

Genetika rostlinných explantátových kultur *in vitro*.

Genetická a epigenetická variabilita v kulturách *in vitro*.

Kultura rostlinných explantátů představuje soubor rostlinných buněk nebo pletiv, asepticky kultivovaných izolovaně od „mateřské“ intaktní rostliny na umělém živném mediu v řízených kultivačních podmínkách. Rostlinné buňky se vyznačují existencí možnosti dediferenciace, tj. schopností přechodu diferencovaných buněk a pletiv do meristematického stavu charakterizovaného intenzivním buněčným dělením a následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů a celých rostlin.

Na kultury rostlinných explantátů *in vitro* se zpočátku pohlíželo jako na vhodný prostředek zachování genetické stability rostlin a prostředek masového klonového množení rostlinného materiálu. Rostliny regenerované *in vitro* by pak měly být „přesné kopie“ výchozí intaktní rostliny, ze které byl odebírán primární explantát. Tato vlastnost, tj. genetická stabilita a produkce identického rostlinného materiálu, se měla udržovat dlouhodobě, v průběhu celé doby kultivace v *in vitro* podmínkách.

Počáteční výsledky také ukazovaly na tuto charakteristiku explantátových kultur, kdy při klonovém množení orchidejí a dalších vegetativně množných okrasných rostlin nebyly u regenerantů shledávány žádné odchylky. Byly vysloveny i myšlenky „kalusových a buněčných“ *in vitro* genových bank jako prostředku dlouhodobé a stabilní konzervace genových zdrojů.

Tento názor musel být dále změněn, protože s rozvojem technik *in vitro* kultivace a zavedením různých typů kultur i z jiných materiálu se začala objevovat řada malých i výrazných odchylek jak v *in vitro* kulturách tak u regenerovaných rostlin. Nálezy odchýlných typů rostlin regenerovaných zejména z kalusových a buněčných kultur ukazovaly, že v průběhu kultivace *in vitro* dochází v somatických buňkách ke genetickým změnám, které přetrvávají i u regenerovaných rostlin.

O genetické stabilitě rozhoduje totiž průběh morfogeneze - a geneticky stabilní systém *in vitro* je vázaný jen na „organizovaný typ vývinu“, při kterém je eliminována fáze dediferenciace a kalogeneze. Tato podmínka organizovaného růstu a vývoje je splněna jen v případě embryonálních kultur a u většiny případů meristémových kultur, případně při regeneraci rostlin cestou přímé somatické embryogeneze. Variabilita v kalusových,

buněčných a protoplastových kulturách se vyskytuje spontánně, nebo může být indukována. Část variability nalézané v těchto kulturách *in vitro* je geneticky podmíněná, část má charakter epigenetické variability.

Genetická změna na úrovni *in vitro* může být podmíněna bodovou mutací, delecí nebo chromozomální přestavbou. V případě, že si i takto geneticky modifikovaná buňka zachová totipotenci, mutace se může projevit změnou fenotypu regenerované rostliny (buď přímo v generaci R1 nebo až po samosprášení v generaci R2).

Ne všechny změny, které kultuře *in vitro* vznikají jsou ale genetické povahy. Variabilita, které v *in vitro* kultuře přetrvává i po řadu buněčných generací (pasáží) a je v *in vitro* podmínkách více méně stabilní, může být potenciálně reverzibilní a vymizí při diferenciaci rostlin nebo po určité době kultivace regenerovaných rostlin mimo kulturu *in vitro*. Tato variabilita (proměnlivost) je pak nazývána jako variabilita epigenetická.

Typy kultur geneticky stabilních a instabilních.

Komplex metod založený na kultivaci a manipulaci s rostlinnými explantáty *in vitro* představuje v novém přístupu ke studiu genetiky rostlinné buňky a nový netradiční doplněk klasických šlechtitelských postupů.

