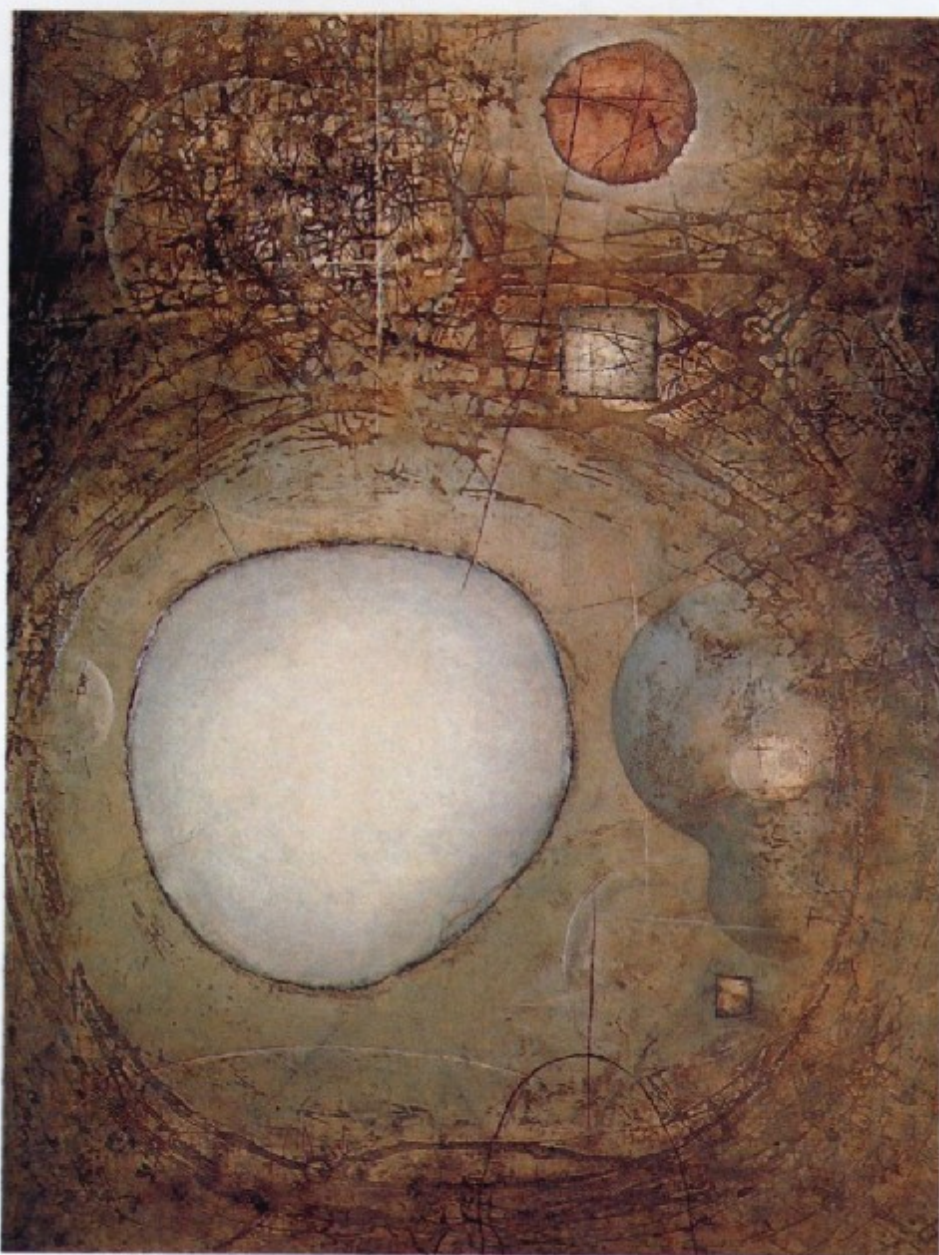


# Fyziologie roślin

STANISLAV  
PROCHÁZKA  
IVANA  
MACHÁČKOVÁ  
JAN  
KREKULE  
JIŘÍ  
ŠEBÁNEK  
A KOLEKTIV



ACADEMIA

# 16 GENETICKÁ PODMÍNĚNOST FYZIOLOGICKÝCH PROCESŮ

Boris Vyskot

Rostliny představují velmi různorodé skupiny organizmů, které mají řadu jedinečných fyziologických, vývojových a reprodukčních procesů. I když se jedná z morfologického hlediska o organizmy poměrně jednoduché, jejich molekulárněgenetické procesy jsou podobně komplexní jako u živočichů. Řada obecných zákonitostí genetiky eukaryotických organizmů byla poprvé popsána právě u rostlin. Z mnoha příkladů lze jmenovat základní zákony klasické genetiky objevené J. G. Mendelem u hrachu nebo objev mobilních genetických elementů popsany B. McClintockovou u kukuřice. Vzhledem k vysoké schopnosti regenerace a relativní snadnosti experimentální manipulace se rostliny staly v průběhu posledního desetiletí vyhledávaným modelovým objektem buněčných a molekulárních biologů.

**Genetická informace** je u rostlin, podobně jako u jiných eukaryotických organizmů, lokalizována především v chromatinu buněčného jádra. Rostliny jsou však výjimečné mezi ostatními skupinami vyšších organizmů skutečností, že jejich **genom je tripartitní**: genetická informace je přítomna nejen v jádře a v mitochondriích (jako u jiných eukaryotických organizmů), ale i v plastidech. Nositeli genetické informace jsou nukleové kyseliny: informace spočívá v tripletovém uspořádání čtyř základních nukleotidů v molekulách DNA, které určují pořadí aminokyselin v bílkovinných řetězcích. Tento tzv. tripletový genetický kód je téměř univerzální pro všechny známé organizmy a je tak výchozím předpokladem pro aplikace technik genového inženýrství.

Sled základních reakcí genetického aparátu (replikace, transkripce a translace) lze dnes provádět též *in vitro* s použitím příslušných komponent z bakteriálních, rostlinných nebo živočišných buněk. Klíčový význam pro rozvoj genového inženýrství měly zejména objevy bakteriálních restričních endonukleáz (štěpících DNA podle její specifické nukleotidové sekvence), DNA-polymeráz (které katalyzují syntézu

komplementárního druhého vlákna podle jednořetězcové matrice DNA) a ligáz (schopných spojovat řetězce DNA nebo jejich fragmenty) a virové reverzní transkriptázy (která může zpětně přepisovat jednovláknovou mRNA od 3'-konce a vytvořit komplementární vlákno cDNA). Mezi techniky, které nejvýraznějším způsobem rozšířily možnosti manipulací s rekombinantní DNA, patří především hybridizace nukleových kyselin na membránách nebo na fixovaných chromozomech *in situ*, sekvenování (tj. stanovení pořadí nukleotidů v DNA nebo aminokyselin v polypeptidových řetězcích), imunologické metody stanovení specifických proteinů a amplifikace sekvencí DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (*PCR, polymerase chain reaction*).

## 16.1 Struktura rostlinného genomu

Většina jaderných genomů vyšších rostlin obsahuje  $10^8$  až  $10^{10}$  párů bází (pb), což jsou hodnoty srovnatelné s jinými eukaryotickými organizmy (tab. 16.1). Nejvyšší zjištěná hodnota činí u některých druhů až  $10^{11}$  pb (např. u jmelí, *Viscum album*), nejmenší genom má pravděpodobně huseníček (*Arabidopsis thaliana*), a to  $7 \cdot 10^7$  pb. Většina rostlinných genomů obsahuje vysoký podíl opakujících se (tzv. repetitivních) sekvencí DNA (viz odd. 16.2.2). U větších rostlinných genomů (nad 2 pg DNA na haploidní jádro) bývá až 80 % unikátních sekvencí DNA uspořádáno ve formě krátkých délek (obvykle menších než 2 000 pb) vmezežených mezi krátké bloky repetitivních sekvencí podobné délky. Krátké jedinečné kódující sekvence jsou obklopeny repetitivními sekvencemi, čímž každému segmentu DNA poskytují unikátní identitu, což může ovlivňovat transkripční aktivitu příslušných genů. Čím je genom menší (pod 2 pg), tím menší je podíl

unikátních sekvencí takto organizovaných; v těchto malých genomech bývají unikátní sekvence organizovány ve shlucích (Flavell 1980).

Tab. 16.1 Srovnání velikosti genomů a přibližné frakce repetitivních sekvencí (v procentech z celkového obsahu jaderného genomu) u zástupců různých fylogenetických skupin organismů – bakterií (*E. coli*), kvasinek (*S. cerevisiae*), rostlin nahosemenných (borovice, *Pinus* sp.), dvouděložných (huseníček, *A. thaliana*; tabák, *N. tabacum*; jmelí, *V. album*) a jednoděložných (cibule, *Allium* sp.; rýže, *O. sativa*; pšenice, *T. aestivum*), hmyzu (octomilka, *D. melanogaster*) a savců.  $0,965 \cdot 10^9$  párů bází odpovídá přibližně jednomu pikogramu DNA.

Druh, resp. skupina organismů	Množství DNA na haploidní jádro (pb)	Obsah repetitivních sekvencí DNA (v %)	Mimojaderná DNA (velikost v pb)
<i>Escherichia coli</i>	$4 \cdot 10^6$	0,1	plazmidy ( $10^3$ – $10^5$ ), bakteriofágy ( $10^4$ – $10^5$ )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \cdot 10^7$	1	plazmidy ( $10^4$ ), mitochondrie ( $10^4$ – $10^5$ )
<i>Pinus</i> sp.	$4 \cdot 10^{10}$	>90	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$7 \cdot 10^7$	10	
<i>Nicotiana tabacum</i>	$1,5 \cdot 10^9$	55	mitochondrie ( $10^5$ – $10^6$ ), plastidy ( $1,5 \cdot 10^5$ )
<i>Viscum album</i>	$1 \cdot 10^{11}$	>90	
<i>Allium</i> sp.	$2 \cdot 10^{10}$	>65	
<i>Oryza sativa</i>	$0,3 \cdot 10^9$	65	
<i>Triticum aestivum</i>	$5 \cdot 10^9$	>75	
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,2 \cdot 10^8$	20	mitochondrie ( $1,6 \cdot 10^4$ )
savci	$3 \cdot 10^9$	60	

Jaderný genom vyšších rostlin obsahuje asi  $10^4$  až  $10^5$  strukturálních genů, z toho v dospělé rostlině je jich exprimováno jen 5–10 %. V různých rostlinných plechivech a buňkách bylo detekováno asi 8 000 shodných typů mRNA, které představují geny odpovědné za základní metabolické funkce, a tudíž konstitutivně exprimované ve všech buňkách (*housekeeping genes*). Většina strukturálních genů je unikátními sekvencemi. Ne všechny unikátní sekvence jsou však strukturálními geny a ne všechny strukturální geny jsou unikátními se-

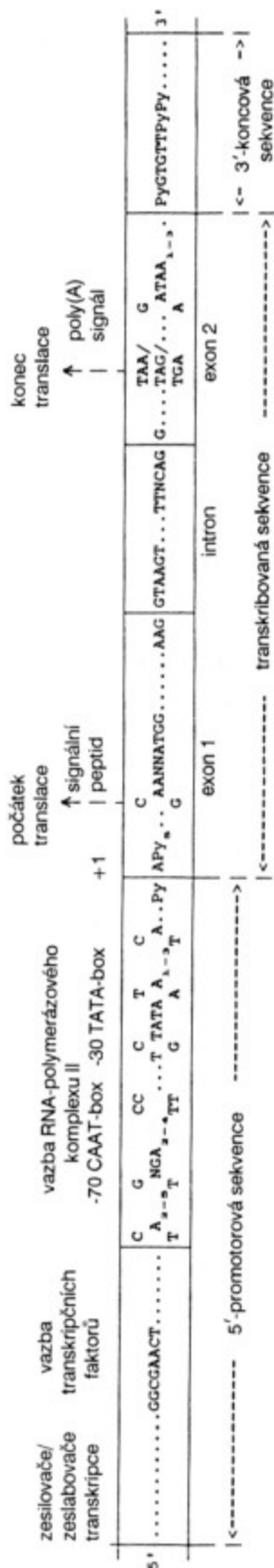
kvencemi. Mnoho významných rostlinných proteinů je kódováno repetitivními sekvencemi, které jsou organizovány v multigenních rodinách.

## 16.1.1 Rostlinné jaderné geny

Transkribované části rostlinných genů dosahují délky pouze 800–3 100 pb, přičemž délka mRNA činí 800–2 500 b; průměrný poměr délky genu k délce mRNA je tedy 1,35. Rostlinné geny totiž podobně jako jiné eukaryotické geny obsahují několik úseků (tzv. intronů), které jsou sice součástí primárního transkriptu, avšak jsou z něj ještě před translací vystřiženy. Exprese rostlinných genů je řízena na různých úrovních, mj. spouštěním a rychlostí transkripce, sestřihem a stabilitou primárního transkriptu, rychlostí translace, stabilitou translačního produktu a jeho transportem (Gallie 1993).

### 16.1.1.1 Transkripční a posttranskripční regulace genové exprese

Pro transkripci jsou zejména důležité dvě sekvence DNA na 5'-konech genů. Jejich bližší část (promotor *sensu stricto*) obsahuje Goldbergův–Hognessův (TATA) box, který váže RNA-polymerázový komplex a určuje počátek transkripce (asi o 30 nukleotidů dále po proudu transkripce). Vzdálenější úseky DNA (ve směru 5') zahrnují vazebná místa pro regulační proteiny (transkripční faktory), které mohou interagovat s RNA-polymerázovým komplexem (obr. 16.1). Tyto úseky mají regulační úlohu; v závislosti na pozici buňky v rostlině, času a vnějších vlivech fungují jako zesilovače nebo zeslabovače transkripce. Jaderné geny kódující proteiny jsou transkribovány pomocí enzymatického komplexu RNA-polymerázy II. Podobně jako jiné eukaryotické organismy obsahuje většina rostlinných jaderných genů sekvence kódující proteiny (**exony**) a nekódující sekvence (**introny**). Mechanizmy vystřihování intronů jsou u různých nezralých mRNA různé a pro spojení exonů a intronů jsou charakteristické vysoce konzervativní sekvence. Vlastní introny mají vysoký obsah adeninu a uracilu, zatímco exony jsou charakteristické vyšším obsahem guaninu a cytozinu. Introny jsou obsaženy i v některých mitochondriálních a plastidových genech a podílejí se na regulaci genové exprese mechanismem, který dosud nebyl zcela objasněn.



Obr. 16.1 Schéma rostlinného genu včetně jeho 5'- a 3'-řídících (regulačních) sekvencí. Zkratky 2'-deoxyribonukleotidových bází: A – adenin, C – cytozin, G – guanin, T – tymin, N – jakákoli báze, Py – pyrimidinová báze (cytozin nebo tymin).

### 16.1.1.2 Struktura genetického materiálu v jádře

U eukaryotických organismů je transkripce řízena i strukturou chromatinu. **Chromatin** představuje jaderný nukleoproteinový materiál, ze kterého jsou složeny chromozomy. Je tvořen DNA v komplexu s histony a nehistonovými proteiny.

### 16.1.1.3 Jaderné proteiny

Stejně jako u jiných eukaryotických organismů reprezentují histonové geny u rostlin rozsáhlé multigenní rodiny, které kódují pět typů bazických **histonů** podílejících se na struktuře chromatinu. Čtyři z nich (H2A, H2B, H3 a H4) spolu s DNA vytvářejí typickou oktamerovou nukleozomovou strukturu, zatímco histon H1 se váže na DNA v oblastech mezi nukleozomy. Tyto oblasti DNA jsou štěpitelné nukleázami a mohou se tu vázat transkripční faktory. Histony se podílejí na regulaci genové exprese; podobně jako jiné proteiny mohou být posttranslačně modifikovány zejména acetylací, fosforylací nebo ribozylací. Mezi jaderné nehistonové bílkoviny patří především proteiny charakterizované vysokou elektroforetickou pohyblivostí (*high mobility group* neboli proteiny *HMG*), které jsou zahrnuty ve struktuře transkripčně aktivního chromatinu.

### 16.1.1.4 Jadérko

Místem, kde u eukaryot probíhá ribozomální genová transkripce a procesy nezbytné pro tvorbu ribozomálních podjednotek, je jadérko. V jadérku jsou syntetizovány 18S, 25S a 5,8S rRNA a ty jsou posléze uspořádány v **ribozomy** spolu s 5S rRNA a ribozomálními proteiny. Velká ribozomální podjednotka obsahuje velkou 25S rRNA, jednu nebo dvě molekuly malých 5,8S rRNA a 5S rRNA a 30 až 40 ribozomálních proteinů, zatímco malá podjednotka obsahuje jedinou molekulu 18S rRNA a 20 až 30 proteinů. Jadérko není stabilní organelou: jeho struktura, velikost a organizace závisí na biogenezi ribozomů. Počet jadérek v buňkách organismů téhož druhu není stabilní, je variabilní dokonce i v buňkách různých pletiv organismu a může záviset též na fázi buněčného cyklu. Geny kódující ribozomální RNA (rRNA) a malé **jaderné** RNA (snRNA) transkribované RNA-polymerázou I a transferové geny (tRNA) transkribované s po-

mocí RNA-polymerázy III patří mezi evolučně vysoce konzervativních geny, které nekódují žádné proteiny, nýbrž RNA tvořící součást genetického aparátu. Podle počtu kopií patří geny pro rRNA mezi vysoce repetitivní (počet tandemových opakování genů pro rRNA je 1 200–32 000 kopií, tvoří asi 1 % celkové jaderné DNA), i když jejich značná frakce bývá inaktivní (Flavell 1986). Nicméně rRNA tvoří více než 90 % z celkového množství RNA, neboť rostlinná buňka potřebuje ke své proteosyntéze asi 10 milionů cytoplazmatických ribozomů. Vzhledem k tomu, že potřebná kvantita molekul rRNA úzce souvisí s celkovou proteosyntetickou aktivitou buňky, podíl aktivních genů pro rRNA se v průběhu ontogeneze mění a variabilní může být dokonce i počet kopií genů pro rRNA (diferenciální amplifikace).

