

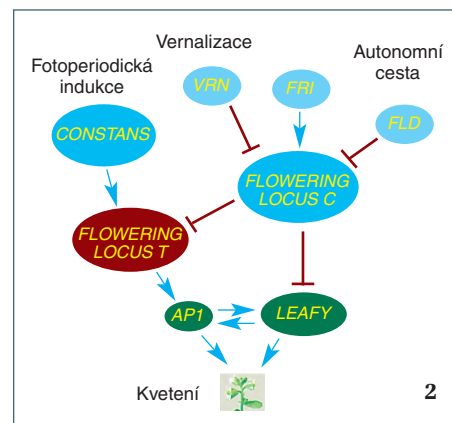
Merlík červený – staronový model pro studium regulace kvetení

Kvetoucí rostliny odjakživa přitahovaly lidskou pozornost, a to i v zimních měsících. Již naši dávní předkové trhali na sv. Barboru větvíčky třešně a těšili se, že na Štědrý den vykvetou. K tomu, aby barborka vykvetla, potřebuje projít před utržením několika chladnými dny, kdy teplota klesne těsně nad bod mrazu. U větvíčky ulomené počátkem listopadu se kvetení nedočkáme. Skryté děje navozující kvetení probouzejí nejen zvědavé otázky. Jsou nanejvýš významné i pro zemědělství, lesnictví i tvorbu krajiny. V minulém ročníku *Živy* vyšel seriál o kvetení (*Živa* 2008, 1: 7–9, 2: 57–60, 3: 100–102, 4: 152–155), který dokumentoval současný stav vědění o tomto důležitém životním pochodu krytosemenných rostlin. V tomto článku bychom rádi ukázali na modelové rostlině merlíku červeném (*Chenopodium rubrum*), jakými nástroji studuje kvetení moderní genetika. Regulace kvetení byla u něj podrobně popsána pomocí klasických metod, avšak její genetické základy zůstávaly zahaleny tajemstvím.

Genetický základ indukce kvetení

Dříve než začneme zkoumat genetické dráhy účastníci se kvetení u druhu, který dosud unikl zájmu molekulárních biologů, je nutno podívat se, jak je tomu u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), nejoblíbenější laboratorní rostliny (*Živa* 2007, 1: 5–7). Právě u něj bylo prokázáno, že klíčovým faktorem kvetení, dlouho hledaným florigenem, je bílkovinný produkt genu *FT* (*FLOWERING LOCUS T*, obr. 2). Tvoří se v listu a odtud putuje do vzrostného vrcholu (*Živa* 2008, 3: 100–102). Zde indukuje expresi genů *LFY* (*LEAFY*) a *AP1* (*APETALA1*), vedoucích k tvorbě květenství a květu. *FT* protein je poměrně malý (tvoří ho asi 180 aminokyselin) a pokud můžeme usuzovat ze sekvencí dosud známých homologních genů u vyšších rostlin, je i vysoce konzervovaný. Homo-

log (gen stejného původu i funkce) *FT* byl nalezen rovněž u rýže, kukuřice, jílku (*Lolium*), povijnice nachové (*Pharbitis nil*), topolu (*Populus*), v podstatě u každé rostliny, kde byl hledán. Transkripci genu *FT*, a tedy i produkci florigenu u huseníčku rolního, aktivuje produkt genu *CO* (*CONSTANS*). Ten zprostředkovává klíčovou informaci o délce dne – je přítomen v dostatečném množství jen za dlouhého dne. Je-li den kratší než určitá kritická mez, protein *CO* je rychle odbouráván. Tím je způsobeno, že huseníček rychle vykvetá za dlouhého dne, tedy za podmínek odpovídajících vrcholnému létu. Je-li den kratší, rostlinka vyčkává, jaké období bude následovat. Na jaře nabírá sílu k bohatému kvetení a hojně produkuje semen v nadcházejícím létě. Je-li podzim, vytváří přizemní listovou růžici, s tou přezimuje



2 Zjednodušené schéma genetické regulace kvetení u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Aktivace je znázorněna modrými šipkami, inhibice červenými úsečkami. Funkce genů je popsána v textu. Orig. H. Štorchová

a vykvetete až příští rok. Pokud by huseníček zastavil růst listů a nasadil na květ např. začátkem listopadu, květy i celou slabou rostlinu by spálil mráz.

