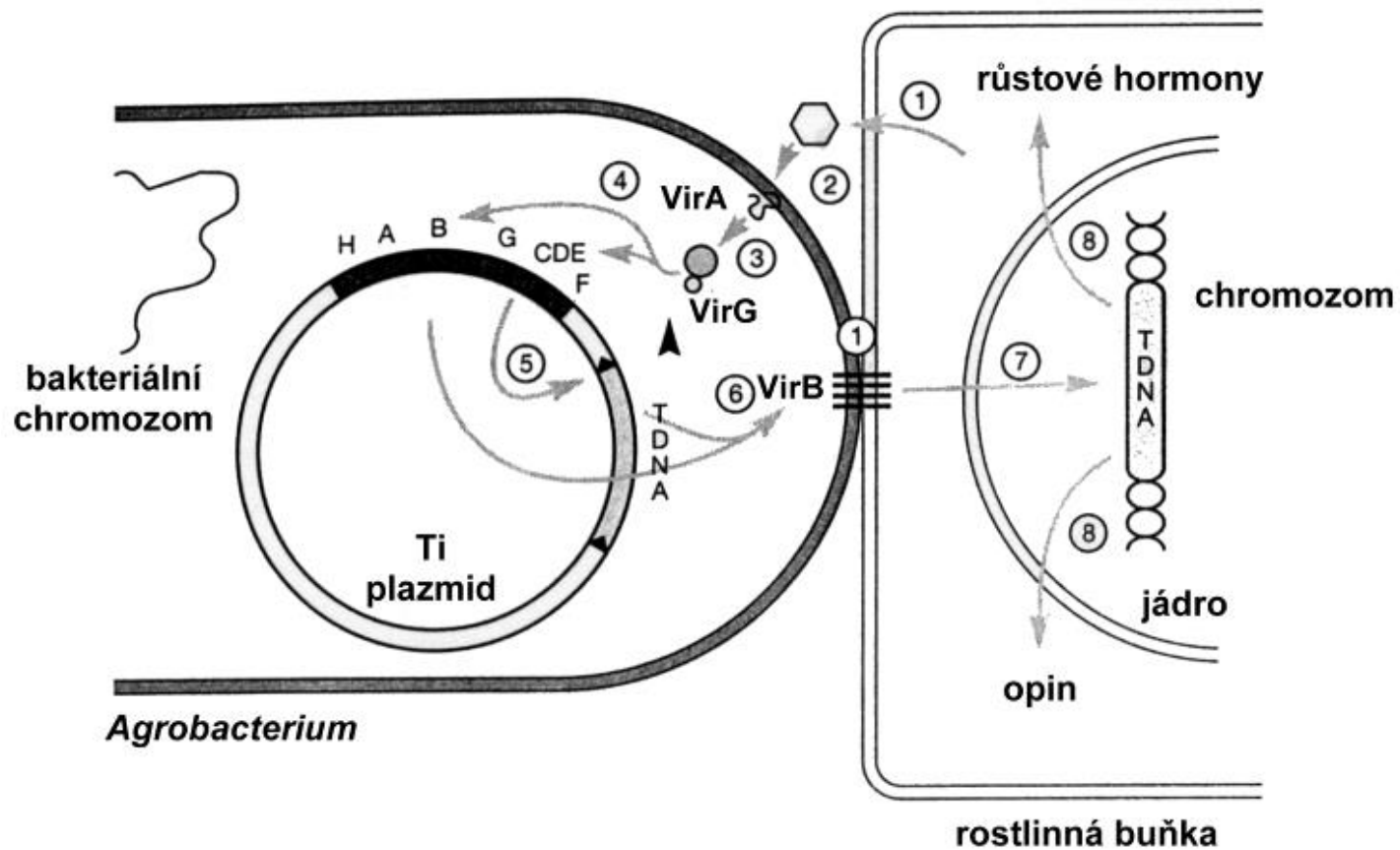
### ➔ Typy mutagenů

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

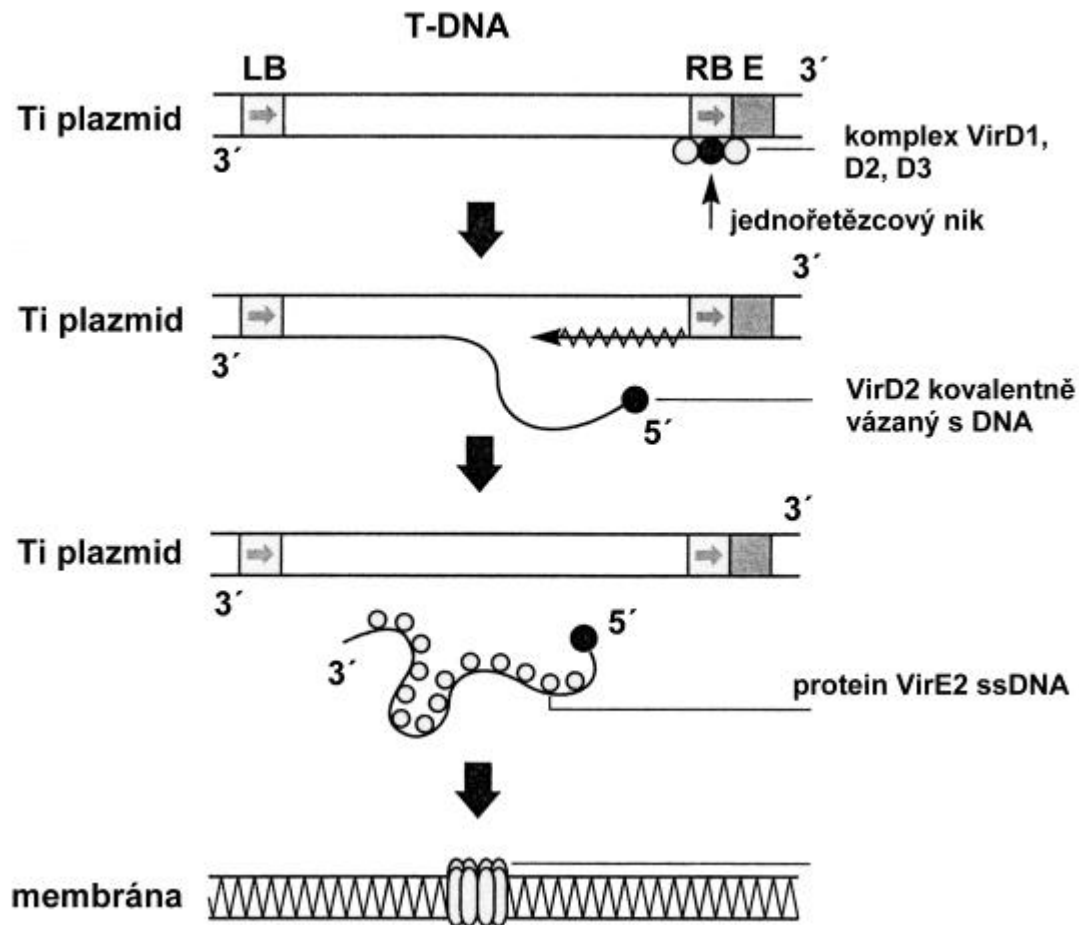
# Inzerční mutageneze

## T-DNA tagging

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



# Model tvorby jednořetězcové T-DNA *A. tumefaciens*





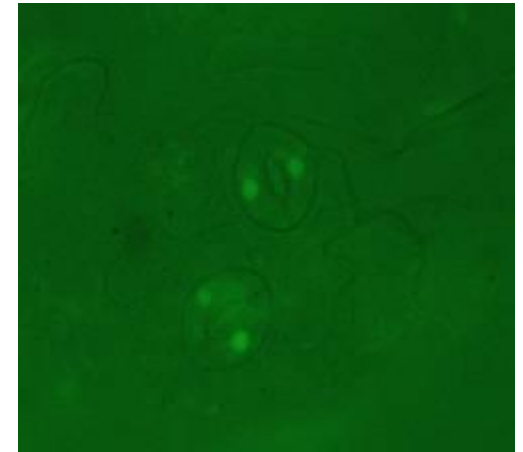
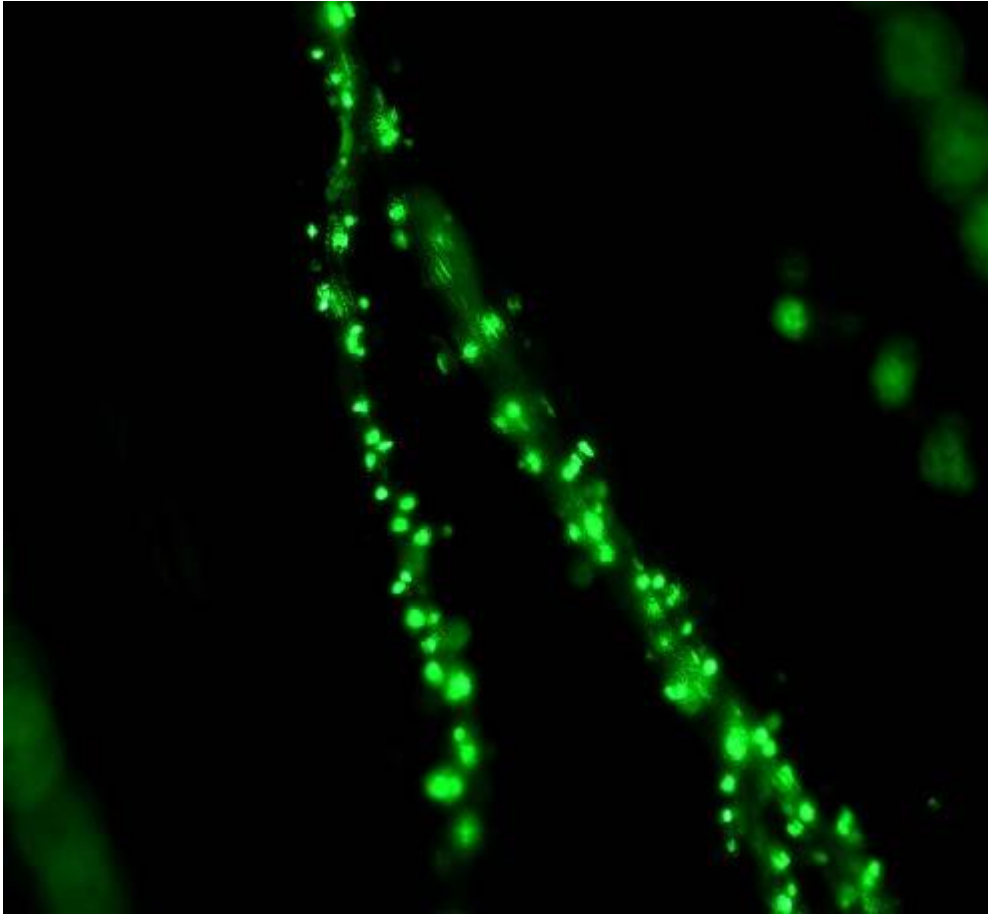
## Metody transformace rostlinných pletiv

