SPONZOROVANÝ ČLÁNEK

JAROSLAV DOLEŽEL

Tráva s trojím věnem

Začali jsme číst obrovské genomy obilovin?

poznáváme svět rostlin

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Pšenice patří k nejdůležitějším světovým plodinám – tvoří základ stravy pro více než třetinu lidstva. Její produkce však stoupá pomaleji než spotřeba. Světové zásoby se tenčí, za posledních deset let klesly zhruba na polovinu. Šlechtitelé podporují a napjatě očekávají výsledky čtení pšeničného genomu.

Vesmír: *Mezinárodní konsorcium pro sekvenování genomu pšenice (International Wheat Genome Sequencing Consortium) patří k nejlépe organizovaným uskupením tohoto typu. Olomoucká Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, která je součástí Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., hraje v jeho činnosti klíčovou roli. Jak konsorcium pracuje?*

Jaroslav Doležel: Cíl konsorcia je nesmírně ambiciózní – přečíst obrovský genom pšenice seté (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*), který je tvořen 17 miliardami párů bází DNA. To je pětkrát více než u člověka a rozsahem jde o dosud největší sekvenační projekt vůbec. Protože ostatní významné plodiny mají genomy podstatně menší, neočekávám, že v nejbližší době bude zahájen projekt podobného rozsahu. Manažerkou konsorcia je Kellye A. Eversole, která dlouho pracovala v americkém Senátu a ve Spojených státech koordinuje další projekty zaměřené na sekvenování celých genomů. Pod jejím vedením je konsorcium profesionálně řízené, má jasný program, práce rychle postupují a nesou ovoce.

Protože pracujeme s tak obrovským genomem, stěží ho můžeme číst celý naráz (viz Vesmír 88, 182, 2009/3). Postupujeme uvážlivě a prvním cílem konsorcia je vytvořit fyzické mapy jednotlivých chromozomů, kterých má pšenice 21 párů. Děje se tak pomocí takzvaných BAC knihoven, kde pro další práci archivujeme krátké úseky DNA, o nichž víme, ze kterých chromozomů pocházejí. Mohlo by se zdát, že v éře sekvenátorů nových generací je tento postup zastaralý. Pomůže nám však nezabloudit v složitém genomu. Snadno by se mohlo stát (a nejednou se také stalo), že bychom sice postupovali rychle, ale nakonec zjistili, že sekvenujeme něco jiného, než jsme chtěli. Genom pšenice je nejen obrovský, ale i složitý mimo jiné tím, že je hexaploidní. Na vzniku pšenice seté se totiž podílely tři příbuzné druhy trav a od každé z nich dostala věnem celý genom. Protože šlo o příbuzné druhy, jsou si rodičovské genomy podobné.

Pšenice setá (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*), odrůda Chinese Spring, jejíž genom se čte. Snímek © Stanislav Vaněk.

Rodokmen pšenice seté

Vesmír: *Jak a kdy vznikla pšenice setá?*

J. D.: Vznikla v oblasti úrodného půlměsíce – tam, kde neolitický člověk změnil životní styl, usadil se a začal provozovat zemědělství. Pšenice setá se na tomto procesu mohla významně podílet. Historie jejího vzniku je však starší. Asi před půl milionem let se zkřížila diploidní planá tráva *Triticum urartu*, která měla genom AA ve dvou sadách po sedmi chromozomech, s příbuzným diploidním druhem trávy, jež měl genom BB také ve dvou sadách po sedmi chromozomech. Ta se asi podobala dnešnímu druhu plané trávy *Aegilops speltoides*. Diploidní kříženec obou druhů měl genom AB a 14 chromozomů (od každého rodiče získal jednu kopii genomu představovanou jednou sadou sedmi chromozomů) a byl neplodný, protože chromozomy genomu A se v procesu tvorby pohlavních buněk nemohly párovat s odlišnými chromozomy genomu B. Když se však všechny chromozomy kříženec zdvojily, vznikla planá tetraploidní pšenice

…s. 564

Doc. Ing. Jaroslav Doležel, DrSc., (*1954) vystudoval Agronomickou fakultu na Vysoké škole zemědělské v Brně. Zabývá se strukturou a evolucí genomu rostlin, vede olomouckou Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., a přednáší na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Od roku 2004 je členem Učené společnosti ČR.

