

tvary, pozoruhodnou symetrií a povrchem buněk. Učebnicovým příkladem je skupina s příznačným českým názvem krásivky (též Živa 2004, 1: 12-14). Krásné jsou nejen buněčné tvary a povrch buněk, ale i chloroplasty nacházející se uvnitř a jejich struktura (obr. 3).

Neméně krásy, která se ovšem ukáže až při bližším průzkumu, v sobě ukrývají na první pohled uniformní „zelené kuličky“ ze skupiny *Chlorococcales*. Mezi ně patří i řasa s latinským názvem *Dictyochloropsis*, která se vyznačuje poměrně velkými rozměry buněk, dosahujícími v průměru až 50 μm. Buňky tohoto organismu jsem opakovaně našel na vrchu Boreč v Českém středohoří, který je proslulý svými ventaroly, tj. místy s vývěry teplého a vlhkého vzduchu v zimním období. Jednobuněčné řasy kulovitého tvaru se složitě utvářeným chloroplastem zde rostou ukryty ve stélkách mechů a na povrchu kamenů ve ventarolech a jejich nejbližším okolí. Již první

konfokální snímky odhalily nečekaně bohatou strukturu chloroplastu s mnoha síťovitě spojenými laloky. Po několika opakovaných studiích již bylo možné načrtnout celou změnu tvaru chloroplastu od mladých buněk až po dospělé, dělicí se buňky. Ze seriálních optických řezů živými buňkami bylo posléze možno vytvořit trojrozměrné rekonstrukce chloroplastů v různých stádiích životního cyklu (obr. 4).

Konfokální mikroskopie: ideální nástroj pro studium řas

S nástupem konfokální mikroskopie výrazně narůstají možnosti studia složitých chloroplastů řas, které dosud stály stranou zájmu algologů. Pomocí této metody lze nejen detailně postihnout změny chloroplastu během životního cyklu mnoha druhů či studovat rozsáhlé přestavby chloroplastu před buněčným dělením, ale také zkoumat vliv různých abiotických faktorů (jako např.

intenzity světla) na trojrozměrné uspořádání laloků chloroplastů.

Rozdíl mezi uniformním tvarem chloroplastů všech vyšších rostlin a velkou variabilitou tvarů chloroplastů mnohých zelených řas je až zarážející. Zdá se, jako by jednobuněčné řasy projevovaly svou druhovou variabilitu právě ve struktuře chloroplastů, kdežto mnohobuněčné vyšší rostliny již vytvářejí pouze morfologicky velmi jednoduché a uniformní chloroplasty „fádního“ tvaru. Také vláknité řasy většinou ve svých buňkách obsahují chloroplasty jednodušších tvarů. Zelené řasy se složitější stavbou stélky, jako např. parožnatky (chary), pak ve svých buňkách hostí tvarově stejně uniformní chloroplasty jako vyšší rostliny. Je tedy možné vyslovit hypotézu, že zatímco vyšší rostliny projevují tvarovou rozmanitost na úrovni listů, květů a jiných orgánů, autotrofní organismy, kterým se v evoluci nepodařilo „vynalézt“ mnohobuněčnost, si touhu po individualitě uspokojují poněkud jinak.

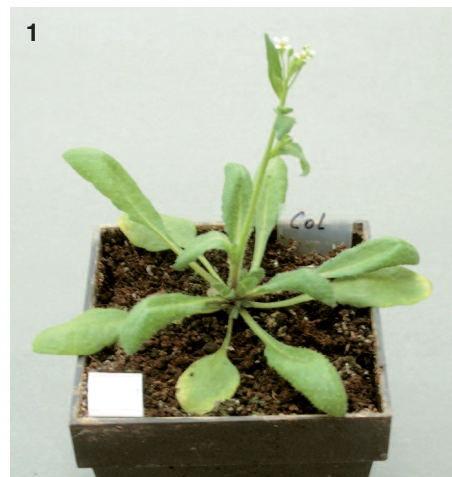
Huseniček rolní a současný výzkum rostlinného genomu

Jana Řepková

Huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*) z čel. brukvovitých (*Brassicaceae*) je významným modelovým objektem pro molekulární genetiku rostlin. Velikost genomu tohoto druhu, nejmenšího genomu v rostlinné říši, byla rozhodujícím důvodem pro získání první kompletní sekvence rostlinné DNA a zahájení systematické funkční analýzy jednotlivých genů.