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

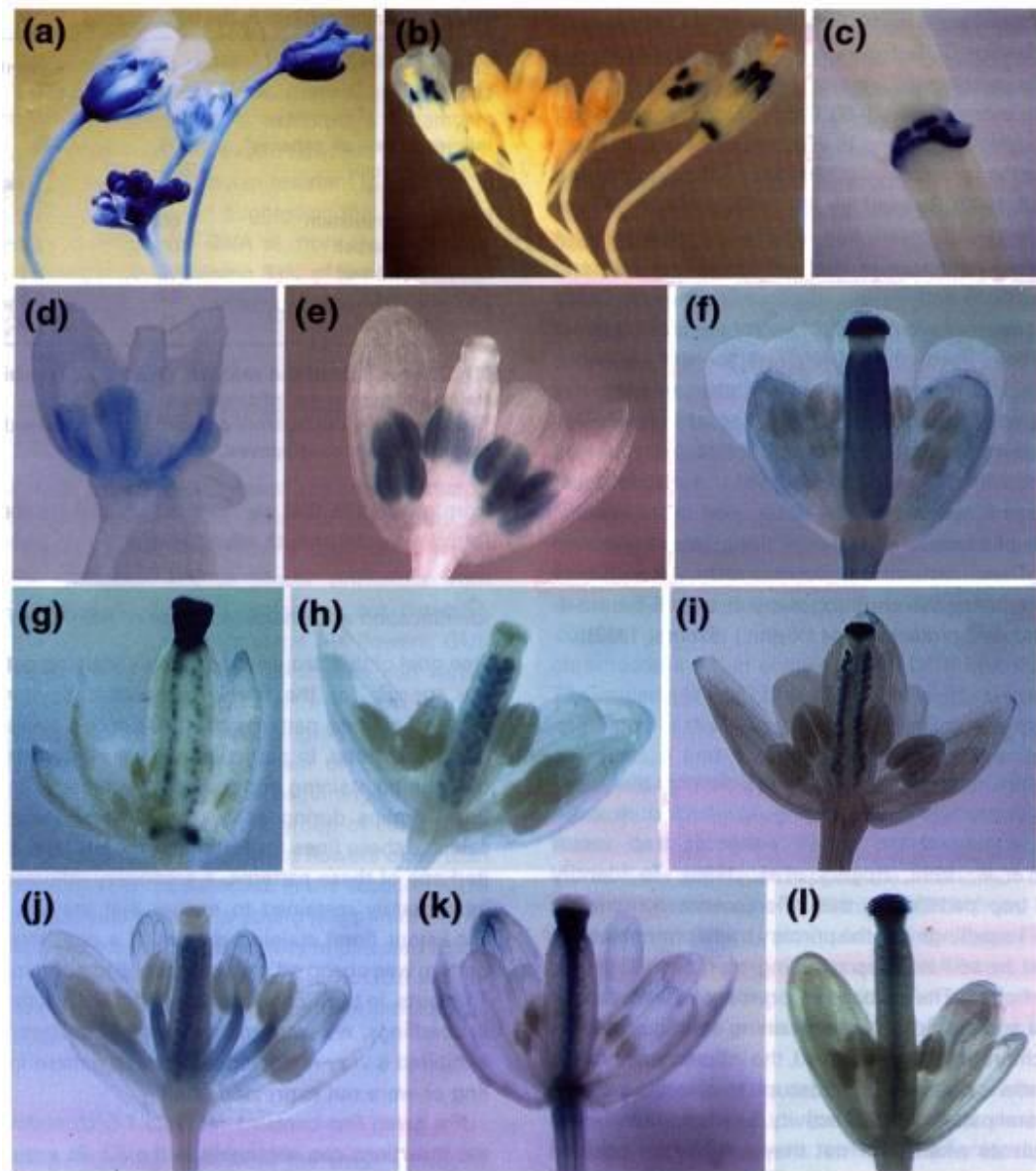
### Markerové geny

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

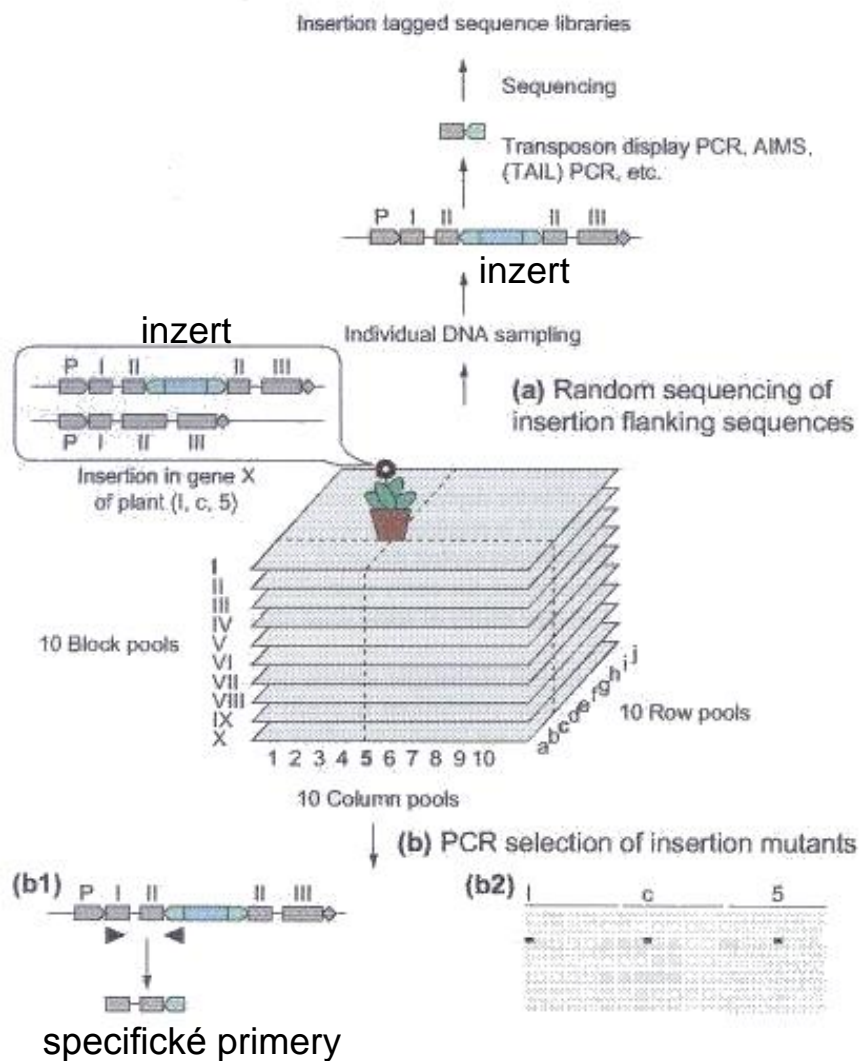
## Expres GFP



# Funkce genu GUS



## Identifikace inzerčních míst přístupem reverzní genetiky



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



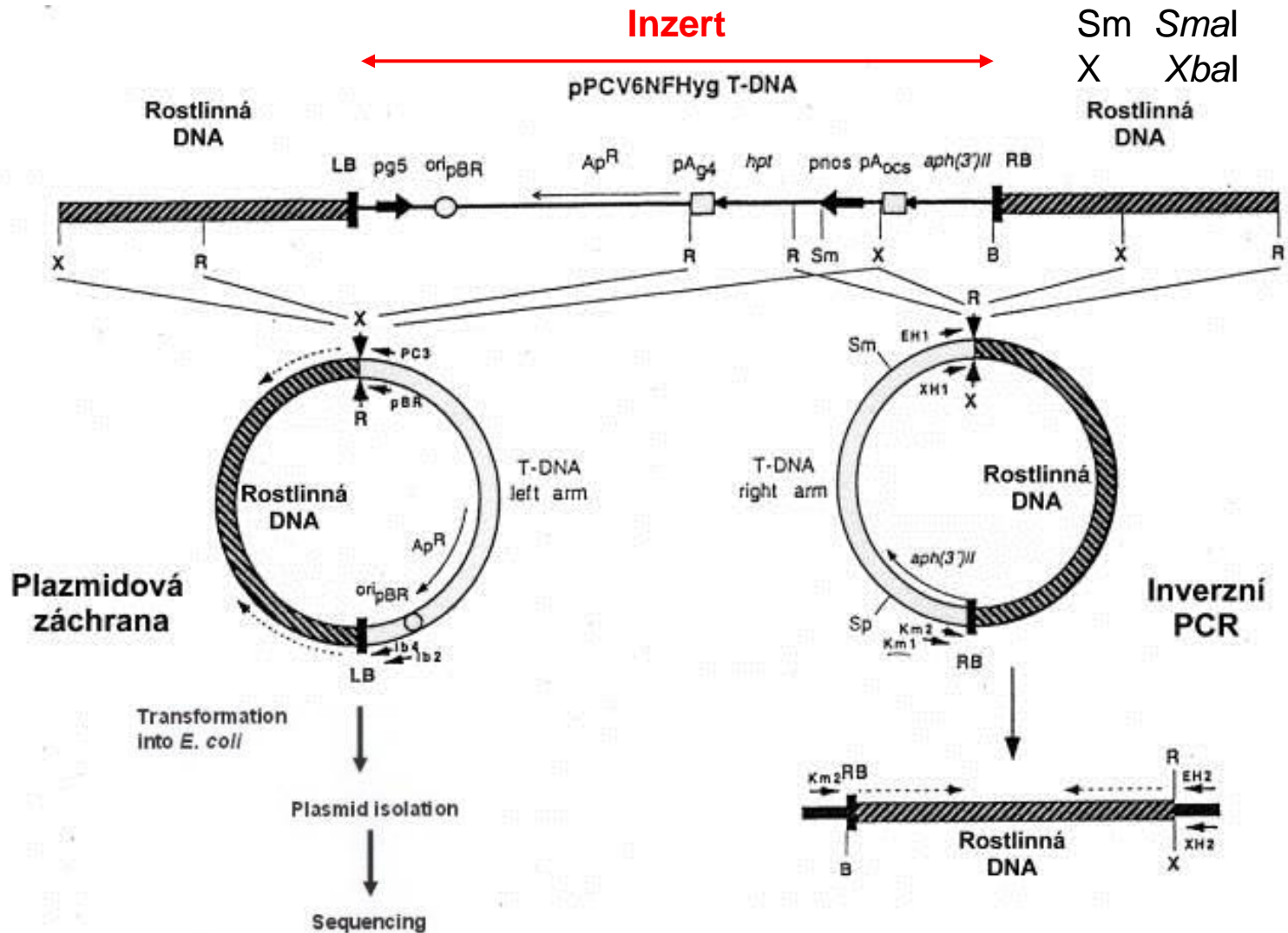
## Ad 6) Izolace rostlinného genu

Zkratky restriktáz

R *EcoRI*

Sm *SmaI*

X *XbaI*



# Využití T-DNA mutageneze

## Vektory

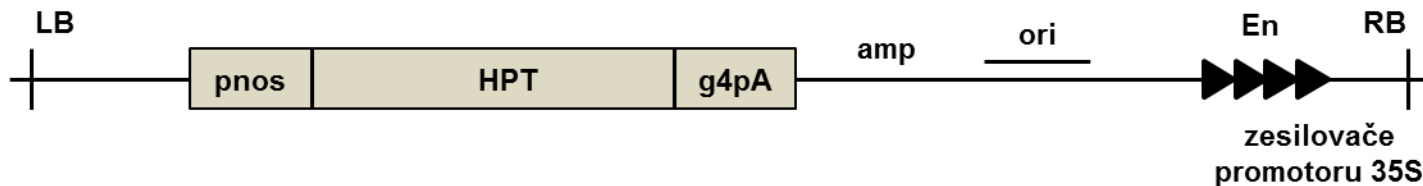
### Nespecializovaný vektor



### Specializovaný vektor – pasivní

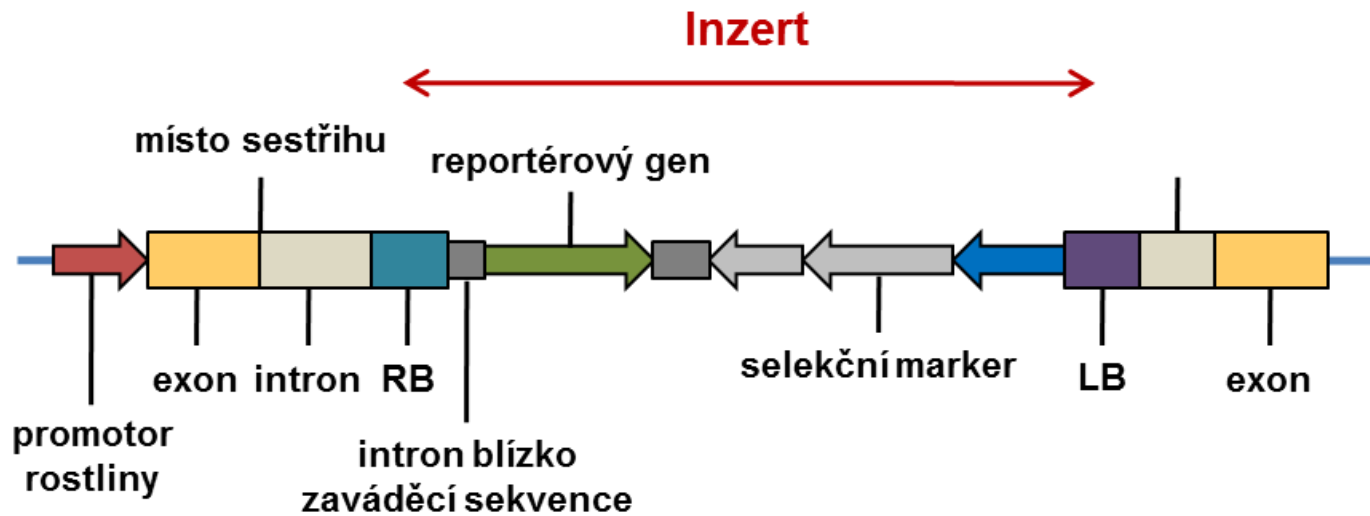