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie ÚEB studuje také genom banánovníku. Vedle společensko-ekonomického významu je banánovník stejně jako pšenice vhodným modelem pro studium změn genomu v průběhu evoluce polyploidních a hybridních druhů rostlin. Laboratoř získala dosud největší objem sekvenčních dat genomu banánovníku a Mezinárodní konsorcium pro genomiku banánovníku ji pověřilo správou Centra pro genomiku banánovníku. V prostorách laboratoře jsou uloženy BAC knihovny banánovníku, referenční sbírka genomových DNA a další biologické materiály, které laboratoř distribuuje do celého světa. Na snímku je list planého druhu *Musa acuminata* ssp. *zebrina* z olomoucké sbírky, © Stanislav Vaněk.

T. turgidum s genomem AABB a čtyřmi sadami po sedmi chromozomech, která byla plodná (chromozomy A se párují s chromozomy A, chromozomy B se párují s chromozomy B). Z ní se vyvinula – a na tom se zřejmě cíleným výběrem podílel člověk – kulturní pšenice tvrdá (*T. turgidum* ssp. *durum*), ze které se například dělají těstoviny. Teprve asi před deseti tisíci lety se tetraploidní *T. turgidum* (AABB) zkřížila s třetím diploidním druhem trávy: *Aegilops tauschii* s genomem DD ve dvou sadách po sedmi chromozomech. Jejich kříženec měl genom ABD ve třech sadách chromozomů po sedmi, a byl samozřejmě neplodný. Teprve po zdvojení všech tří sádek chromozomů vznikla planá hexaploidní pšenice s genomem AABBDD v šesti sadách chromozomů po sedmi [$(3 \times 7) \times 2 = 42$ chromozomů]. Přesněji jde o allohexaploidní druh, přičemž předpona „allo“ vyjadřuje odlišnost rodičovských genomů. Tohoto kříženec si člověk zřejmě všiml, selektoval jej a přispěl ke vzniku pšenice seté (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*). Je zajímavé, že nebyla nalezena planá forma hexaploidní pšenice, a zdá se, že k rozšíření pšenice by bez přispění člověka nedošlo.

Genomové knihovnictví

Vesmír: *Vraťme se k tématu našeho rozhovoru. Co to je BAC knihovna a fyzická mapa chromozomu?*

J. D.: Knihovna DNA je sbírka fragmentů chromozomů vložených technikami genového inženýrství do bakterií, zpravidla do druhu *Escherichia coli*. V případě BAC knihoven je vektorem sloužícím k vložení do bakterie umělý bakteriální chromozom (**B**acterial **A**rtificial **C**hromosome). Transformované bakterie lze dlouhodobě skladovat při teplotě –80 °C, v případě potřeby namnožit a dále s nimi pracovat. Fyzická mapa představuje soubor klonů z BAC knihovny uspořádaných tak, aby se navzájem částečně překrývaly a jejich pořadí odpovídalo jejich umístění v genomu. Dostupnost fyzické mapy zásadním způsobem usnadňuje a urychluje izolaci genů a odvozování DNA markerů využitelných v šlechtění. Umožní rovněž sekvenování gigantického genomu pšenice po menších částech (skupinách BAC klonů), což velmi usnadní jinak velmi složité sestavování krátkých sekvenačních čtení.

Při konstrukci fyzické mapy celého genomu pšenice seté bude třeba uspořádat nejméně dva miliony BAC klonů, což je velmi obtížné, nejen pro jejich velký počet, ale i kvůli zmíněné podobnosti rodičovských genomů. V případě našeho konsorcia je práce usnadněna tím, že BAC knihovny připravujeme z jednotlivých chromozomů, respektive jejich ramének. Tím odpadá problém s podobností genomů a práce je velmi zjednodušena i tím, že raménka tvoří jen několik procent celého genomu, a uspořádáváme tedy „jen“ asi padesát tisíc klonů pro každé raménko zvlášť. Další výhodou naší strategie je možnost přidělit jednotlivé chromozomy různým laboratořím, které mohou na konstrukci fyzické mapy a sekvenování genomu postupovat souběžně s ostatními, a tím se celý projekt samozřejmě značně urychluje.

