

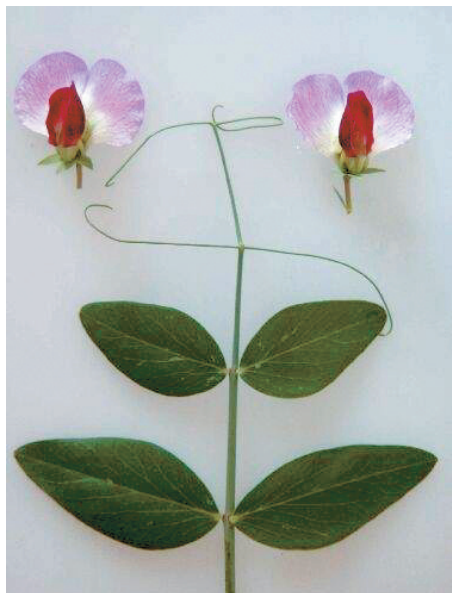
Hrách v genomickém věku — 140 let od Mendelova objevu

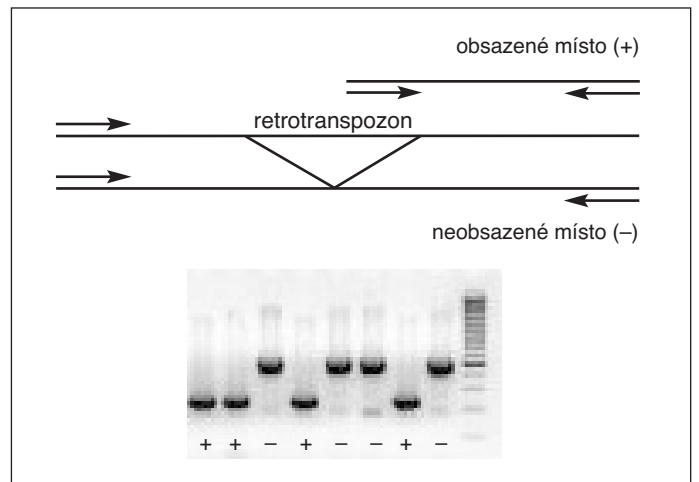
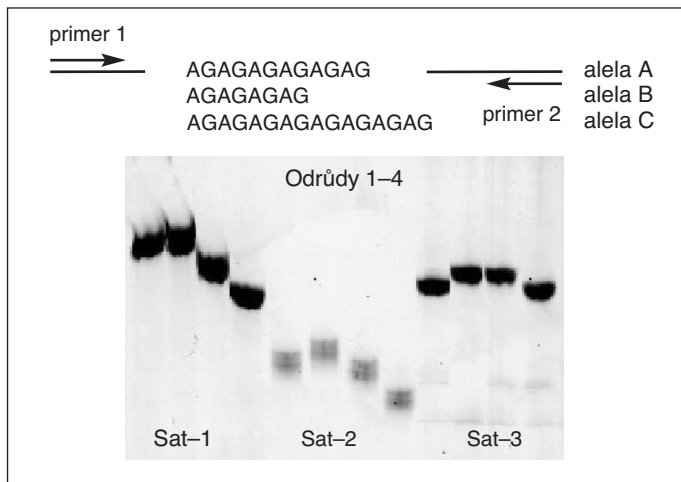
Petr Smýkal

Před 140 lety (1866) byly publikovány výsledky pokusů J. Gregora Mendela (1822–1884), opata brněnského augustiánského kláštera, které zásadně změnilo náš pohled na problematiku dědičnosti a biologie samotné. Mendelovy objevy se staly základem nového vědního odvětví, pro něž v r. 1905 W. Bateson navrhl termín genetika. V době zahájení svých experimentů pracoval Mendel s různými rostlinnými druhy, z nichž se nejčastěji zmiňují ječmálky (*Hieracium* sp.), šlo však i o další druhy okrasných a hospodářských rostlin. Po počátečním hledání vhodného experimentálního materiálu se velmi šťastně rozhodl pro hrách setý (*Pisum sativum*) jako hlavní pokusný model. I když není znám Mendelův myšlenkový postup při výběru hrachu, důvodů bylo několik. Především hledal a potřeboval druh s trvale odlišnými hodnotitelnými znaky. Dále potřeboval rostlinu, která dovoluje chránit oplozený květ před působením cizího pylu, vzniklé hybridy navíc netrpí poruchami plodnosti v následujících generacích. Hrách setý jako samosprašná rostlina poskytoval již v Mendelově době dostatek odrůd s výrazně odlišnými znaky tvaru semene a lusku, barvy květu a výšky. Právě pokusy na hrachu umožnily Mendelovi objevit základní principy dědičnosti.