### 16.1.1.5 Geny kódující proteiny

I když rostlinné organizmy jsou podstatně strukturně i funkčně jednodušší než živočichové, jejich genomy jsou podobně velké a komplexní a obdobné jsou i mechanismy jejich funkční regulace. Také obecná struktura rostlinných genů je shodná s živočišnými geny a zahrnuje tři základní úseky: vlastní gen kódující polypeptid a dvě oblasti, které jej obklopují, na 5'-konci iniciační (viz odd. 16.1.1.1) a na 3'-konci terminační. Terminační sekvence na 3'-koncích kódujících sekvencí obsahují polyadenylační signály, které slouží k posttranskripční modifikaci související se stabilitou mRNA. V aminoterminální oblasti některých translačních produktů se nacházejí aminokyselinové sekvence, které nemají bezprostřední vztah k funkci polypeptidů a jsou z nich finálně odstraněny. Tyto tzv. **tranzitní peptidy** umožňují membránový transport proteinů do plastidů nebo mitochondrií.

Nejlépe prostudovanými geny u rostlin jsou geny kódující **zásobní proteiny** v semenech, neboť jejich transkripční a translační produkty tu jsou velmi četné a navíc mají často rozhodující agronomický význam. Zásobní proteiny bývají klasifikovány na bázi jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech: u obilovin jsou hlavními zásobními proteiny prolaminy (rozpuštěné ve vodném roztoku alkoholu), které obsahují až 30 molárních procent prolinu a 40 molárních procent glutaminu, mají však nízký obsah některých esenciálních aminokyselin (např. lyzinu). Určitá imunologická křížová reaktivita u prolaminů kukuřice (zein), ječmene (hordein) a pšenice (gliadin) naznačuje značnou ho-

mologii příslušných genů. Dalšími důležitými skupinami semenných proteinů jsou albuminy (rozpuštěné ve vodě), globuliny (rozpuštěné v roztocích solí) a gluteliny (rozpuštěné v roztocích kyselin nebo alkálií). Zásobní semenné proteiny jsou kódovány genovými rodinami. Jednotlivé geny v počtu několika až několika desítek kopií na haploidní genom jsou lokalizovány ve shlcích nebo jednotlivě na různých chromozomech. Obvykle obsahují introny a jejich produkty představují heterologní skupiny proteinů různé velikosti.

### 16.1.1.6 Reverzně se replikující sekvence DNA

Reverzní transkripce, tj. zpětný přepis genetické informace z RNA do DNA, je součástí replikačního cyklu savčích retrovirů a rostlinných kaulimovirů; u eukaryotických organizmů jde o proces výjimečný. Některé sekvence DNA jaderného genomu se replikují reverzní transkripcí prostřednictvím RNA jako meziprojektu: patří sem koncové úseky chromozomů (telomery) a retroelementy. **Telomery** jsou specializovanými strukturami na koncích chromozomů, které tvoří nukleozomovou strukturu. Obsahují jednoduchou repetitivní sekvenci DNA bohatou na guaninová rezidua. Telomery se replikují pomocí enzymu telomerázy, ribonukleoproteinu, který syntetizuje vlákno telomerické DNA podle templátu uvnitř sekvence své RNA-složky (Blackburn 1991).

Druhou skupinou reverzně se replikujících sekvencí DNA jsou **retroelementy**, u kterých dochází ke transpozici dceřiných kopií tvořených reverzní transkripcí intermediární RNA. Byly prokázány, podobně jako mobilní genetické elementy replikující se DNA-DNA-cestou, ve vysokém počtu kopií na genom u mnoha druhů vyšších rostlin (Grandbastien 1992). Jejich struktura je podobná retrovirům, retroelementy však nejsou infekční a nekódují plášťový protein. Je zřejmé, že retroelementy jsou fylogeneticky velmi starými strukturami a mohou hrát roli v evoluční adaptaci rostlin.

### 16.1.2 Mitochondriální genom

Mitochondriální genom je u vyšších rostlin (ve srovnání s mitochondriálním genomem živočichů) extrémně velký a složitý ( $2 \cdot 10^5$  až  $2,5 \cdot 10^6$  pb). Skládá se obvykle z jednoho hlavního (*master*) chromozomu,

který obsahuje veškerou mitochondriální genetickou informaci a četné repetitivní sekvence. Rekombinací mezi těmito repetitivními sekvencemi vznikají subgenomové cirkulární (popř. i lineární) chromozomy a plazmidy, v důsledku čehož je mitochondriální genom variabilnější než plastidový. Mitochondriální genom je spolu se specifickými proteiny lokalizován v mitochondriálním jádře a obvykle obsahuje více kopií chromozomů (Kuroiwa 1982). Mitochondrie mají svůj vlastní replikační, transkripční a translační aparát. Jejich geny obsahují introny a po jejich vystřížení dochází ke spojování exonů rozptýlených v mitochondriálním genomu (*trans-splicing*).

Mitochondriální geny řady druhů rostlin se často podrobují zvláštním posttranskripčním úpravám, které modifikují kódující schopnost mRNA. Mechanizmem, který ještě není zcela objasněn (jde pravděpodobně o deaminaci v pozici C-6 pyrimidinového kruhu), dochází v mRNA ke tvorbě uracilu v místě, kde se původně nacházel cytozin. Tato **modifikace mitochondriálních molekul RNA** (*RNA editing*) vede ke změnám tripletového kódu, a tím i k aminokyselinovým záměnám nebo výskytu iniciačních a terminačních kodonů. Biologický význam procesu editování zjevně spočívá v regulaci množství translatovatelných mRNA bez *de novo* syntézy primárních transkriptů.

### 16.1.3 Plastidový genom

Plastidový genom obsahuje obvykle několik desítek až stovek shodných cirkulárních dvouvláknových molekul DNA o velikosti  $1,2 \cdot 10^5$  až  $1,9 \cdot 10^5$  pb. Každá tato molekula DNA obsahuje rozsáhlou oblast přítomnou ve dvou kopiích v obrácené orientaci, která nese operon kódující plastidové geny pro rRNA. Fyzikální mapování plastidového genomu prokázalo jeho vysokou konzervativnost mezi vzdálenými skupinami krytosemenných rostlin a řasami, u vyšších rostlin je též značná konzervativnost v pořadí genů. Na základě sekvencování plastidového genomu bylo zjištěno, že existuje vysoký stupeň homologie mezi plastidovými a prokaryotickými geny. Tento výsledek potvrzuje hypotézu o **endosymbiotickém původu** eukaryotických buněk: plastidy (i mitochondrie) vznikly z volně žijících prokaryot, která vstoupila do předchůdců eukaryotických buněk. Expres plastidových genů je řízena na úrovni transkripce a translace a je závislá i na posttranskripčních a posttranslačních modifikacích,

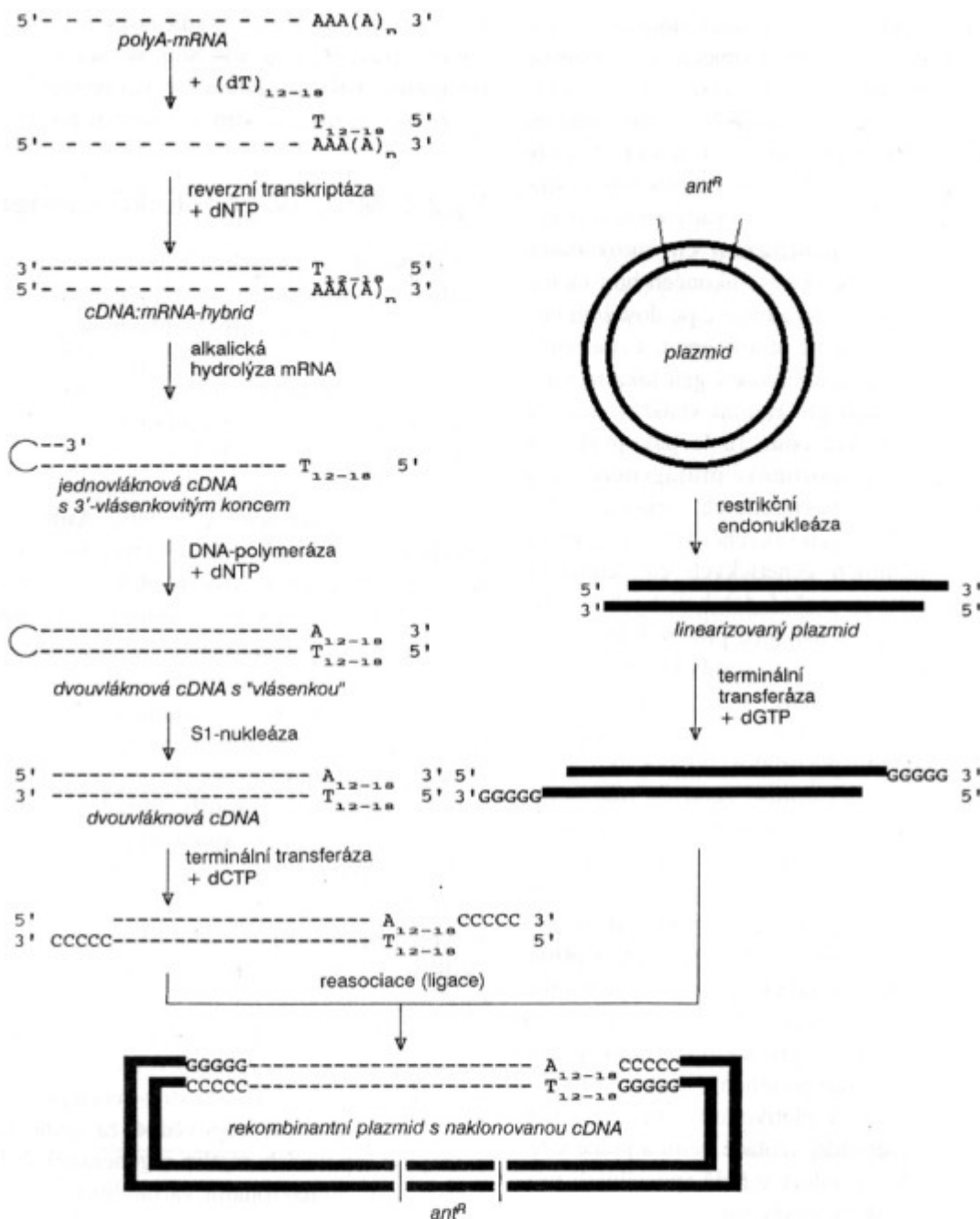
mezi které patří i editování mRNA podobně jako u mitochondrií. Plastidové geny obsahují nekódující introny, avšak jejich mRNA nemají čepičkovou strukturu na 5'-konci ani polyadenylační signál na 3'-konci (Weil 1987).

Plastidy sice mají svůj vlastní genom i replikační, transkripční a translační aparát, avšak většina proteinů funkčních v plastidech je kódována jadernými geny, které jsou jako prekurzorové molekuly translatovány na cytoplazmatických ribozomech a poté importovány do plastidů. Tyto prekurzory jsou poněkud větší než odpovídající zralé proteiny, neboť obsahují v aminoterminální části tranzitní peptid, který umožňuje jejich vstup do plastidů.

### 16.1.4 Metody izolace genů a mapování genomu

Nové metody molekulární genetiky umožňují aplikovat celou řadu strategií při izolaci a identifikaci rostlinných genů. Patří mezi ně především konstrukce **knihoven cDNA** z populací izolovaných mRNA (obr. 16.2). Jejich subtrakční hybridizace, kdy jsou srovnávány cDNA-klony připravené z různých genotypů nebo orgánů, umožňují izolovat geny, které jsou známé pouze svým fenotypovým projevem. Cenným nástrojem ke srovnávání příbuznosti genotypů i ke konstrukci vazebných map je **polymorfie délky restrikčních fragmentů DNA** (*RFLP, restriction fragment length polymorphism*), detekovaná pomocí hybridizace na membránách se značenými sondami DNA. Polymerázová řetězová reakce (PCR) pak umožňuje izolovat a sekvenovat úseky DNA lokalizované mezi dvěma známými oligonukleotidovými sekvencemi. S pomocí oligonukleotidů s náhodnou sekvencí je také možné analyzovat **genomovou polymorfii** a provádět mapování genomu (například technikou *RAPD, random amplified polymorphic DNA*). Identifikaci genů odpovídajících za změněný fenotyp nebo studium specifické genové exprese v různých pletivech a orgánech umožňuje technika srovnávání radioaktivně značených produktů polymerázové řetězové reakce (tzv. *differential display*), tvořených z templátů cDNA připravených reverzní transkripcí z populace izolovaných polyadenylovaných mRNA (*RT-PCR, reverse transcription PCR*).

Při lokalizaci genu v genomu se obvykle vychází z genomových knihoven (obsahujících velké úseky



Obr. 16.2 Jedna z možných metod přípravy knihoven cDNA komplementárních k populaci mRNA. Prvním krokem je izolace celkové RNA z rostlinného materiálu, následuje selekce polyadenylovaných molekul mRNA a syntéza komplementárního řetězce DNA pomocí reverzní transkriptázy iniciovaná z oligo(dT)primeru. Alkalickou hydrolyzou je pak z cDNA:mRNA-hybridu odstraněno původní vlákno mRNA a pomocí DNA-polymerázy se nasyntetizuje druhé vlákno cDNA. Enzym S1-nukleáza (která je schopna štěpit pouze jednovláknovou DNA) pak degraduje vlásečkovou strukturu, která obě vlákna spojuje, a konečně terminální transferáza dosyntetizuje na 3'-hydroxylových koncích obou vláken DNA oligodeoxycytidinové segmenty, umožňující klonování populace těchto molekul cDNA do plazmidového vektoru, ve kterém jsou na 3'-koncích opět s pomocí terminální transferázy syntetizovány komplementární segmenty oligodeoxyguanidinové. Finálním krokem je včlenění fragmentů cDNA do plazmidu a transformační přenos tohoto rekombinantního plazmidu do bakterií *E. coli*, které jsou selektovány na rezistenci k příslušnému antibiotiku. Symboly: mRNA (---), cDNA (---), plazmid (▬▬▬), dNTP, dCTP, dGTP – deoxynukleotidtrifosfáty, dT – deoxytymidin.

genomové DNA klonované v bakteriofágách nebo umělých kvasinkových chromozomech) a z možnosti zjištění chromozomální pozice neznámého genu ve vazbě k již klonované sekvenci DNA. Další analýza potom probíhá pomocí hybridizace DNA/DNA a případně i sekvenováním DNA od tohoto nejbližšího známého fragmentu DNA v překrývajících se klonech genomové DNA (tzv. **procházení chromozomem**, *chromosome walking*). Proces je ukončen buď identifikací hledaného genu, nebo alespoň, po dosažení nejbližšího markeru na opačné straně genu, vymezením genomového úseku, kde je hledaný gen lokalizován.

Vypracování postupů pro rutinní vnášení genů do rostlin (transgenóza, viz odd. 16.4) pak poskytuje možnost **inzerční transpozonové mutagenéze** (*gene tagging*): pomocí agrobakteriálních vektorů a náhodné integrace cizorodých sekvencí DNA (například *T-DNA* nebo mobilních genetických elementů) do rostlinného genomu je možné detekovat jeho strukturní a funkční změny a nakonec prostřednictvím cizorodé DNA jako hybridizační sondy izolovat odpovídající geny. Izolace genu z genomové banky připravené z takto modifikované rostliny je obvykle usnadněna začleněním plazmidového počátku replikace a bakteriálního selekčního genu do transponované sekvence DNA (tzv. metoda *plasmid rescue*).

Pomocí inzerční mutagenéze je možné izolovat i rostlinné promotory. V tomto případě je do rostlin vnášen signální gen postrádající promotorovou sekvencí a k jeho expresi tedy může dojít pouze v případě, kdy je integrován za jakýkoli funkční promotor. Prostřednictvím konstrukce chimérických genů vzniklých fúzí izolovaných promotorů se strukturními signálními geny je možné po jejich vnesení do rostlin analyzovat orgánovou a pletivovou specifitu jejich exprese. Detailní metodiky izolace genů a práce s rekombinantní DNA lze nalézt v řadě speciálních monografií (například Shaw 1988, Sambrook et al. 1989, Negrutiu a Gharti-Chhetri 1991).

## 16.2 Strukturální stabilita rostlinného genomu

Původní představy naznačovaly, že struktura eukaryotického genomu je velmi stabilní a podrobuje se pouze výjimečným stochastickým změnám, které se v závislosti na selekční výhodnosti mohou fixovat v evoluč-

ním procesu. Současné studie však dokazují, že zejména rostlinné genomy jsou ve stavu **dynamické proměnlivosti** a podléhají četným přestavbám, někdy i v závislosti na měnícím se vnějším prostředí.