Vesmír: *Jak se BAC knihovny specifické pro jednotlivé chromozomy vytvářejí?*

J. D.: Udělat takovou BAC knihovnu není žádná legrace a vyžaduje to obrovskou zkušenost s mnoha technikami cytogenetiky, cytometrie, molekulární biologie a genomiky. Není to práce pro jednotlivce, ale pro sehraný tým špičkových odborníků. Vývoj celého balíku metod nám trval mnoho let a byl možný díky podpoře Grantové agentury ČR, MŠMT ČR a Národní agentury pro zemědělský výzkum. Vlastní práce na konstrukci knihovny začíná tříděním chromozomů pomocí průtokové cytometrie. Pro každou knihovnu potřebujeme nejméně pět milionů chromozomů a jenom jejich třídění trvá asi 6 týdnů. Vzorek pro třídění je suspenze chromozomů, kterou připravujeme homogenizací kořenových špiček. Abychom získali dostatečné množství chromozomů, musíme nejdříve ve špičkách synchronizovat buněčné dělení a zastavit je ve fázi, kdy jsou chromozomy plně kondenzované (v metafázi). Pak DNA chromozomů barvíme specifickým fluorescenčním barvivem a vzorek je připravený pro třídění.

Při analýze průtokovým cytometrem je suspenze chromozomů uspořádávána ve vodním paprsku o průměru 70 mikrometrů tak, že se pohybují jeden za druhým. Rychlostí asi 1000 chromozomů za sekundu procházejí jednotlivě přes úzký paprsek laseru, molekuly fluorescenčního barviva absorbují světelnou energii laseru, kterou však okamžitě uvolňují ve formě záblesku fluorescence. Podle množství vyzářeného světla je stanoven obsah DNA. Jen o něco níže pod oblastí

měření je vodní paprsek rozdělován na nanolitrové kapičky. Ty, v kterých je chromozom, jenž nás zajímá, jsou nabity kladným nebo záporným elektrickým nábojem a po průchodu eletrostatickým polem jsou odchýleny do sběrné nádobky. Zpočátku jsme však narazili na problém, že chromozomy pšenice mají podobnou velikost a podle množství fluorescence se dal třídit jen chromozom 3B, který je větší než ostatní, a má tedy nejvíce DNA. Pokračovat nám pomohla práce E. R. Searse z padesátých let minulého století, který v USA pracoval s modelovou odrůdou pšenice Chinese Spring a vytvořil telosomické linie. V každé z těchto linií chybí jedno z ramének některého chromozomu, buď dlouhé, nebo krátké. Chromozom, kterému kus chybí, má nejméně DNA, tedy i nižší fluorescenci než ostatní, a můžeme jej pomocí cytometru izolovat. Sears nemohl tušit, že jeho práce poslouží genomice, ale jak je vidět, dobře udělaná práce se neztratí.

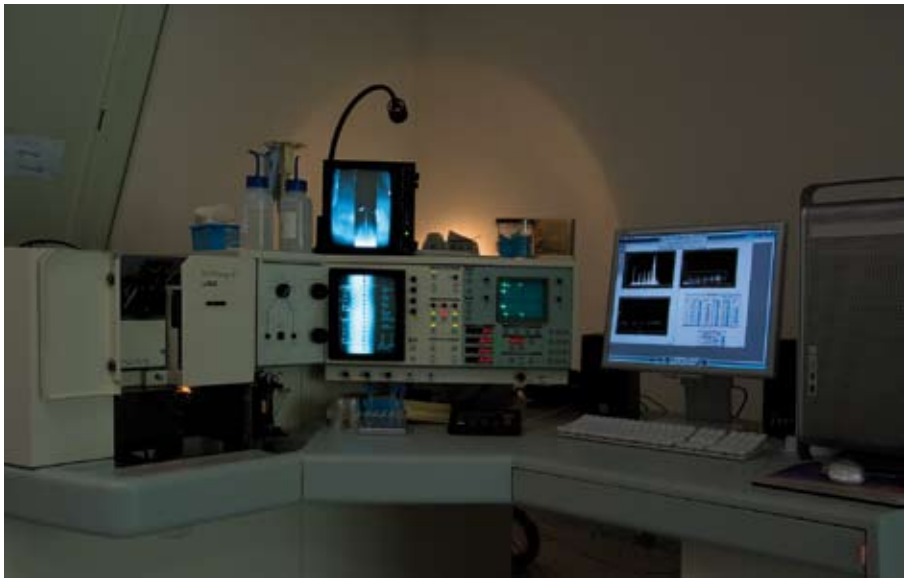
Vesmír: *A je to. Roztřídíte chromozomy, rozsekáte je na kousky, ty nacpete do bakterií, sekvenujete…*