### Specializovaný vektor – aktivní



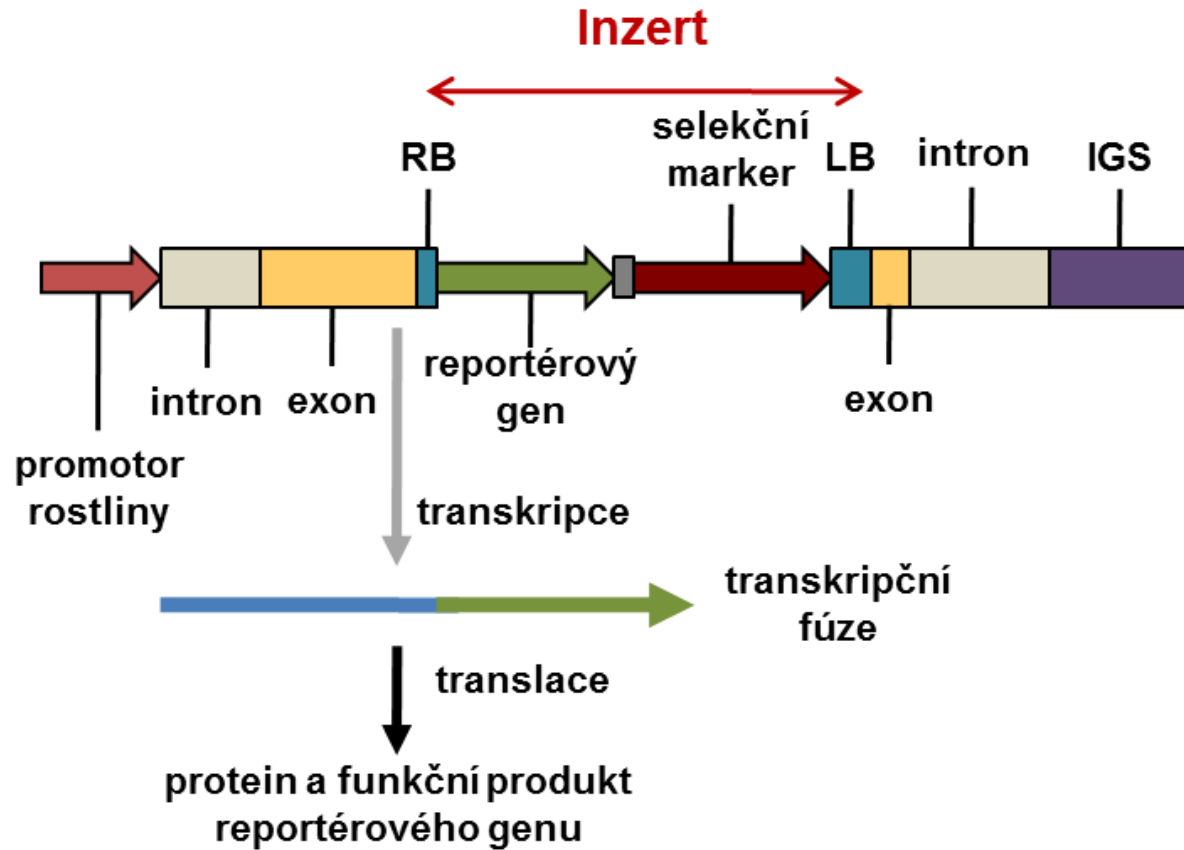
# Specializované vektory

## Past na geny



# Specializované vektory

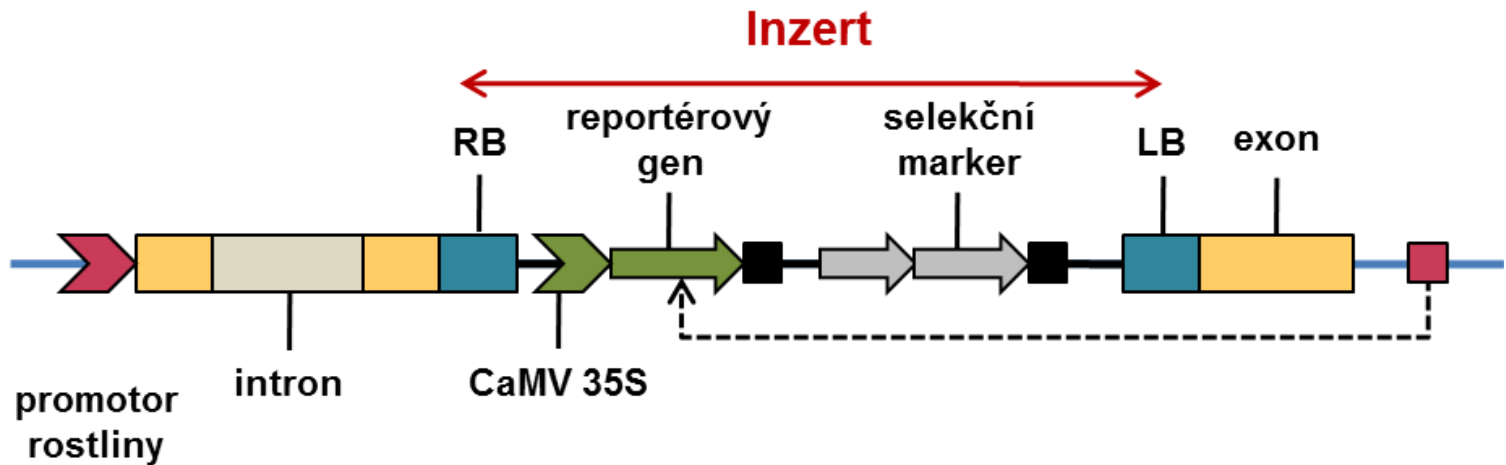
## Past na regulační sekvence – promotor





# Specializované vektory

Past na regulační sekvence – zesilovač





## Výsledky inzerční mutagenese

### 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

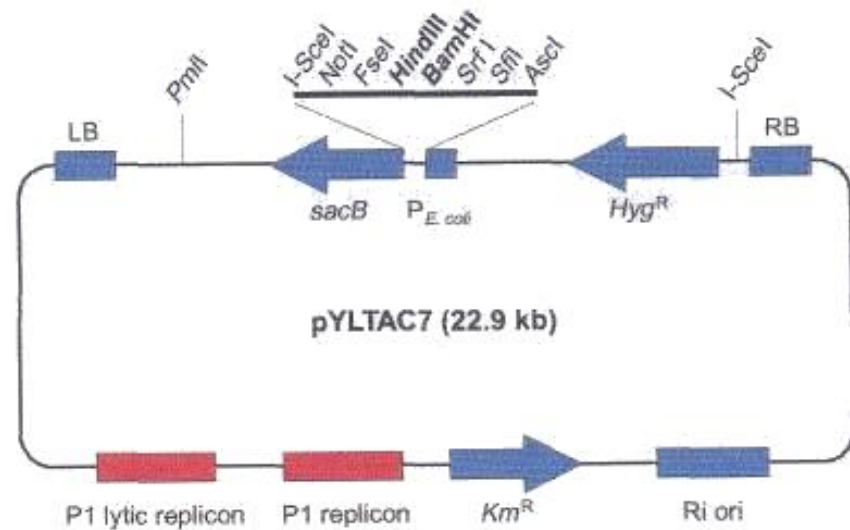
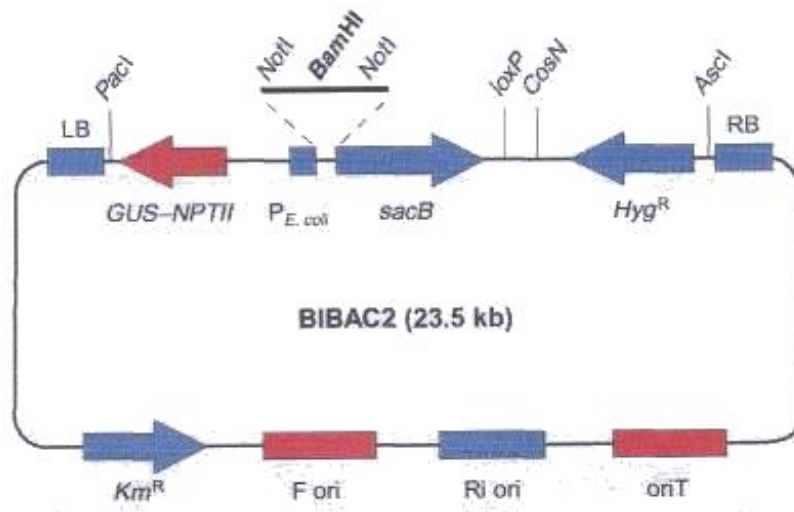
- ➔ *G1* vývoj trichomů 1989
- ➔ *Gi* signály fytochromů 2000
- ➔ *Dfl1* kontrola auxinů

**Reverzní genetika** – hlavní podíl identifikovaných genů

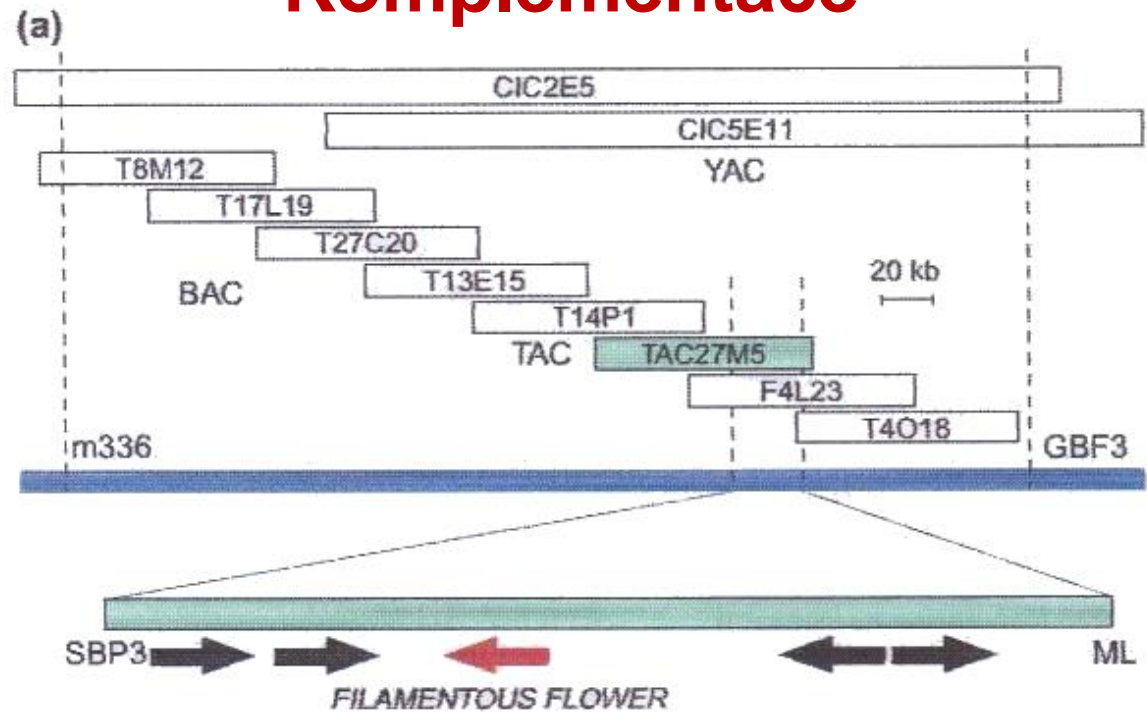
- ➔ Genová rodina *ACTIN* celkem 63 genů
- ➔ Aktivační tagging - asi 20 genů