Dvouděložná rostlina huseniček rolní je malá a nenápadná jednoletá bylina (obr. 1), kterou v 16. stol. poprvé popsal Němec Johannes Thal. Tehdy ji nazval *Pilosella siliquosa*. Až v r. 1842 byl přijat její dnešní název *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Můžeme se s ní běžně setkat v přírodě a její populace se vyskytují na celé severní polokouli v Evropě, Asii a Africe, byla nalezena také v Severní Americe a Austrálii, kam byla pravděpodobně zavlečena z Evropy.

Z jakého důvodu získala tato rostlina zcela výsadní postavení v genetice a především v molekulární genetice rostlin? Je to proto, že splňuje všechny podmínky modelového organismu. K těm patří snadná kultivace v laboratorních podmínkách i v podmínkách *in vitro* a prostorová nenáročnost. Krátká generační doba, pouhých 6 až 8 týdnů od vysetí, nám umožňuje získat 6 až 8 generací do roka. Při optimálním růstu získáme z jedné rostliny až několik tisíc semen



Obr. 1 Dvouděložná rostlina huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je významným modelovým objektem v genetice. Na obr. ekotyp *Columbia*, který je výchozím genotypem pro navození mutací jak klasických tak inzerčních a jejich další analýzu zaměřenou na zjištění a charakterizaci genů

a tedy i stejný počet potomků v další generaci, což je výhodné pro genetickou analýzu. Avšak tím hlavním důvodem, proč se huseniček rolní stal skutečným reprezentantem vyšších rostlin, je velikost a struktura jeho genomu. V jádře má pět párů chromozomů a haploidní genom obsahuje 125×10^6 párů bazí (bp), tj. 125 Mb. Jeho genom je tedy asi jen 25krát větší než genom bakterie *Escherichia coli*, 10krát větší než genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, je porovnatelný s genomem živočišného modelového objektu mušky octomilky (*Drosophila melanogaster*) a asi 26krát menší než genom člověka. A právě velikost genomu byla rozhodujícím faktorem při výběru první rostliny pro kompletní sekvencování DNA.

Obr. 2 Mutant huseničku rolního (*A. thaliana*). Mutace byla indukována ionizujícím zářením — rentgenovými paprsky. Fenotypově (fenotyp je soubor znaků, kterými se v daném prostředí projevuje genotyp) se projevuje protáhlými dělohami a listy, které jsou šedo-zelené, romboidní (ve tvaru kosočtverce), se dvěma zuby



Projekty studia genomu

V r. 1992 byl zahájen projekt The Arabidopsis Genome Initiative, jehož cílem bylo porozumět fyziologii, biochemii, růstu a vývoji huseničku rolního jako představitel kvetoucích rostlin. Zahrnoval analýzu mutantů, genových interakcí (jeden znak je kódován dvěma a více geny), klonování genomových sekvencí a jejich sekvenování. Vlastní sekvenování bylo zahájeno v r. 1996 a koncem r. 2000 bylo dokončeno. Na výzkumu se podílelo 6 týmů a 40 světových laboratoří z Evropy, Japonska a USA.

Díky tomuto klíčovému projektu je znám sled nukleotidů celého jaderného i mimojaderného genomu huseničku rolního u ekotypu Columbia a počet genů byl stanoven na 25 498. Kódují 11 600 různých druhů proteinů, z nichž 35 % je jedinečných. U mnoha proteinů lze předpokládat určitou homologii s proteiny člověka i dalšího modelového organismu — hlístice háďátka řepného (*Caenorhabditis elegans*). Asi 20 % z těchto předpokládaných proteinů, pro které jsou k dispozici kompletní sekvence aminokyselin, vykazuje homologii s proteiny jiných eukaryotických organismů, což dokumentuje evoluční konzervativní charakter buněčných funkcí u eukaryot. Současně probíhalo a probíhá sekvenování genomů dalších rostlinných druhů. Druhou rostlinou se známou sekvencí DNA se stala rýže setá (*Oryza sativa*).

Po r. 2000 byly zahájeny další dva klíčové projekty, The Arabidopsis 2010 Program a The Plant Genome Program, jejichž cílem je do r. 2010 určit funkce co největšího počtu rostlinných genů. Tím se výzkum původně zaměřený zejména na strukturu genomu rostlin dostal do období funkční genomiky zaměřené převážně na přiřazení funkcí jednotlivým genům vyřazením příslušných genů z činnosti. Základním předpokladem pro zjišťování funkce rostlinných genů je mutační analýza s využitím chemomutagenů (chemických látek navozujících mutace), jako jsou např. EMS (etylmetansulfonát), ENU (1-etyl-1-nitrozomocovina), MNU (1-metyl-1-nitrozomocovina) nebo dES (dietylsulfát), či fyzikálních mutagenů, jako je ionizující záření, nejčastěji rentgenové pa-