Délka dne není zdaleka jediným faktorem, který rozhoduje o tom, kdy rostlina vykveté. Výše zmíněný příklad třešňových větvíček poukázal na význam působení nízké teploty. Ta má vliv i na ozimé ekotypy huseníčku, byť u nich působí v jiném vývojovém bodě dráhy indukce kvetení. Nízké teploty aktivují u huseníčku rolního gen *VRN2*. Jím kódovaný protein inhibuje expresi klíčového genu *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), jehož produkt je silným inhibátorem exprese genu *FT* a tím pádem i kvetení (obr. 2). A protože dvakrát minus dává plus, *FT* je aktivován a huseníček nasadí na květ. Podobných regulačních vztahů vědci postupně objevují celou řadu a z jednoduchého učebnicového schématu se stává pavučina. Zájem badatelů se přesouvá k dalším rostlinným druhům. Je u nich regulace kvetení obdobná?

Rýže, huseníček a merlík

Jakkoli je modelová rostlina huseníček rolní užitečná, ekonomickým významem rýži konkurovat nemůže. Není divu, že zásadní pokusy, které měly objasnit způsob regulace kvetení u krátkodenních rostlin (květoucích za krátkého dne), byly provedeny právě u ní. Centrálními hráči jsou opět homology genů *FT* a *CO*, jenže se bohužel jmenují úplně jinak. Genu *FT* odpovídá *Hd3a* (hd je odvozeno od heading date, čili doba kvetení rýže), genu *CO* zase gen *Hd1*. Je-li den krátký, protein *Hd1* aktivuje gen *Hd3a*.

Jinou krátkodenní rostlinou, která dlouho poutala zájem květních biologů, je merlík červený (*Chenopodium rubrum*). Za určitých podmínek vykvetá již ve stáří pěti dnů, což umožňuje provést mnoho pokusů v krátké době. Žádné geny související

1 Merlík červený (*Chenopodium rubrum*) je vynikající modelovou rostlinou pro studium kvetení. Má však i další pozoruhodné vlastnosti, např. odolnost vůči zasolení. Na obrázku je zachycen čtyřtydenní merlík červený rostoucí v koncentraci 0,15 M NaCl. Foto J. Kolář



Biologie a počítače

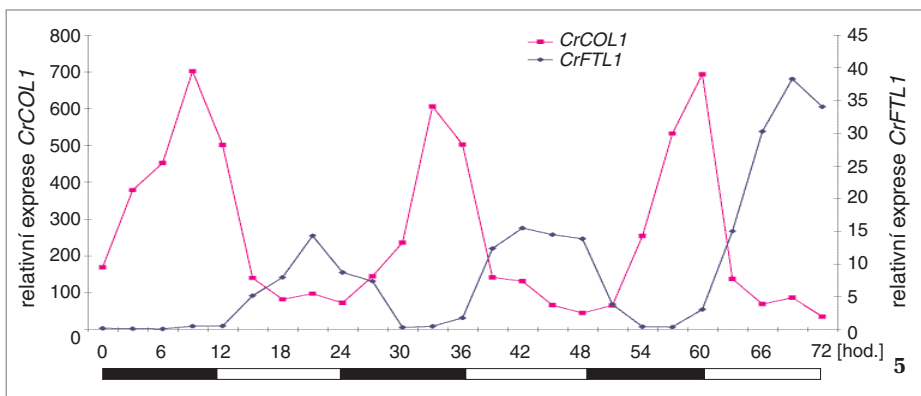
Výše uvedený podrobný popis postupu, jak najít nový gen, velmi dobře ilustruje základní směřování současné molekulární biologie. Těžiště práce se zvolna přesunuje z laboratoře k počítači. Důkladná analýza všech dostupných sekvencí a informací o jejich významu, tj. o možné funkci jednotlivých aminokyselin, o četnosti využívání kodonů pro stejnou aminokyselinu v různých druzích, o roli krátkých regulačních oblastí, to vše snižuje náklady na opakování laboratorních pokusů. Stále více platí – dvakrát měř a jednou řež. Neboli prohledej internet důkladně raději třikrát než jednou, a teprve potom navrhní primer. Z tohoto hlediska musíme konstatovat, že dnešní školní mládež je připravena vstoupit do éry biotechnologií možná lépe, než si učitelé připouštějí. Škola by měla zájmu dětí o počítače využít. (A zahraniční učebnice genetiky jsou plně rozmanitých příkladů.) Pokročilejší studenti mohou stahovat sekvence různých zajímavých genů a srovnávat je pomocí volně dostupných programů, jako je např. BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Základní znalosti bioinformatiky se vzhledem k rozmachu biomedicíny budou hodit nejen budoucím badatelům, ale např. i lékařům.