### 16.2.1 Mobilní genetické elementy

Pravděpodobně nejznámějším zdrojem nestability rostlinného genomu jsou mobilní genetické elementy, objevené v 50. letech B. McClintockovou při studiu chromozomálních aberací u kukuřice. Tyto elementy DNA jsou svou strukturou podobné bakteriálním transpozonům a způsobují inzerční mutace podle místa své translokace (obr. 16.3). Pokud obsahují gen nezbytný pro svůj replikativní přenos, transpozázu, jedná se o autonomní genetické elementy. **Autonomní elementy** mají velikost až několika tisíc pb a jsou ohraničeny krátkými repetitivními sekvencemi v obrácené orientaci. Delecemi v autonomních elementech vznikají **neautonomní elementy**, jejichž mobilita musí být zajišťována enzymem produkovaným autonomními elementy. Jedinou podmínkou mobilizace těchto elementů je tak přítomnost terminálních obrácených opakování. Mobilní genetické elementy jsou hlavní příčinou dynamicky proměnlivého stavu rostlinného genomu a způsobují spontánní nestabilní mutace i chromozomové přestavby (Döring a Starlinger 1986). V kryptickém stavu jsou mobilní elementy fenotypově neidentifikovatelné. Mutantní fenotyp je výsledkem jejich inzerce do strukturních oblastí genů (inaktivace) nebo do regulačních sekvencí (reaktivace inaktivních, resp. suprese aktivních genů). Mobilní elementy bývají např. vysoce aktivní v buněčných kulturách *in vitro* z důvodu stresových podmínek kultivace a mohou být odpovědné za četné nestabilní změny v populacích rostlin-regenerantů (jako jedna z příčin tzv. somaklonální variability).

### 16.2.2 Repetitivní sekvence DNA

Repetitivní (tj. opakující se) sekvence lze podle frekvence výskytu rozdělit na skupiny s nízkou četností (10 až 100 kopií v genomu), středně se opakující sekvence (100- až 1 000krát) a frakci vysoce repetitivních sekvencí DNA (více než 10 000 kopií na genom). V některých genomech tyto vysoce repetitivní sekvence reprezentují až 20 % jaderného genomu a tvoří rozsáhlé **heterochromatinové oblasti**.



Podle způsobu uspořádání v genomu dělíme repetitivní sekvence DNA do dvou hlavních typů. Prvním typem jsou tandemové sekvence, složené z identických nebo podobných jednotek uspořádaných za sebou v mnoha opakováních, např. satelitní DNA. Délky jejich jednotek se pohybují od několika pb až po několik tisíc pb a počet kopií dosahuje až milion na genom. Jsou obvykle lokalizovány ve specifických oblastech genomu. Druhým typem opakujících se sekvencí jsou takové repetice, které jsou v genomu rozptýleny mezi jinými repeticemi a jedinečnými sekvencemi (Flavell 1980). Repetitivní sekvence DNA (jaderné a mitochondriální) představují další významný zdroj strukturní nestability rostlinného genomu, neboť se v průběhu ontogeneze a fylogeneze podrobují různým typům změn (viz odd. 16.2.3).

### 16.2.3 Ontogenetická a fylogenetická nestabilita rostlinného genomu

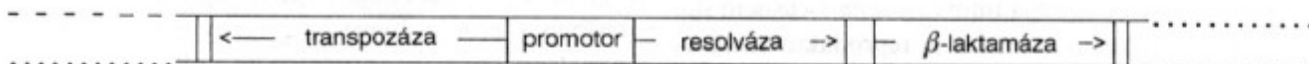
Na základě studia reasociační kinetiky DNA bylo zjištěno, že rychlost evoluce repetitivních sekvencí je enormně vysoká. Protože tyto sekvence nebývají exprimovány a nejsou proto vystaveny selekčnímu

tlaku, dochází v nich ke kumulaci bodových mutací. Často jsou pak velké repetitivní sekvence složeny z podrodin s různou četností opakování.

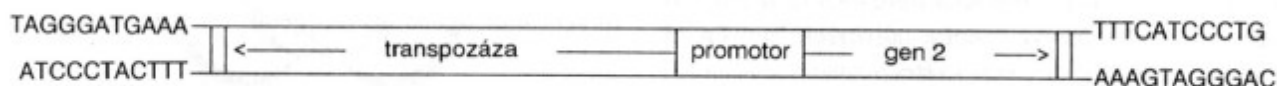
Důkazem značné mobility rostlinného genomu je prokázáný přenos řady plastidových a mitochondriálních sekvencí DNA do jádra (tzv. **promiskuitní DNA**; Lewin 1983). Dnešní organelové genomy nyní naplňují pouze malý podíl svých genetických potřeb, ostatní jsou poskytovány jadernými geny. U vyšších rostlin a kvasinek bylo prokázáno, že řada organelových sekvencí DNA byla po duplikaci stabilně transponována do jádra. Mobilita mezi jádrem a mitochondriemi, jádrem a plastidy a plastidy a mitochondriemi není omezena jen na prekambriální dobu, ale je konstantním a kontinuálním procesem po celou evoluci.

U většiny eukaryotických organismů někdy dochází k vícečetné replikaci některých sekvencí DNA (**amplifikace genů**). Nestabilní (dočasné) amplifikace DNA provázejí diferenciaci i dediferenciaci a mohou být vyžadovány ke specifickým buněčným funkcím (Nagl 1990). Původně formulovaná zákonitost konstantního množství DNA na buněčné jádro tak byla objevy somatické polyploidie, transponovatelných elementů a diferenciací replikace DNA nahrazena novou zákonitostí **potenciální genomové variability**.

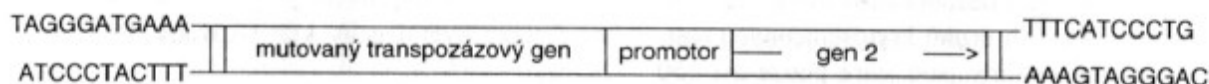
*Tn3*-element (*Escherichia coli*):



*Ac*-element (*Zea mays*):



*Ds*-element (*Zea mays*):



Obr. 16.3 Srovnání struktury mobilních genetických elementů u bakterií a rostlin. *Tn3* je jedním z nejlépe prostudovaných transpozonů v *Escherichia coli*. Obsahuje tři geny, které odpovídají za syntézu enzymů transpozázy, resolvázy (katalyzují přenos transpozonu z jednoho místa cirkulárního chromozomu na jiné) a  $\beta$ -laktamázy, která odpovídá za rezistenci bakterie vůči antibiotiku ampicilinu. *Ac* a *Ds* jsou zástupci rostlinných mobilních elementů izolovaných z kukuřice (*Zea mays*). *Ac* je tzv. autonomním elementem, neboť nese gen pro transpozázu umožňující jeho mobilitu v rostlinném jaderném genomu. Delecí, popř. jinou mutací v transpozázovém genu vznikají neautonomní elementy typu *Ds*, jejichž mobilita může být zprostředkována enzymem transpozázou, produkovanou v téže buňce autonomním elementem *Ac*. Nutným předpokladem mobilizace všech bakteriálních i rostlinných elementů je přítomnost (ne vždy zcela shodných) obrácených opakování nukleotidových sekvencí na jejich koncích (u *Tn3* je tvořeno 38 nukleotidy, u uvedených rostlinných elementů obvykle 11 nukleotidy). Délky mobilních elementů *Tn3* a *Ac* jsou podobné (asi 5 000 pb), elementy *Ds* mohou být podstatně kratší.

Některé genomové změny vznikají následkem vnějších stresových vlivů, jiné jsou součástí normálního ontogenetického programu nebo k nim může docházet i náhodně. Replikace DNA začíná v eukaryotických buňkách na velmi mnoha počátcích (asi několika desítkách tisíc), tento počet je u odlišných druhů rostlin i pletiv a orgánů různý. Jsou sdruženy v rodinách a každá rodina přitom obsahuje místa, která jsou aktivována ve stejnou dobu. Konstitutivní heterochromatin se replikuje v pozdní fázi S buněčného cyklu a nepodrobuje se procesu crossing-over při meióze. Walbot a Cullis (1985) vyslovili teorii, že genomová flexibilita rostlin je odrazem jejich mimořádné adaptivní schopnosti na měnící se životní prostředí. Příkladem této flexibility jsou polyploidie, přestavby chromozomů, změny v chromozomálním imprintingu, genové amplifikace a redukce i aktivita transponovatelných elementů. Mechanismy způsobující změny genomu mohou být různé, některé mají programový charakter (např. amplifikace genů s cílem zvýšení kvantity jejich produktů), jiné jsou náhodné (obvykle transpozice mobilních elementů).

Snad největším rozdílem mezi rostlinami a živočichy je **neschopnost lokomočního pohybu** u rostlin. Zvířata se mohou přizpůsobovat měnícímu se životnímu prostředí svým chováním, zatímco rostliny tak mohou činit pouze krátkodobými fyziologickými regulacemi nebo dlouhodobě změnami svého vývoje. U živočichů je zárodečná linie založena v časném stadiu vývoje, zatímco u rostlin je reprodukční vývoj zahájen až přeměnou vegetativního prýtového vrcholu v květní v reakci na prostředí nebo stárnutí. Tento způsob reprodukce znamená, že u rostlin v podstatě není přítomna zárodečná linie *strictu senso* a že gamety jsou tvořeny z mnoha odlišných buněčných linií přítomných v různých květech rostliny. Rostliny jsou podstatně více tolerantní vůči chromozomálním abnormalitám než živočichové. Příkladem flexibility rostlinného genomu je i obrovská rozdílnost ve velikosti genomů u různých druhů krytosemenných rostlin. Krytosemenné rostliny jsou staré pouze asi 150 milionů let, avšak mají přitom velmi široké rozpětí množství DNA na jádro, od 0,1 pg až do 100 pg u různých druhů (Bennet a Smith 1976). Savci jsou fylogeneticky starší skupinou organismů (asi 300 milionů let), ale množství DNA v jádře je u většiny druhů téměř shodné. Rostliny jsou tak výrazným příkladem tzv. **paradoxu hodnoty C**, tedy ztráty korelace mezi množstvím DNA v jádře a komplexitou pří-

slušného organismu. Amplifikace genů indukovaná stresem je považována za jeden z nejvýznamnějších faktorů evoluce genomu a tedy i vytváření nových znaků. Názorným příkladem flexibility rostlinného genomu jsou rychlé, vnějším stresem indukované genetické i epigenetické změny morfologických a fyziologických znaků u lnu, které jsou děděny v řadě hlavních generací (tzv. genotropy).

## 16.3 Řízení procesů diference

Procesy pletivové a orgánové diference jsou řízeny kombinatorickou aktivací promotorových sekvencí mnoha genů, která je přísně regulována časově a místně (Lyndon a Francis 1992). Klíčovou roli při diferenciaci meristemických buněk v orgánové systému hrají zejména **homeotické geny**, které kódují transkripční faktory aktivující specifické geny. Proteinové transkripční faktory jako produkty regulačních genů mají dvě významné oblasti: **konzervativní DNA-vazebnou doménu**, která zajišťuje specifitu vazby na regulační sekvenci DNA, a **aktivační doménu**, která je schopna interagovat s jinými faktory. Důležitými mutacemi v homeotických genech mají za následek změnu identity vegetativních nebo květních orgánů. Tvorba květních orgánů reprezentuje časově posloupný proces; homeotické geny jsou aktivovány (pravděpodobně prostřednictvím rostlinných hormonů či jiných efektorů) pouze v určitých pletivech a v určitém období vývoje rostliny a jejich produkty, transkripční faktory, řídí procesy diference aktivací jiných, morfogenetických genů.

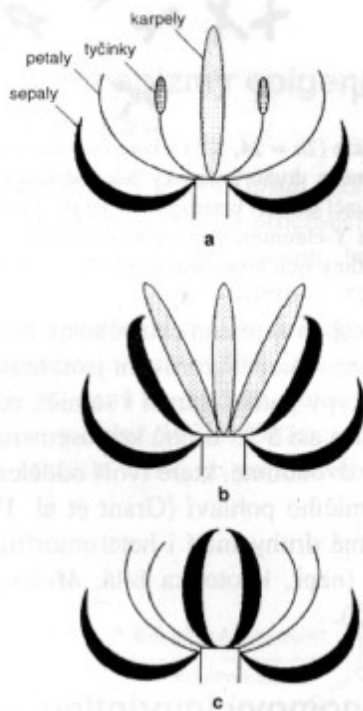
### 16.3.1 Homeotické květní geny

Na základě fenotypového projevu jejich mutací jsou homeotické květní geny klasifikovány do tří skupin (Schwarz-Sommer et al. 1990):

**První skupina** zahrnuje mutace ovlivňující vývoj nebo iniciaci květního primordia. Takové mutantní rostliny netvoří vlastní reprodukční orgány, ba ani květní obaly. Patří sem typy, u kterých mutantní genové produkty interferují s hormonálně řízenou tvorbou květního primordia (mutanty *sterilis* a *steriloides*) nebo narušují vývoj primordia po květní indukci (mutace *squamata* a *squamosa*).

**Druhou skupinu** homeotických mutantů tvoří mutace, které způsobují změnu květní symetrie. Tak například u hledíku, který má květy souměrné podle jediné osy (zygomorfni), způsobuje mutace *cycloidea* tvorbu květů a květních orgánů paprscitě souměrných (aktinomorfních).

**Třetí skupina** homeotických genů determinuje identitu jednotlivých květních orgánů a jejich architekturu. Květy mají typické uspořádání svých orgánů ve čtyřech kruzích: v prvním a druhém vnějším kruhu se vytvářejí květní obaly, tj. kališní lístky (sepaly), resp. korunní plátky (petaly), ve třetím a čtvrtém vlastní pohlavní orgány, tj. tyčinky, resp. pestíčky (karpely). Všechny dosud známé homeotické mutanty této třetí skupiny se vyznačují tím, že jediná mutace homeotického genu zasahuje vždy dva sousední květní kruhy a že existuje řada nezávislých lokusů, jejichž mutace se projevují shodným homeotickým fenotypem (obr. 16.4). Tak například byly identifikovány geny, které způsobují výskyt pestíkovitých sepal a tyčinkovitých petal (geny *ovulata*, *macho*, *apetala2*),



Obr. 16.4 Květní diagramy (příčné řezy) huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) – normální rostlina a dva homeotické mutanty. (a) Normální typ (oboupohlavný květ), (b) mutant *pistillata*, u něhož dochází k přeměně korunních plátků v kališní lístky a tyčinek v pestíčky (květ je tedy jedнопohlavný, samičí), (c) mutant *agamous*, jehož tyčinky jsou transformovány v další kruh korunních plátků a pestíčky v kališní lístky (květ bez reprodukčních orgánů).

petaloidních tyčinek a sepaloidních pestíků (geny *ple-na*, *petaloidea*, *agamous*) nebo sepaloidních petal a pestíkovitých tyčinek (geny *deficiens*, *globosa*, *pistillata* aj.).

Analýza klonovaných rostlinných homeotických genů *deficiens* a *agamous* a jimi kódovaných proteinů odhalila oblast s vysokým stupněm homologie k DNA-vazebným doménám dvou známých transkripčních faktorů u fylogeneticky velmi vzdálených organismů, savců (*SRF*, *serum response factor*) a kvasinek (*MCMI*, *minichromosome maintenance gene*). Tato konzervativní oblast je proto nazývána **MADS-doménou** (*MCMI*, *Agamous*, *Deficiens*, *Srf*) a byla později nalezena i u řady jiných rostlinných homeotických genů. Tato srovnání naznačují, že molekulární mechanismy řízení ontogeneze u rostlin a jiných eukaryot mohou být obdobné.

### 16.3.2 Duální systém dědičnosti u eukaryotických organismů

U eukaryotických organismů existují dva systémy dědičnosti, z nichž jeden odpovídá za přenos genetické informace mezi pohlavními generacemi a druhý za přenos informace o expresi genů v průběhu ontogeneze (Maynard Smith 1990). První systém je založen výlučně na genetické informaci dané sekvencemi nukleotidů v DNA a řídí se principy mendelovské dědičnosti. Druhý systém, nazývaný **epigenetická dědičnost**, vychází též ze základní genetické informace uložené v sekvencích DNA, je však odpovědný za přenos informace o aktivitě genů v buněčných liniích. Je regulován různými vnitřními a vnějšími faktory a je obvykle doprovázen specifickou modifikací příslušných oblastí chromatinu. Tyto modifikace mohou být v určitých případech, zákonitých nebo stochastických, přenášeny i do pohlavního potomstva. Dědičnost epigenetických změn neodpovídá mendelovským zákonům klasické genetiky. Například **paramutace** (tj. dědičné změny v expresi genů způsobené interakcí alel), popsané zejména u kukuřice, odporují mendelovskému principu o nezávislé segregaci alel. Mendelovy pokusy s hrachem vyústily ve vyslovení principu identity reciprokých křížení. Toto pravidlo neplatí u některých mezidruhových křížení (parentální dominance) a taktéž u genů, které jsou odlišně exprimovány v závislosti na pohlaví rodiče, od kterého byla příslušná alela zděděna (parentální neboli genomový

Tab. 16.2 Srovnání a příklady některých epigenetických procesů u krytosemenných rostlin a savců.

