

Co prozradilo srovnání genomů a transkriptomů bublinatky. Od populační genetiky k populační genomice 2.

V minulém dílu (Živa 2016, 2: 61–63) jsme načrtli možnosti, které nabízí molekulární biologie pro studium rostlinných genomů. A to i u rostlin získaných v terénu, nepatřících mezi modelové druhy. V druhé části se zaměříme na vodní masožravé bublinatky (*Utricularia*). Prohlédneme si z ptáčích perspektivy první kompletně osekvenovaný genom v tomto rodu, jenž náleží druhu *U. gibba*. Poté nahlédneme podrobněji do zajímavých zákoutí genomické krajiny. Zjistíme třeba, zda si bezkořenné bublinatky uchovaly geny řídící vývoj kořene. Také srovnáme genom *U. gibba* a transkriptom bublinatky obecné (*U. vulgaris*), což nám mimo jiné umožní odhadnout mutační rychlost a tedy i chod molekulárních hodin u bublinatky.

Nejmenší rostlinné genomy

Podívejme se nyní, co vše lze vyčíst z nově osekvenovaného genomu masožravé bezkořenné vodní bublinatky *U. gibba* (obr. 2) a také ze srovnání transkriptomů tohoto druhu a bublinatky obecné (obr. 3–6). Rod *Utricularia* obsahuje stovky popsaných druhů a zřejmě i další dosud nepopsané. Velikost genomů bublinatky se nalézá v rozmezí zhruba od dvojnásobku genomu huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*; délka 125 Mbp – milionů párů bází, velikost haploidního genomu) až po 82 Mbp u *U. gibba*, což představuje jednu z nejmenších hodnot u cévnatých rostlin (Veleva a kol. 2014). Pokud vyjdeme z předpokladu, že v základní sadě mají všechny rostliny včet-

ně *U. gibba* zhruba 30 tisíc genů, můžeme vypočítat, kolik bází připadá na jeden gen prostým vydělením obou čísel. Vyjde asi 2 700 bází, což je dost málo, většina rostlinných genů bývá i s introny (vmezeřenými nekódujícími úseky) delší. A to jsme nenechali nic na junk DNA, tedy nekódující intergenovou DNA, která zpravidla zabírá velkou část genomu. Nedošlo tedy u *U. gibba* přece jen k redukci počtu genů? Analýza úplné sekvence (Ibarra-Laclette a kol. 2013) ukázala, že nikoli. Počet genů této bublinatky 28 494 dokonce přesahuje počet genů huseničky (27 204). Zde musíme poznamenat, že kompletní genomická sekvence ještě neznamená, že známe přesně celkový počet genů. Ten se mění, jak postup-

ně rozpoznáváme nové geny, takže výše uvedené číselné údaje nejsou konečné.

Za miniaturizací genomu *U. gibba* tedy stojí především výrazné zmenšení rozsahu nekódující intergenové DNA. To skutečně nastalo – v genomu byl nalezen jen velice malý počet retrotranspozonů, většinou neúplných. Také průměrná délka genů zůstává nižší, díky kratším intronům a úspornému uspořádání genů částečně přes sebe, jsou-li kódovány v protilehlých řetězcích. Délka genomu *U. gibba* se blíží nejmenší možné velikosti genomu vyšších rostlin. Zjevně existuje velký selekční tlak ve směru jeho maximální redukce.

Mnoho zajímavého ukázala fylogenetická analýza genomu *U. gibba*, která odhalila polyploidizační události v minulosti. Obecně se mnoho polyploidizací u tak malého genomu neočekávalo, a proto se tento výsledek stal možná největším dosavadním překvapením analýzy kompletního genomu rostlin. Po oddělení od předka révy vinné (*Vitis vinifera*) došlo v linii *U. gibba* ke třem následným polyploidizacím, tedy o jednu více než v linii vedoucí k huseničce rolníku! Po každé polyploidizaci proběhla redukce jak počtu genů, tak intergenových oblastí. Co je však příčinou tak výrazného evolučního trendu ke zmenšování genomu až na samou hranici možností? A jak v těchto souvislostech rozumět opakované polyploidizaci? Neměly by se jí bublinatky spíše vyhnout?