Podívejme se však, jak vypadá genetika hrachu v době rozmachu molekulární biologie a genomiky. Až donedávna se zdálo, že hrách jako genetický model bude zcela zapomenut, neboť další generace genetiků se zaměřily na jiné modelové rostliny, např. kukuřici (B. McClintock v 50. letech), rýži či kultovní rostlinu současných molekulárních biologů — huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*, v r. 2001 první kompletně sekvenovaný genom rostlin). Z pohledu genomiky představuje podstatnou překážku rozsáhlý genom hrachu (5×10^9 párů bází DNA — bp). Protože jsou však luskoviny (tedy celá čel. bobovitých — *Fabaceae*) z praktického i experimentálního hlediska velmi zajímavé kvůli fenoménu symbiotické fixace vzdušného dusíku, byly postupně nalezeny nové modely vhodnější pro experimentování. Takto vstoupil do hry štirovník japonský (*Lotus japonicus*) a vojtěška *Medicago truncatula*, jejichž genom je 10× menší než u hrachu (5×10^8 bp). Tyto druhy byly vybrány jako modelové luskoviny pro sekvenování jejich kompletní genetické informace. Jsou samozřejmě nejen objektem genomiky, ale i dalších metod studujících genovou expresi, jako je transkriptomika či proteomika. Mutanti nezbytní pro ověření funkce sekvenovaných genů jsou získáváni nejčastěji pomocí transgenního přístupu, což umožňuje postupy tzv. reverzní genetiky (jde o opačný proces, kdy se postupuje metodami molekulární biologie a genetiky, od identifikace genu postiženého mutací, ke znaku, který je ovlivněn). Pozornost je věnována samozřejmě i komerčně úspěšné sóji, v tomto případě však vstupuje opět do hry velikost genomu a skutečnost, že jde o polyploidní druh (tj. s pomnoženým genomem, kdy se veškeré geny vyskytují v několika kopiích),

V horní řadě rodičovské komponenty křížení bělokvětého listového typu hrachu setého (*Pisum sativum*) s fialovým bezlistým typem. Po zkřížení dojde ke vzniku F1 kříženců (všichni jedinci F1 generace jsou shodní) s převládajícími dominantními znaky (v tomto případě by výsledkem byl fialovokvětý listový hrách) ♦ Dole F2 generace — rekombinace vlastností rodičů. Po samoopylení F1 jedince dochází v následující generaci k volné kombinaci a štěpení nezávislých znaků. Na obrázku jsou vidět tři vybrané kombinace F2 generace. Snímky R. Dostálové





Princip detekce mikrosatelitní repetitivní DNA sekvence. Mikrosatelitní repetice jednoduchého motivu (zde di-nukleotidu AG) je vložena v genomové DNA. Nejčastěji se tyto repetice vyskytují v nekódujících oblastech, kde nejsou na rozdíl od sekvencí kódujících protein, tedy funkci, vystaveny tak vysokému selektivnímu tlaku. Díky tomu jsou možné častější změny (mutacemi, chybami při replikaci DNA) projevující se v prodloužení či zkrácení repetice. S využitím primerů 1 a 2 (krátkých úseků jednovláčkové DNA) nacházejících se vně této repetice a potřebných pro zahájení polymerázové řetězové reakce (PCR) dochází k namnožení daného úseku DNA. Po elektroforetickém rozdělení produktů PCR reakce na gelu je možné odečtení konkrétní délky dané alely (např. A, B, C) sledovaných vzorků (odřůdy 1–4). Analýzou několika nezávislých mikrosatelitních míst (Sat-1, 2, 3) je možné studovat např. genetickou příbuznost daných jedinců, populací apod.

což komplikuje fyzické mapování genů (stanovení jejich polohy na chromozomu).