	Krytosemenné rostliny	Savci
Epigenetické procesy		
parentální imprinting	pouze v extraembryonálních pletivech – triploidní endosperm (2 maternální genomy + 1 paternální genom)	řada genů v embryonálních tkáních, karcinomy dizomického původu, projev mnoha nervových chorob v závislosti na rodičovském původu
kontrola výživy embrya		extraembryonální paternální inaktivace X-chromozomu
možnost androgeneze, partenogeneze a polyploidie	vysoká (přirozeně i experimentálně)	nemají
alelické interakce	paramutace, transgeny	transvekce
kompence dávky genů nesených pohlavními chromozomy	lyonizace X-chromozomu u některých dvoudomých rostlin?	lyonizace jednoho samičího X-chromozomu
inaktivace transgenů	velmi častý jev	častý jev
funkční (popř. genetická) haploidie	gametofytická fáze vývinu, pohlavní chromozomy u některých dvoudomých rostlin	poohlavní chromozomy, alelická exkluze v buňkách produkujících imunoglobuliny, tvorba haploidních gamet
parentální dominance u mezidruhových hybridů	běžný jev	častý jev
specifická ztráta (sad) chromozomů	mezidruhové hybridy u ječmene	hybridní buňky v kulturách <i>in vitro</i>
Mechanismy		
metylace DNA	metylace promotorů inaktivních genů v nukleotidových sekvencích: CG, CNG i nesymetrických	CG (vzácněji i CNG)
časná/pozdní doba replikace DNA	časná replikace aktivních a pozdní replikace inaktivních genomových domén	
acetylace nukleozomových histonů	deacetylace netranskribovaných míst chromatinu př. fakultativní heterochromatin v endospermu	př. inaktivní X-chromozom

vtisk, *imprinting*). **Genomový imprinting** je tedy definován jako proces, kdy specifická modifikace chromatinu gamet rodičů v závislosti na jejich pohlaví vede k funkčním rozdílům mezi samčím a samičím genomem v diploidních buňkách potomstva. Zatímco u živočichů (zejména u savců) je genomový imprinting zákonitým jevem, u krytosemenných rostlin byl dosud prokázán pouze v mimoembryonálních pletivech semene, endospermu (tab. 16.2). Tento rozdíl



Obr. 16.5 Metafáze ( $2n = 24, XY$ ) v kořenovém meristému samčí rostliny dvoudomého druhu knotovky bílé (*Melandrium album*). U knotovky je samčí pohlaví heterogametické (tj. v prašnicích jsou tvořeny gamety s Y-chromozomem nebo s X-chromozomem), zatímco samičí rostliny jsou homogametické ( $2n = 24, XX$ ).

může být způsoben zejména skutečností, že velká většina druhů krytosemenných rostlin jsou hermafrodité: vytvářejí oba typy gamet, samčí i samičí, na stejných jedincích. Pouze asi 5 % druhů krytosemenných rostlin jsou druhy dvoudomé, které tvoří odděleně jedince samčího a samičího pohlaví (Grant et al. 1994). Některé dvoudomé druhy mají i heteromorfní pohlavní chromozomy (např. knotovka bílá, *Melandrium album*, obr. 16.5).

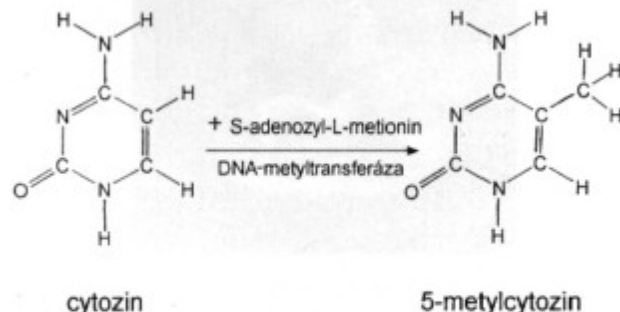
### 16.3.3 Genomový imprinting u rostlin

U krytosemenných rostlin dochází po vniknutí pylové láčky do samičího zárodečného vaku k procesu tzv. **dvojího oplození**. Jedna ze dvou samčích gamet oplodní vaječnou buňku, zatímco druhá samčí gameta splývá s centrálním jádrem zárodečného vaku, který

u většiny druhů rostlin vzniká fúzí dvou haploidních jader ve středu zárodečného vaku. Na procesu diploidní embryogeneze se však podílí jen oplozená buňka vaječná; oplozené dvoujaderné centrální jádro tvoří triploidní extraembryonální pletivo (endosperm), které vyživuje embryo během jeho vývoje. Genom embrya je tedy tvořen jednou mateřskou a jednou otcovskou sadou chromozomů, zatímco v endospermu jsou kombinovány dva mateřské a pouze jediný otcovský genom. Rozsáhlé studie na kukuřici prokázaly, že jestliže je tento poměr genomů v endospermu odlišný, embryo abortuje (Kermicle a Alleman 1990). Tyto analýzy též dokládají, že nepřítomnost otcovských zástupců osmi z 19 zkoumaných chromozomových ramen způsobuje podstatnou redukci velikosti semene. Tento specifický rodičovský efekt je omezen pouze na endosperm; ve vlastní embryonální linii dosud u rostlin nebyl prokázán. Oddělené oplození tedy zakládá zárodečnou dráhu embrya relativně prostou imprintovaných genů, zatímco genomový imprinting je významný pro vyživovací funkci mimoembryonální buněčné linie, vzniklé druhým oplozením.

### 16.3.4 Mechanizmy epigenetických procesů

Ačkoli mechanismy nejsou dosud zcela vysvětleny, je zřejmé, že v epigenetických procesech, které odpovídají za funkční plasticitu genomu, hrají rozhodující úlohu **metylace DNA, kinetika replikace DNA a struktura chromatinu**. Je dokázáno, že metylace DNA (zejména cytozinu, obr. 16.6) negativně ovlivňuje expresi genů u většiny eukaryotických organismů (Jost a Saluz 1993). Zatímco v jaderných genomech savčích druhů je metylováno asi jen 8 %



Obr. 16.6 Modifikace cytozinu metylací v poloze C-5 pyrimidového kruhu. Reakce je katalyzována DNA-metyltransferázou a donorem metylové skupiny je S-adenozyl-L-metionin.

cytozinových bází, u rostlin dosahuje tato hodnota až 30 %. Vysoký stupeň metylace rostlinných genomů je způsoben především značným obsahem hypermetylovaných repetitivních sekvencí (až 90 % genomu). Navíc je rostlinná DNA metylována v sekvencích CG, CNG (kde N je jakákoli báze) i v nesymetrických sekvencích DNA, zatímco v genomech obratlovců se metylace cytozinu vyskytuje téměř výhradně v dubletách CG.

Genomy obsahují výrazně hypermetylované i hypometylované oblasti: hypermetylované domény zahrnují repetitivní sekvence DNA (heterochromatin), které se nepodrobují procesu crossing-over při meióze, zatímco hypometylované domény (tzv. hypometylované ostrůvky) jsou rekombinačně aktivní a představují především konstitutivně exprimované geny. V některých výjimečných případech, jako je inaktivace (lyonizace) jednoho ze dvou pohlavních X-chromozomů v samičích buňkách savců (kompenzace dávky genů nesených tímto chromozomem), dochází k hypermetylaci celého chromozomu (Grant a Chapman 1988, Vyskot et al. 1993). Methylace cytozinu se při mitotickém dělení buňky dědí pomocí udržovacích DNA-metyltransferáz. Znamená to, že tyto metylázy rozpoznávají hemimetylovanou DNA, vznikající semikonzervativní replikací, a metylují nová, dceřiná vlákna DNA. Tento mechanismus tak poskytuje molekulární základ pro buněčnou dědičnost specifických genových aktivit v průběhu individuálního vývoje. Změna metylace může vést k dědičným abnormalitám v expresi genů, které nazýváme **epimutacemi** (Holliday 1990). Nejčastěji užívaným činidlem k experimentální indukci změn metylačního stavu DNA je 5-azacytidin, který může být do DNA včleňován na místo cytozinu nebo metylcytozinu a blokuje metylaci DNA kovalentní vazbou do aktivního centra DNA-metyltransferáz. Methylace promotorových úseků genů jsou často spojeny s jejich inaktivací a jsou orgánově specifické. Bylo též prokázáno, že metylace DNA jsou zodpovědné za aktivaci a inaktivaci rostlinných mobilních genetických elementů a vnesených cizorodých genů (viz odd. 16.4.4). Methylace může inhibovat genovou expresi tím, že brání vazbě specifických proteinových transkripčních faktorů, například vazbou metylcytozin-specifických proteinů. Ačkoli role metylace cytozinu v inaktivaci genů je evidentní, je pravděpodobné, že metylace DNA není příčinným, ale spíše sekundárním procesem, který zajišťuje přenos informace o aktivitě genů (epigene-

tické informace) v průběhu buněčných dělení (Lock et al. 1987).

U rostlin dochází k přeměně apikálního meristému z vegetativního stavu na generativní (indukce kvetení) v závislosti na faktorech vnějšího prostředí, zejména na světle a teplotě. Některé rostliny vyžadují k indukci kvetení chladové působení, tzv. jarovizaci. **Jarovizace** je typickým epigenetickým procesem, který je omezen na jedinou pohlavní generaci; nepřenáší se do pohlavního potomstva. Burn et al. (1993) prokázali, že chladové působení navozuje rozsáhlé snížení hladiny metylcytozinu v rostlinném genomu a současně demonstrovali, že předčasné kvetení lze navodit i pomocí hypometylační látky, 5-azacytidinu. Homeotické geny, které řídí tvorbu květních orgánů (viz odd. 16.3.1), jsou zvláště citlivé na regulaci exprese prostřednictvím metylace cytozinu. Experimentální hypometylace rostlinného genomu (navozená aplikací 5-azacytidinu nebo prostřednictvím protismylného genu k DNA-metyltransferáze) vede především ke změnám identity květních kruhů a ke snížení samčích i samičích fertility (Vyskot et al. 1995, Finnegan et al. 1996).

Klíčová úloha metylace DNA v procesu determinace pohlaví byla prokázána u dvoudomé rostliny knotovky bílé, kde aplikace 5-azacytidinu vedla u samčích rostlin k **pohlavnímu zvratu**: byly zde aktivovány geny odpovědné za tvorbu pestíků, a tak navozen vznik oboupohlavných květů. V tomto případě šlo o epigenetickou změnu jednosměrně dědičnou: byla přenášena do pohlavního potomstva pouze tehdy, kdy oboupohlavná rostlina byla v křížení použita jako pylový donor (Janoušek et al. 1996).

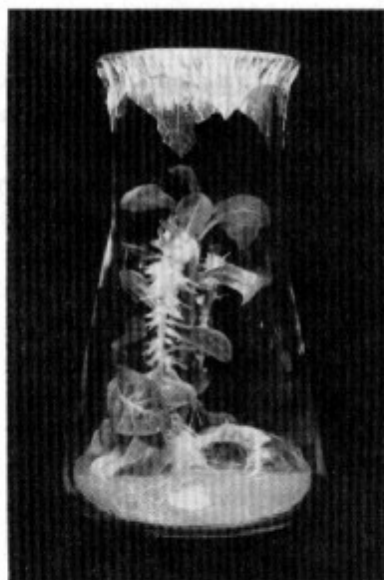
Během dlouhodobé kultivace rostlinných pletiv *in vitro*, které ke svému růstu vyžadují aplikaci exogenních auxinů a cytokininů, občas dochází ke spontánní ztrátě potřeby uvedených rostlinných hormonů. Tento klasický epigenetický jev se nazývá **habituace** a je způsoben aktivací rostlinných genů účastnících se biosyntézy hormonů (Meins 1994). Habituace na rostlinné hormony (auxiny nebo cytokininy), i když je potenciálně reverzibilní, je ve vysoké frekvenci mitoticky udržována v kultivovaných buněčných liniích. Habituované buňky svou schopností autonomní proliferace připomínají rostlinné buňky nádorové, které mohou být iniciovány různými patogenními organizmy (např. bakteriemi, hmyzem nebo houbami) nebo se objevují u některých hybridů „spontánně“ jako důsledek určité kombinace alel (tzv. genetické nádory).

## 16.4 Genové inženýrství rostlin a jeho uplatnění v základním výzkumu a šlechtění

V průběhu posledních dvou desetiletí byl repertoár metod genetiky a šlechtění rostlin rozšířen o techniky genetických manipulací. Jako genetické manipulace s rostlinnou buňkou označujeme všechny nekonvenční techniky prováděné *in vitro*, kterými lze modifikovat rostlinný genom. **Genetické manipulace** u rostlin lze z hlediska používaných metod rozdělit do dvou hlavních směrů:

- **buněčné inženýrství**, zahrnující modifikaci genetické informace recipientního organismu prostřednictvím přenosu celých buněk (parasexuální hybridizace) nebo izolovaných organel,
- vlastní **genové inženýrství**, reprezentující vnášení klonovaných genů (genetická transformace, transgenoz).

Konstrukce transformovaných (transgenních) buněk a rostlin nemá význam pouze ve šlechtění, ale je cenným nástrojem v základním výzkumu při studiu struktury a stability genomu, regulace genové exprese, izolaci genů i při analýze molekulárních mechanismů vývoje a metabolismu rostlin.



Obr. 16.7 Nádor *crown-gall* vyvolaný prostřednictvím onkogenního kmene *Agrobacterium tumefaciens* na poraněné rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum*) pěstované v kultuře *in vitro*. Nadprodukce auxinu a cytokininu tvořeného v nádorových buňkách vede i k indukci růstu kořenů a prýtvových výhonků v okolí nádoru.

## 16.4.1 Metody vnášení klonovaných genů do rostlin

Vnášení genů, obvykle klonovaných v bakteriálních plazmidech, do rostlin je většinou zprostředkováno pomocí přenašečů, tzv. **vektorů** (zejména bakterií nebo virů). Vhodné vektory by měly mít snadný vstup do rostlinné buňky, široký okruh hostitelských rostlinných druhů, schopnost včlenění do rostlinných chromozomů (zaručující stabilitu při mitóze), schopnost přenosu do semenného potomstva a neměly by negativně ovlivňovat fenotyp rostliny. Ne všechny vektory tyto parametry splňují. Cizorodá DNA je po vstupu do rostlinné buňky obvykle integrována do rostlinných chromozomů v náhodných pozicích. Cílenou integraci klonované sekvence DNA (podrobené například definované bodové mutagenézi) do určitého lokusu rostlinného genomu lze realizovat vhodnou konstrukcí vektorové molekuly DNA, obsahující alespoň částečně shodnou sekvenci k cílové genomové DNA, a dosáhnout tak homologní rekombinace. Cílená integrace genů je běžně prováděna u kvasinek i živočichů, u rostlin však dosud bylo dosaženo jen sporadických úspěchů. Tato technika by umožňovala nejen studium genové funkce a regulace, ale i cílené šlechtění rostlin eliminací nežádoucích genů (*gene replacement*). Nejrozšířenějším vektorem k přenosu DNA do rostlin jsou agrobakteriální plazmidy.

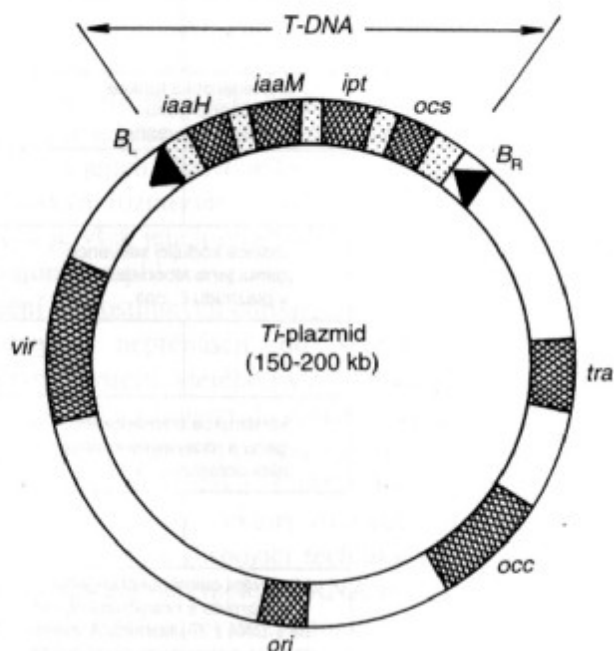
### 16.4.1.1 Agrobakteriální vektory

Rostliny se staly středem zájmu molekulárních genetiků teprve v 70. letech v souvislosti s objevem plazmidů *Ti* (*tumor inducing*) půdní patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která je schopna infikovat většinu druhů dvouděložných a nahosemenných rostlin. Tato bakterie funguje jako „přirozený genový inženýr“, neboť po infekci rostlinné buňky stabilně včleňuje část svého **onkogenního plazmidu** do rostlinných chromozomů. Tohoto procesu lze využít k přenosu žádaných genů po jejich předchozí integraci do transponované sekvence DNA.

*Agrobacterium tumefaciens* je půdní gramnegativní bakterie z čeledi *Rhizobiaceae*, která vyvolává tvorbu nádorů typu **crown-gall** na poraněných místech rostlin (obr. 16.7). Její infekčnost je podmíněna přítomností velkého plazmidu *Ti*, na kterém se nachází mj. i oblast *T-DNA* (*transferred DNA*) a geny odpovědné za virulenci. Vlastní morfologii a fyziologii rostlinných ná-

dorů ovlivňují geny ze segmentu *T-DNA* s promotory eukaryotického typu, které jsou v nádorových buňkách konstitutivně exprimovány. Jde o geny, jejichž produkty katalyzují syntézu **auxinu** (tryptofan-2-monooxygenáza, *iaaM*, a indolyl-3-acetamidhydroláza, *iaaH*) a **cytokininu** (izopentenyltransferáza, *ipt*) a kondenzaci organických kyselin s bazickými aminokyselinami za vzniku látek opinového typu (například oktopinsyntázy nebo nopalinsyntázy). Mimo *T-DNA* nese *Ti*-plazmid i geny zodpovědné za virulenci, katabolismus opinů bakteriální buňkou a konjugativní přenos *Ti*-plazmidu mezi agrobakteriálními buňkami (obr. 16.8).