Odpovědi zatím neznáme. Leccos napoví životní styl bublinatky, něco odvodíme z detailního pohledu na genomickou krajinu *U. gibba*. Blízká budoucnost jistě přinese nové odpovědi, protože genomický výzkum bublinatky rychle pokračuje a srovnání genomů blízkých příbuzných druhů odhalí klíčové souvislosti. O čem všem můžeme uvažovat?

Již článek v loňském ročníku Živy (2015, 6: 286–289) naznačil možný vztah mezi vysokou rychlostí růstu této vodní bezkořenné rostliny a malým genomem, který může být rychleji replikován. K tomu přistupuje nedostatek živin, především fosforu, nutného pro syntézu kostry DNA složené z cukrů (deoxyribózy) a fosfátových skupin v životním prostředí bublinatky. Kořisti nemusí být vždy dostatek, rostlina občas hladoví a menší požadavek na fosfor při syntéze DNA se jistě hodí.

Další okruh hypotéz je spjat s vysokou mutační rychlostí pozorovanou u bublinatky a dalších masožravých rostlin (Wicke a kol. 2014). Rychlost mutací může souviset s oxidativním stresem, kterému tyto rostliny zatím z nejasného důvodu podléhají. Některé systémy oprav mutačního poškození DNA se zakládají na rekombinaci a mohou vést k delecím, tedy k odstranění úseků DNA. Rozvinutí této myšlenky vyústilo v zajímavé vysvětlení opakovaných polyploidizací v linii *U. gibba* (Carretero-Paulet a kol. 2015). Podle této představy je polyploidizace nejsnazší cestou, jak rychle doplnit životně nutné geny, jež se postupně poztrácely nebo narušily v průběhu opravných či jiných procesů působících na



1 Národní přírodní památka Hrabanovská černava – stanoviště bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*) a rdestu zbarveného (*Potamogeton coloratus*)



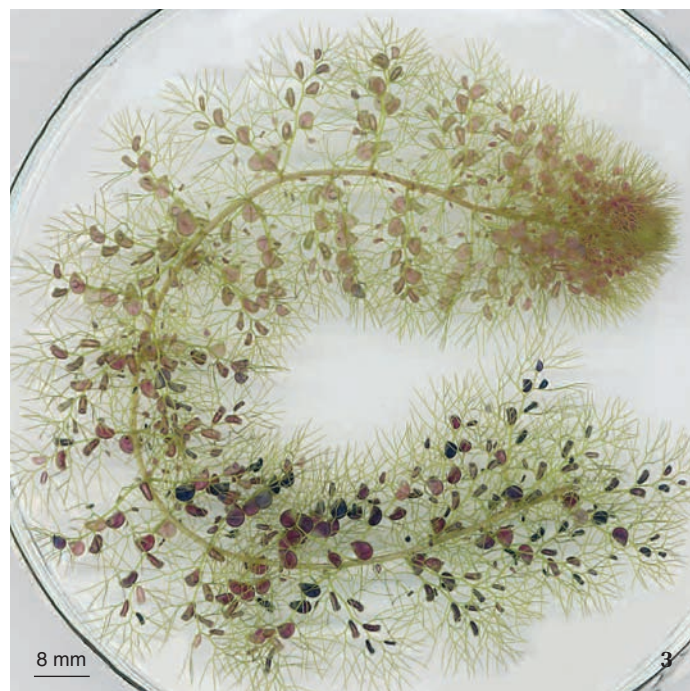
2 Subtropická obojživelná bublinatka *U. gibba* je rozšířena v mělkých mokřadech na všech kontinentech. Má silně redukované listy a vyznačuje se velmi malým genomem, takže se stala oblíbeným modelem zahraničních molekulárních genetiků.

3 Prýt bublinatky obecné nese tisíce pastí. Druh v ČR kriticky ohrožený patří mezi dvě největší vodní bublinatky na světě, spolehlivě se pěstuje ve venkovní nádrži a stal se modelovou rostlinou českých ekofyziologů a transkriptomiků.

úrovni DNA. Polyploidizace by tedy měla být preferována přírodním výběrem právě u linií, u kterých dochází k redukci genomu. Zatím byla tato revoluční hypotéza vyslovena na základě studia jediného genomu – *U. gibba* – a brzy uvidíme, zda ji potvrdí genomické sekvenční dalších druhů.