O významu hrachu a dalších luskovin mírného pásu svědčí i přístup Evropské unie, která přijala v r. 2004 Luskovinový integrovaný projekt (Grain Legumes Integrated Project), který je zahrnut do 6. rámcového programu výzkumu EU. Mimo politické aspekty (konkurenceschopnost a menší závislost na dovozové sóji) rozhodly i aspekty praktické, jako je potřeba většího pěstování luskovin z důvodů lepší péče o ornou půdu, změny osevních postupů a orientace na tzv. proteinové plodiny (na rozdíl od obilovin obsahujících především zásobní škrob je semeno luskovin složeno jen z embrya a tedy proteinů), ať již pro potřeby lidské výživy či krmení zvířat. O významu hrachu svědčí i skutečnost, že podobně jako u mnohem rozšířenější kukuřice nebo rýže vychází několik mezinárodních periodik věnovaných jen genetice rodu *Pisum*.

Srovnávací genomika luskovin

Přestože je hrách objektem genetických studií již půldruhého století, překvapivě málo víme o struktuře jeho genomu, a to jak o karyotypu, tak i o genetické informaci jednotlivých chromozomů. Příčinou je především již zmíněná složitost genomu. Avšak právě tato komplexita poskytuje na druhé straně možnost studia architektury genomu, pro fyziologické a biochemické analýzy je výhodou dostatečná velikost rostliny.

Karyotyp hrachu tvoří 7 párů chromozomů ($2n = 14$). Jaderný genom obsahuje

přibližně 5×10^9 párů bází DNA. Toto množství převyšuje několikanásobně rozsah genomu již sekvenovaných rostlin, jako je huseníček (10^8 párů bází) či rýže a je srovnatelný s genomem člověka. Velikost genomu hrachu je způsobena zastoupením velkého množství opakujících se (repetitivních) sekvencí. Právě pro vysoký obsah těchto repetitivních sekvencí byly nakonec vybrány pro sekvenování zmíněné bobovité rostliny. Přčtení jejich genetické informace však bude mít bezprostřední význam i pro studium genomu hrachu. Podobně jako v případě huseníčku, řepky či rýže a ostatních obilovin bude možno využít značnou evoluční konzervovanost sekvencí příbuzných druhů a fyzickou posloupnost organizace celých genomových úseků. Díky existenci podrobných genetických a cytogenetických map tak bude možné postupně porovnat jednotlivé úseky genomu a časem snad i jednotlivé geny evolučně blízkých druhů, např. hrachu, bobu či čočky. Již od dob Mendela existují sbírky hrachu obsahující rozličné morfologicky odlišné mutanty s odlišnou strukturou listů, úponků či schopností tvořit hlízky s bakteriemi fixujícími dusík. Přiřazení těchto mutantů k již charakterizovaným mutantům obou sekvenovaných druhů luštěnin může napomoci i k mapování genomu hrachu.

Repetitivní DNA

Podívejme se nyní blíže na stavbu repetitivních sekvencí, na něž je genom hrachu tak bohatý. Tyto sekvence byly objeveny před 40 lety na základě studia kinetiky reasociace denaturované DNA (tedy zpětného párování, vyhledání identických úseků DNA po jejím naštěpení, fragmentaci, denaturaci v roztoku — úseky často se opakující a častěji zastoupené se vyhledají rychleji než úseky jedinečné nebo zastoupené malým počtem kopií). Teprve v poslední době poodhalujeme neobyčejnou strukturu a funkční různorodost těchto sekvencí. Pozoruhodnými repetitivy jsou transpozony, zvláštní genetické sekvence popsané poprvé před 60 lety u kukuřice, které se vyznačují specifickým způsobem přemísťování v genomu. Čtenář se v této souvislosti mohl setkat s termínem „skákájící DNA“. Specifickým typem jsou retrotranspozony. Na rozdíl od klasických transpozonů pohybujících se mechanismem „vyjmutí a následného vložení“ do jiného místa genomu se retrotranspozony mohou početně množit. Nejprve se totiž přepisují do molekul RNA a teprve pak zpětně (tzv. reverzní

