



1. Kultura in vitro nádorových kořenů po transformaci rostlin knotovky bakterií *Agrobacterium rhizogenes*. Je to varianta známější bakterie *A. tumefaciens*, která způsobuje nádory kalusové morfologie.

slovenská akademie věd, v oblasti základního biologického výzkumu reprezentovaná především Biofyzikálním ústavem AV ČR (BFÚ AV ČR). Jeho zakladatelem byl profesor lékařské fakulty Ferdinand Herčík. Ústav se tehdy soustředil především na výzkum radio-biologický, ale postupně se stával centrem základního výzkumu molekulárněbiologického. V současné době má ústav devět oddělení, která se zabývají molekulární a buněčnou biofyzikou. V oblasti buněčné biofyziky je jedním z důležitých směrů vývojová genetik a rostlin.

Moderní genetik a rostlin se v Biofyzikálním ústavu zrodila na počátku sedmdesátých let 20. století, kdy se zde sešli mikrobiolog Milan Bezděk a jeho tehdejší aspirant rostlinný genetik Boris Vyskot a začali se věnovat problematice rostlinných nádorů indukovaných půdní bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Zjistili řadu originálních poznatků o nádorových rostlinných buňkách, jejich extrémních růstových vlastnos-

BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV

A NOVODOBÁ HISTORIE GENETIKY ROSTLIN V BRNĚ

STANISLAV
KOZUBEK

Město Brno je v celém světě známo jako místo, kde se zrodila nauka o dědičnosti čili genetik a na zásluha augustiánského mnicha Johanna Gregora Mendela, který zhruba před 150 lety ve starobrněnském klášteře prováděl své slavné pokusy s hybridy rostlin hrachu a postuloval základní pravidla dědičnosti. Brno tedy má v oblasti genetiky rostlin velmi slavnou tradici. Bohužel 20. století na ni příliš nenavázalo. Po první světové válce bylo v Brně ustaveno postupně několik vysokých škol a na některých z nich (zejména na Masarykově univerzitě a tehdejší Vysoké škole zemědělské) se profesori a studenti věnovali biologii i genetice rostlin. Snad nejvýznamnějším brněnským fyziologem rostlin byl profesor Vysoké školy zemědělské Rudolf Dostál, autor nauky o celistvosti rostlin. Po druhé světové válce vznikala v Brně Česko-

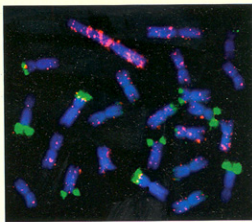
tech i reparačních schopnostech. Ovlivnění epigenetickým učením britského vývojového genetiky Conrada Waddingtona se klonilo k názoru, že původ nádoru je epigenetický: tedy že bakterie je induktorem, který spustí ektopickou expresi rostlinných genů kódujících auxin a cytokinin, což nezvratně vede k neorganizovanému nádorovému růstu. Podstatné je, že k takové ektopické expresi dochází v jisté frekvenci i spontánně, například v mezidruhových hybriděch či při kultivaci buněk *in vitro*. To byla právě oblast, kde brněnští vědci z BFÚ AV ČR přinesli řadu nových poznatků již v sedmde-

KOMERČNÍ
PREZENTACE

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i.,
Královopolská 135, 612 65 Brno

sátých letech 20. století, což jim vyneslo i uznání zahraničních kolegů. Kandidátních teorií pro indukci nádorového růstu bylo více, hovořilo se zejména o fágách *A. tumefaciens* nebo o infekční RNA. Vítězná z toho sporu vyšla v roce 1980 americká genetička Mary-Dell Chiltonová, která prokázala platnost plazmidového tumorigenního principu. Onkogenní agrobakterie obsahují velký plazmid, jehož část se po infekci rostlinné buňky oddělí, putuje do rostliny a kovalentně se včleňuje do nahodilých částí rostlinného chromozomu (obr. 1). Jde tedy o zcela výjimečnou událost, kdy nepohlavním procesem přechází genetická informace z bakterie do rostliny. Takovému procesu říkáme horizontální genový přenos.