Zmenšování genomu a polyploidizace – další překvapení v říši rostlin

Představa redukce genomu vyvolávající polyploidizaci jde zdánlivě proti zdravému rozumu. Vždyť naopak ty největší rostlinné genomy (Živa 2015, 1: 4–5) jsou mnohonásobně polyploidní. Nicméně L. Carretero-Paulet se spolupracovníky (2015) nabízejí zajímavé důkazy. Geny *U. gibba* roztrídili podle sekvenční podobnosti do skupin, které zhruba odpovídají genovým rodinám. Genové rodiny se skládají z genů podobné sekvenční, mají též společný fylogenetický původ, někdy sahající k předku všech krytosemenných nebo dokonce suchozemských rostlin. Jak košatěl vývojový strom rostlin, vznikaly řády, čeledi a rody, množilo a rozrůžňovalo se potomstvo původně jediného genu. Tak např. velmi známá rodina transkripčních regulátorů *FT/TFL* (Živa 2008, 3: 100–103) řídí zásadní životní procesy rostlin jako klíčení, zastavení růstu a nástup kvetení. I jména těchto genů jsou rodinná – např. *MOTHER OF FT*, *BROTHER OF FT* či *TWIN SISTER OF FT*. Jejich předkem byl zřejmě gen podobný členu této rodiny u dnešní plavuně vranečku (*Selaginella*). Ne všechny genové rodiny



ale mají tak starodávný původ, některé z nich se objevily a rozrostly až v souvislosti s vývojem druhu nebo rodu. Autoři porovnali genové rodiny *U. gibba* s dalšími plně sekvenovanými druhy rostlin – mimo jiné rajčete (*Solanum lycopersicum*) nebo kejklířky skvrnitě (*Mimulus guttatus*). Zjistili, že genové rodiny *U. gibba* jsou méně početné, častěji tvořené jediným členem, s hojnějším zastoupením rodin specifických pro bublinatku. Tento jev vysvětlili pomocí vyššího obratu (turnover) genů *U. gibba*. Zjednodušeně řečeno, bublinatkové geny častěji zanikaly, ale častěji také vznikaly, např. cestou zdvojení a následného odlišení od původní funkce. Docházelo ke zdvojení jak krátkých úseků nebo jednotlivých genů, tak celých genomů. Právě zdvojení celého genomu v průběhu polyploidizací poskytla dostatek rozmanitého materiálu pro evoluci nových genů, nahrazujících ty ztracené.

Jestliže pouhý pohled na genom *U. gibba* z ptáčích perspektiv vedl k zajímavé hypotéze o souvislosti polyploidizace se zmenšováním genomu, oč více se dovídáme ze studia funkce konkrétních genů bublinatky! Tyto rostliny vedou skutečně podivuhodný život odlišný od ostatních. Vytvářejí plně ponořené prýty, ale také květenství vyčnívající nad vodní hladinu a částečně lákající hmyzí opylovače. Musejí tedy zvládat např. tvorbu a regulaci průduchů, byť je potřebují pouze v určité fázi svého života. Stejně tak je třeba přizpůsobit charakter kutikuly ochraně plně ponořených i plně vynořených orgánů. Rovněž masožravost klade velké nároky. Rostlina dokáže nejen ulovit kořist, ale také vstřebat živiny z jejího těla. Genové vybavení musí odpovídat všem těmto rozmanitým životním nárokům.

Zrod a zánik genů osvětluje evoluci bublinatky

Způsob, jak nahlédnout do funkční mapy genomu bublinatky, nabízí srovnání počtu genů a velikostí rodin v různých funkčních kategoriích *U. gibba* a jiných rostlin. Existuje řada programů pro tzv. anotaci transkriptomu nebo genomu. Ty automaticky

procházejí sekvenční kontigů (potenciálních transkriptů v transkriptomu či kusů chromozomu v genomu), porovnávají je se všemi dostupnými sekvenčními, stanovují předpokládanou hranici kódující sekvenční a přiřazují jim určitou funkci. Rozpoznají např. geny kódující enzymy určitých biochemických drah, odpověď na stres, transkripční faktory různých typů atd. Pokud pozorujeme velkou rozmanitost v tvorbě nějakého orgánu, struktury nebo v průběhu biologického procesu, lze očekávat, že příslušná funkční kategorie bude u bublinatky obsahovat více členů. To se potvrdilo v plném rozsahu (Carretero-Paulet a kol. 2015).