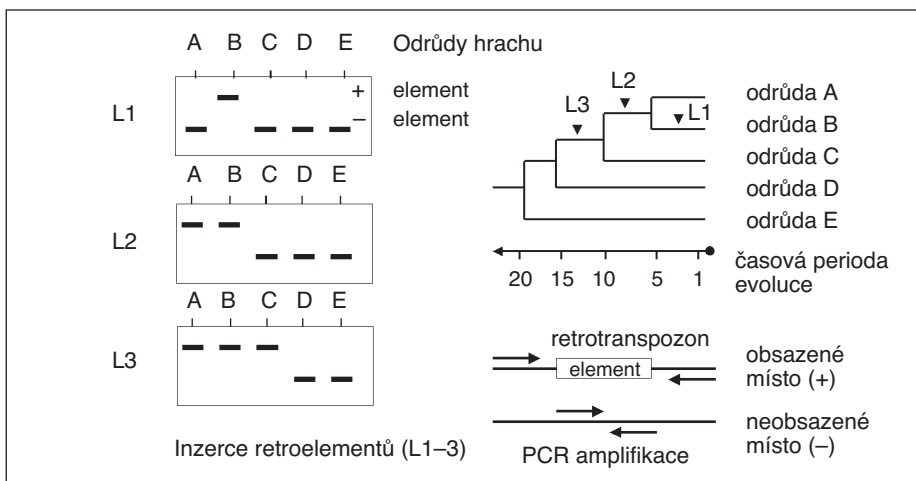
Princip RBIP (Retrotransposon-Based Insertional Polymorphism) metodiky detekce inzerce retrotranspozonu. Vložením konkrétní sekvence DNA — retrotranspozonu — do genomové DNA vzniká na daném místě tzv. obsazené místo (+). Evolučně původnější je místo postrádající danou inzerci — neobsazené místo (-). S použitím protilehlých primerů, homologních k dané oblasti DNA, dochází během polymerázové řetězové reakce k namnožení fragmentu odpovídající oblasti. Elektroforetické rozdělení produktů reakce na agarózovém gelu ukazuje délkový rozdíl mezi dvěma možnými stavy (neobsazené místo 500 párů bází, obsazené 200 bp). Blíže v textu

přepis, odtud název retroelementy) do molekul DNA. Kopie retroelementu se vkládají na nová místa v genomu, přičemž původní mateřský element zůstává na původním místě. Vznikají tak stovky a tisíce nových kopií, které postupně kolonizují genom. Samozřejmě vyvstává otázka, zda tyto sekvence nemohou zvětšovat genom do nekonečna (blíže také Živa 2000, 4: 149–152, Vesmír 2006, 8).

Retroelementy se vyskytují u všech dosud studovaných organismů. Jsou rozděleny podle organizace, struktury a pořadí genů, které kódují. U hrachu bylo dosud popsáno nejméně 30 rodin retroelementů typu *Ty1-copia* s počtem 30 až 3 000 kopií na genom. Celkově se odhaduje, že představují kolem 5 % z celého genomu. Druhá skupina *Ty3-gypsy* je ještě početnější, odhadem tvoří až 30 % genomu. Připočteme-li ostatní typy repetitivní DNA, dostaneme se k hodnotám kolem 50–60 % genomu. Přibližně polovinu genomu hrachu tedy představují tyto „nepotřebné“ opakující se sekvence. Uvozovky u slova nepotřebný jsou zcela na místě, neboť teprve začínáme chápat, jakou roli hrají tyto sekvence v evoluci a v regulaci genové exprese u všech organismů člověka nevyjímaje (viz Vesmír 2006, 7 a 8).

Mohly tyto sekvence ovlivnit práci J. G. Mendela? Samozřejmě, že ano. Můžeme být jen rádi, že si Mendel vybral za hlavní objekt svého studia právě hrách. Problémy by nastoupily nejen u cizosprašného druhu, jako jsou např. bob (*Vicia*) či fazol (*Phaseolus*), polyploidního či apomiktického druhu (jako byl Mendelův jeřábík), ale také u rostlin oplývajícími aktivními mobilními elementy DNA (např. kukuřice). Čtenář si jistě dovede představit situaci, kdy se transpozon vloží do kódující oblasti genu a následně dojde k jejímu přerušení. Jeden ze znaků sledovaných Mendelem — sra-