Příklady mutací huseničku rolního (Arabidopsis thaliana). Obr. 3 Mutace compacta (cp) se fenotypově vyznačuje položakrslým vzrůstem rostlin a nahloučenými listy v listové růžici. Gen určující tyto vlastnosti se nachází na chromozomu 2 a využívá se jako signální gen. Pro snadnou detekci se tento znak používá jako morfologický marker

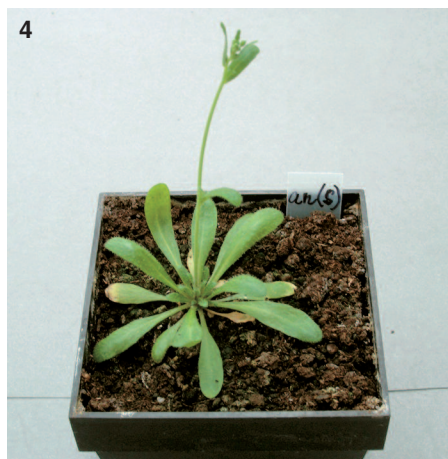


prsky. Takto byly získány a posléze zmapovány tisíce mutantů huseničku rolního.

K dalšímu urychlení rozvoje funkční genomiky došlo po zavedení metodik tzv. inzerční mutagenese — metod funkčního ovlivnění genů prostřednictvím cizorodé DNA. Při inzerční mutagenesi jsou většinou rostlinné buňky transformovány bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, což umožňuje vnášet prostřednictvím molekulárních vektorů do genomu tzv. T-DNA (T-DNA je součástí onkogenního Ti plazmidu bakterie *A. tumefaciens* a za normálních okolností vyvolává vznik rostlinných nádorů. Vhodně „odzbrojená“ T-DNA se však stala mocným nástrojem rostlinné molekulární genetiky a genetického inženýrství). Začleněním do rostlinné DNA způsobují T-DNA a transpozony (mobilní genetické elementy) inaktivaci nebo i aktivaci genů, a tak usnadňují identifikaci a izolaci genů hostitele.

Výzkum huseničku rolního probíhá i na několika pracovištích v České republice (Biofyzikální ústav AV ČR v Brně, Ústav experimentální botaniky AV ČR v Praze a v Olomouci, Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích). Na našem oddělení genetiky a molekulární biologie Masarykovy univerzity v Brně byli již v 70. letech 20. stol. získáni vlastní mutanti s chlorofylovými a embryonálními defekty a s defekty v morfologických znacích. Řada z nich je uchována v genové bance NASC

Obr. 4 Mutace angustifolia (an) indukovaná rentgenovými paprsky. Fenotypově se projevuje úzkými a celokrajnými listy a větším počtem listů v růžici ♦ *Obr. 5 Mutace chlorominuta (chm) indukovaná chemomutagenem EMS. Vyznačuje se světle zelenými mladými listy, květní stonky a kališní listy jsou žlutozelené. Mutace způsobuje poruchu ve tvorbě chlorofylu*



(Nottingham Arabidopsis Stock Centre). Cílem současné práce je lokalizace mutantních alel v genetické mapě huseničku, což je první krok k identifikaci genů určujících tyto znaky a jejich izolaci.

Studium mutací

Morfologické mutace — dědičné změny genotypu založené na nukleotidové změně DNA — lze z fenotypového hlediska rozdělit do několika základních kategorií. Od standardní rostliny se mutanti odlišují v celkové velikosti nebo ve velikosti a tvaru listu, v charakteru okraje listu nebo ve struktuře základní růžice (obr. 2–8), jejíž uspořádání závisí na délce řapíku listů, počtu listů a jejich vzájemném postavení. Identifikace genů a především funkce jejich předpokládaných proteinů ovlivňujících morfogenezi listů není doposud ve většině případů spolehlivě objasněna. Morfogeneze listu je složitý proces a je zřejmé, že mechanismů, které se na ní podílejí, bude značně množství.