Vědci si rychle všimli, že se část agrobakteriálního plazmidu přenesla do rostliny i poté, co jsou rostlinné onkogeny vyřazeny z funkce. Tak vznikly tzv. odzbrojené vektory, které jsou schopny do rostlin vnášet klonované geny, a tím rostliny modifikovat i fenotypově. Agrobakteriální vektory se rychle staly nejrozšířenějším nástrojem modifikace rostlin, ať už v základním výzkumu nebo ve šlechtitelské praxi. Do této oblasti genetického inženýrství se vrhli i kolegové z BFÚ AV ČR, kteří se mj. zabývali i studiem stability rostlinného jaderného genomu. Svými pracemi přispěli k zjištění, že rostlinný genom je poměrně nestabilní, a zejména při stresu se restrukuralizuje. Do rostlinného genomu modelového tabáku vnesli i mobilní genetický element z mouchy octomilky, k jeho aktivnímu pohybu však v rostlině nedošlo. Brněnští vědci patřili ve střední Evropě vůbec k prvním, komu se podařilo zkonstruovat transgenní rostliny. Expresi vnesených genů sledovali pomocí selektovatelného (a zároveň i reportérového) bakteriálního genu odpovídajícího za rezistenci vůči kanamycinu. Zjistili přitom, že vnesené geny nejsou vždy funkční, že záleží mj. na místě včlenění cizího genu do chromozomu či na počtu kopií transgenů v rostlinném genomu. V tomto okamžiku se kolegové z BFÚ AV ČR opět inspirovali dílem Conrada Waddingtona a výsledky interpretují jako epigenetické řízení genové exprese. V osmdesátých letech byly jediným známým mechanismem ovlivňování funkce genů metylace DNA, tedy cytozinu. Metoda genomového sekvencování si ještě nebyla vyvinuta, a tak brněnští kolegové studovali umlčování transgenů pomocí restričních endonukleáz. Vskutku metylaci DNA prokázali a potvrdili, že koreluje s procesem umlčování. Dalším nástrojem jak studovat metylace je empirická aplikace látek, které modifikují funkci enzymů DNA metyltransferáz. Nejznámějším z nich je zřejmě 5-azacytidin, mj. objevený v časných šedesátých letech minulého století v Ústavu organické chemie a biochemie AV v Praze. Brněnským vědcům se podařilo prokázat,



že tento analog cytozinu vyvolává hypometylací DNA a umlčené geny aktivuje. Také přinesli originální poznatky o tom, že taková empirická hypometylace je značně stabilní a přenáší se jak při mitotickém dělení, tak meioticky.

Rok 1989 přinesl samozřejmě velké oživení i do rostlinného výzkumu na BFÚ AV ČR v Brně. M. Bezděk se stal prvním porevolučním ředitelem a jeho velké oddělení studia genové exprese se postupně diferencovalo v několik směrů: B. Brzobohatý se zabýval studiem cytokininů, A. Kovařík studoval molekulární mechanismy epigenetiky, J. Fajkus začal studovat strukturu a funkci telomer a konečně B. Vyskot se zaměřil na vývojovou genetiku a reprodukční a evoluční biologii. Tím B. Vyskota začal svá studia struktury a funkce pohlavních chromozomů dvoudomých rostlin na modelu knotovky (*Silene latifolia*) v roce 1992. Tato rostlina, jako málokterý rostlinný druh, má heteromorfni pohlavní chromozomy X a Y, formálně je genetický systém determinace podobný člověku. Samičí rostliny (v květech pouze s pestíky) mají konstituci XX, zatímco samčí rostliny (vytvářející jen prašníky) mají karyotyp XY; jde tedy o typ savců s dominantní úlohou Y. Brněnští výzkumníci začali se studiem epigenetických mechanismů, které hrají roli v sexualitě rostlin. Je známo, že u savců je chromozom Y rozsáhle degenerován a chromozom X je u samic dávkově kompenzován. Tento proces (lyonizace) je provázen hypermetylací sekvencí DNA inaktivovaného samičího chromozomu X. Tým B. Vyskota postupně s pomocí několika cyto-geneticko-molekulárních technik prokázal, že také jeden ze dvou chromozomů X samičích rostlin knotovky je podobně modifikován a replikuje se v pozdní fázi buněčného cyklu. Pomocí protilátek vůči různě modifikovaným nukleozomálním histonům a sledováním kinetiky replikace chromozomů dále brněnští kolegové zjistili strukturální uspořádání kódujících sekvencí na chromozomech; geny jsou nahroučeny v oblastech sousedících s rozsáhlými subtelomerními repeticemi. Ve spolupráci s americkou sku-