Bublinatka *U. gibba* má např. podstatně rozšířenou rodinu genů umožňujících syntézu velmi dlouhých řetězců mastných kyselin, které se podílejí na tvorbě různých typů kutikuly. Jedenáct genů této rodiny stojí proti 0–4 členům přítomným u jiných krytosemenných. Podobně došlo k velké expanzi několika genových rodin odpovědných za reakci rostliny na chitin, základní složku těl členovců a drobných hlístic – významné kořisti bublinatky. Chitinázy a další obdobné enzymy jsou indukovány u nemasožravých rostlin v reakci na napadení plísněmi. Studium „chitinových“ genů bublinatky předběžně ukazuje evoluční původ biochemických drah zodpovědných za trávení kořisti a vstřebávání živin u bublinatky. Mohly se vyvinout z obranných reakcí při napadení houbami, tedy přítomných u všech cévnatých.

Podívejme se teď na jeden z nejpozoruhodnějších orgánů v říši rostlin – past bublinatky, fungující na základě podtlaku. Předpokládá se, že se vyvinula z listu. Její tvorbu řídí jistě velký počet genů, které se při první analýze ocitly v kategoriích s neznámou funkcí, protože dosavadní anotované databáze (obsahující sekvenční s přiřazenou funkcí) nic konkrétního nenabízejí. První pohled do genomu *U. gibba* však naznačuje zajímavé kandidáty „pastových“ genů. V kategorii vývoj postranních kořenů se objevily tři geny pro tvorbu kořenových meristémů a rozložení kořenových

vlásků. Bublínatka ovšem žádný kořen nemá. Nabízí se lákavá možnost, že v těchto případech došlo k posunu funkce a zmíněné geny se účastní tvorby pastí. Ostatně důležitou součástí pastí tvoří trichomy, které mohly využít genové signální dráhy řídicí tvorbu kořenových vlásků. Byť by základy pastí byly listového původu, malá změna promotorových sekvencí (krátké úseky DNA před začátkem kódující sekvence, které rozhodují, zda gen bude prepisován, a tedy aktivní) mohla zajistit expresi kořenových genů ve vyvíjejících se pastech.

Ztracené kořeny

Bublínatky jako vodní bezkořenné rostliny přijímají živiny členěným povrchem svého ponořeného prýtu a výživové doplňky čerpají z kořisti v pastech. Molekulární detaily tohoto složitého procesu dosud neznáme. Zajímavé informace však již můžeme vyčíst z genomických a transkriptomických sekvencí. Nabízí se základní otázka, co se stalo se stovkami genů řídicích růstu a fungování kořenů u suchozemských rostlin. Výše jsme popsali zajímavý případ tří kořenových genů, které mohly získat novou funkci. Jiný byl osud zhruba 60 genů hrajících klíčovou úlohu v kořenech huseničky rolního, avšak chybějících u *U. gibba* (Ibarra-Laclette a kol. 2013). Tyto geny jsou u suchozemských rostlin důležité např. pro přenos auxinového signálu (*PIN2*) nebo řídí tvorbu Caspariho proužků (představujících bariéru pro vstup látek mezibuněčným prostorem) v endodermis, kontrolují růst kořenových vlásků a kořenové čepičky. V genomu *U. gibba* po nich nezůstala žádná stopa. Zatím není k dispozici kompletní sekvence genomu jiného druhu bublínatky, která by objasnila, kdy k této mnohčetné ztrátě kořenových genů došlo, zda postupně, naráz, anebo odlišně v různých vývojových liniích rodu *Utricularia*.

Tuto otázku (kromě řady jiných) jsme se rozhodli řešit s kolegy z Botanického ústavu AV ČR, v. v. i., v Třeboni (Lubomír Adamec) a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (Jaroslav Vrba se spolupracovníky) v rámci společného projektu Grantové agentury ČR. Sestavili jsme transkriptom bublínatky obecné, vzdálenější příbuzné druhu *U. gibba*, a hledali v něm kořenové geny. Jejich seznam jsme vytvořili shromážděním údajů o genové expresi získaných z veřejných databází. Hlavním kritériem byla výlučná či převažující exprese v kořeni a alespoň rámcově známá funkce.