Genové rodiny

Vratme se však zpět k merlíku a nově nalezeným genům. Jejich sekvence naznačovala blízkou příbuznost *FT* genům jiných rostlin. Vystupují však skutečně v roli florigenu i u merlíku? Výroky o funkci genů musíme u rostlin vážit velmi opatrně. Většina genů má totiž někde v genomu své příbuzné s podobnou sekvencí, ale s odlišnou funkcí. Některé genové rodiny mají tři členy, jiné třeba sto. Vznikly pravděpodobně cestou duplikace ať již malé části anebo celého genomu. Polyploidizace, která vede ke znásobení kompletních genových sádek, je u rostlin velmi častá. Také gen *FT* u huseníčku má své sourozence. Dokonce se tak jmenují – např. *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*), *MFT* (*MOTHER OF FT*) a *BFT* (*BROTHER OF FT*). Jejich funkce je dosud objasněna jen málo. U sestřičky (*TSF*) se prokázalo, že může za jistých okolností gen *FT* částečně nahradit. Mohli bychom ji tedy připodobnit ke dvojčeti spíše dvojvaječnému než jednovaječnému. Při pátrání v genomu neprozkoumané rostliny nám zatím ani nejdokonalší počítačová analýza nezaručí, že jsme našli ten pravý homolog *FT* a ne jeho příbuzného. O funkci genu musíme podat nezvratný důkaz.

Klíčový důkaz

V čem spočívá? Máme dvě možnosti, jak postupovat. Za prvé, můžeme v naší rostlině studovaný gen „vypnout“. Pak sledujeme, zda kvetení probíhá stejně u „vypnutých“ a kontrolních rostlin. Pokud zpozorujeme výrazné opoždění kvetení u „vypnutých“ rostlin, prokážeme tím funkci našeho genu jakožto induktoru kvetení. Druhou možností je přenést sledovaný gen do rostliny, která má mutaci v genu, o němž předpokládáme, že je s naším genem funkčně totožný. V našem případě jde o přenos do huseníčku nesoucího mutaci



v genu *FT* a velmi pozdě kvetoucího. (Pozn.: Možná pozorného čtenáře napadne, jak je možné, že nakonec přece jen vykvete, když nemá florigen. Velmi dobrý postřeh, ale zatím přesně nevíme.) Dojde-li u rostlin transformovaných našim genem k vymizení efektu mutace a časnému kvetení, je zřejmé, že náš gen funkčně nahradil původní mutovaný gen. Bohužel, pokud k nápravě (komplementaci) mutace nedojde, neřekne nám tento typ pokusu vůbec nic. Je totiž možné, že sice máme ten pravý gen s funkcí florigenu, avšak rozdílnost obou rostlinných druhů je tak velká, že znemožňuje správné fungování vneseného genu. U druhů fylogeneticky tak vzdálených, jako je merlík a huseníček, je tato možnost velmi pravděpodobná.