2. Fluorescenční hybridizace in situ ukazuje akumulaci plastidových sekvencí DNA (červené signály) na chromozomu Y knotovky. Jak je i z obrázku patrné, pohlavní chromozomy jsou v genomu největší a dobře rozlišitelné. Zelené signály jsou markery identifikace autozomů.



3. Laserová mikrodisekce umožňuje bezdotykovou metodou izolovat specifický chromozom, v tomto případě pohlavní chromozom X knotovky, pomoci polymerázové řetězové reakce jeho sekvence amplifikovat a dále klonovat v knihovně a skrínovat na přítomnost důležitých genů.

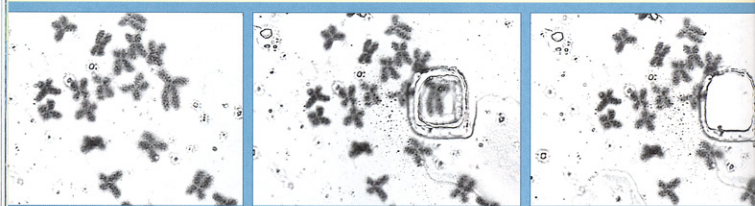
pinou S. R. Grantové, francouzským týmem I. Negrutia a japonskými kolegy se S. Matsunagou také zmapovali funkční oblasti chromozomu Y a prokázali, že tento chromozom zahrnuje minimálně tři skupiny genů, které u samečků vedou k inhibici samičího reprodukčního programu a k realizaci samičí sexuality.

Snad nejprestižnější prací oddělení B. Vyskota je demonstrace epigenetického řízení pohlavnosti rostlin. Experimentální modulaci metylace DNA odvodili rostlinný materiál se samičím genotypem XY, který však byl fenotypově oboupohlavní. Frekvence hermafroditů v populaci ovlivněných rostlin byla 21 %, což zjevně vylučuje úlohu genetických mutací. Rostliny byly ve skutečnosti androhermafroditickými chimérami, tedy vytvářely na jednom jedinci oboupohlavně i samčí květy. Pomocí analýzy jejich DNA vědci prokázali, že rostliny mají výrazně hypometylovaný jaderný genom. Jak už věděli z vlastních předchozích studií, experimentálně navozená hypometylace je u rostlin dědičná. Proto také prováděli rozsáhlé hybridizační experimenty, aby prokázali, že i epigenetický hermafroditismus je dědičný. Jejich názor se potvrdil. Pokud byly hermafroditní rostliny samoopylovány či použity jako pylový dárcé, znak oboupohlavnosti se dědil do dalších generací s neúplnou penetrancí a rozdílnou expresivitou. Namísto postupného vyhasínání epimutace v dalších generacích naopak vzrůstala frekvence hermafroditů a četnost oboupohlavných květů. Z výsledků křížení vyplývá, že epimutace byla vázána na chromozom Y a spočívala v blokádě funkce genů, které fungují jako supresory samičího vývoje programu. Hlavním přínosem této práce je tedy demonstrace epigenetického řízení sexuality a možnosti jejího ovlivnění a dědičnosti.