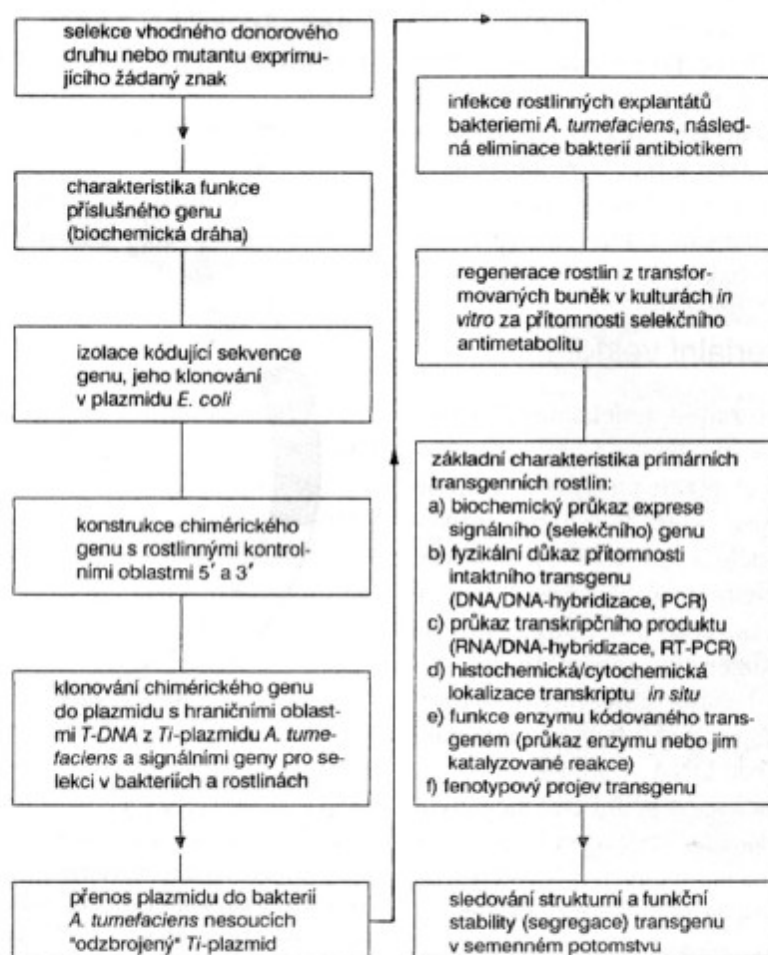
Přenos genetické informace z bakterie *A. tumefaciens* do rostlinného genomu je ojedinělým příkladem genetické výměny mezi organizmy z různých říší. Procesy, které přitom probíhají, však nejsou nijak výjimečné. Jedná se v podstatě o adaptace dvou prokaryotických procesů: aktivace genové exprese v reakci na vnější stimul prostřednictvím dvoukomponentního pozitivního regulačního systému v bakterii a konjugativní přenos *T-DNA* z donorové bakterie do recipient-



Obr. 16.8 Schematická mapa standardního onkogenního plazmidu *Ti* oktopinového kmene *Agrobacterium tumefaciens*. *T-DNA*, obklopená pravým ( $B_R$ ) a levým ( $B_L$ ) přímým opakováním o 25 pb, zahrnuje geny kódující tryptofan-2-monooxygenázu (*iaaM*), indolyl-3-acetamidhydrolázu (*iaaH*), izopentenyltransferázu (*ipt*) a oktopinsyntázu (*ocs*). Mimo *T-DNA* jsou lokalizovány geny virulentního regulonu (*vir*), geny umožňující konjugativní přenos *Ti*-plazmidu (*tra*), geny kódující katabolismus oktopinu (*occ*) a replikační počátek plazmidu (*ori*).

ní rostlinné buňky. Přenosové funkce jsou v *A. tumefaciens* kódovány **plazmidovými i chromozomálními virulentními geny**. V průběhu procesu hojení dochází v poraněných rostlinných buňkách k syntéze ligninu z fenolických prekurzorů, které slouží jako chemoatraktant pro bakterie *A. tumefaciens* a následnou indukci *Ti*-plazmidových virulentních (*vir*) genů. Bakteriální chromozomální virulentní geny (*chvA* a *chvB*) jsou exprimovány konstitutivně a zprostředkují zejména přichycení bakterií k rostlinné buňce prostřednictvím celulózoových vláken. Virulentní geny lokalizované na *Ti*-plazmidu potom řídí a zprostředkují speciální reakce rozpoznávání rostlinné buňky a následné procesy vedoucí k přenosu *T-DNA*. Tyto geny jsou lokalizovány v jednom velkém regulonu v osmi operonech (*virA* až *virH*). Geny *virA* a *virG* svými produkty pozitivně řídí transkripci ostatních *vir*-genů: aminoterminální část *virA*-proteinu slouží jako senzorová doména interagující přímo s rostlin-

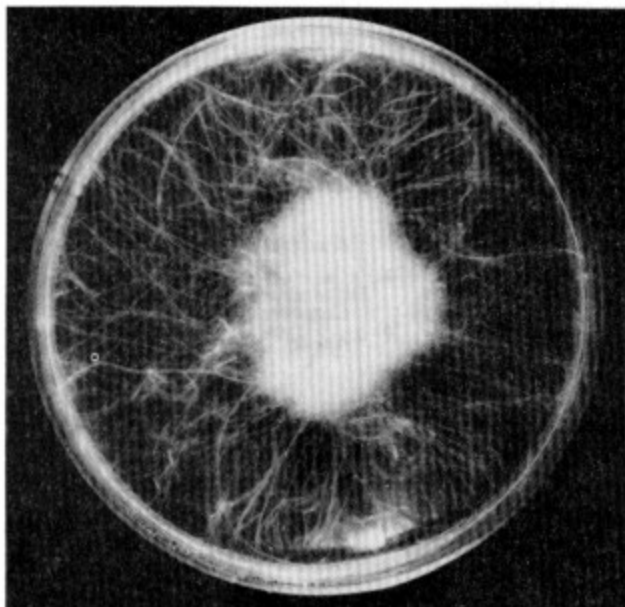
nými signálními molekulami a předává signál *virG*-proteinu, který aktivuje ostatní *vir*-geny. V transformačním procesu hrají rozhodující úlohu **hranice segmentu *T-DNA***, které jsou tvořeny přímým opakováním ne zcela shodných 25pb úseků DNA. Jakákoli DNA lokalizovaná mezi těmito hranicemi může být transportována a integrována do rostlinných chromozomů, přičemž rozhodující úlohu hraje pravá hraniční sekvence ( $B_R$ , *right boundary*), od které přenos *T-DNA* začíná. Produkt *virD1*-genu působí jako specifická nukleáza, která vyštěpí pravděpodobně jediné vlákno *T-DNA*, jež je potom s pomocí *virD2*-proteinu transportováno do rostlinné buňky. Finálně je *T-DNA* integrována do rostlinného chromozomu procesem **náhodné (ilegitimní) rekombinace**, což zajišťuje její mitotickou i meiotickou stabilitu. Detailní popis procesu přenosu *T-DNA* do rostlinných buněk lze nalézt v řadě specializovaných prací (např. Tinland 1996).



Obr. 16.9 Schéma experimentálního postupu pro přenos cizorodých genů do rostlin prostřednictvím binárního systému *Agrobacterium tumefaciens* a rostlinných explantátových kultur *in vitro*.



Původně vypracované postupy přenosu klonovaných genů do *Ti*-plazmidů byly poměrně složité; zahrnovaly několikanásobné konstrukce plazmidových vektorů obsahujících žádaný gen, signální geny pro selekci příslušných plazmidů v *Escherichia coli* a fragmenty *T-DNA* v promiskuitních plazmidech, které byly vnášeny do *A. tumefaciens*, kde dvojitou homologní rekombinací docházelo k integraci do *Ti*-plazmidu. *T-DNA* však obsahuje onkogeny (*iaaM*, *iaaH* a *ipt*), které odpovídají za nadprodukcii auxinu a cytokininu a brání v regeneraci rostlin z transformovaných buněk. Proto bylo nutné tyto geny eliminovat buď mutací, nebo delecí. To vedlo ke konstrukci vektorových *Ti*-plazmidů, kde velká část *T-DNA* je nahrazena úsekem malého plazmidu *E. coli*, což též umožnilo snadnou introdukcii žádaných genů klonovaných v tomto pomocném plazmidu jednoduchou rekombinací. Objasnění funkce jednotlivých úseků *Ti*-plazmidu dále vedlo ke konstrukci tzv. **binárních vektorů**, kde žádaný gen je klonován v malém plazmidovém vektoru spolu s pravou hraniční sekvencí *T-DNA* a nezbytné produkty agrobakteriálních virulentních genů jsou zajišťovány *Ti*-plazmidem v pozici *trans*. Těmito metodami již bylo dosaženo přenosu a exprese mnoha set prokaryotických a eukaryotických genů v rostlinách pod kontrolou konstitutivních i indukčních promotorů, které mohou být rozpoznávány rostlinným transkripčním aparátem (obr. 16.9).



Obr. 16.10 Stabilizovaná kultura nádorových kořenů (*hairy roots*) *in vitro* izolovaná po infekci rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*) onkogenním kmenem *Agrobacterium rhizogenes*.

Blízkým příbuzným *A. tumefaciens* je *Agrobacterium rhizogenes*, které na místě poranění rostlin vyvolává tvorbu větvených kořenových struktur (***hairy roots***, obr. 16.10). Schopnost infekce *A. rhizogenes* je opět závislá na přítomnosti velkého onkogenního plazmidu (*Ri*, *root inducing*) a schopnosti jeho segmentu (*T-DNA*) včleňovat se do rostlinného genomu. Tento segment nese dva geny odpovědné za syntézu auxinu a dále čtyři geny (*rolA*, *rolB*, *rolC* a *rolD*), jejichž produkty působí synergicky a determinují morfologii kořenových nádorů. Kořenové nádorové kultury je možné pěstovat na syntetických médiích *in vitro* a mají potenciální využití v biotechnologiích (produkce kořenových sekundárních metabolitů). Na rozdíl od nádorů *crown-gall* jsou kultury *hairy roots* schopny regenerace v rostliny, které se však vyznačují charakteristickým změněným fenotypem (svraštělé listy, redukovaná apikální dominance, zkrácená internodia, silné kořenění a snížená fertilita).

#### 16.4.1.2 Rostlinné viry jako vektory

Jinými prokaryotickými patogeny, které snadno pronikají do rostlinné buňky a jsou schopny se v ní replikovat, jsou rostlinné DNA- a RNA-viry. Výhodou použití virů jako vektorů pro přenos genetické informace je schopnost systemického šíření v rostlinách po infekci jejich částí a velký výběr virů s vhodným hostitelským rozmezím. Velkou nevýhodou virových vektorů je však jejich omezená klonovací schopnost, autonomní replikace (nedochází ke kovalentnímu včlenění do rostlinných chromozomů) a skutečnost, že se obvykle nepřenášejí do semenného potomstva. Prvním virem, kterého bylo použito k přenosu cizího (bakteriálního) genu do rostlin, byl jeden z několika známých rostlinných dvouvláknových DNA-virů, virus mozaiky kvěťáku, *CaMV* (Brisson et al. 1984). S RNA-viry jako vektory jsou manipulace složitější, neboť nejsou k dispozici techniky přímé konstrukce rekombinantních molekul RNA *in vitro*. Při integraci genů do RNA-virových genomů je proto nutné připravit zpětnou transkripční cDNA kopii viru. Transformaci rostlin lze potom provést buď infekcí rekombinantní cDNA nebo jejími transkripty syntetizovanými *in vitro*. Tento postup byl poprvé experimentálně ověřen u jednoděložných rostlin pomocí RNA-viru mozaiky sivepu, *BMV* (French et al. 1986).

Zvláštní metodou, která umožňuje vnášení virových genomů do rostlin ve fytopatologickém výzku-

mu, je **agroinfekce**. Virový genom (DNA u kaulimovirů nebo cDNA u RNA-virů) je přitom klonován v několika tandemových opakováních do *T-DNA* *Agrobacterium tumefaciens* a vnesen do rostlin, kde rekombinací mezi kopiemi virové DNA dochází k jejich uvolnění a následnému vzniku infekčních virových částic.

### 16.4.1.3 Mechanický přenos klonované DNA

Protože řada krytosemenných rostlin (zejména jednoděložných druhů, včetně hospodářsky významných obilovin) není citlivá vůči agrobakteriální infekci, bylo vypracováno několik alternativních přístupů k vnášení klonovaných genů do rostlin nebo rostlinných explantátů. Pokud je možné u těchto druhů regenerovat izolované protoplasty zpět v celé rostliny, jsou používány techniky permeabilizace jejich cytoplazmatické membrány elektrickým šokem (elektroporace), kapilární mikroinjekce nebo indukovaného příjmu DNA s pomocí polyetylglykolu (Potrykus 1990). Tyto techniky jsou využívány i k testování tranzientní exprese vnášených chimérických genů, neboť k jejich expresi může docházet i před integrací do chromozomů. Nejnovější metodou je tzv. **mikroprojektilový přenos DNA** (*particle bombardment*) do jader nebo organel kultivovaných buněk a případně i do intaktních rostlinných orgánů vstřelováním mikroskopických částic netoxických kovů (například wolframu nebo zlata), které povrchově adsorbovaly klonované molekuly DNA z roztoku.

### 16.4.2 Selektovatelné a reportérové geny

Velkým zdokonalením vektorů je využití **dominantních signálních genů**, které umožňují selekci transgenních buněk i rostlin na základě získané rezistence vůči antimetabolitům (např. kanamycinu, hygromycinu, bleomycinu nebo metotrexátu) nebo monitorováním transgenozie biochemickou detekcí reportérového enzymu (např. chloramfenikolacetyltransferázy,  $\beta$ -glukuronidázy, luciferázy); jejich přehled je uveden v tab. 16.3. Dominantní signální geny jsou připravovány *in vitro* jako **chimérické konstrukty** fúzí promotorů eukaryotického typu a vhodných terminátorů transkripce se strukturálními geny kódujícími signální

Tab. 16.3 Přehled dominantních selektovatelných a reportérových genů (možnost snadného biochemického testu) v genomu inženýrství rostlin. Index r značí navození rezistence k dané látce.

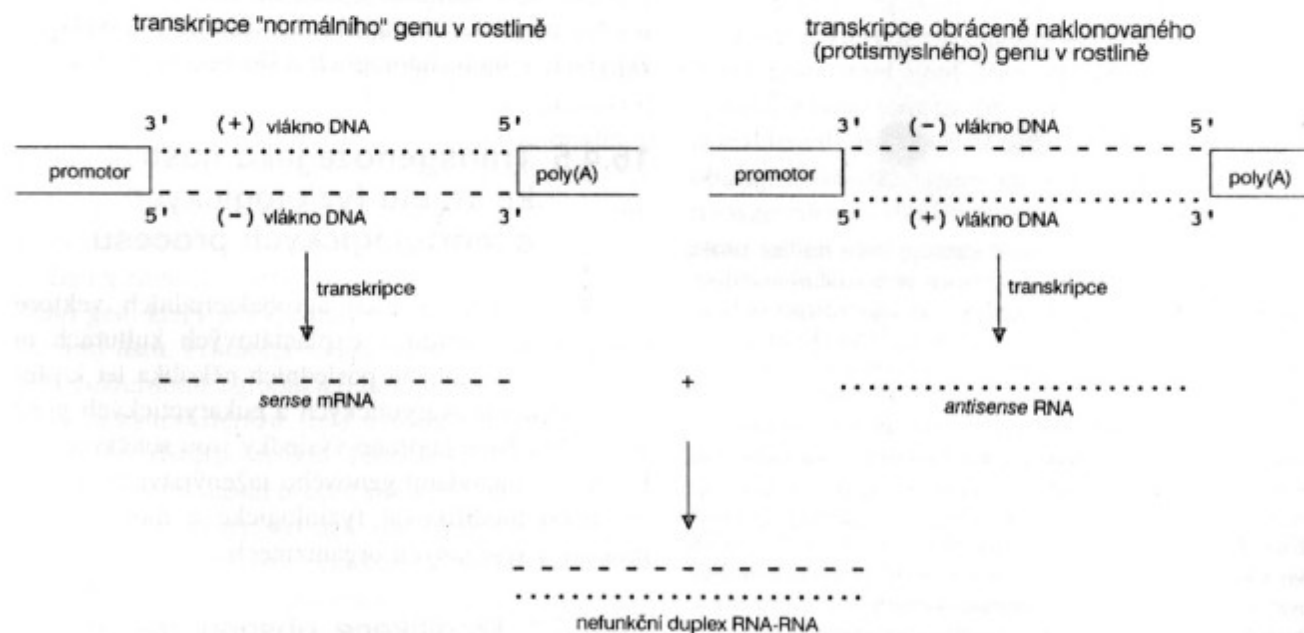
Gen	Enzym (protein)	Donor	Přímá selekce	Test
<i>als</i>	acetolaktátsyntáza (chlorsulfuron')	<i>Arabidopsis thaliana</i>	rezistence k chlorsulfuronu	-
<i>aroA</i>	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntáza (glyfozát')	<i>Salmonella typhimurium</i>	rezistence ke glyfozátu	-
<i>bar</i>	fosfinotricin-acetyltransferáza	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	rezistence k bialaphosu	+
<i>ble</i>	?	<i>Escherichia coli</i> (Tn5)	rezistence k bleomycinu	-
<i>bxn</i>	bromoxynilnitriláza	<i>Klebsiella ozaenae</i>	rezistence k bromoxynilu	-
<i>dhfr</i>	dihydrofolátreduktáza (metotrexát')	<i>E. coli</i> (Tn7, pr67), <i>Mus musculus</i>	rezistence k metotrexátu	-
<i>cat</i>	chloramfenikol-acetyltransferáza	<i>E. coli</i> (Tn9)	-	+
<i>gfp</i>	zeleně fluoreskující protein	<i>Aequorea victoria</i>	-	+
<i>gus</i> ( <i>uidA</i> )	$\beta$ -glukuronidáza	<i>E. coli</i> (K12)	-	+
<i>hph</i>	hygromycin-fosfotransferáza	<i>E. coli</i> (pJR225)	rezistence k hygromycinu B	+
<i>lacZ</i>	$\beta$ -galaktozidáza	<i>E. coli</i>	-	+
<i>luc, lux</i>	luciferáza	<i>Photinus pyralis</i> , <i>Vibrio harveyi</i>	-	+
<i>npt I</i> , <i>npt II</i>	neomycin-fosfotransferáza I, II	<i>E. coli</i> (Tn601, Tn5)	rezistence ke kanamycinu	+
<i>spt</i>	streptomycin-fosfotransferáza	<i>E. coli</i> (Tn5)	rezistence k streptomycinu	-
<i>sul I</i>	dihydropteroátsyntáza (sulfonamid')	<i>E. coli</i> (pR46)	rezistence k sulfonamidu	-
<i>tdc</i>	tryptofan-dekarboxyláza	<i>Catharanthus roseus</i>	rezistence k 4-metyltryptofanu	-
<i>zm-p60</i>	$\beta$ -glukozidáza	<i>Zea mays</i>	-	+
<i>ocs, nos</i>	oktopinsyntáza, nopalinsyntáza	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	+
<i>iaaM</i> , <i>iaaH</i>	tryptofan-monooxygenáza, indolylacetamidhydroláza	<i>A. tumefaciens</i>	růst bez auxinů	-
<i>ipt</i>	izopentenyl-transferáza	<i>A. tumefaciens</i>	růst bez cytokininů	-