Logická úvaha nás tedy odkazuje k prvnímu typu pokusu. Avšak „vypnout“ jakýkoli gen u merlíku není zatím vůbec snadné. Můžeme použít univerzální metodu RNA interference a umlčet expresi cílového genu pomocí specifické dvouřetězcové RNA. K tomu potřebujeme vnést do merlíku příslušný genový konstrukt. Jistě je to možné, ale zatím merlík transformovat neumíme. Nezbylo nám nic jiného, než se pokusit merlíkovými geny *FT* napravit *ft* mutaci u huseníčku rolního a doufat ve štěstí. Obr. 4 ukazuje, že se pokus zdařil! Některé semenáčky nesoucí merlíkový gen *FTL1* dokonce vykvétaly již ve stáří pěti dnů, sotvaže rozvily dva pravé lístky. Neměli ale pak sílu vytvořit šešule byt jen s jediným semínkem a zahynuly bez potomků. Takto jsme ztratili polovinu transformovaných linií, nicméně ty, co přežily, potvrdily funkci merlíkového genu *FTL1* jako induktoru kvetení.

Překvapení nakonec

Po čtyřech letech pilného snažení jsme se dostali k tomu nejpodstatnějšímu. Jestliže jsou *FT* geny merlíku a huseníčku tak podobné, že se funkčně zastupují, můžeme vůbec očekávat nějaké zvláštnosti v regulaci genu *FT* u merlíku? Jak vůbec funguje vztah ústřední dvojice *CO* a *FT* u této plevelné rostliny? Abychom mohli odpovědět, museli jsme nejprve najít merlíkové homology *CO*. Poté jsme pročetli zprávy o studiích kvetení merlíku ze 60. a 70. let a naplánovali pokusy. Vystavili jsme pětidenní semenáčky různě dlouhé noci, stálému světlu či trvalé tmě. Vždy jsme sledovali, zda rostlinky posléze vykvétou či nikoli. Jednoznačně jsme potvrdili starší závěry, že pro indukci kvetení u merlíku červeného postačí působit jedinou indukční periodou tmy o délce 12 hodin.

5 Průběh exprese genů *FTL1* a *COL1* u merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*) během tří dnů. Den a noc jsou znázorněny bílými nebo černými obdélníky. Orig. D. Cháb

V několikahodinových intervalech jsme odebírali vzorky pro extrakci celkové RNA. V nich jsme měřili množství mRNA odpovídající genům *FTL1* a *CO*. Průběh exprese obou genů při střídání dne a noci o délce 12 hodin, tedy za podmínek navozujících kvetení, je znázorněn na obr. 5. Na první pohled je zřejmé, že maximum exprese jednoho z genů odpovídá minimu exprese druhého. U huseníčku a rýže je za indukčních podmínek maximum exprese *FT* posunuto jen kousek za maximum exprese *CO*. Námí změřený průběh exprese obou genů naznačuje spíše negativní vliv proteinu *CO* na expresi *FT*.

A ještě jedna okolnost je pozoruhodná. Ve všech pokusech jsme za světla naměřili velmi nízké hodnoty mRNA pro gen *CO*. Světlo zřejmě u merlíku inhibuje transkripci tohoto genu. Takto nepůsobí na žádný z dosud popsanych genů *CO*. Radostnému pokřiku a malování nových schémat kvetení však zatím brání nedokončené experimenty s přenosem genů *CO* z merlíku do *co* mutant huseníčku. Dosud si nejsme jisti, zda jsme opravdu našli funkční homology *CO* genů a ne jejich nevlastní bratříčky. Rodina *CO* genů je totiž ještě rozvětvenější a košatější než rodina genů *FT*. Pokusy letos dokončíme a doufáme, že ve studiu kvetení merlíku červeného budeme moci pokračovat. Tento zajímavý druh rozhodně stojí za další zkoumání. Navíc je blízkým příbuzným merlíku čilského (*Ch. quinoa*), plodně jihoamerického And, která umožnila rozkvět říše Inků a nyní je nadějnou plodinou pro zasolené polopouštní oblasti na celém světě. Poznatky o regulaci kvetení merlíku mají proto také velkou praktickou hodnotu.

Studium vývojové biologie rostlin na molekulární úrovni je velmi přitažlivou disciplínou se zřejmým dopadem na zemědělství. Laboratoře Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., jsou otevřeny nové generaci studentů se zájmem o tento krásný obor. Mohou a nás pracovat na magisterských i doktorandských tématech. Článek vychází z výsledků získaných Davidem Chábem v rámci jeho postgraduálního studia.

Studium genetických základů kvetení u merlíku červeného bylo podpořeno grantem Grantové agentury ČR 522/05/300.