V současnosti je velké úsilí B. Vyskota a jeho spolupracovníků E. Kejnovského a R. Hobzy věnováno studiu struktury a evoluce pohlavních chromozomů na modelech knotovky, šťovíku a papáje. Hlavní otázkou je genetická degenerace chromozomu Y. Je známo, že pohlavní chromozomy člověka se začaly vyvíjet asi před 200 miliony let, jsou

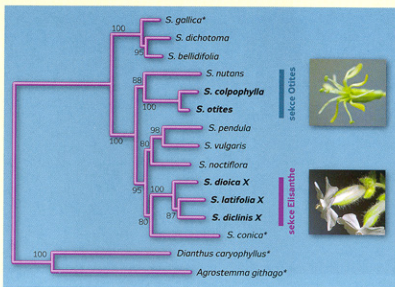
tedy evolučně staré. Pohlavní chromozomy dvoudomých rostlin jsou jen vzácně heteromorfni a jejich stáří se odhaduje na pouhých 15–20 milionů let. Studium struktury pohlavních chromozomů rostlin tedy analyzujeme časná stadia evoluce chromozomů člověka. Dosud máme jen víceméně nepřímé důkazy o tom, že rostlinný chromozom Y u knotovky je degenerován. Rostliny totiž nejsou schopny života, pokud nemají alespoň jeden plně funkční chromozom X. Brněnští kolegové také pomocí sofistikovaných křížení rostlin prokázali, že chromozom Y nemá schopnost projít samičím haploidním gametofytem. Na chromozomu Y také nalezi řadu vysoce akumulovaných repetitivních sekvencí, satelitů a mikrosatelitů, což lze považovat za první příznak degenerace. Chromozom Y, jak zjistili spolupracovníci B. Vyskota, též akumuluje sekvence plastidové DNA jako výsledek horizontálního genového přenosu (obr. 2). Všechny tyto nepotřebné sekvence se na chromozomu Y hromadí zjevně proto, že tento chromozom z větší části ztratil schopnost rekombinace se svým jediným možným partnerem, chromozomem X. Díky nejmodernějším možnostem laserové mikrodisekce vědci z BFÚ připravují unikátní knihovny úseků DNA, z nichž loví geny, které především řídí sexualitu rostlin (obr. 3).

Vznik dvoudomosti u rostlin patří k žhavým tématům evoluční biologie. Pomocí molekulárněbiologických analýz sekvencí genů se brněnským vědcům ve spolupráci především z kolegy z Lyonu podařilo prokázat, že pár pohlavních chromozomů knotovky se vyvinul z jednoho páru obyčejných autozomů, dodnes se nacházejících u hermafroditních příbuzných druhů v rámci rodu *Silene*. Na základě znalosti funkce a nukleotidové sekvence květních genů u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) se J. Žlůvové podařilo najít a analyzovat kandidátní geny, které se u knotovky podílejí na realizaci pohlavnosti. Srovnáváním nukleotidových sekvencí Y-vázaných genů a jejich X-vázaných alel se podařilo prokázat, že Y-kopie mají delší introny s akumulací transponozů a jejich exprese je nižší než u X-vázaných alel, což opět naznačuje evoluční degeneraci, i když ve výrazně



nížším rozsahu, než je tomu u živočichů. Největším úspěchem posledního období práce brněnských kolegů je fylogenetická analýza evoluce pohlavních chromozomů v rámci rodu *Silene*. V tomto rodu se totiž vyskytují dvě poměrně vzdálené větve, skupiny dvoudomých druhů: sekce *Elisanthe* a sekce *Otites* (obr. 4). B. Janoušek se spolupracovníky si položili otázku, zda se pohlavní chromozomy u těchto odlišných skupin vyvinuly ze stejného páru autozomů. Brněnská vědci nejprve museli prokázat pionýrské úsilí při studiu pohlavnosti u druhů sekce *Otites*. Především zjistili, že tyto rostliny vůbec nemají heteromorfní pohlavní chromozomy, tedy jsou zřejmě evolučně mladší než pohlavní chromozomy knotovky. Dále prokázali, že i u sekce *Otites* je heterogametním pohlavním sex samčí (tedy formálně XY), což jinými autory nebylo předpokládáno. Nejvýznamnějším výsledkem tohoto originálního studia je však zjištění, že pár pohlavních chromozomů u rostlin sekce *Otites* vznikl z jiného páru autozomů než u sekce *Elisanthe*, což je faktem více než zajímavým, zjištěným poprvé v říši rostlin. U živočichů je tento jev též velmi ojedinělý; v nedávné době byl popsán u ryb rodu medaka.