Využití biotechnologických metod a principů v genetice a ve šlechtění rostlin je možné rozdělit do dvou zcela odlišných oblastí:

- techniky zachovávající původní genotyp, umožňující krátkodobé i dlouhodobé uchování rostlin v kultuře *in vitro* bez významnějších genetických změn
- techniky zvyšující genetickou variabilitu během kultivace *in vitro*.

Techniky zachovávající původní genotyp:

a/ meristémové kultury

Meristém vhodný na založení kultury *in vitro* je struktura obsahující vlastní apikální meristém a jeden až dva páry listových primordií. Výhodný je zejména vysoký množitelství koeficient dosahovaný tímto typem kultury - z primárního explantátu lze získat 500 000 - 1 000 000 geneticky identických rostlin. Meristémová kultura je geneticky velmi stabilní. Buňky apikálního meristému vytváří integrovaný, geneticky vysoce stabilní systém - vysoká genetická stabilita tohoto systému je zapříčiněna velmi přísnou kontrolou

syntézy DNA a mitózy (neumožňující vznik endopolyploidie) a kontinuálním mitotickým dělením meristematických buněk (eliminace spontánních mutací).

Rostliny regenerované z meristémové kultury jsou fenotypově homogenní a geneticky stabilní - identické s výchozím explantátem. Frekvence mutací v potomstvu je srovnatelná s frekvencí mutací při tradičním vegetativním rozmnožování. Kromě možnosti klonování rostlin in vitro prostřednictvím meristémové kultury (mikropropagace) má z praktického hlediska značný význam možnost eliminace virových chorob a dalších fytopatogenů při kultivaci meristémů.

b/ embryokultury

Embryokultury se rovněž vyznačují značnou genetickou stabilitou, při odvození (regeneraci) rostlin ze zygotických embryí v embryonální kultuře se neseťkáváme se změnami karyotypu ani dalšími genetickými změnami - genetická kontinuita se projeví stabilním genotypem u regenerovaných rostlin, identickým s in vitro kultivovaným embryem.

c/ klonování in vitro

Cílem této techniky (resp. celého technologického postupu) je získání velkého počtu geneticky identických rostlin, shodných s výchozím materiálem. Klonování v podmínkách kultur in vitro (mikropropagace) se může již počítat k běžným metodám klonového (vegetativního) rozmnožování rostlin.

Rozmnožování v podmínkách in vitro probíhá:

- indukci axilárních meristémů při kultivaci izolovaných vrcholů (meristémové kultury)
- indukci adventivních meristémů a pupenů
- diferenciací rostlin de novo procesem organogeneze nebo somatické embryogeneze.

Geneticky stabilní systém a produkce identického rostlinného materiálu je zabezpečena v případě meristémových kultur a somatické embryogeneze. V ostatních případech může docházet k nárůstu geneticky podmíněné variability způsobeným částečnou nestabilitou regeneračního systému.

Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

a/ kalusové kultury

V povrchových vrstvách buněk explantátu se při přenosu do in vitro podmínek indukuje mitotické dělení. Diferencované buňky trvalých pletiv přechází do meristemického stavu - dediferencují. Vytváří se neorganizovaná hmota buněk - kalus. Výsledkem procesu dediferenciace je vznik geneticky i morfogeneticky heterogenního systému.

Protože většina rostlinných druhů je polysomatických, je i karyologický stav buněk dediferencovaného pletiva různý. Navíc při indukci kalusu v kultuře in vitro mohou v explantátu probíhat 4 odlišné procesy (odděleně nebo se mohou různě kombinovat) - mitóza, endoreduplikace následovaná mitózou, fragmentace chromozómů (amitóza) a amplifikace DNA. Je tedy vidět, že primární kalus může obsahovat velmi heterogenní buněčnou populaci, která částečně odráží preexistující cytogenetické podmínky a částečně výsledky procesů, které probíhají během indukce kalusu.