## Speciální typy vektorů



# Komplementace



(b)



Wild type



*filamentous flower mutant*

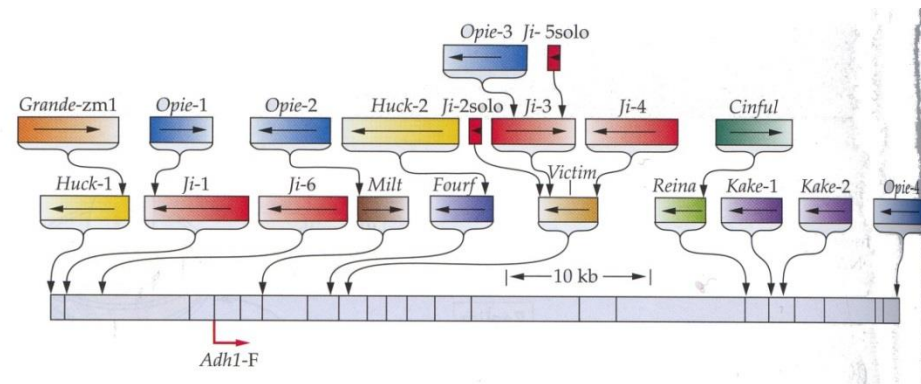


Mutant complemented with TAC27M5

# 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

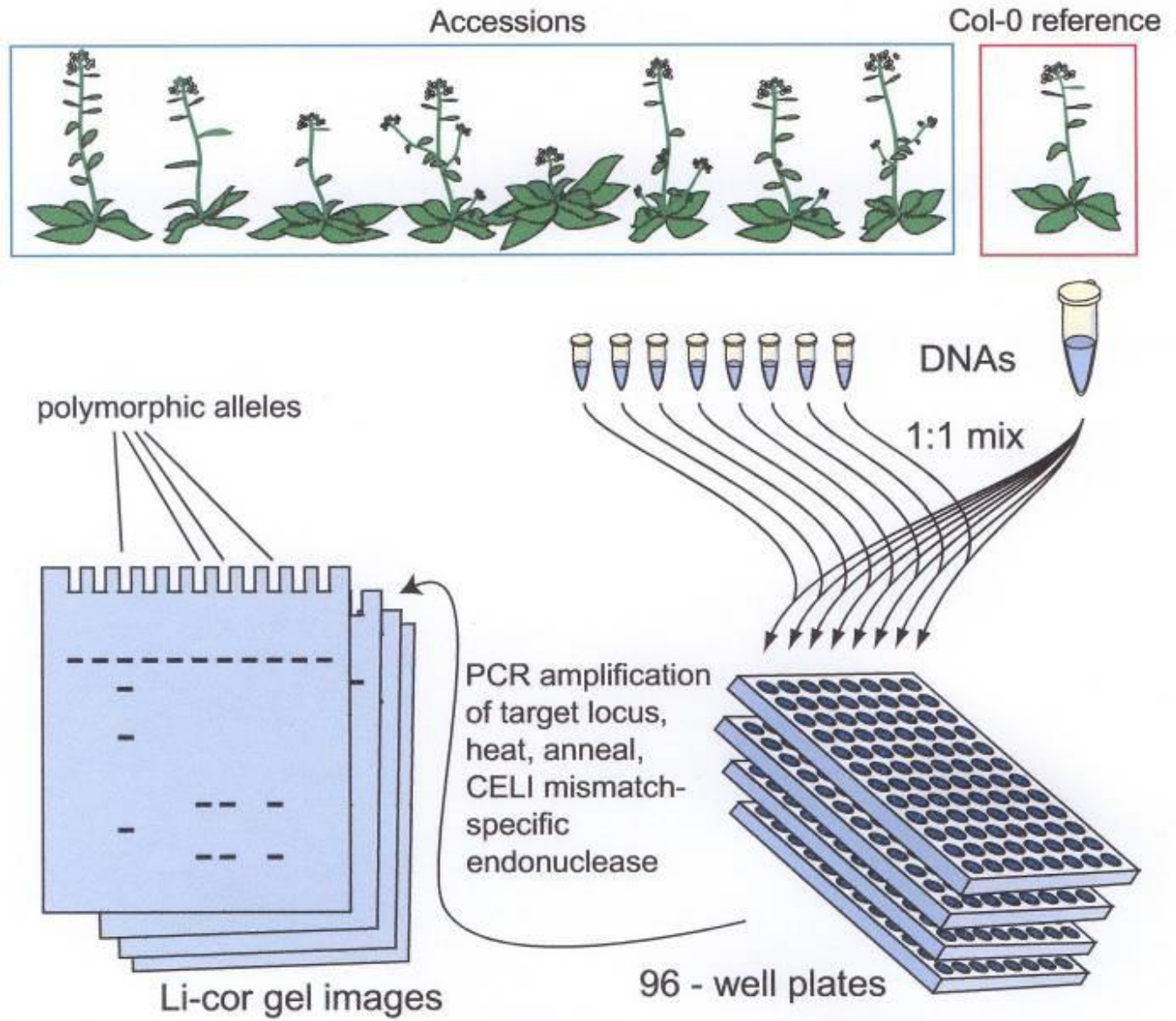
## Rýže

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



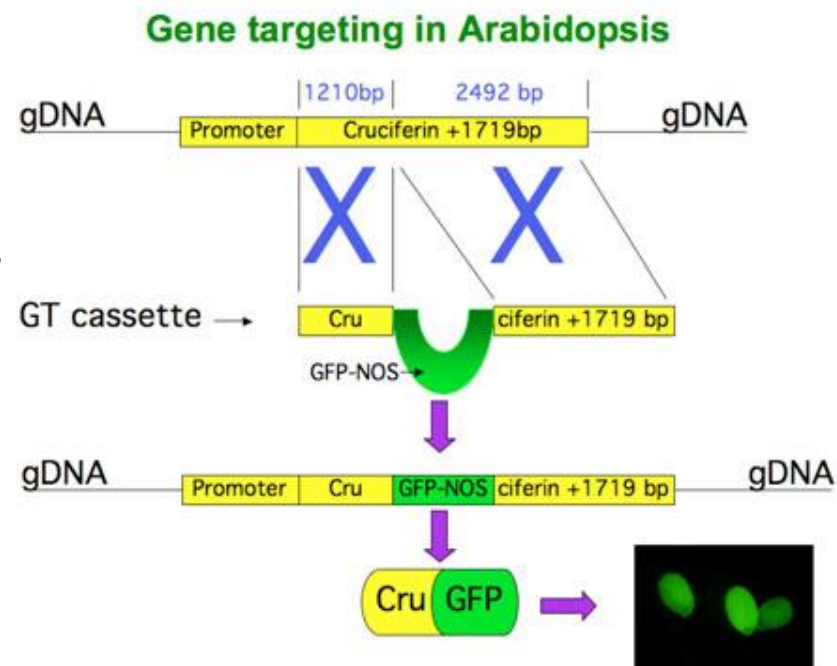
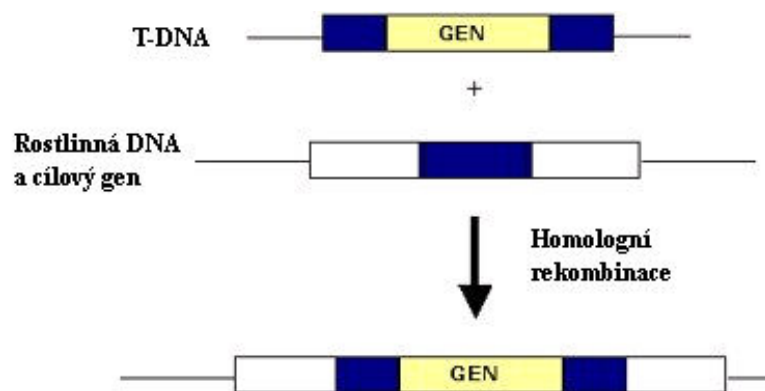
## Klasická mutageneze – chemomutageny

- ➔ **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)**



## Další metody identifikace funkcí rostlinných genů

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



# Techniky založené na umlčování specifických genů

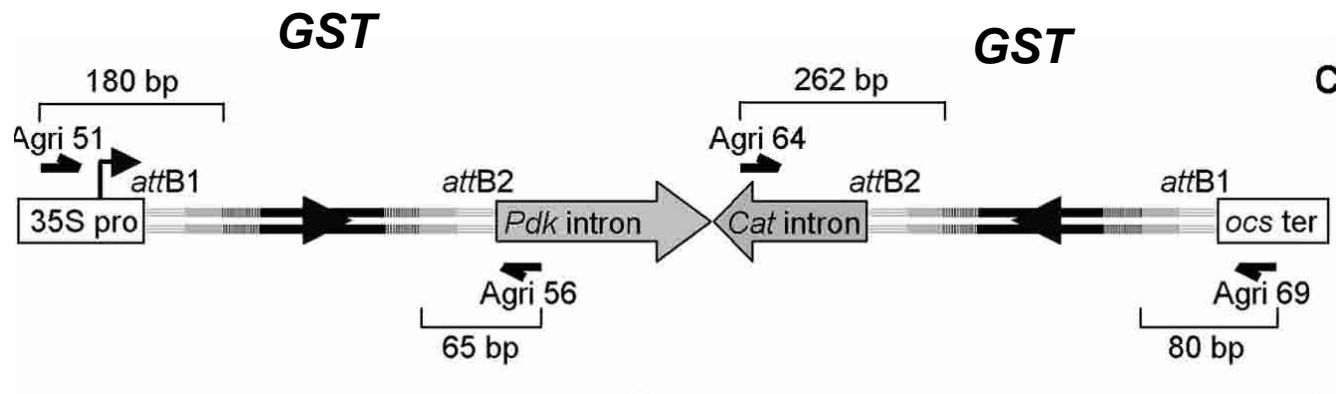
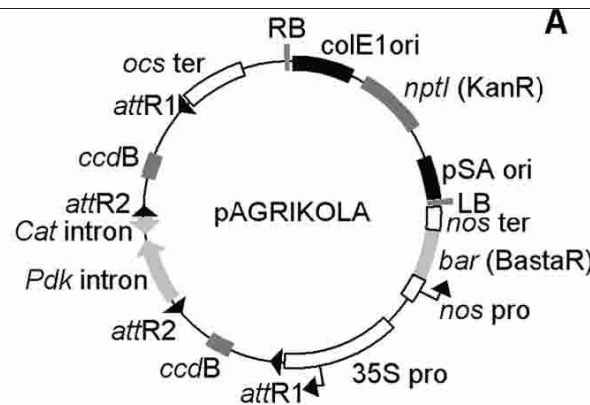
## ➔ Především RNA interference