J. D.: Kdepak, o BAC knihovně ještě nemůže být řeč. Když jsme zásluhou kolegyně Ing. Hany Šimkové, CSc., která vypracovala metodu izolace neporušené DNA z tříděných chromozomů, prošlapali cestičku až sem, jen jsme slyšeli: „Jo, to je zajímavé.“ A tím zájem končil. Požadavek byl, abychom dokázali, že lze udělat BAC knihovnu z tříděných chromozomů. Tím jsme se však zabývat nechtěli, zakládat v Olomouci genomiku jsme v té době neměli v úmyslu. Nabídli jsme kolegům v USA, že jim pošleme DNA z tříděných chromozomů, a požádali je, aby našli někoho, kdo knihovnu připraví. Když jsme však zmínili, že největší množství DNA, které můžeme poskytnout, je 5 mikrogramů – a to představuje několik milionů chromozomů! – dostali jsme jednoznačnou odpověď: „Z tak malého množství DNA nikdo nikdy žádnou BAC knihovnu neudělá, to nejde.“ A zase jsme byli na začátku. Museli jsme tedy optimalizovat mnoho dalších kroků a přizpůsobit řadu postupů. Na konci dlouhé cesty byla metodika, díky níž jako jediní na světě umíme tento typ knihovny vytvořit z tak malého množství DNA.

Víc než knihovníci

Vesmír: *Nyní pro konsorcium (a nejen pro ně) připravujete a spravujete BAC knihovny chromozomů pšenice. Co to obnáší? Jak se rozhoduje, kdo kterou část genomu bude číst?*

J. D.: Když jsme před lety prosazovali zmíněný postup – konstruovat fyzické mapy a sekvenovat genom pšenice po menších částech, po chromozomech – málokdo to považoval za reálné. To se však změnilo a teď prožíváme období, kdy všichni mají zájem o DNA z izolovaných chromozomů pšenice, a nejde jim vždy jen o sekvenování, třeba pouze potřebují zjistit polohu určité sekvence DNA v genomu. Přitom jsme tuto aplikaci publikovali před patnácti lety. Máme radost, že jim to „již dochází“. Nejdříve však bylo nut-



Průtokový cytometr a sorter BD FACSVantage SE, který Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie ÚEB využívá pro třídění chromozomů. Snímek © Stanislav Vaněk.

Ze spolupráce se šlechtitelskou stanicí v Hladkých Životicích se vyvinul rozsáhlý program studia genomu kříženců kostřav (*Festuca*) a jílků (*Lolium*), de facto člověkem nově vytvořeného rodu *Festulolium*, který spojuje výhodné vlastnosti obou rodičů. Jejich genomy v jádře hybrida různě interagují a tak je tento systém vhodný pro studium změn hybridních a polyploidních genomů. Ve spolupráci s australskou firmou Diversity Arrays Technology Ltd. olomoucká laboratoř vyvinula DNA čip, pomocí něhož bude možné rychle stanovit, jakou část genomu od kterého z rodičů sledovaný hybrid obsahuje a studovat vztah mezi strukturou genomu a agronomickými vlastnostmi. Tato práce je podporovaná granty NAZV QH71267 a GA ČR 521/07/P479. Na snímku je kříženec kostřavy rákosovité a jílku mnohokvětého © David Kopecký.

né přesvědčit kolegy, aby naši strategii přijali. Na začátku se přidalo jen pár laboratoří. V prvé řadě to byli Francouzi, s nimiž jsme připravili vůbec první BAC knihovny z tříděných chromozomů, a pak Američané, kteří nás přizvali k řešení projektů National Science Foundation a Ministerstva zemědělství USA.

Zlomem bylo získání projektu 7. rámcového programu „Triticeae Genome – KBBE 212019“, kterého se účastní 15 evropských laboratoří a jehož velká část je založena na naší práci. Koordinátorkou projektu je Catherine Feuillet (Institut National de la Recherche Agronomique, Clermont-Ferrand), která jako jedna z prvních klonovala geny u pšenice a naši strategii vždy podporovala. Po krátkém období, kdy jen pomalu přibývali zájemci o jednotlivé chromozomy, si najednou i ostatní uvědomili, že při dalším váhání na ně žádný chromozom nezbude a „nebudou mít vlajku“ na genomu pšenice. S Nory jsme se střetli o chromozom 7D, který jsme si vzali právem prvního, protože knihovny připravujeme, a máme tedy právo si vybrat. Po delší diskusi se nakonec smířili s chromozomem 7B. Japonci nás kontaktovali minulý rok, volný byl ještě chromozom 6B. Australané si zamluvili tři chromozomy, ale nakonec zjistili, že na to nemají peníze, a ponechali si jen 7A. Kdybyste se zeptal, proč budou Němci číst chromozom 6A, nikdo vám to neřekne; chtějí se prostě na prestižním projektu mezinárodního konsorcia podílet a chromozom 6A byl jeden z posledních volných. Nechtěl bych však, aby to vyznělo tak, že se chromozomy rozděluji živelně. I zde má konečné slovo koordinátorka konsorcia Kellye Eversole – a vždy jsme se dohodli. Pro nás je důležité, že jsme pro Českou republiku zajistili účast na prestižním světovém projektu a že máme možnost sekvenovat dokonce tři chromozomy (3D, 4A a 7D). To, jestli se bude naše republika aktivně podílet i na této fázi projektu konsorcia, záleží především na tom, zda se podaří získat finanční podporu.