Princip stanovení genetické příbuznosti pomocí RBIP systému. Sledujeme-li několik nezávislých inzercí retrotranspononu (zde L1–3) u studovaného souboru jedinců, genotypů, odrůd hrachu (A–E), je možné odvodit jejich genetickou příbuznost (např. ve formě dendrogramu). Evolučně původnější je neobsazené (–) místo postrádající danou inzerci retrotranspononu ve studovaném genomu. Vložení retrotranspononu v místě L3 je společné odrůdám A, B, C, předchází tedy vložení retrotranspononu v místě L2, které je společné jen odrůdám A, B. Evolučně nejmladší je inzerce L1 vyskytující se pouze v odrůdě B. Studium několika desítek takovýchto míst je možné poměrně přesně usuzovat na genetickou příbuznost a fylogenetické vztahy daného souboru či populace. Všechny orig. P. Smýkala



tělost semen hrachu, typická pro sladké zahradní dřevňové hrachy, je způsobena přítomností transpononu v genu kódujícím enzym odpovědný za řetězení cukrů do molekul škrobu. Inaktivací tohoto genu se v semeni nehromadí škrob, ale zůstává zde volný a tudíž sladký cukr.

Studium genetické diverzity hrachu

Rod hrách zahrnuje kromě hrachu setého i dodnes planě rostoucí příbuzné druhy či poddruhy, jako je *Pisum abyssinicum*, *P. elatius*, *P. fulvum*, *P. hum* a další. Všechny druhy jsou diploidní ($2n = 14$), jednoleté a pocházejí z oblasti Středomoří a Blízkého východu, kolébky starověkých civilizací a jednoho z hlavních domestikčních center. Hrách se zde dodnes vyskytuje na rozmanitých stanovištích, což vedlo ke vzniku různých forem a posléze primitivních odrůd.

Následným cíleným výběrem bylo novodobě vyšlechtěno množství původně krajo- východních odrůd až současných moderních odrůd. Odlišují se jak ve snadno hodnotitelných hospodářských a morfologických znacích, tak i v dalších znacích, jako je odolnost k chorobám, škůdcům či ostatním stresovým faktorům (Živa 2005, 5: 208–209). Pro šlechtění na všechny tyto vlastnosti je jako u ostatních kulturních plodin nesmírně důležitá existence tzv. genových bank. Zde jsou shromažďovány, vyhodnocovány a skladovány položky daného druhu od planých forem až po moderní odrůdy.

V současné době se stal nanejvýš potřebným trendem přechod od pouhého hromadění položek k jejich aktivnímu využití podmíněnému podrobným studiem. Jde nejen o hodnocení v polních či laboratorních podmínkách, ale také o využití poznatků genetiky a především pak genomiky. Odhaduje se, že celosvětově genové banky obsahují přibližně 7 milionů položek různých druhů (!). Je tedy velmi pravděpodobné, že mnohé položky jsou zastoupeny vícenásobně a naopak mnoho jich stále chybí či jsou nedostatečně. Proto se v rámci zmíněného evropského projektu buduje i reprezentativní sbírka hrachu, která bude obsahovat přibližně 6 000 položek, a uvažuje se i o sbírce celosvětové.

V České republice jsme plnocosnými následovníky Mendelova díla. Již od 60. let 20. stol. byla v Ústavu technických plodin a luskovin budována kolekce původních, krajových a současných odrůd světového sortimentu hrachu čítající v současnosti kolem 1 500 položek. V této činnosti dnes pokračuje firma Agritec v Šumperku. Zhruba

stejný počet položek obsahuje doplňková kolekce zahradních dřevňových hrachů spravovaná genovou bankou v Olomouci. Z hlediska potřeb praktického šlechtění musíme znát co nejpodrobněji vlastnosti jednotlivých rodičů daného křížení. Těžko očekávat, že zkřížením dvou blízkce příbuzných odrůd vznikne odrůda mající zcela nové vlastnosti. I když u převážné většiny kulturních plodin byl postupně vypracován podrobný systém hodnocení viditelných morfologických znaků, ani systém 41 popisných znaků u hrachu není schopen plně zachytit genetickou diverzitu tohoto druhu.