Oddělení vývojové genetiky rostlin BFÚ AV ČR se ve studiu pohlavních chromozomů rostlin stalo prakticky světovou špičkou, což



4. **Fylogenetický strom rodu *Silene* ukazuje dvě vzdálenější větve dvoudomých rostlin, které nezávisle na sobě vyvinuly dvoudomost i pohlavní chromozomy: sekce *Elisanthe* (zastoupená zejména modelovou knotovkou – *S. latifolia*) a sekce *Otites* (reprezentovaná druhem *S. colpophylla*).**

dokazuje jejich priorita jak v počtu publikací, tak v počtu citací (podle WoS 2009). Brno se tedy může pyšnit tím, že má vědce, kteří důstojně pokračují ve šlépějích J.G. Mendela, a nezbývá než doufat, že výsledky jejich práce budou včas doceněny. Pracovníci tohoto oddělení jsou zvaní jako řečníci na všechny významnější akce v oborech studia chromozomů i rostlinné genetiky ve světě, publikují ve špičkových vědeckých časopisech a spolupracují s předními zahraničními pracovišti, nyní zejména s ETH v Curychu a s univerzitami v Lyonu, Helsinkách, Almerii a také v Honolulu. Bývalí doktorandí této laboratoře dosáhli vynikajících úspěchů, například K. Říha (nyní vedoucí oddělení v Ústavu molekulární genetiky rostlin Gregora Mendela ve Vídni) získal prestižní cenu firmy Novartis, B. Janoušek cenu Hlávkovy nadace, R. Hobza Wichterleho cenu AV a J. Žilová cenu Učené společnosti ČR. V současné době je v této laboratoři vedeno osm doktorandů a čtyři tamější vědeckí pracovníci přednášejí na šesti univerzitách v ČR. Brněnské pracoviště je také koordinátorem centra základního výzkumu studia rostlinného genomu sponzorovaného MŠMT.

Oddělení vývojové genetiky rostlin B. Vyskoka je jedno z nejlepších oddělení Biofyziálního ústavu AV ČR, avšak zdaleka není jediné, které dosáhlo světové špičky. Neméně významná jsou také oddělení biofyziální chemie a molekulární onkologie M. Fojty, které položilo základy nového vědního oboru (viz „Padesát let elektrochemie nukleových kyselin“, Akademický bulletin 4/2009), oddělení Struktury a dynamiky nukleových kyselin J. Šponera, jednoho z našich nejcitovanějších vědců, a další. BFÚ AV ČR byl opakovaně hodnocen mezinárodními komisemi jako jeden z nejlepších ústavů AV ČR v oblasti věd o živé přírodě. Je to skvělé pracoviště s velkým počtem mladých lidí a atmosférou příznivou pro špičkový výzkum.

Literatura

- Hobza R., Vyskot B.: Laser microdissection-based analysis of plant sex chromosomes, *Methods in Cell Biology* 82, 433–453, 2007
- Janoušek B., Široký J., Vyskot B.: Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*, *Molecular and General Genetics* 250, 483–490, 1996
- Mráčková M., Nicolas M., Hobza R., Negrutiu L., Moneger F., Widmer A., Vyskot B., Janoušek B.: Independent origin of sex chromosomes in two species of the genus *Silene*, *Genetics* 179, 1129–1133, 2008
- Nicolas M., Marais G., Hykelová V., Janoušek B., Laporte V., Vyskot B., Mouchiroud D., Negrutiu L., Charlesworth D., Moneger F.: A gradual and ongoing process of recombination restriction. – *Public Library of Science Biology* 3, 47–56, 2005
- Vyskot B.: The role of DNA methylation in plant reproductive development. In: *Sex Determination in Plants*, ed. Ainsworth CC, Bios Oxford 1999, pp. 101–120
- Vyskot B., Hobza R.: Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog, *Trends in Genetics* 20, 432–438, 2004