Během in vitro růstu kalusových a suspenzních kultur se naskýtají dostatečné možnosti pro další cytogenetickou a genetickou variabilitu závisící na mnoha faktorech: např. na genetické konstituci druhu, hormonálním složení kultivačního média, typu kultury a kultivačním režimu. Lze pak sledovat výskyt haploidních, diploidních a polyploidních buněk. Rozsah polyploidie je někdy omezen možností indukovat mitózu u endoreduplikovaných buněk. V kultuře se mohou vyskytnout i buňky aneuploidní, dvoj- a více jaderné, vzrůstá frekvence chromozómových strukturálních změn.

Polyploidní a aneuploidní buňky, produkované in vitro, mohou být eliminovány nebo mohou i získávat převahu v závislosti na selekčním tlaku. Svoji roli zde hraje i doba kultivace. V průběhu dlouhodobé kultivace in vitro se kumulují cytologické nepravidelnosti, které mohou být příčinou snížení nebo i úplné ztráty organogenní schopnosti. S dobou kultivace kalusu in vitro rovněž roste podíl cytologicky odlišných rostlin, které z kultury regenerovaly, vzrůstá podíl polyploidních, chimérických a aneuploidních rostlin. Ale na druhou stranu se také někdy zdá, že rostliny jsou schopny regenerovat jen z pupenů odvozených z těch buněk, které mají počet chromozómů relativně vyvážený.

Obecně se dá vyjádřit - čím déle prochází kultura fází kalusu (resp. neorganizovaného růstu), tím větší genetická variabilita se projeví u regenerovaných rostlin - a i když můžeme považovat všechny buňky kalusu za totipotentní, ne všechny jsou pak z morfogenetického hlediska schopné regenerovat v intaktní rostlinu.

b/ buněčné (suspenzní) kultury

Tyto kultury jsou tvořeny dediferencovanými buňkami v tekutém médiu. Tento typ kultury lze založit po přenesení rozpadavého kalusu do tekutého média a jeho roztřepáním. Kulturu tvoří drobné shluky dělících se buněk. Charakteristika procesů probíhající v kalusových kulturách plně platí i pro buněčné kultury, míra genetické nestability je v tomto

c/ protoplastové kultury

Protoplasty lze získávat ve velkých množstvích z různých pletiv nebo i buněčných kultur. Protoplasty jsou během kultivace v in vitro podmínkách velmi senzitivní vůči okolnímu prostředí, kalusy či rostliny (embryoidy) získané z protoplastů mohou pak vykazovat značnou míru genetické variability.

d/ kultury prašníků a mikrospor

Haploidní rostliny představují neobyčejně cenný materiál pro genetický výzkum i šlechtění. Použití haploidního materiálu umožňuje sledování segregace genů (alel) na gametické úrovni a současně dovoluje získat dokonale homozygotní rostliny už v F₁ generaci.

Metody in vitro indukce haploidů jsou následující:

- indukovaná androgenese v prašниковých a pylových kulturách (jediný způsob, jak lze získat haploidní organismus bez účasti cytoplasmy vajíčka)
- selektivní eliminace chromozómů v hybridním zárodku
- indukovaná gynogeneze v neoploďných vajíčkách in vitro

Mikrospory (i vajíčka) kultivované in vitro se mohou vyvíjet dvěma způsoby - cestou přímé pylové embryogeneze, nebo dochází k neorganizovanému růstu, tvorbě haploidního kalusu, ze kterého regenerují rostliny.

V prvním případě vzniká převážně haploidní potomstvo - a naopak u rostlin vzniklých nepřímou androgenézí (resp. gynogenezí) se vyskytuje značná cytogenetická variabilita, kromě haploidů regenerují diploidní, polyploidní a mixoploidní rostliny.