Pšeničné geny

Vesmír: *Co již víme o genech pšenice seté, o jejich funkci, k čemu nám to může být dobré?*

J. D.: Počet genů diploidních obilovin se odhaduje na 30–40 tisíc, u hexaploidní pšenice předpokládáme asi 120 tisíc genů, někteří autoři odhadují až 160 tisíc. Dosud bylo izolováno deset genů pšenice podmiňujících některé rezistence, vernalizaci (viz článek I. T. Prášila na s. 567) a také gen Q, který souvisí s domestikací pšenice mimo jiné i tím, že ovlivňuje snadné uvolňování zrn z klásků, a tedy snadné vymlácení zrn. Izolovaných genů je zatím málo a vedle složitosti genomu je dalším důvodem to, že mnoho důležitých znaků je založeno kvantitativně a závisí na mnoha genech, které se obtížně identifikují (viz článek L. Kratochvíla na s. 556). Využití izolovaných genů nemusí spočívat jen v genových manipulacích. Šlechtitelům pomůže, když budou moci brzy po vyklíčení pomocí DNA markerů zjistit, ve kterých rostlinkách požadovaný gen je, a pak pěstovat jen ty vybrané.

Studium struktury genomu pšenice je však významné z mnoha dalších důvodů. Dnes je již jasné, že stejně jako u pšenice došlo u většiny druhů rostlin v průběhu evoluce k jedné nebo více epizodám zdvojení počtu chromozomů (polyploidizaci) a často také k mezidruhové hybridizaci. Tyto procesy měly za následek zmnožení genetické informace v buněčném jádře, přičemž některé části rodičovských genomů mohly být jako nadbytečné eliminovány, jiné se mohly díky „nadbytečnosti“ různě modifikovat či diverzifikovat a umožnit, aby vznikly varianty genů podmiňujících nové vlastnosti (viz Vesmír 88, 265, 2009/4). Těmto procesům dosud málo rozumíme a pšenice je pro takto zaměřená studia vhodným modelem. Je to evolučně mladý druh, a můžeme tedy studovat raná stadia vývoje polyploidního a hybridního genomu a snad i odpovědět na otázku, co udělalo z plané trávy pšenici, která stála u kolébky naší civilizace.

Vesmír: *Děkujeme za rozhovor.*

/Za Vesmír se ptal Stanislav Vaněk./

AOPK ČR

Internetové stránky
www.natura2000.cz

poskytují uclené informace o soustavě Natura 2000 v České republice. Natura 2000 je **soustava chráněných území**, kterou vytvářejí na svém území podle jednotných principů státy Evropské unie za účelem ochrany evropsky významných druhů a přírodních stanovišť.

Odborným garantem pro vytvoření soustavy Natura 2000 v České republice je z pověření Ministerstva životního prostředí AOPK ČR, která pro tento účel vytvořila a spravuje internetové stránky www.natura2000.cz.

Na stránkách naleznete:

- obecné informace o soustavě Natura 2000 v České republice a v Evropské unii,
- informace o kritériích pro zařazení lokalit do soustavy, procesu zajištění jejich ochrany a zásadách péče o lokality,
- databázi evropsky významných lokalit (EVL) a ptačích oblastí (PO), které dohromady tvoří soustavu Natura 2000 v ČR a popis fenoménů (druhů a stanovišť), pro které jsou konkrétní EVL a PO vymezovány,
- publikace týkající se Natury 2000 (články, metodické materiály, brožury, knihy, internetové stránky aj.), odkazy na související internetové stránky,
- aktuální informace týkající se změn, hodnocení apod.

Agentura ochrany přírody a krajiny ČR

Nuselská 39, Praha 4, 140 00, telefon 241 082 219, fax 241 082 999, e-mail: aopkcr@nature.cz, www. nature.cz

INZERCE 1323