### ➔ *A. thaliana* – Projekt AGRİKOLA

- *Arabidopsis*
- Genomic
- RNA Interference
- Knock-Out
- Line Analysis

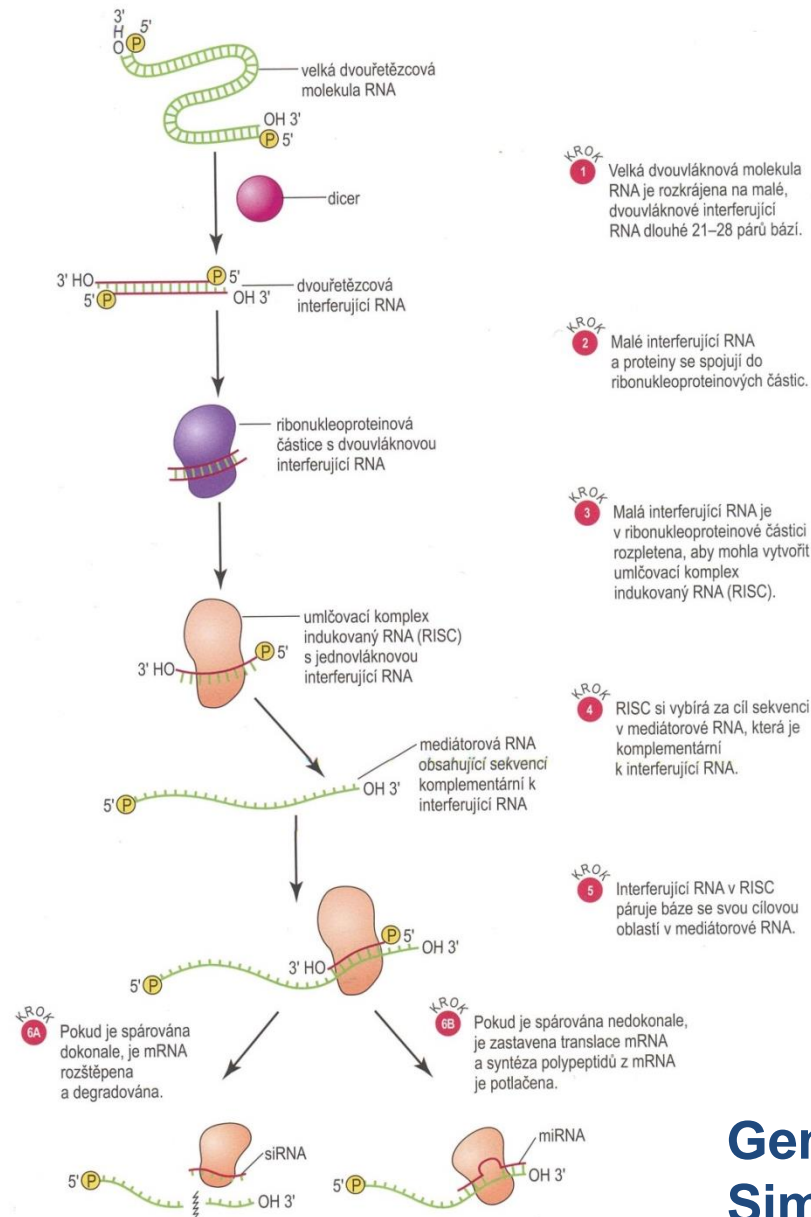
➔ Tvorba 20 tisíc RNAi konstruktů

➔ Z kolekce 21 120 GST (Gene Specific Tag) *Arabidopsis*



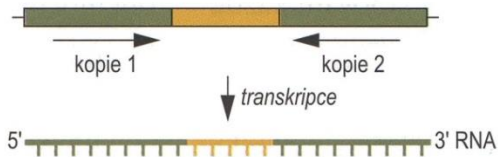


## Schéma RNA interference

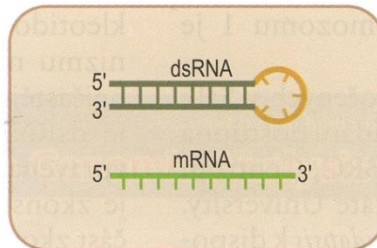


## zahájení RNAi vnesením transgenu kódujícího komplementární RNA

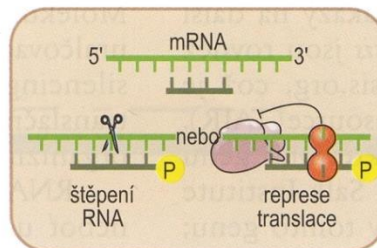
- KROK 1** Expresní genová kazeta nesoucí dvě kopie požadované sekvence v obrácené orientaci je vnesena do genomu.



- KROK 2** Komplementární sekvence v mRNA se párují a vytvářejí částečně dvouřetězcovou „vlásenkovou“ strukturu.



- KROK 3** Degradace mRNA nebo represe její translace pomocí umlčovacího komplexu indukovaného RNA (RISC).



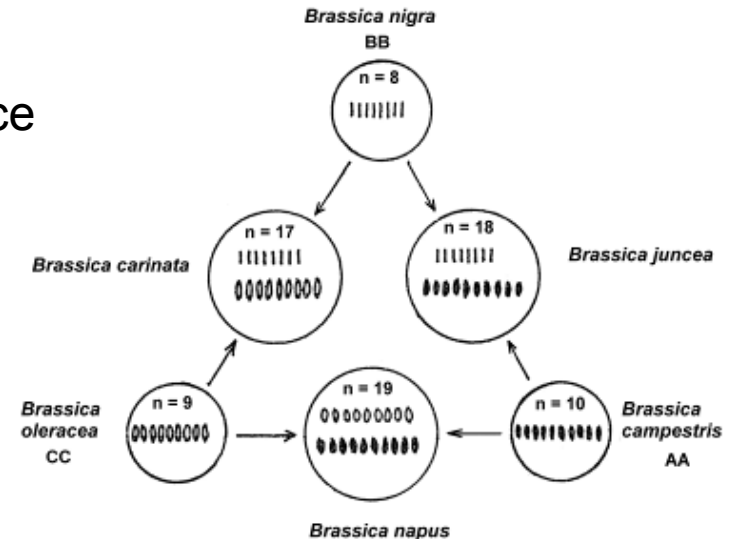
(b)