Prohlédli jsme více než 300 genů s prokázanou nebo předpokládanou funkcí ve vývoji kořene a zjistili jsme, že ty „kořenové“ geny, které scházejí u *U. gibba*, nejsou přítomné ani u bublínatce obecné a obráceně. Dokonalou shodu v chybějících genech nelze vysvětlit jen neúplnou informací transkriptomu, musíme rovněž předpokládat jejich absenci v genomu b. obecné. Naopak nález některých jiných „kořenových“ genů v transkriptomu tohoto druhu svědčí jednoznačně o jejich přítomnosti v genomu. Mohli jsme tedy uzavřít, že k mnohačetné ztrátě kořenových genů došlo u společného předka obou bublínatek, zřejmě nedlouho po vzniku rodu a patrně v souvislosti s přechodem na vodní způsob života (Bárta a kol. 2015). Další genomy a transkriptomy



bublínatek řečnou o této fascinující změně životního stylu jistě více. Vždyť takto zkoumáme jev podobný evoluci delfínů a velryb! Sekvence kořenových genů hrají stejnou roli jako fosilie koster končetin u předků kytovců a dlouhé řady sekvencí jsou geologickými vrstvami genomické krajiny. Jen místo kladívka používáme klávesnici.

Závěr

Nahlédnutí do genomu přináší obecné poznatky, objasňuje dynamiku evoluce genů a celých genových rodin. Současně však genomická informace obsahuje nepřehledné množství specifických údajů, vztahujících se ke konkrétním genům, jedinečným funkcím nebo biologickým procesům. Proto je nutné zveřejnit genomické nebo transkriptomické sekvence na webových stránkách a umožnit dalším badatelům, aby si v datech našli poznatky, o které mají zájem. Transkriptom bublínatky obecné najdete na stránce <http://utricularia.prf.jcu.cz/>, včetně transkriptů mikroorganismů, které s touto rostlinou koexistují.

Co zajímavého jsme ještě našli? Všimli jsme si např. extrémně vysoké úrovně alternativního sestihu transkriptů genu pro sfingosin-1-fosfát lyázu. Našli jsme přes 400 různých dlouhých transkriptů, které měly rozmanitě zkombinované exony a nevystřížené introny. Tento postup rostlina používá, chce-li účinně a rychle regulovat expresi důležitých genů. Sfingosin je poněkud záhadná molekula, mnoho o jeho roli v rostlině nevíme. Vyskytuje se ve sfingolipidech v některých typech membrán. Sfingosin-1-fosfát byl rozpoznán jako regulátor zavírání průduchů prostřednictvím iontových kanálků u huseničky rolního. Proč však bublínatka produkuje tolik typů transkriptů pro enzym lyázu štěpící sfingosin-1-fosfát, a tak řídicích jeho hladinu v ponořených prýtech, které žádné průduchy nemají? Zde již má volné pole fantazie, která si může představit vliv této molekuly třeba na udržování podtlaku v pastech. A zbývá vymyslet a provést fyziologický pokus, který tuto hypotézu otestuje. Můžeme kupř. aplikovat různé koncentrace sfingosinu-1-fosfátu na pasti bublínatky a pomocí citlivé kamery sledovat, zda bude ovlivněno otvírání pastí.

Genomických krajín přibývá a procházka kteroukoli z nich obohatí každého botanika. Stačí si vybrat rostlinný druh a proklikat se k vlastní otázce, vyřešit další záhadu.

Studium transkriptomu bublínatky obecné bylo podpořeno Grantovou agenturou Čes-



4 Turiony, dormantní přezimovací pupeny, bublínatky obecné mohou být dlouhé až 2,5 cm.

5 Květenství b. obecné – dolní cíp koruny je typicky prohnut jako koňské sedlo. Květní stopka má překvapivě průduchy. Venkovní kultura v Botanickém ústavu AV ČR, v. v. i., v Třeboni

6 Bublínatka obecná vyrůstající na jaře z turionu. Tyto pupeny obsahují chlorofyl, a vyrůstající rostliny tak mohou od samého začátku růstu fotosyntetizovat. Listy turionů nenesou pasti.

7 Slatiniště Karštejn na Třeboňsku – tůňka s bublínatkou jižní (*U. australis*) a aldrovandkou měchýřkatou (*Aldrovanda vesiculosa*). Snímky L. Adamce

ké republiky (P504/11/0783), za spolupráce Botanického ústavu AV ČR, v. v. i., Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Použitá literatura uvedena na webu Živý.