enzymy. Nejčastěji používanými konstitutivními promotory v genových manipulacích u rostlin jsou 5'-sekvence opinsyntázových genů z *Ti*-plazmidu *A. tumefaciens* a 35S RNA-promotor z viru mozaiky kvěťáku (*CaMV*). Z rostlin byla izolována i řada promotorů, které umožňují specifickou expresi genů v určitých orgánech nebo pletivech: například promotor genu kódujícího semenný protein fazeolin je funkční pouze v děložních lístcích, gluteninový promotor v endospermu, patatinový promotor v hlízách nebo promotor *Rubisco*-genu v listech při světelné indukci. Nejrychlejší technikou užívanou k testování funkce těchto promotorových sekvencí je sledování **tranzientní exprese** klonovaných chimérických genů po jejich indukovaném příjmu (např. elektroporací) v rostlinných protoplastech.

### 16.4.3 Strategie využití protismyslných genů

Strategie využití tzv. protismyslných (*antisense*) sekvencí nukleových kyselin je založena na blokování informačního toku z mRNA do proteinu aplikací vláknů RNA komplementárního k sekvenci cílové

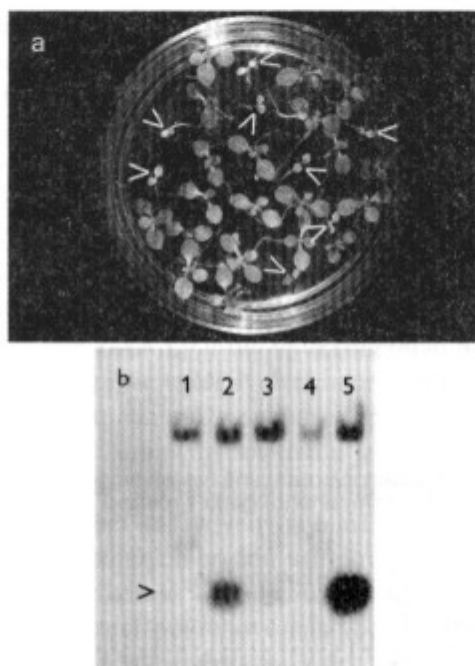
mRNA. Experimentálně je toho obvykle dosaženo „obráceným“ naklonováním příslušného genu pod vhodný promotor, začleněním tohoto konstruktů do *T-DNA* v agrobakteriálním vektorovém systému a jeho přenosem do rostlin. V transgenních rostlinách se pak syntetizuje **protismyslné vlákno RNA**, které na základě párování bází tvoří s „normální“ mRNA duplexy, jež jsou rychle degradovány, nebo je mRNA poškozena při posttranskripční úpravě, případně je jinak blokována translace (obr. 16.11). Tento proces je v některých případech součástí přirozeného regulačního systému u prokaryot i eukaryot, kdy se tvoří krátká komplementární vlákna RNA, inhibující funkční transkripty v určitém stadiu ontogeneze. První pokusy se syntetickými protismyslnými geny byly prováděny pomocí tranzientní exprese v izolovaných protoplastech: introdukované protismyslné geny svými transkripty inhibovaly expresi příslušných signálních genů. Protismyslné geny jsou schopny i blokovat nebo redukovat funkci přirozených rostlinných genů v transgenních rostlinách, jak to bylo prokázáno například u syntézy flavonoidů v květech nebo polygalakturonázy a etylenu ve zrajících plodech.



Obr. 16.11 Schéma strategie využití protismyslné (*antisense*) RNA k inhibici exprese endogenních rostlinných genů. V normálních rostlinách (jakož i v ostatních prokaryotických a eukaryotických organizmech) vznikají příslušné mRNA přepisem jediného vlákna dvoušroubovice DNA (tzv. minus-vlákno neboli *sense strand*, značeno čárkovaně). Pokud je gen naklonován pod promotor obráceně, je přepisováno plus-vlákno DNA (*antisense strand*, značeno tečkovaně). Po vnesení takového chimérického genu do rostliny (například pomocí agrobakteriálního vektoru) vzniká v rostlinných buňkách protismyslná RNA (*antisense RNA*), která může s příslušnou normální rostlinnou mRNA na základě párování bází vytvářet duplexy, a tím znemožňovat proces translace.

## 16.4.4 Strukturní a funkční stabilita transgenů

Fyzická přítomnost transgenů a jejich počet kopií v rostlinném genomu jsou ověřovány Southernovou (DNA/DNA) hybridizací nebo technikou PCR, jejich exprese je zjišťována pomocí RNA/DNA-hybridizace a imunologických metod detekce příslušných polypeptidů, případně jednoduššími enzymovými testy, při nichž jsou *in vitro* nebo *in situ* detekovány finální produkty signálních enzymových reakcí (obr. 16.12).



Obr. 16.12 (a) Potomstvo získané samoopylením rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*), do které byl vnesen neomycinfosfotransferázový gen (*nptII*) z *Escherichia coli*, navozující rezistenci ke kanamycinu. Semenačky rostoucí na syntetickém médiu s kanamycinem segregují na kanamycin-rezistentní a kanamycin-senzitivní rostliny v mendelistském statistickém poměru 3:1. U senzitivních rostlin se efekt kanamycinu projevuje retardovaným vývojem, blokováním syntézy chlorofylu a pozdější letalitou na úrovni vývinu děložních lístků (tyto rostlinky jsou označeny šipkami). (b) Biochemické stanovení enzymu neomycinfosfotransferázy v transgenních rostlinách tabáku. Proteinové extrakty z rostlin jsou elektroforeticky separovány v akrylamidovém gelu a na něm je *in situ* provedena „sandvičová“ reakce za přítomnosti substrátu (kanamycinu) a donoru fosfátových skupin ( $^{32}\text{P}$ -koncově značeného adenosin trifosfátu, ATP). Výsledný produkt, fosforylovaný kanamycin, označený šipkou, je vizualizován autoradiograficky na rentgenovém filmu. Vzorek v dráze číslo 1 je negativní kontrola (normální tabák), transgenní vzorky číslo 2 a 5 mají vysokou hladinu enzymu, vzorek číslo 3 je velmi slabě pozitivní a vzorek v dráze číslo 4 enzym neobsahoval (zjevně došlo k „umlčení“ transgenů).

I když strukturní stabilita transgenů v rostlinách je vzhledem k jejich integraci do chromozomů vysoká, dochází často k jejich **inaktivaci**, zejména v případě přítomnosti více kopií transgenů. K této inaktivaci, která je obvykle provázena metylací jejich promotorů, může docházet, pokud jsou transgeny organizovány jako tandemová opakování (*cis*-inaktivace) nebo jeden metylovaný transgen může inaktivovat jiný v pozici *trans* mechanismem analogickým u paramutací, případně může docházet ke koordinovanému „umlčování“ dvou nebo více homologních transgenů (*co-suppression*, Matzke a Matzke 1995). Procesy inaktivace založené na úplné nebo částečné homologii úseků DNA transgenů probíhají na úrovni transkripční nebo posttranskripční. Předpokládá se, že párování homologních sekvencí může způsobovat inaktivní genetický stav *de novo*-metylací a heterochromatinizací (**transkripční inaktivace**) nebo mRNA-produkty více transgenů se akumulují, až dosáhnou kritické hladiny, při které dochází k jejich rychlé degradaci (**posttranskripční inaktivace**). „Umlčování“ transgenů v rostlinách je dnes široce využíváno jako modelový systém ke studiu interakcí homologních sekvencí DNA, neboť by k němu mohlo docházet i u endogenních genů, zejména v polyploidních rostlinách. Z praktického hlediska je však „umlčování“ transgenů určitou překážkou při aplikacích technik genového inženýrství v biotechnologiích a šlechtitelské praxi.

## 16.4.5 Transgenóze jako nástroj ke studiu fyziologických a morfoloických procesů

Pokroky v konstrukcích agrobakteriálních vektorů a regeneraci rostlin v explantátových kulturách *in vitro* vedly v průběhu posledních několika let k přenosu mnoha prokaryotických a eukaryotických genů do rostlin. Níže popsané výsledky jsou současně příklady, jak metodami genového inženýrství lze studovat nebo modifikovat fyziologické a morfoloické procesy v rostlinných organizmech.

### 16.4.5.1 Modifikace obsahu rostlinných hormonů

Řada druhů mikroorganismů (zejména fytopatogenní bakterie) produkuje rostlinné hormony auxinového nebo cytokininového typu, i když metabolické dráhy,

keré vedou k biosyntéze těchto látek, nemusejí být v rostlinách a bakteriích shodné. Syntéza rostlinných hormonů, auxinu a cytokininu, kódovaná *T-DNA* původem z onkogenních plazmidů *Agrobacterium tumefaciens* je podmínkou pro aktivitu těchto bakterií jako fytopatogenů. Agrobakteriální geny odpovídající za syntézu auxinu a cytokininu nejsou homologní s geny, které kódují enzymy katalyzující syntézu hormonů v normálních rostlinách. Jednou z možností využití genového inženýrství ke studiu biologických funkcí rostlinných hormonů je vnášení genů odpovídajících za jednotlivé kroky v syntéze (popř. v degradaci nebo jiné chemické modifikaci) rostlinných hormonů z *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes*, případně i z jiných druhů bakterií (*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium* sp. aj.).

### Cytokininy

Produkt jednoho z agrobakteriálních onkogenů, izopentenyltransferázy (*ipt*), která kondenzací izopentenylpyrofosfátu a adenosinmonofosfátu (AMP) dává vznik izopentenyl-AMP, je pravděpodobně klíčovým enzymem v biosyntéze cytokininů; izopentenyl-AMP je rostlinou rychle transformován v biologicky aktivní cytokininy, zejména deriváty zeatinu. Gen kódující izopentenyltransferázu z *A. tumefaciens* byl se silným promotorem z viru mozaiky kvěťáku vnesen do rostlin tabáku. Tyto transgenní rostliny mají až stonásobně vyšší hladinu cytokininu ve srovnání s normálními rostlinami a vykazují ztrátu apikální dominance, potlačování procesu stárnutí a zejména neschopnost tvorby kořenů.

Gan a Amasino (1995) izolovali z *Arabidopsis thaliana* gen, který je exprimován výhradně při procesu stárnutí listů. Promotor tohoto genu pak naklonovali ke strukturnímu agrobakteriálnímu genu kódujícímu izopentenyltransferázu (*ipt*) a tento chimérický gen vnesli do rostlin tabáku. Jakmile v listech transgenních rostlin nastal proces stárnutí (který normálně vede k jejich programované smrti), došlo k indukci syntézy cytokininů, tím bylo stárnutí potlačeno a listy dále vykazovaly fotosyntetickou aktivitu. Aktivita transgenu byla tedy řízena autoregulačním mechanismem a rostliny nejevily žádné nežádoucí symptomy nadprodukce cytokininů (např. neschopnost tvorby kořenů). Tato práce je názorným příkladem, jak je možné pomocí transgenozie ovlivnit procesy stárnutí rostlin.

Estruch et al. (1991) provedli transformaci rostlin genem *ipt*, do něhož byl mezi promotor a kódující oblast genu vklonován mobilní genetický element *Ac* z kukuřice. Takto upravený gen je exprimován pouze v případě, kdy dojde k vyštěpení *Ac*-elementu. Pokud k vyštěpení transponovatelného elementu došlo až v pozdější době vývoje rostliny a pouze v některých oblastech prýtu, rostliny byly schopny tvořit kořeny. Vysoká hladina cytokininu v listech odrážela vyšší četnost transpozice *Ac*-elementu a měla za následek tvorbu drobných výhonků prýtů na okrajích listů (viviparie). Květní pupeny dávaly vznik abnormálním květům s vysokým obsahem cytokininu, avšak s výrazně nižší hladinou transkriptů některých homeotických květních genů. Tyto výsledky naznačují, že cytokininy mohou řídit aktivitu homeotických genů, a tedy i vývoj květních orgánů.

### Auxiny

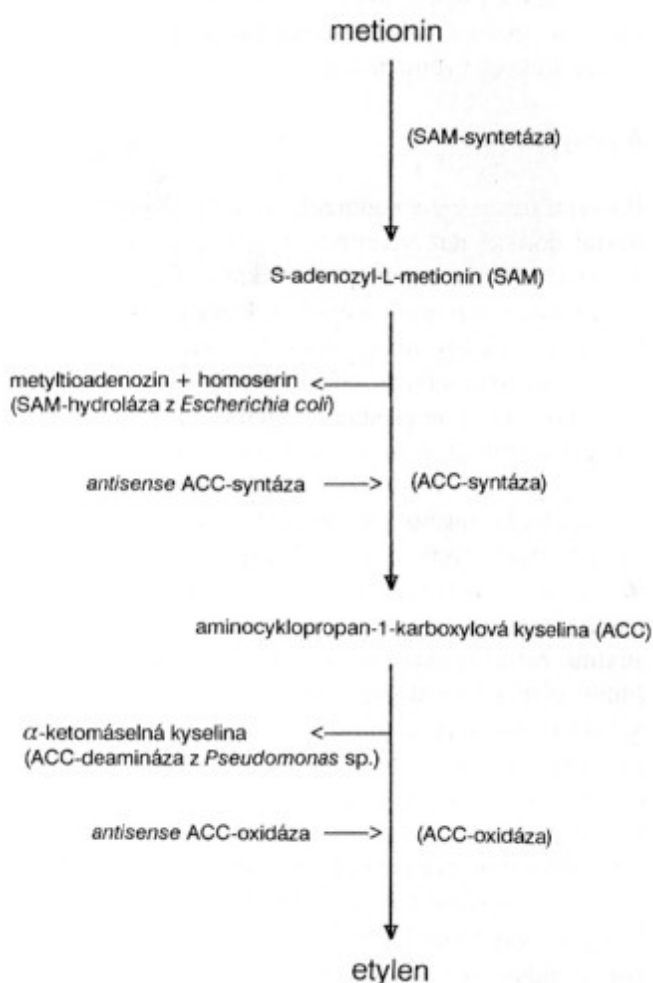
Biosyntéza auxinu v nádorech *crown-gall* probíhá poněkud odlišně než v normálních rostlinách. Produkt agrobakteriálního genu *iaaM* katalyzuje přeměnu tryptofanu v indolyl-3-acetamid, který je pak konvertován ve výsledný auxin (indolyl-3-octovou kyselinu, IAA) prostřednictvím enzymu indolyl-3-acetamid-hydrolázy, který je produktem genu *iaaH*. Jelikož indolyl-3-acetamid není obvykle meziproductem biosyntézy auxinu v rostlinách (tím je u rostlin indolyl-3-acetaldehyd), musí být v nádorech *crown-gall* funkční oba agrobakteriální geny, *iaaM* a *iaaH*. V testovaných transgenních rostlinách vede exprese genu *iaaM* s pomocí silného promotoru k určitému zvýšení syntézy auxinu, zatímco exprese samotného genu *iaaH* nemá žádný účinek. Ke studiu biologických funkcí auxinu byl do rostlin mrkve vnesen agrobakteriální *T-DNA*-segment, který obsahoval gen *iaaH* se svým vlastním konstitutivním promotorem, zatímco gen *iaaM* byl naklonován pod kontrolu tepelně indukovatelného promotoru z mouchy octomilky (*Drosophila melanogaster*). Vystavení transgenních rostlin zvýšené teplotě pak bezprostředně vedlo ke zvýšení hladiny auxinu a indukci tvorby kořenů.