# Genomika rostlin

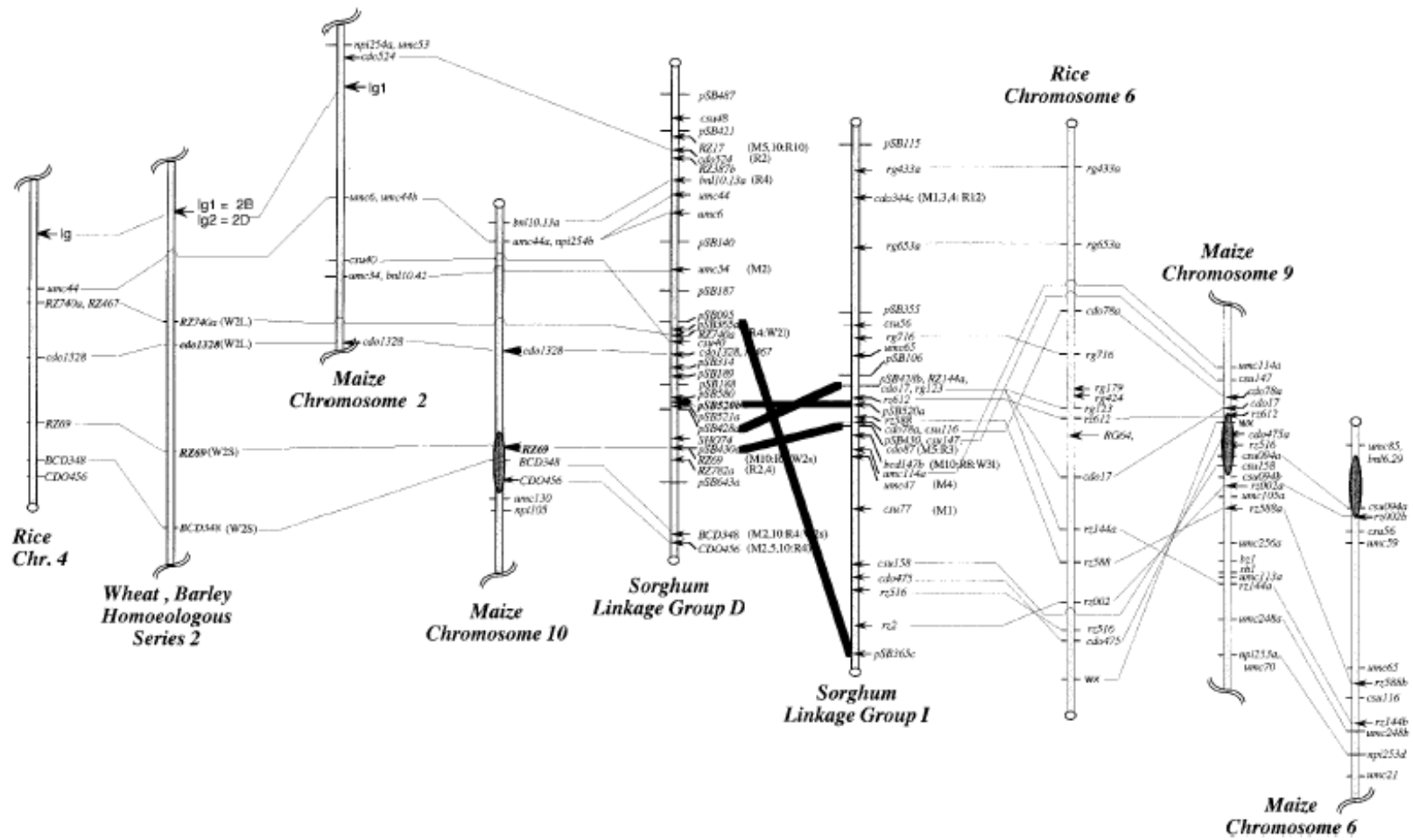
## Srovnávání genomů

### ➔ Srovnávací genomika:

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

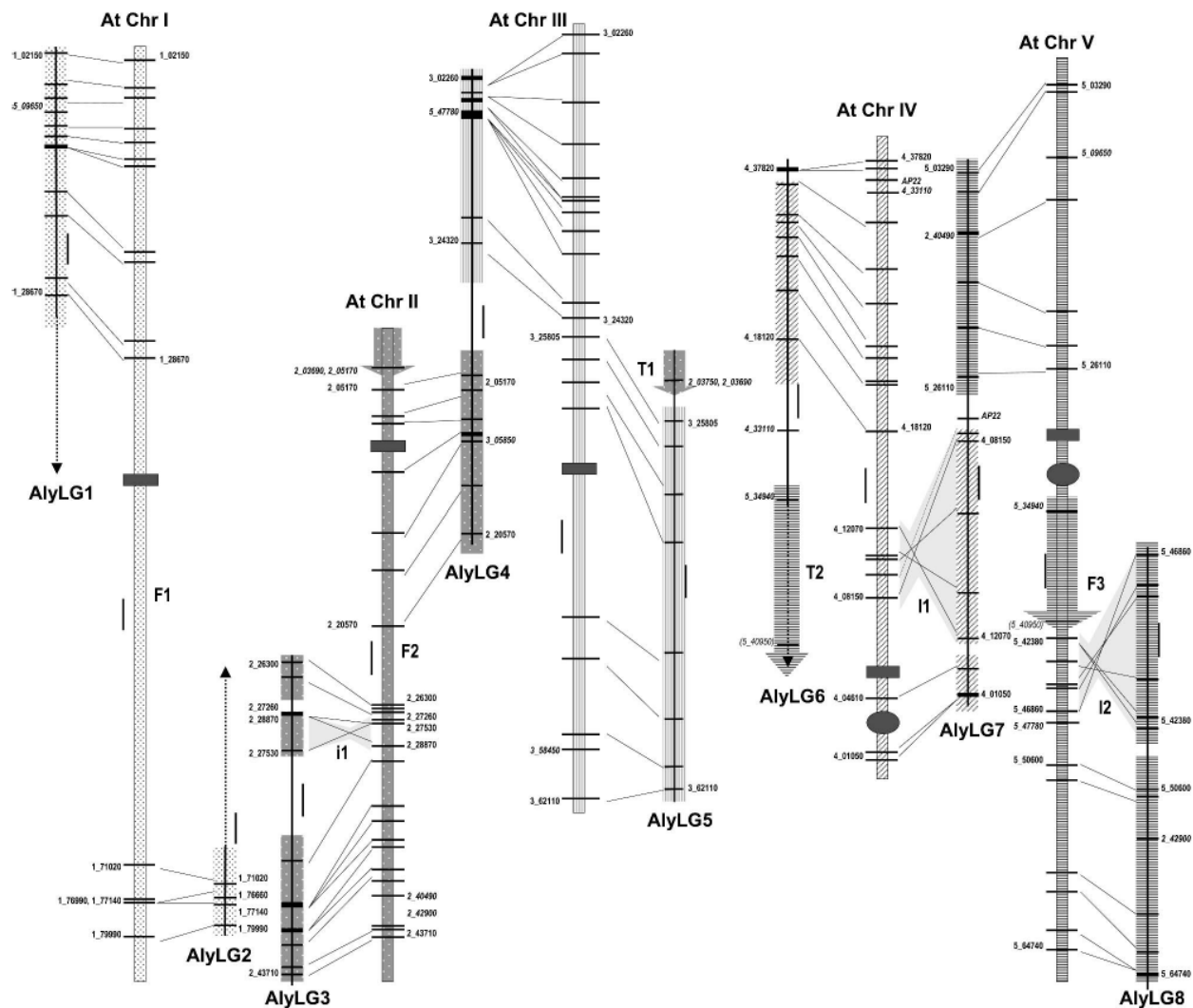


# Genomy rostlin se podobají

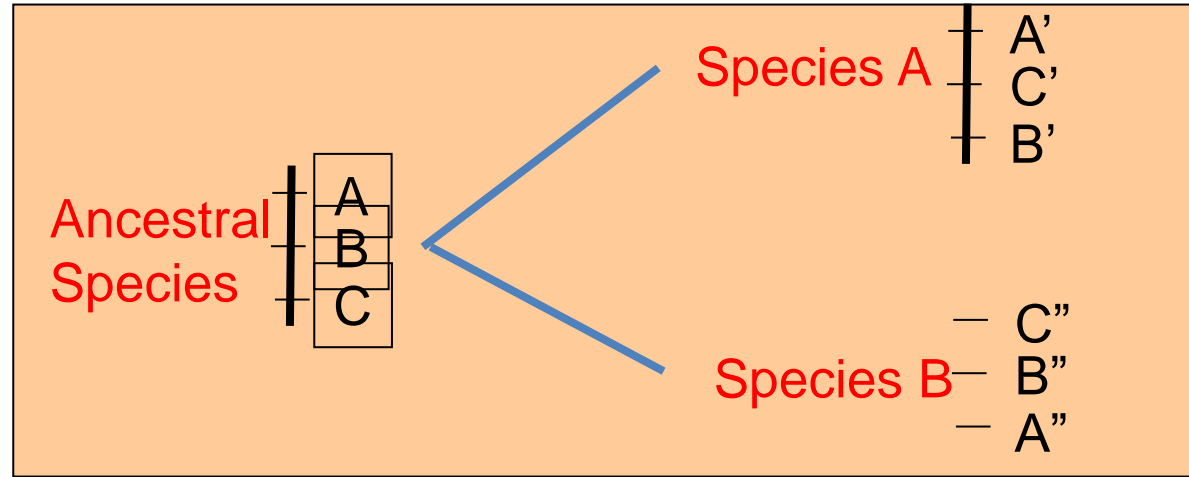




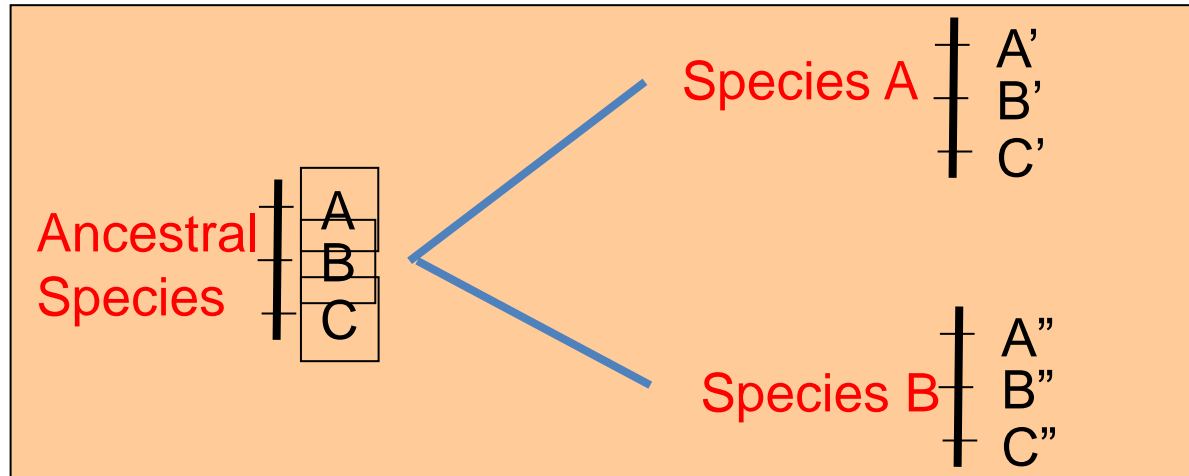
# Kolineární oblasti genomů *Arabidopsis thaliana* a *A. lyrata*



**Syntenie** = přítomnost orthologních lokusů u dvou druhů na stejném chromozomu

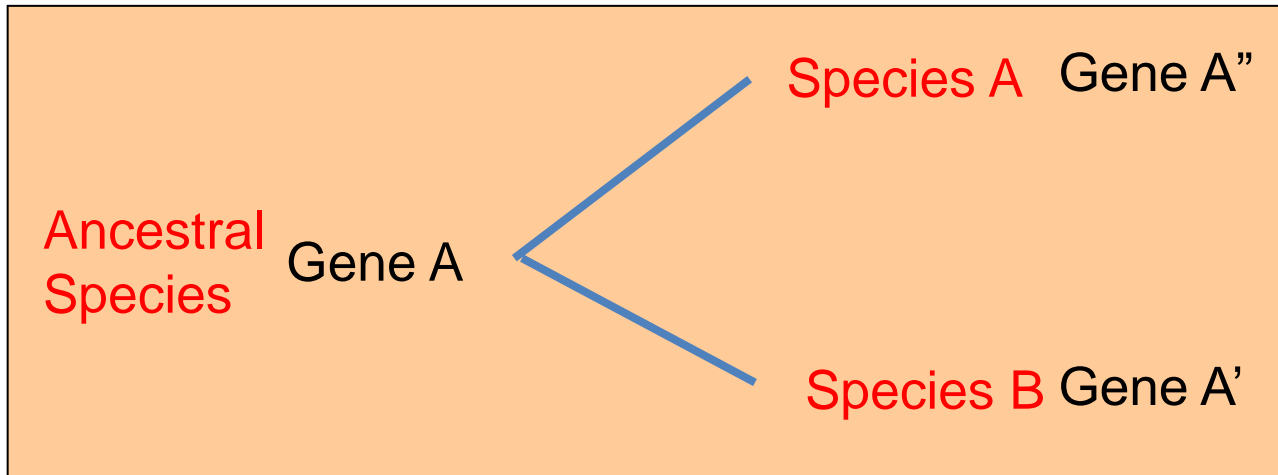


**Kolinearita** = skupina lokusů je u dvou druhů přítomna ve stejném pořadí

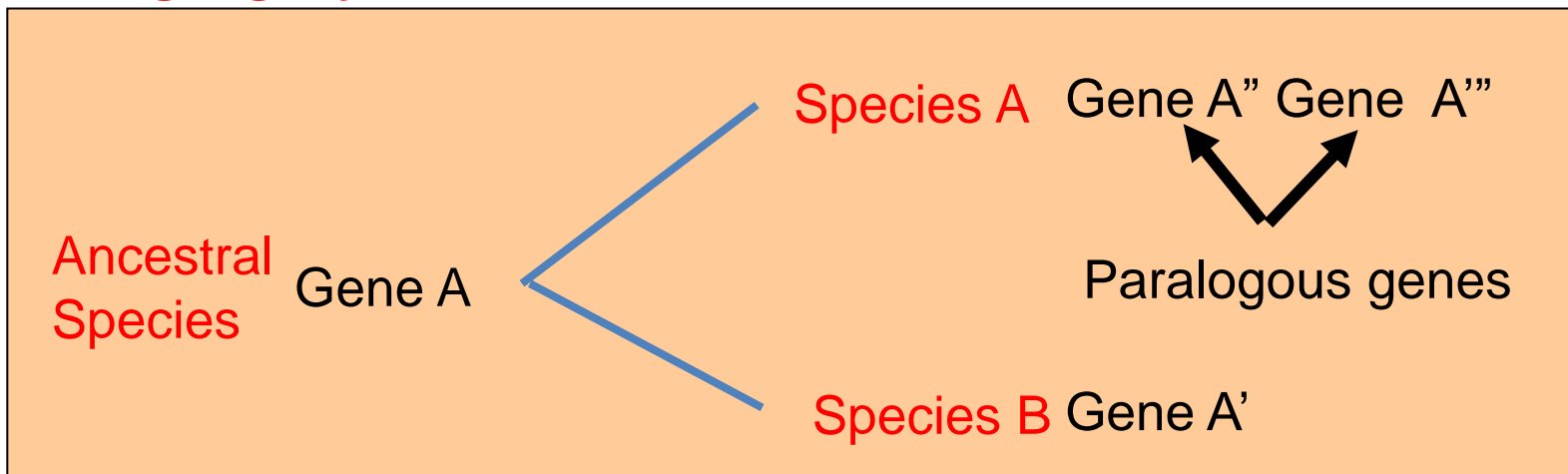


## Orthology vs. paralogy

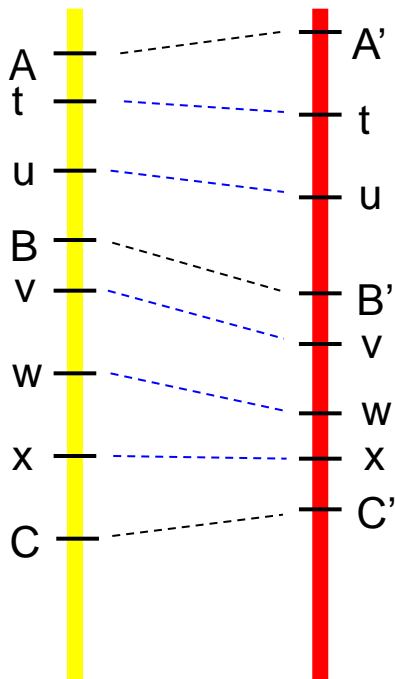
**Orthologní geny** = geny u různých organismů, které jsou přímými potomky genu přítomného u společného předka těchto organismů