U dvoudomých rostlin (např. knotovka bílá) se při regeneraci haploidních rostlin projevuje silná selekce vůči chromozómu Y - vznikají jen diploidi XX (samičí), nevzniká jedinec o

konstituci pohlavních chromozómů YY. Pravděpodobně se projevuje se selekce na úrovni prorůstání embryoidů. Haploidní systém představuje velmi účinný nástroj genetické analýzy organismu a této otázce je věnována značná pozornost. V poslední době se objevují ojedinělé zprávy o uskutečnění regenerace rostlin o konstituci pohlavních chromozómů YY. Tito regeneranti pak představují zajímavý genetický model a umožňují další posun ve studiu genetiky explantátových kultur i genetiky rostlin vůbec.

e/ selekce na buněčné úrovni

Jedním z nadějným směrů výzkumu v oblasti explantátových kultur je selekce žádaných genotypů v podmínkách in vitro - cílem je získání materiálů s geneticky podmíněnou rezistencí (proti různým patogenům, zasolení půdy, suchu, herbicidům), se stabilním projevem znaku a se současným zachováním hospodářských vlastností původního genotypu.

Předpokladem pro uplatnění tohoto systému in vitro selekce je fungující regenerační systém a teprve po ověření schopnosti kultivace a regenerace z buněčné kultury je možné přistoupit k vlastnímu selekčnímu systému in vitro.

f/ využití somaklonální variability

Jak je tedy vidět, rostliny regenerované z kultur in vitro nejsou vždy geneticky a morfologicky uniformní. Genetická variabilita in vitro, projevující se na úrovni regenerovaných rostlin jako somaklonální variabilita, odráží jak genetickou konstituci výchozího explantátu (genetickou mozaiku pletiv primárního explantátu), tak i možnost vzniku nových genotypů v průběhu kultivace in vitro.

Během kultivace in vitro dochází k následujícím typům změn:

- změny v počtu chromozómů, regenerace aneuploidních rostlin, frekvence změn roste s dobou kultivace in vitro
- změny struktury chromozómů, patrné při chování chromozómů v meióze, nehomologní -
- translokace, inverze, delece
- deamplifikace a amplifikace genů
- genové mutace
- změněná exprese multigenních rodin
- mobilizace transponovatelných elementů

Možné příčiny vzniku somaklonální variability jsou:

- existence genetických změn v buňkách diferencovaných pletiv intaktních rostlin
- karyologické změny v in vitro kultuře
- mutace major a minor genů v in vitro kultuře
- změny regulace exprese genů, transpozómy, mitotický crossing-over

Geneticky nestabilní jsou kalusové, buněčné a protoplastové kultury a v některých případech rostliny z nich regenerované. Pokud kultura projde fází kalusu, vzrůstá cytogenetická variabilita. Tyto kultury jsou pak rezervoáry rozsáhlé variability, jejíž projev závisí ještě na mnoha faktorech.

Naopak kultury intaktních orgánů, vyznačujících se růstem organizovaným struktur (meristémů, embryí), jsou do značné míry geneticky stabilní a rostliny z nich regenerované mají charakter klonu (geneticky uniformního potomstva). Tyto dva různé systémy stability, resp. variability, poskytují významné možnosti pro studium genetiky rostlinné buňky a rovněž aplikace možnosti pro současné šlechtitelské biotechnologie.

Mutace a selekce mutantů v in vitro kulturách.

In vitro kultury mohou být vhodným prostředkem pro navození mutací a selekci vhodných šlechtitelsky využitelných genotypů. Pro tyto účely jsou nejčastěji využívány kultury buněk (buněčné, suspenzní kultury), dále pak protoplasty a kalusy.

Jako kritéria projevu mutace je považováno:

- stabilita znaku i v nepřítomnosti selekčního faktoru
- mutovaný znak se projeví okamžitě
- znak se projeví v nízké frekvenci
- dochází k expresi znaku i na úrovni regenerovaných rostlin
- dochází k sexuálnímu přenosu znaku v následných generacích

Poslední dvě kritéria jsou významná z hlediska studia genetiky mutačních procesů na úrovni celistvé rostliny a pro možnou aplikaci selekčně mutačních postupů ve šlechtění rostlin.