Zde vstupuje do hry bouřlivě se rozvíjející molekulární biologie a genomika. Vzhledem k nedostatku informací o sekvencích nejsme ve většině případů dosud schopni sledovat variabilitu přímo na úrovni oblastí DNA kódujících určitou funkci, čili genů. Proto používáme pro hodnocení variability rozsáhlé rodiny repetitivní DNA. V tomto směru jsou atraktivní právě retrotransponony, a to pro vysoký počet jejich kopií ve studovaném genomu. Důležité je, že tzv. mateřský element zůstává (na rozdíl od klasického transpononu) na původním místě a tvoří tak stálou „značku“ předávanou dalším generacím. Právě tato skutečnost povyšuje retrotransponony nad všechny ostatní používané molekulární markery (markery). Známe-li sekvenci ohraničující daný element pro navrzení primerů použitých v následné PCR detekci (metoda polymerázové řetězové reakce je dnes základním nástrojem molekulární biologie, umožňuje v podstatě neomezené namnožení vybraného úseku DNA ve zkumavce a následné zviditelnění vzniklého produktu), a takto prostudujeme několik desítek jednotlivých inzercí, dostáváme výsledné soubor hodnot v binárním kódu přirovnatelné k čárovému kódu, který charakterizuje daného jedince, odrůdu.

Tento systém byl doveden k dokonalosti využitím techniky tzv. DNA čipů (viz obr. a také Živa 2005, 3: 98–99). Pomocí DNA čipů byla studována evoluční fylogenetická příbuznost původních druhů, forem a odrůd hrachu (viz obr.). Na našem pracovišti studujeme tímto způsobem genetikou příbuznost odrůd hrachu s důrazem na rozsáhlý materiál českého a slovenského původu, reprezentující výsledky šlechtění během posledních přibližně 90 let. Retrotranspononové markery společně s mikrosatelitními sekvencemi (dalšími představiteli repetitivní DNA) umožňují postihnout např. časově se měnící šlechtitelské trendy, zabývat se otázkami genetické sta-

bility odrůd nebo naopak působením genetického posunu (driftu).

Výhled do blízké budoucnosti šlechtění hrachu

Informace o genetické příbuznosti, resp. vzdálenosti jsou důležitým vodítkem pro šlechtitele (např. při výběru rodičů pro křížení či přesnou identifikaci a právní ochranu odrůd). Není však možné spokojit se jen s jejím odhadem, založeným na repetitivních sekvencích, které jsou evolučně jinak selektovány než kódující sekvence. Nutné jsou informace o sekvencích konkrétních genů zabezpečujících tvorbu zásobních proteinů, odolnost k chorobám, škůdcům apod. V tomto případě budeme moci brzy využít údaje o sekvencích těchto genů u příbuzných rodů — stírovníku a vojtěšky. Musíme však zdůraznit, že prostým sekvencováním genomu práce nekončí, ale naopak spíše začíná.

Následně je totiž zapotřebí přiřadit danému genu jím kódovanou funkci. Můžeme využít např. mutanty (v nichž je gen nefunkční nebo je jeho funkce modifikována — inzercí, delecí či záměnou nukleotidové báze), nebo pečlivým pozorováním a popisem projevu (fenotypu) odpovídajícího dané alele příslušného genu. A zde je prostor pro uplatnění dlouhodobě studovaných mutantů, variant či odrůd hrachu s odlišnými vlastnostmi. Bude-li mít šlechtitel k dispozici jakýsi katalog přiřazující konkrétní alele daného genu určitý projev, bude možné lépe navrhnout žádoucí cílovou kombinaci potřebných alel.

Z uvedeného je zřejmé, že genetika a potažmo moderní genomika není samoúčelná a někdy i drahá věda odtržená od reality, ale naopak disciplína umožňující vybírat žádoucí vlastnosti hospodářsky významných organismů. V žádném případě však nebude možné odvrhnout klasické polní testování plodin a nahradit je „jednoduchým a rychlým testem na úrovni DNA“, jak o tom sní či je přesvědčeno mnoho současných praktických šlechtitelů. Testování kvalit určitého genotypu pomocí někdy až mytizovaných DNA markerů bude sice praktickým a především přesným a rychlým pomocníkem, bez vzájemného kombinování genomických a fenotypických informací se ale neobejdeme.

Uvedená problematika je řešena s podporou Výzkumného záměru MSM 2678424601, poskytnutého MŠMT ČR pracovišti Agritec Plant Research s.r.o. v Šumperku.