Gen *iaaL*, izolovaný z bakterie *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*, kóduje enzym IAA-lyzinsyntetázu, který katalyzuje konjugaci lyzinu a IAA. Konjugáty IAA s aminokyselinami se vyskytují i v rostlinách, avšak konkrétně konjugát IAA s lyzinem tu není obvyklý. Spena et al. (1991) naklonovali gen *iaaL*

pod vhodný promotor za účelem studia, zda konjugace IAA k lyzinu ovlivňuje biologickou aktivitu auxinu v rostlinách. Získané transgenní rostliny tabáku a bramboru vykazovaly některé fenotypové odchylky charakteristické pro sníženou hladinu auxinu: částečně potlačený vývoj kořenů a ohyb řapíku a střední listové žilky (epinastie).

## Etylen

Technika transgenozie umožnila potlačení syntézy endogenního rostlinného hormonu etylen, který mj. urychluje zrání plodů. Etylen je chemicky nejjednodušším známým hormonem a jeho metabolická dráha



Obr. 16.13 Inhibice syntézy etyleny v rostlinách prostřednictvím technik genového inženýrství. Schéma reprezentuje základní biosyntetickou dráhu etyleny (od metioninu přes SAM a ACC) a možnosti jejího narušení potlačením ACC-syntázy, případně ACC-oxidázy, prostřednictvím protismyslých genů nebo degradací meziproduktů syntézy etyleny po vnesení genů bakteriálního původu (SAM-hydroláza nebo ACC-deamináza).

v rostlinách je již zcela objasněna. Výchozí látkou je metionin, který spolu s ATP dává vznik S-adenozyl-L-metioninu (SAM), jenž je dále konvertován v aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) s pomocí enzymu ACC-syntázy. Finální reakcí biosyntézy etyleny je oxidace ACC na etylen ( $C_2H_4$ ), katalyzovaná ACC-oxidázou (viz kap. 8). Klíčovým meziproduktem je tedy SAM, který se uplatňuje i v jiných metabolických drahách (zejména jako univerzální donor metylových skupin).

Good et al. (1994) připravili transgenní rostliny rajčete, do kterých vnesli SAM-hydrolázový gen z bakteriofágu *T3 Escherichia coli*. Enzym SAM-hydroláza katalyzuje rozklad SAM na metyltioadenozin a homoserin, což má za následek kritický nedostatek SAM pro řadu buněčných reakcí. Aby nedocházelo k některým nežádoucím poruchám metabolismu rostliny, byl gen kódující SAM-hydrolázu naklonován pod kontrolu tkáňově specifického promotoru, který je aktivován pouze v průběhu zrání plodů rajčete. Výsledné transgenní rostliny se vyznačovaly normálním fenotypem, avšak syntéza etyleny ve zrajících plodech byla silně redukována, což mělo za následek požadované brzdění přezrávání plodů.

Inhibice syntézy etyleny bylo dosaženo i jinými strategiemi genového inženýrství: konstrukcí transgenních rostlin nesoucích protismysléné geny, jež inhibují expresi rostlinných genů kódujících enzymy ACC-syntázu nebo ACC-oxidázu, případně přenosem bakteriálního genu ACC-deaminázy (obr. 16.13).

### 16.4.5.2 Regulace metabolismu sacharidů

Škrob je hlavním rostlinným zásobním polysacharidem, který se ukládá ve formě zrn v amyloplastech a chloroplastech, kde probíhá i jeho biosyntéza. Jedním z prekurzorů škrobu je adenzindifosfátglukóza (ADP-glukóza), jejíž tvorba z glukóza-1-fosfátu a ATP je katalyzována enzymem ADP-glukózapyrofosforylázou (AGPáza). Dřívější studie potvrdily, že ADP-glukóza je výhradním prekurzorem biosyntézy škrobu, neboť mutanty se sníženou hladinou AGPázy izolované u kukuřice obsahovaly v endospermu obilky výrazně nižší obsah škrobu.

Müller-Röber et al. (1992) připravili transgenní rostliny bramboru, ve kterých byla exprese AGPázy inhibována vnesením chimérického protismysléného genu pod kontrolou silného konstitutivního promotora.

ru. Transgenní rostliny vykazovaly sníženou hladinu AGPázy v listech i hlízách. To mělo za následek potlačení syntézy škrobu v početných malých hlízách, kde docházelo k hromadění sacharózy a glukózy. Inhibice AGPázy neovlivnila hladiny jiných enzymů, které se účastní syntézy škrobu, došlo však k významné redukci exprese zásobních hlízkových proteinů (zejména patatinu), což naznačuje souvislost mezi syntézou zásobních látek, škrobu a bílkovin, v bramborových hlízách.

Do rostlin byl také vnesen gen *glgC* z *Escherichia coli*, který kóduje bakteriální enzym AGPázu (Stark et al. 1992). Aktivita tohoto enzymu je regulována jinými efektorovými látkami než aktivita obdobného enzymu v rostlinách. Transgenní rostliny bramboru obsahovaly vyšší množství škrobu ve svých hlízách, docházelo zde tedy ke zvýšenému přísunu organického uhlíku. Tyto výsledky naznačují, že účinnost fotosyntetické asimilace vzdušného oxidu uhličitého může být regulována i aktivitou enzymů podléjících se na syntéze škrobu, tedy schopností využívat fotosyntetické produkty formou tvorby zásobních polysacharidů.

### 16.4.5.3 Modifikace syntézy rostlinných lipidů

Nejčastějšími rostlinnými lipidy jsou estery glycerolu a mastných kyselin (triacylglyceroly neboli triglyceridy), které se akumulují jako zásobní látky v semenech a plodech některých druhů rostlin a představují významný komerční zdroj tuků a olejů. Fyzikální a chemické vlastnosti lipidů jsou závislé na složení mastných kyselin a jejich distribuci na skeletu glycerolu. Většina z více než 200 známých mastných kyselin je syntetizována právě v rostlinách; nejhojnějšími jsou kyseliny palmitová, stearová, olejová, linolová a linolenová. Kyselina linolová je například esenciální složkou potravy savců, neboť savci nejsou schopni desaturovat olejovou kyselinu, která má ve svém uhlíkatém řetězci jedinou dvojnou vazbu, na kyselinu linolovou, která má dvě dvojně vazby. Biochemie lipidového metabolismu je velmi složitá, je v ní zahrnuto více než třicet enzymů, které katalyzují reakce od acetylkoenzymu A až k výsledným produktům. Klasickým šlechtěním rostlin jsou z řepky olejky odstraňovány nežádoucí mastné kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem (např. kyselina eruková, která má ve své molekule 22 atomů uhlíku). Syntéza kyseliny

erukové je řízena dvěma geny bez vzájemné dominance, které působí aditivně a prodlužují uhlíkaté řetězce mastných kyselin.

V posledních letech již byly izolovány některé geny, jejichž produkty se účastní syntézy mastných kyselin a lipidů, a tyto geny byly pod kontrolou specifických promotorů, aktivních pouze v rostlinných zásobních orgánech, vneseny do rostlin (Töpfer et al. 1995). Prvním úspěchem genového inženýrství bylo zvýšení obsahu nasycené mastné kyseliny stearové na úkor nenasyčené kyseliny olejové prostřednictvím strategie exprese protismyslného desaturázového genu u řepky. Stejného cíle, tj. zvýšení obsahu kyseliny stearové, bylo dosaženo nadprodukcí tioesterázového genu izolovaného ze sóji. Naopak zvýšený obsah kyseliny olejové je požadován u řepky i jiných olejnin pro průmyslové využití; toho bylo dosaženo v transgenních rostlinách řepky po vnesení protismyslného genu oleátdesaturázy. Podobné výsledky byly demonstrovány u sóji, kde byla zvýšena hladina linolenové kyseliny v semenech inhibicí linolátdesaturázy prostřednictvím protismyslného genu.

### 16.4.5.4 Produkce proteinů v transgenních rostlinách

#### *Modifikace aminokyselinového složení zásobních proteinů*

Zásobní proteiny prolaminového typu u řady obilovin (např. pšenice, ječmene, kukuřice) mají nízký obsah lyzinu, zatímco zásobní proteiny leguminóz mají málo sirtých aminokyselin. Ke zvýšení kvality zásobních proteinů u rostlin bylo navrženo několik strategií. Jako nejperspektivnější je možné považovat přístupy proteinového inženýrství: cílená mutagenese stávajících genů *in vitro* a jejich zpětný přenos do rostlin, případně i vnášení optimalizovaných syntetických genů by měly vést ke tvorbě proteinů se zvýšenou hladinou esenciálních aminokyselin (Jaynes et al. 1986). Problémem je však zajištění stability takto modifikovaných proteinů v rostlinných pletivech i jejich změněné fyzikálně-chemické vlastnosti. Druhou alternativou je zvýšení syntézy jiných typů vlastních zásobních proteinů, které jsou bohatší na obsah limitních aminokyselin. Ke zvýšení obsahu esenciálních aminokyselin v zásobních proteinech semen u obilovin je nutné též vypracovat metody regenerace a transformace *in vitro*.

### Produkce protilátek v transgenních rostlinách

Byly zkonstruovány chimérické geny, které obsahují kódující sekvenci z  $\alpha$ -amylázového signálního peptidu ječmene, fúzované s cDNA, jež kódují lehký a těžký řetězec savčí monoklonální protilátky. Do expresního vektoru byly klonovány oba geny současně a po vnesení do rostlin tabáku byla uvnitř jejich endoplazmatického retikula prokázána funkční agregace obou řetězců protilátky. V analogických studiích byly cDNA odvozené z myších hybridomových mRNA vneseny do tabáku, transgenní rostliny exprimující jednotlivé  $\gamma$ - nebo  $\kappa$ -imunoglobulinové řetězce byly spolu kříženy a daly vznik potomstvu, ve kterém oba řetězce byly exprimovány současně (Hiatt et al. 1989). Tyto pokusy naznačují širší možnosti využití protilátek v rostlinném výzkumu. Vazba protilátek k malým molekulám (např. toxiny, hormony, herbicidy), které prostupují buněčnou stěnou, by mohla vést k retenci těchto molekul v určitých částech rostlin a mohla by se uplatnit i při studiích interakcí rostlina–patogen.

### Zlepšení chuťových vlastností rostlinných potravin

Některé tropické rostliny vytvářejí ve svých plodech specifické bílkoviny, které se vyznačují schopností vazby na chuťové receptory savců a vyvoláváním pocitu sladkosti; jsou až 100 000krát „sladší“ než sacharóza. Jedním z těchto sladkých proteinů je monelin, akumulující se v plodech africké rostliny *Dioscorea phyllon cumminsii*. Monelin je tvořen dvěma peptidy vázanými nekovalentními vazbami, které jsou za zvýšené teploty nebo v kyselém prostředí nestabilní. Penarrubia et al. (1992) však připravili syntetický gen, který kóduje oba peptidy v jediném peptidovém řetězci za sebou. Produkt tohoto genu je stabilnější než původní dvouřetězcový monelin a nemá žádné mutagenní nebo cytotoxické vlastnosti. Gen byl naklonován pod kontrolu konstitutivního promotoru a vnesen do rostlin salátu a dále pod promotorem, který je aktivován pouze ve zrajících plodech, byl vnesen do rajčete. V obou případech docházelo k očekávané akumulaci příslušné mRNA a peptidu monelinu. Tvorba monelinu v transgenních rostlinách tak reprezentuje netradiční přístup ke zvyšování chuťových a jiných kvalitativních vlastností rostlinných potravin. Představuje též možnost vysoce efektivní bioprodukce alternativního sladidla expresí monelinového genu v transgenních rostlinách nebo mikroorganizmech.

### 16.4.5.5 Regulace kvetení a fertility květů prostřednictvím transgenoz

#### Indukce samčí sterility chimérickým RNázovým genem

Jedním z důležitých šlechtitelských cílů je navození samčí sterility k usnadnění přípravy hybridního osiva. V samčích pohlavních orgánech, prašnicích, se tvoří až několik tisíc specifických mRNA. Klíčovou roli při tvorbě pylu hraje prašničková výstelková pletivo (tapetum), kde se tvoří mnoho specifických proteinů a jiných látek, které vyživují vyvíjející se pylová zrna nebo se stávají složkami stěny pylových zrn. Klasickými šlechtitelskými postupy již byla izolována řada různých cytoplazmatických a jaderných mutací bránících vývinu pylu a způsobujících tak samčí sterilitu. Pomocí technik genového inženýrství byla izolována promotorová oblast jednoho tabákového genu specificky funkčního pouze v prašničkovém tapetu a tato sekvence byla fúzována s **RNázovými geny** izolovanými z *Aspergillus oryzae* a *Bacillus amyloliquefaciens*. Tyto geny kódují RNázu, enzym, který nespecificky štěpí molekuly RNA. Pomocí agrobakteriálního vektoru byly tyto konstrukty vneseny do tabáku a řepky. Expresí chimérických RNázových genů selektivně destrukovala tapetum při vývinu prašníku, bránila tvorbě pylu a vedla k rostlinám se samčí sterilitou (Mariani et al. 1990).

#### Inhibice tvorby květů protismyslným genem k mitochondriální citrát syntáze

Cyklus kyseliny trikarboxylové (citrátový cyklus, viz kap. 5) je klíčovým procesem metabolismu mitochondrií u eukaryotických organismů včetně rostlin. Ke studiu biologické funkce tohoto metabolického cyklu byl použit protismyslný gen k mitochondriálnímu enzymu citrát syntáze, který katalyzuje první krok v citrátovém cyklu. Transgenní rostliny bramboru exprimovaly protismyslnou RNA a docházelo ke snížení hladiny enzymu citrát syntázy. V průběhu vegetativního růstu byly tyto rostliny nerozlišitelné od kontrolních, avšak indukce kvetení byla u transgenních rostlin opožděna a květy abortovaly již v počátečních stadiích vývinu (Landschütze et al. 1995). Mikroskopická analýza defektních pupat prokázala zejména abnormální struktury v semeníku. Mechanismus



účinku snížené aktivity mitochondriální citrát syntázy na samčí sterilitu tedy bude zásadně odlišný od jiných mitochondriálních defektů (zejména od redukování schopnosti syntetizovat ATP v průběhu vývinu pylu nebo celých prašníků), které vedou k samčí sterilitě (tzv. cytoplazmatická samčí sterilita).

#### *Modifikace květní morfologie prostřednictvím homeotických transgenů*

Homeotické geny kódují transkripční faktory, které se rozhodujícím způsobem podílejí na aktivaci genů řídících procesy diferenciaci a morfogeneze (viz odd. 16.3.1). Řada homeotických genů ovlivňujících květní morfologii již byla izolována a některé z nich byly prostřednictvím agrobakteriálních vektorů přeneseny do jiných druhů rostlin. Z řepky olejky (čeleď *Brassicaceae*) byl například izolován gen *agamous*, jehož exprese je přísně regulována a který normálně odpovídá za tvorbu orgánů třetího a čtvrtého květního kruhu (tyčinky a pestíky). Tento gen byl po naklonování pod silný konstitutivní promotor vnesen do rostlin tabáku (čeleď *Solanaceae*). Transgenní rostliny vykazovaly předpokládané homeotické květní transformace: přeměnu sepal v pestíky a petal v tyčinky (Mandel et al. 1992). Transkripční faktor tvořený genem *agamous*, odpovídající za tvorbu pohlavních orgánů, byl tedy vlivem nespécifického (konstitutivního) promotoru tvořen i v „nepatřičných“ pletivech základů kalichu a koruny, kde aktivoval geny determinující tvorbu tyčinek a pestíků. Tato práce demonstruje možnosti cílené modifikace struktury květních orgánů i vysokou fylogenetickou stabilitu rostlinných transkripčních faktorů.

### 16.4.6 Další cíle transgenozie ve šlechtění rostlin

Pokud se týká uplatnění transgenozie ve šlechtitelských programech, největšího pokroku bylo dosaženo v navození rezistence vůči virovým chorobám a herbicidům; k dalším dílčím úspěchům patří přenos genů odpovědných za odolnost vůči požerovému hmyzu, brzdění předčasného zrání plodů, produkce farmakologicky významných látek aj. Řada významných plodin (zejména kukuřice, tabák, brambor, bavlník, řepka a sója) s takto geneticky modifikovanými vlastnostmi již byla uvedena do zemědělské praxe.

#### 16.4.6.1 Zvýšení odolnosti rostlin vůči virům

Jednou z klasických šlechtitelských metod s cílem navození rezistence vůči virovému onemocnění je tzv. **křížová ochrana** (*cross-protection*), spočívající v inokulaci rostlin oslabeným virem, který pak potlačuje replikaci superinfikujícího patogenního viru. Podobného principu bylo využito i při konstrukci transgenních rostlin se sníženou citlivostí vůči viru mozaiky tabáku (*TMV*). Pomocí reverzní transkripce RNA genu *TMV*, kódujícího plášťový protein, byl připraven a přenesen do rostlin chimérický gen, který v transgenních rostlinách produkoval virový plášťový protein. Mechanismem, který nebyl dosud zcela objasněn, dochází v transgenních rostlinách po virové infekci k inhibici virové replikace nebo alespoň k její redukci. Jiný směr genového inženýrství ve šlechtění na rezistenci spočívá v inhibici genové exprese RNA-virů v transgenních rostlinách prostřednictvím vnesené **protismyslné RNA**. Další strategie je založena na existenci **satelitních RNA** jako virových parazitů. Tato satelitní RNA může u některých virů provázet jejich infekci, čímž alespoň částečně potlačuje virovou replikaci i expresi symptomů choroby. Transkripce klonované cDNA virového satelitu v rostlinné buňce vede po infekci k enkapsulaci satelitní RNA do virových částic a zpomalení replikace viru. Experimentálně jsou testovány i další možné mechanismy obrany vůči RNA-virům, zejména využití **ribozymů**, které štěpí specifické sekvence ribonukleotidů virového genomu.