Na našem pracovišti se podrobně studovaly morfologické mutace *cupuliformis* a *rotundata* (obr. 10), které mění růstový potenciál listů. Mutace *involuta* (obr. 7) a *lycopodioformis* dávají vznik mutantům s defekty jak ve struktuře vegetativních orgánů, tak i ve struktuře květenství a v době do

Obr. 6 Mutace convoluta (cn) indukovaná rentgenovými paprsky. Fenotypovým projevem mutace je stáčení děloh, řapíků a stonků kolem své osy proti směru hodinových ručiček, listy v růžici jsou také stočené ♦ *Obr. 7 Mutace involuta (iv) indukovaná chemomutagenem EMS. Listy v listové růžici jsou velmi drobné, složené podél hlavního žebra. Mutace je charakteristická velmi drobným vzrůstem rostlin, květenstvím složeným jen z několika květů a výraznou raností*





Obr. 8 *Mutace sparsipila (spi)* indukovaná chemomutagenem MNU. Vyznačuje se světle zelenými listy, které jsou téměř bez trichomů. Rostliny jsou velmi statné s větším počtem listů v listové růžici a velmi pozdní ♦ Obr. 10 *Mutace rotundata (rd)* indukovaná chemomutagenem MNU. Fenotypově se projevuje širokými a okrouhlými listy a krátkými řapíky

tého až do stadia zralosti, ale na molekulární úrovni jde o proces velmi komplikovaný, kterého se účastní kolem čtyř tisíc genů. Pro zajištění vývoje zygoty až po organizovanou mnohobuněčnou strukturu zralého embrya musejí být jejich funkce přesně koordinovány. K určování funkcí genů se využívají opět modelové organismy, především huseniček, ale také kukuřice setá (*Zea mays*). Na našem pracovišti bylo identifikováno několik různých mutací s defekty ve vývoji nezralých semen. Poznatky o regulaci embryogeneze rostlin jsou však stále neúplné a funkce genů je často spojena s funkcí rostlinných hormonů, auxinů a cytokininů (viz článek J. Frimla na str. 8).

Pro tvorbu jednotlivých orgánů jsou důležité také procesy zahrnující fotosyntézu. Mutace v genech, které se na ní podílejí, jsou spojeny s defekty při tvorbě chlorofylu. Dvě mutace s chlorofylovými defekty *chlchrominuta* (obr. 5) a *lucida* (obr. 11) byly charakterizovány prostřednictvím genetického mapování. Žlutozelené zbarvení listů naznačuje, že došlo k defektu ve tvorbě chlorofylu.

Rozvoj genomiky

Na základě poznání kompletních sekvencí genomů dvou rostlinných druhů a částečných sekvencí dalších byl získán rozsáhlý studijní materiál a přímo se nabízí jejich srovnání z různých hledisek. To je také cílem tzv. srovnávací genomiky. Např. uspořádání genů a lokusů na chromozomech se stalo náplní srovnávací genomiky druhů čtyř čeledí — již zmíněných brukvovitých, lipnicovitých (*Poaceae*), bobovitých (*Fabaceae*) a lilkovitých (*Solanaceae*). Čeledi

Obr. 9 *Mutace glabrous (gl)* vyznačující se lysými listy a stonky, což je způsobeno ztrátou schopnosti tvořit trichomy. Tento výrazný znak je využíván jako morfologický marker. Gen determinující znak je lokalizován na chromozomu 3 ♦ Obr. 11 *Mutace lucida (lc)* indukovaná chemomutagenem MNU. Vyznačuje se svítivě žlutozeleným zbarvením děloh a listů v důsledku poruch ve tvorbě chlorofylu. Snímky J. Řepkové

nebyly vybrány náhodou, zahrnují totiž ekonomicky nejvýznamnější druhy, jako je brukev zelná (*Brassica oleracea*), brukev řepák (*B. rapa*), brukev černá (*B. nigra*) a jejich hybridy brukev sítinovitá (*B. juncea*), brukev řepka (*B. napus*) a hořčice habešská (*B. carinata*) — brukvovité; kukuřice setá, pšenice setá (*Triticum aestivum*), rýže setá — lipnicovité; sója luštinatá (*Glycine max*), čočka kuchyňská (*Lens culinaris*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), hrách setý (*Pisum sativum*), vojtěška setá (*Medicago sativa*) — bobovité; rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*), lilek brambor (*S. tuberosum*), tabák virginský (*Nicotiana tabacum*), paprika setá (*Capsicum annuum*) — lilkovité.

Dostáváme se tak od poznání genomu „bežvýznamného“ huseničku k poznání genomů významných plodin, ale i k možnosti využití konkrétních rostlinných genů pro zlepšení znaků a vlastností kulturních druhů prostřednictvím genetických modifikací (viz seriál E. Pekárkové, 2004–6: 1–6). Soubor dat, který poskytuje uživatelsky dostupné informace o huseničku rolním, se neustále průběžně aktualizuje. Zdrojem komplexních informací je internetová databáze The Arabidopsis Information Resource — TAIR na adrese www.arabidopsis.org.