**Paralogní geny** = geny, které se duplikovali u daného druhu



## Makrosyntenie vs. microsyntenie

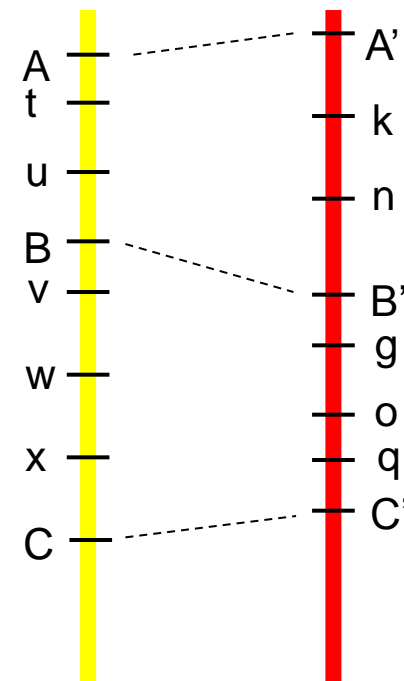


### ➔ Vlevo:

- nejen geny A, B, C syntenní,
- mikrosyntenie

### ➔ Vpravo:

- pouze geny A, B, C syntenní
- mikrosyntenie není

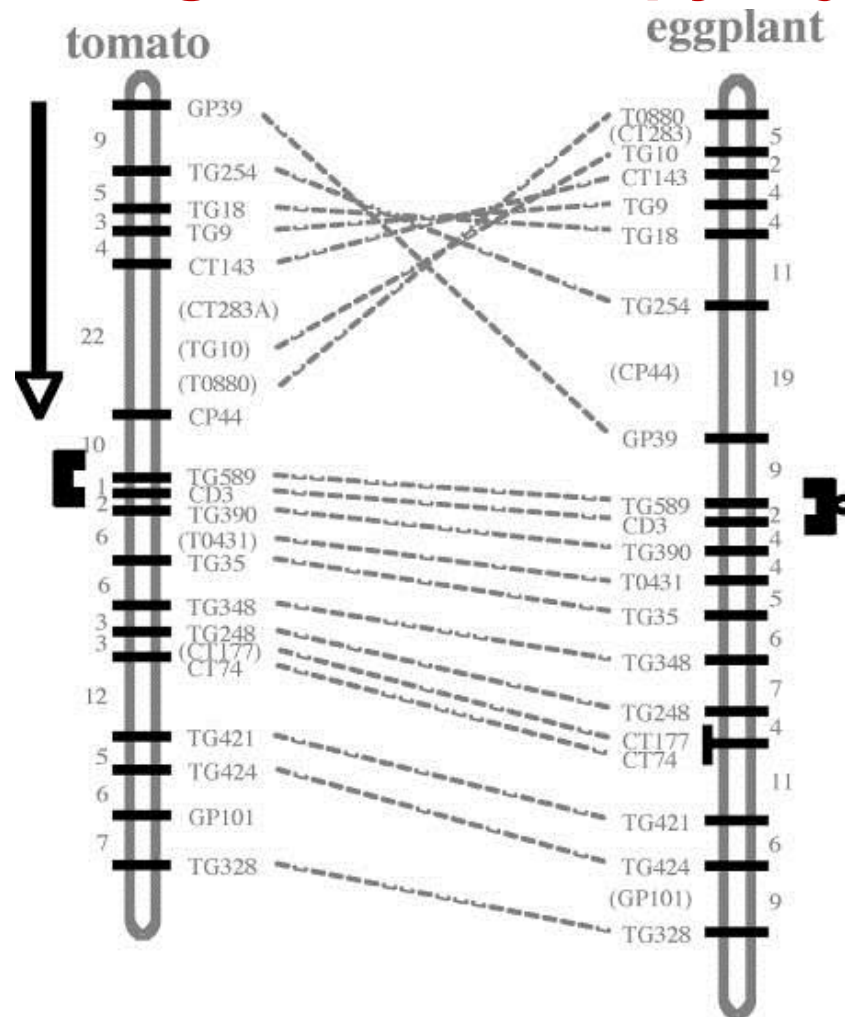


### ➔ **Makrosyntenie** (daná společným původem), **makrokolinearita**

- 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**



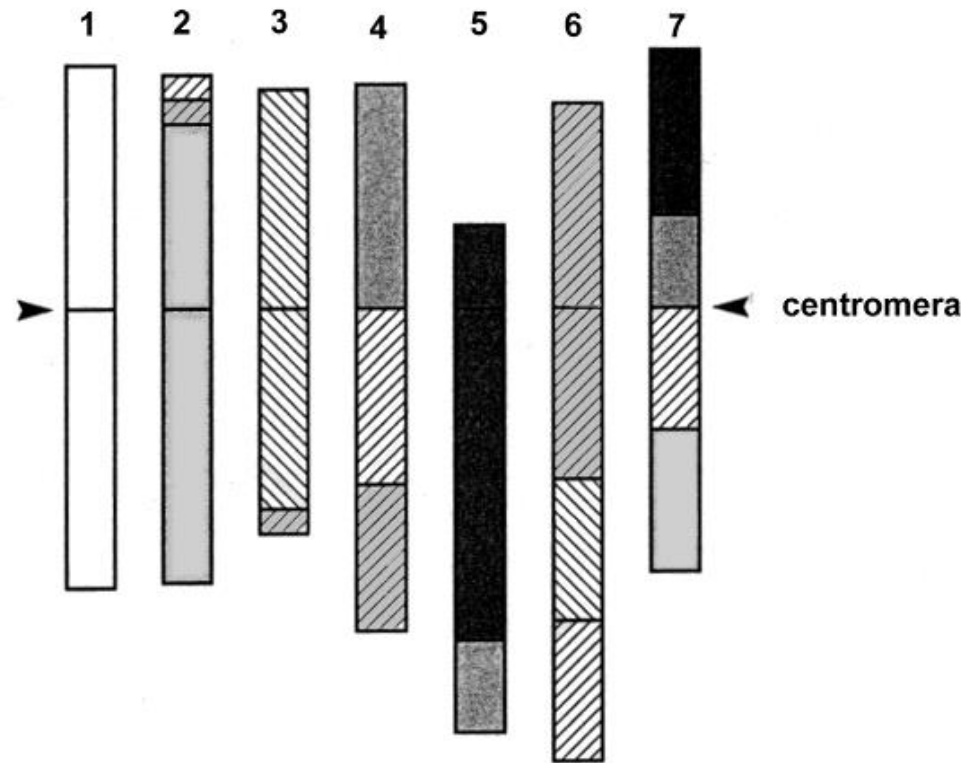
## Porovnání genetické mapy rajčete a lilku



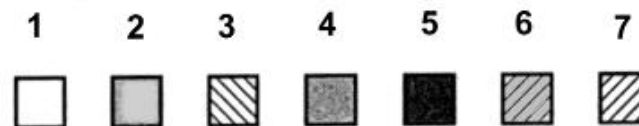
- ➔ Syntenní mapy rajčete a bramboru se liší 5 paracentrickými inverzemi