#### 16.4.6.2 Transgenní rostliny toxické k hmyzím predátorům

*Bacillus thuringiensis* je bakterie, jež v rané fázi sporulace vytváří krystalická proteinová tělíska obsahující **protoxin**, který po rozštěpení v alkalickém obsahu střev je toxický pro larvy motýlů, případně jiného hmyzu (Aronson et al. 1986). Geny, které tento protoxin kódují, byly s pomocí agrobakteriálních vektorů vneseny do rostlin tabáku a rajčete s cílem intoxikace jejich hmyzích predátorů. Zatímco exprese celého protoxinového genu měla pro vlastní rostliny letální efekt, introdukce fragmentu tohoto genu byla rostlinami tolerována a hladina toxického proteinu tvořeného rostlinou byla dostatečně vysoká na larvy hmyzu. Z jiných typů *B. thuringiensis* jsou izolovány

geny kódující specifické toxiny vůči broukům a konstruovány chimérické geny k navození rezistence rostlin např. k mandelince bramborové.

Jako reakce na požer hmyzem nebo mechanické poranění dochází u některých druhů rostlin (například z čeledí *Solanaceae* nebo *Viciaceae*) k indukci syntézy serinových **proteinázových inhibitorů**, které narušují trávicí procesy predátorů, a představují tak rostlinný obranný mechanismus proti nim. Například gen kódující trypsinový inhibitor již byl izolován a pomocí agrobakteriálního vektoru vnesen do jiného rostlinného druhu, kde po požeru způsoboval hynutí larev motýlů.

### 16.4.6.3 Transgeny jako indikátory aktivity induktorů rezistence

Rostliny mají vyvinuty četné mechanismy k obraně vůči biotickým i abiotickým stresům (kap. 15). Patří mezi ně například syntéza řady chemických látek nebiřkovinné (inhibitory proteinů, antibiotika, taniny, fytoalexiny, alelochemické sloučeniny, oligogalakturonidy) i bílkovinné povahy [lytické enzymy, proteiny indukované zvýšenou teplotou (*heat-shock proteins*), proteiny indukované patogeny (*pathogenesis-related proteins*), metalotioneiny]. Syntéza těchto látek je obvykle vyvolána patogenem nebo jiným inducibilním faktorem. Lze očekávat, že jejich zvýšená aktivita by mohla vést i ke zvýšené širokospektrální indukované rezistenci rostlin.

Enzym chalkonsyntáza katalyzuje klíčovou regulační reakci při syntéze rostlinných antibiotik – **fytoalexinů** (odd. 15.3.3). Byly proto zkonstruovány chimérické geny obsahující chalkonsyntázový inducibilní promotor a strukturální gen kódující reportérový enzym  $\beta$ -glukuronidázu (Doerner et al. 1990). Transgenní rostliny nesoucí tento chimérický gen jsou pak využívány k vyhledávání možných induktorů rezistence prostřednictvím snadné histochemické detekce  $\beta$ -glukuronidázové aktivity.

### 16.4.6.4 Přenos genů navozujících rezistenci vůči herbicidům

Pokud je známo cílové místo účinku herbicidu na rostlinný metabolismus (obvykle se jedná o specifické vazebné místo v molekule některého enzymu), je v principu možné prostřednictvím genového inženýrství modifikovat toto místo tak, aby se herbicid stal

pro kulturní transgenní plodinu netoxickým. Prvního úspěchu bylo dosaženo u herbicidu **glyfozátu**, který blokuje funkci 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy (EPSP-syntázy), klíčového enzymu biosyntézy aromatických sloučenin, což vede k „hladovění“ na aromatické aminokyseliny, k hromadění šikimátu a k smrti rostliny. Z bakterie *Salmonella typhimurium* byla izolována mutantní alela tohoto genu kódující EPSP-syntázu, která díky jediné aminokyselinové substituci prokazuje výrazně sníženou afinitu ke glyfozátu, aniž by tím byla ovlivněna funkce enzymu. Tento gen byl naklonován pod promotor eukaryotického typu a přenesen do rostlin, které pak vykazovaly vysokou toleranci ke glyfozátu. Jiný herbicid, **chlorsulfuron**, se váže na enzym acetolaktátsyntázu, čímž blokuje biosyntézu aminokyselin s rozvětvenou uhlíkovou kostrou. Mutantní alela tohoto genu, necitlivá k chlorsulfuronu, která byla izolovaná z *Arabidopsis thaliana*, navodila rezistenci vůči herbicidu v transgenních rostlinách tabáku.

Jako nejvhodnější se jeví využití strategií, které vedou k enzymatické detoxikaci herbicidu v rostlinách (Botterman a Leemans 1988). Herbicid **bialaphos** je tripeptidové antibiotikum produkované *Streptomyces hygroscopicus*, které po rozštěpení peptidázami uvolňuje fosfinitricin (analogon kyseliny L-glutamové), jenž je inhibitorem glutaminsyntázy. Tento enzym má v rostlinách klíčovou roli v asimilaci amonných iontů a regulaci metabolismu dusíku. Z mikroorganismu *S. hygroscopicus* byl izolován gen, jehož produkt, fosfinitricinacetyltransferáza, katalyzuje acylaci toxického fosfinitricinu. Tento gen byl klonován pod silným promotorem do „odzbrojeného“ *Ti*-plazmidu *A. tumefaciens* a navodil rezistenci transgenních rostlin tabáku, bramboru a rajčete vůči herbicidům bialaphosu a fosfinitricinu.

### 16.4.6.5 Regulovaná exprese chimérického metalotioneinu

Genové inženýrství umožňuje řešit i problematiku některých toxických látek obsažených v rostlinné potravě. Patří sem zejména neesenciální **těžké kovy** (např. kadmium), které jsou přijímány rostlinami z půdy a mohou se akumulovat v částech rostlin, které představují lidskou a živočišnou potravu. U myší byl identifikován a klonován gen kódující protein metalotionein, který má schopnost vázat (chelatizovat) těžké kovy. Příslušná myší cDNA byla klonována pod tran-

skripční kontrolu promotoru regulovaného světlem z menší podjednotky genu *Rubisco* a byly zkonstruovány transgenní rostliny s metalotioneinovou aktivitou i vyšší hladinou kadmia. Chelatizací kadmia je možné navodit vyšší odolnost rostlin vůči tomuto kovu a navíc vyvázat kadmium v těch částech rostlin, které nejsou součástí potravních řetězců člověka.

#### 16.4.6.6 Produkce farmakologicky významných látek

Transgenní rostliny mají strategický význam i pro masovou výrobu nejrůznějších biofarmak. Tyto látky, zejména biologicky aktivní peptidy, mohou být produkovány jako část chimérických rostlinných zásobních proteinů. Například část genu kódujícího albumin 2S u *Arabidopsis thaliana* byla nahrazena sekvencí kódující neuropeptid **leu-enkefalin** se sousedním místem pro štěpení peptidázou. Pomocí vektorového systému *A. tumefaciens* byl tento konstrukt vnesen do rostlin *A. thaliana* a albuminy 2S izolované ze semen byly tráveny trypsinem a izolován leu-enkefalin (Vandekerckhove et al. 1989). Touto relativně jednoduchou cestou je tedy možné dosáhnout masové produkce farmakologicky důležitých látek ze semen transgenních rostlin.

## 16.5 Souhrn

V průběhu posledních dvou desetiletí bylo dosaženo velkého pokroku v oblasti molekulární a buněčné genetiky rostlin. Stalo se tak díky objevu možnosti vnášení klonovaných genů do rostlin pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a zejména pak díky využití nejmodernějších technik molekulární genetiky. Rostliny jsou eukaryotickými organizmy s tripartitním genomem (jádro, mitochondrie a plastidy). Jejich genetická informace je kódována sekvencemi nukleotidů v DNA. Vzhledem k tomu, že genetický kód je u rostlin a organismů z jiných skupin eukaryot i prokaryot totožný, je možné rostlinný genom modifikovat přenosem cizorodých genů s vhodnými regulačními sekvencemi. S pomocí agrobakteriálních vektorů již bylo připraveno mnoho transformovaných (transgenních) rostlin, které se uplatnily jak v základním výzkumu (studium struktury a funkce genů), tak i v zemědělské praxi. Struktura i počet genů v rostlinném jaderném genomu jsou v zásadě podobné jako u ji-

ných eukaryotických organismů. Jednotlivé druhy vyšších rostlin se často vyznačují velmi odlišnou velikostí jaderného genomu, přičemž tato velikost není v korelaci s komplexitou příslušných rostlinných organismů. Většina druhů rostlin má vysoký obsah DNA v buněčných jádrech (až  $10^{11}$  párů bází), což souvisí se značně velkou frakcí opakujících se, obvykle inaktivních a metylovaných sekvencí DNA. Procesy diferenciace rostlin jsou řízeny kombinatorickým účinkem mnoha genů, které jsou exprimovány (v závislosti na vnějším prostředí) přísně místně a časově. Podobně jako u jiných eukaryot byly i u rostlin identifikovány tzv. homeotické geny, které kódují transkripční faktory aktivující geny zodpovědné za procesy morfogeneze. Současné výzkumy ukazují, že také mechanismy epigenetické dědičnosti odpovědné za mitotický přenos informace o aktivitě genů (zejména metylace DNA, kinetika replikace DNA a acetylace nukleozomálních histonů) jsou u rostlin obdobné, jako je tomu u ostatních eukaryotických organismů. Vzhledem k neschopnosti lokomočního pohybu došlo u rostlin v průběhu evoluce k vytvoření mnoha mechanismů, které zvyšují jejich schopnost adaptace vůči měnícím se životním podmínkám. Patří k nim i totipotence, tj. schopnost každé (somatické i generativní) buňky dát vznik celému rostlinnému organismu. Tato schopnost představuje velkou výhodu pro využití rostlin jako experimentálních eukaryotických modelů.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Aronson A. I., Beckman W., Dunn P. (1986): *Microbiol. Rev.* 50: 1.  
Bennet M. D., Smith J. B. (1976): *Philos. Trans. R. Soc. London*, B 274: 227.  
Blackburn E. H. (1991): *Trends Biochem. Sci.* 16: 378.  
Botterman J., Leemans J. (1988): *Trends Genet.* 4: 219.  
Brisson N., Paszkowski J., Penswick J. R., Gronenborn B., Potrykus I., Hohn T. (1984): *Nature* 310: 511.  
Burn J. E., Bagnall D. J., Metzger J. D., Dennis E. S., Peacock W. J. (1993): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 287.  
Doerner P. W., Stermer B., Schmid J., Dixon R. A., Lamb C. J. (1990): *Bio/Technology* 8: 845.  
Döring H.-P., Starlinger P. (1986): *Annu. Rev. Genet.* 20: 175.  
Estruch J. J., Prinsen E., van Onckelen H., Schell J., Spena A. (1991): *Science* 254: 1364.  
Finnegan E. J., Peacock W. J., Dennis E. S. (1996): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8449.  
Flavell R. B. (1980): *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 569.  
Flavell R. B. (1986): *Oxford Surv. Plant Mol. Biol.* 3: 251.  
French R., Janda M., Ahlquist P. (1986): *Science* 231: 1294.  
Gallie D. R. (1993): *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 77.

- Gan S., Amasino R. M. (1995): *Science* 270: 1986.
- Good X., Kellogg J. A., Wagoner W., Langhoff D., Matsumura W., Bestwick R. K. (1994): *Plant Mol. Biol.* 26: 781.
- Grandbastien M.-A. (1992): *Trends Genet.* 8: 103.
- Grant S., Houben A., Vyskot B., Široký J., Wei-Hua P., Macas J., Saedler H. (1994): *Dev. Genet.* 15: 214.
- Grant S. G., Chapman V. M. (1988): *Annu. Rev. Genet.* 22: 199.
- Hiatt A., Cafferkey R., Bowditch K. (1989): *Nature* 342: 76.
- Holliday R. (1990): *Philos. Trans. R. Soc. London, B* 326: 329.
- Janoušek B., Široký J., Vyskot B. (1996): *Mol. Gen. Genet.* 250: 483.
- Jaynes J. M., Yang M. S., Espinoza N., Dodds J. H. (1986): *Trends Biotechnol.* 4: 314.
- Kermicle J. L., Alleman M. (1990): *Development (Suppl.)*, 9.
- Kuroiwa T. (1982): *Int. Rev. Cytol.* 75: 1.
- Landschütze V., Wilmitzer L., Müller-Röber B. (1995): *EMBO J.* 14: 660.
- Lewin R. (1983): *Science* 219: 478.
- Lock L. F., Takagi N., Martin G. R. (1987): *Cell* 48: 39.
- Lyndon R. F., Francis D. (1992): *Plant Mol. Biol.* 19: 51.
- Mandel M. A., Bowman J. L., Kempin S. A., Ma H., Meyerowitz E. M., Yanofsky M. F. (1992): *Cell* 71: 133.
- Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R. B. (1990): *Nature* 347: 737.
- Matzke M. A., Matzke A. J. M. (1995): *Plant Physiol.* 107: 679.
- Maynard Smith J. (1990): *J. Theor. Biol.* 143: 41.
- Meins F., Jr. (1994): In: Mok D. W. S., Mok M. C. (eds): *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, 269.
- Müller-Röber B., Sonnewald U., Willmitzer L. (1992): *EMBO J.* 11: 1229.
- Nagl W. (1990): In: Bajaj Y. P. S. (ed.): *Somaclonal Variation in Crop Improvement*, Vol. I. Springer-Verlag, Berlin, 153.
- Negrutiu I., Gharti-Chhetri G. B. (eds) (1991): *A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Penarrubia L., Kim R., Giovannoni J., Kim S.-H., Fischer R. L. (1992): *Bio/Technology* 10: 561.
- Potrykus I. (1990): *Physiol. Plant* 79: 125.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Ed. 2. Cold Spring Harbor Lab Press, New York.
- Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H. (1990): *Science* 250: 931.
- Spena A., Prinsen E., Fladung M., Schulze S. C., van Onckelen H. (1991): *Mol. Gen. Genet.* 227: 205.
- Stark D. M., Timmerman K. P., Barry G. F., Preiss J., Kishore G. M. (1992): *Science* 258: 287.
- Tinland B. (1996): *Trends Plant Sci.* 1: 178.
- Töpfer R., Martini N., Schell J. (1995): *Science* 268: 681.
- Vandekerckhove J., van Damme J., van Lijsebettens M., Botterman J., De Block M., Vandewiele M., De Clercq A., Leemans J., van Montagu M., Krebbers E. (1989): *Bio/Technology* 7: 929.
- Vyskot B., Araya A., Veuskens J., Negrutiu I., Mouras A. (1993): *Mol. Gen. Genet.* 239: 219.
- Vyskot B., Koukalová B., Kovařík A., Sachambula L., Reynolds D., Bezděk M. (1995): *Theor. Appl. Genet.* 91: 659.
- Walbot V., Cullis C. A. (1985): *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 367.
- Weil J. H. (1987): *Plant Sci.* 49: 149.

## DOPORUČENÁ LITERATURA

- Ainsworth C. (ed.) (1998): *Sex Determination in Plants*. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Gustafson J. P. (ed.) (1990): *Gene Manipulation in Plant Improvement*, Vol. II. Plenum Press, New York.
- Hohn B., Dennis E. S. (eds) (1985): *Genetic Flux in Plants*. Springer-Verlag, Wien.
- Jost J. P., Saluz H. P. (eds) (1993): *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Ondřej M. (1992): *Genové inženýrství kulturních rostlin*. Academia, Praha.
- Shaw C. H. (ed.) (1988): *Plant Molecular Biology: a Practical Approach*. IRL Press, Oxford.



## FYZIOLOGIE ROSTLIN

prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc., RNDr. Ivana Macháčková, CSc.,  
doc. Ing. Jan Krekule, DrSc., prof. Dr. Ing. Jiří Šebánek, DrSc.

*Autorský kolektiv:*

prof. RNDr. Jan Gloser, CSc., prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc., doc. Ing. Jan Krekule, DrSc.,  
RNDr. Ivana Macháčková, CSc., prof. RNDr. Lubomír Nátr, DrSc., RNDr. Ilja Prášil, CSc.,  
prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc., prof. RNDr. Zdeněk Sladký, DrSc., Ing. Jiří Šantrůček, CSc.,  
prof. Dr. Ing. Jiří Šebánek, DrSc., prof. RNDr. Marta Tesařová, CSc., doc. RNDr. Boris Vyskot, CSc.

Vydala Academia  
nakladatelství Akademie věd České republiky  
Legerova 61, Praha 2  
s finanční podporou Fondu Akademie věd České republiky  
pro vydávání vědecké literatury

Vazbu s použitím reprodukce obrazu Jiřího Valenty navrhl Oleg Man  
Redaktorka publikace RNDr. Eva Leinerová  
Technická redaktorka Běla Trpišovská

Vytiskla CENTA, spol. s r. o.,  
odštěpný závod Brno, Vídeňská 113

Vydání 1., Praha 1998  
Ed. číslo 4903  
ISBN 80-200-0586-2