# Srovnávací genomika - obiloviny

haploidní sada chromozomů rýže

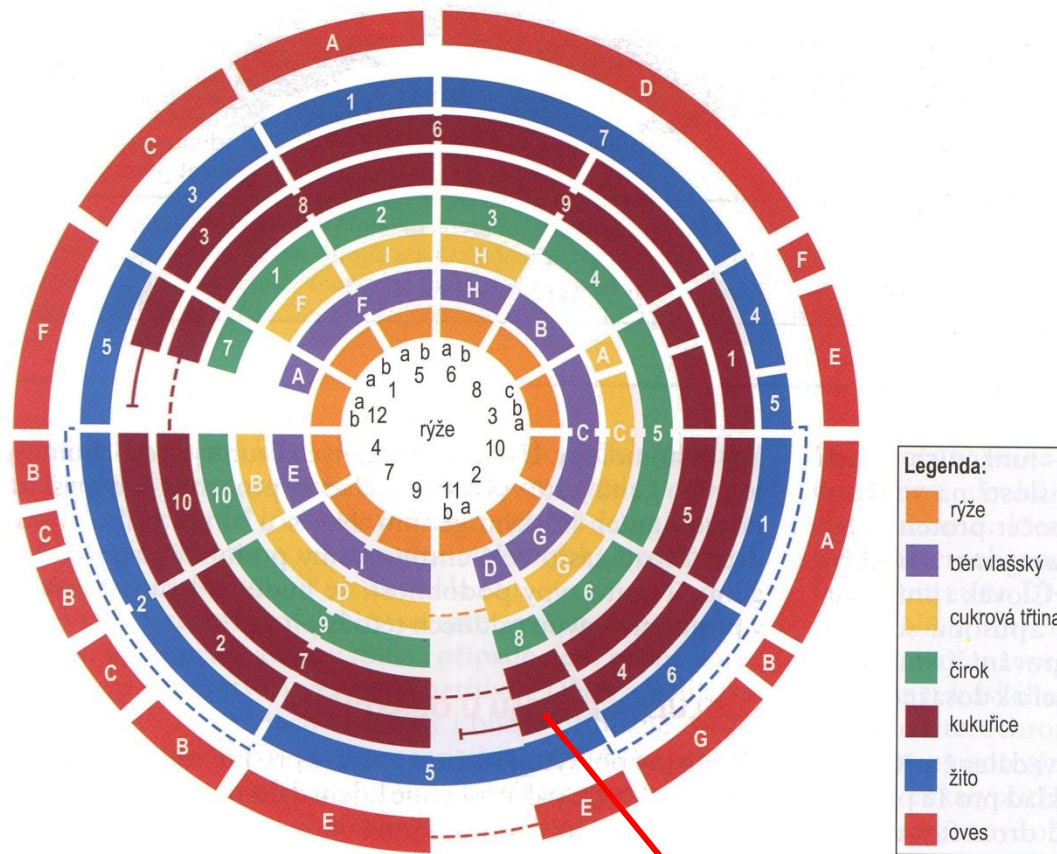


homologické chromozomy genomu D pšenice



# Srovnávací mapa genomů 7 obilovin

## Názorné přiřazení homologních bloků

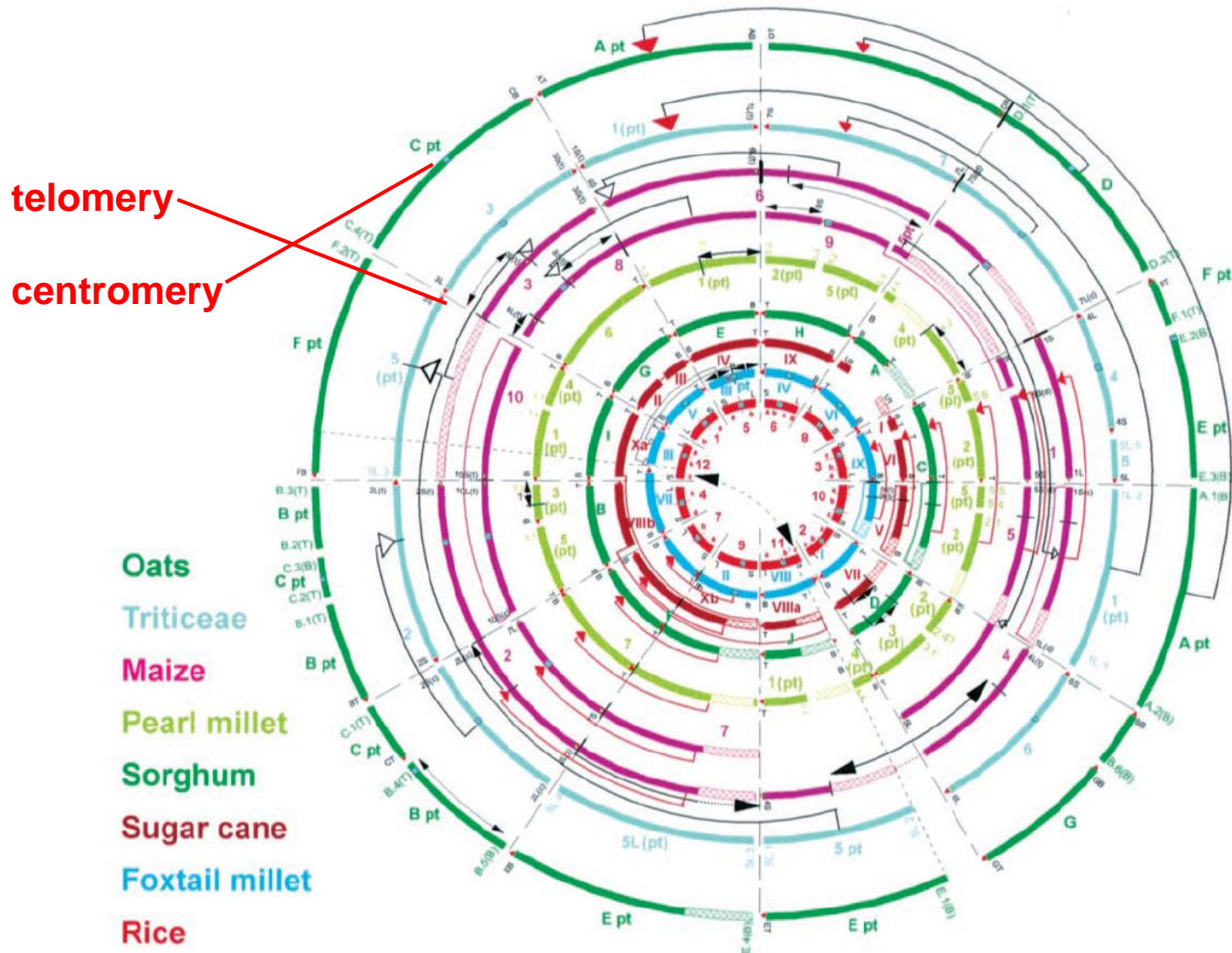


Přilehlé segmenty chromozomů žita

➔ Vysoce konzervovaná struktura genomů obilovin

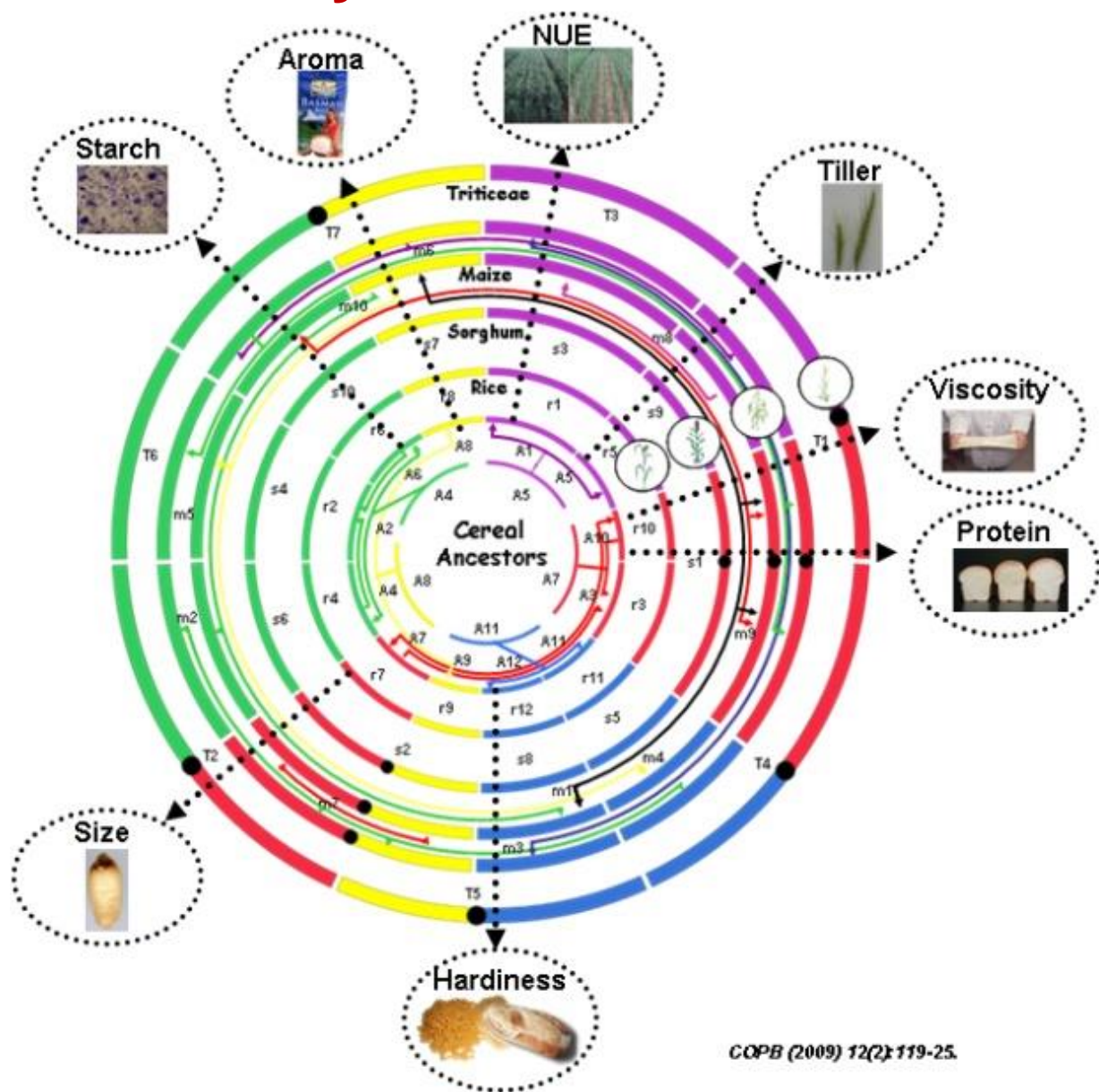


## Kolinearita (syntenie) genomů lipnicovitých

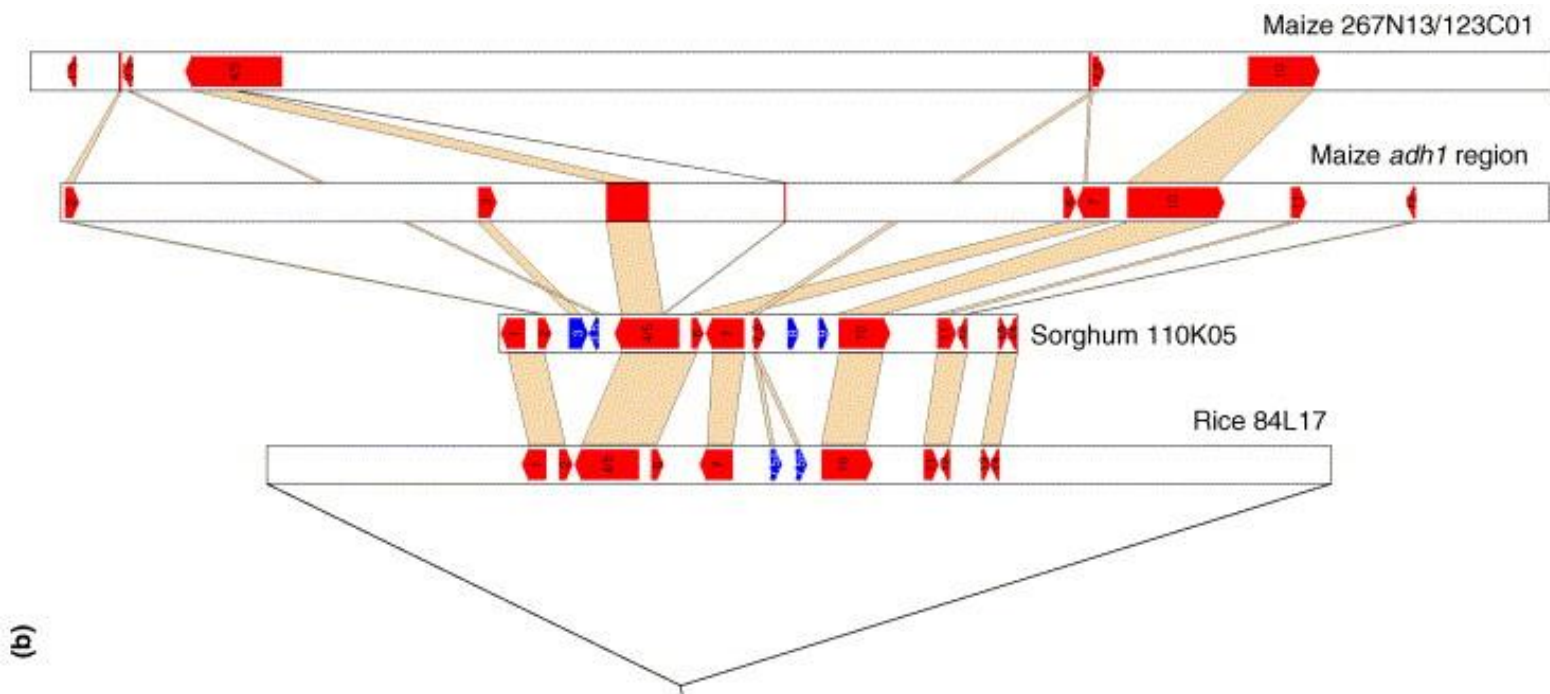




# Genomy obilovin a asociované znaky



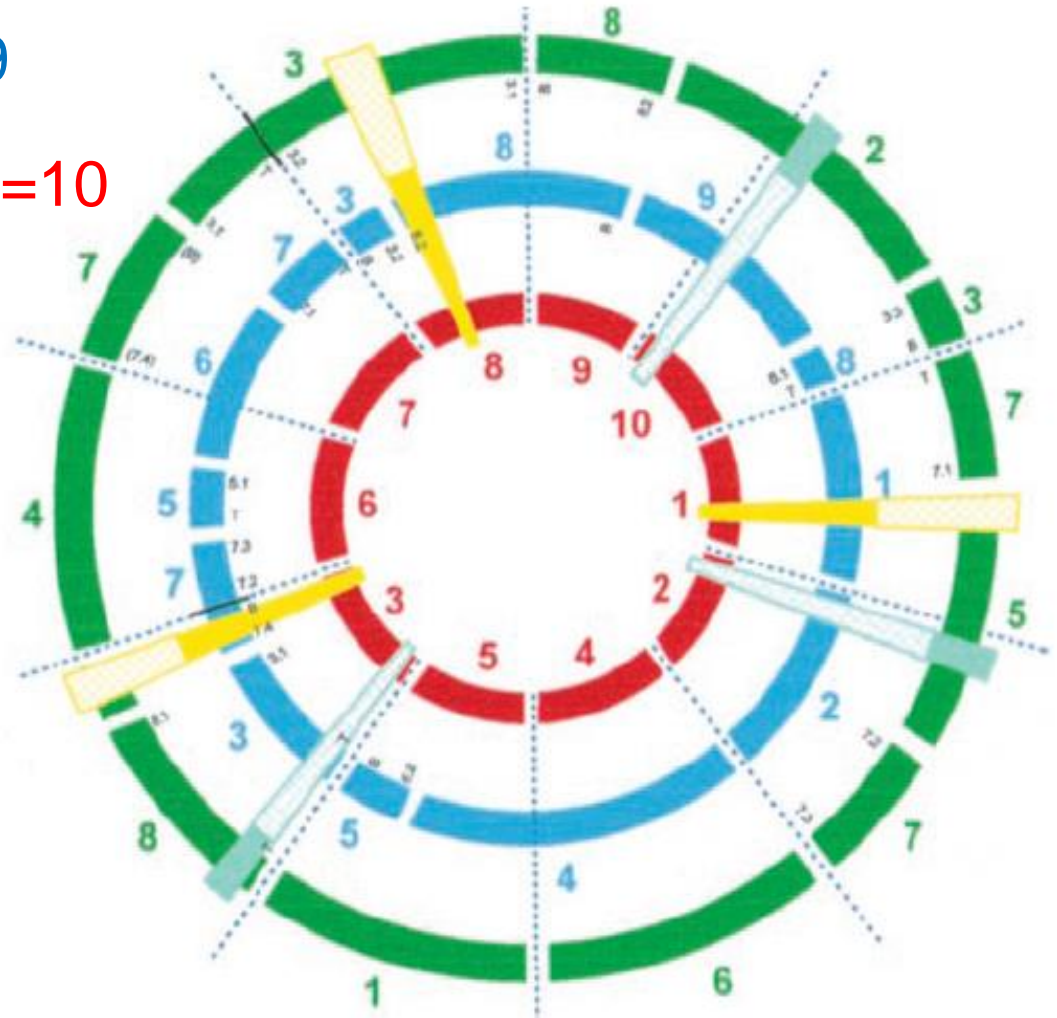
# Kolineární úseky se liší především zastoupením repetitivní DNA



(b)

## Genomy „brasik“

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





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