V následujícím přehledu jsou uvedeny znaky na než jsou zaměřeny mutační a selekčně mutační postupy (znaky využitelné v genetice a šlechtění rostlin), a kde kultury in vitro představují nekonvenční přístup ke šlechtitelské problematice a indukci zvýšené genetické variability:

- selekce mutantů se zlepšenou nutriční kvalitou bílkovin (změna skladby bílkovinných frakcí, genové inženýrství zásobních proteinů, zvýšení obsahu esenciálních aminokyselin)
- selekce mutantů s vyšší rezistencí/tolerancí vůči zasolení
- selekce na zvýšenou rezistenci vůči chorobám (interakce původců houbových a bakteriálních chorob s rostlinnými buňkami v in vitro podmínkách, indukce rezistence pomocí toxických látek produkovanými fytopagenními organismy, infekce a replikace virů v protoplastech)
- selekce mutantů rezistentních vůči herbicidům
- selekce na toleranci vůči teplotnímu stresu
- selekce na rezistenci/toleranci vůči iontům kovů

Somatická hybridizace (fúze protoplastů)

Protoplasty představují svým způsobem unikátní systém studia genetiky rostlinné buňky a systém využitelný pro produkci hybridních genotypů - somatických hybridů. Teoreticky je možné provést fúzi protoplastů jedinců fylogeneticky velmi vzdálených (byly prováděny i experimenty s fúzí protoplastů rostlinných a živočišných), ale u hybridních buněk pak nastávají zásadní problémy na úrovni genové regulace a genové/ jaderné kompatibility a vzniklá hybridní buňka není schopna dělení nebo vzniká omezeně se dělící neregenerující kalus.

Somatická hybridizace byla po dlouhé období propagována jako zásadní metoda pro produkci hybridních rostlin - takových kombinací, které nelze získat normálním křížením. Ale pouze několik somatických hybridů je opravdu využitelných: *Brassica naponigra* - vznikla po fúzi protoplastů *B. napus* a *B. nigra*, odolná vůči houbě *Phoma lingam*, somatický hybrid *Solanum tuberosum* a *S. brevidens* je rezistentní vůči některým virovým chorobám.

Obecně není možné získávat fertillní somatické hybridy jednoduchou kombinací - splynutím kompletních genomů dvou příbuzných nebo nepříbuzných druhů. Zkouší se

metody asymetrické hybridizace - nejlepší využití fúze protoplastů asi bude v produkci cybridů, kteří obsahují jaderný a cytoplazmatický genom jednoho rodiče a jen cytoplazmatický genom druhého rodiče. Tato metoda může mít význam v přenosu CMS při šlechtění rostlin. Při přenosu CMS z *Raphanus sativus* do *Brassica napus* nebo *B. oleracea* se projevuje tzv. „chilling“ efekt (= chladový efekt) - při teplotách pod 15°C žloutnou listy, je nižší intenzita fotosyntézy. Odstranění „chilling“ efektu je možné výměnou plastidů *Raphanus sativus* za plastidy *Brassica napus* nebo *B. oleracea*.

Principy genového inženýrství rostlin.

Genové inženýrství pracuje s izolovanými definovanými úseky DNA, které představují geny nebo další sekvence DNA. Gen z tohoto pohledu je definován jako úsek DNA, který se skládá z kódujících sekvencí a jim příslušejících regulačních sekvencí, začíná specifickým rozpoznávacím místem - promotorem, pak následují zaváděcí sekvence, kódující sekvence (u vyšších rostlin stejně jako dalších eukaryont jsou kódující úseky - exony přerušovány nekódujícími úseky - introny), pak následují terminační sekvence (3'-koncový úsek DNA se signály ukončení transkripce).

Izolovat a klonovat lze zejména takové geny, u nichž můžeme v čistém stavu izolovat protein, pro který DNA nese informaci, a molekulu mRNA, která zprostředkovává přenos genetické informace uložené na DNA a primární strukturou dané proteinové molekuly. Geny tvoří jen malou část rostlinné DNA. Tato část se pohybuje v rozmezí řádově desetin procent až několika procent. Určitou výjimkou je *Arabidopsis thaliana*, rostlina používaná jako model v molekulárně biologických studiích. Větší část jejího genomu (velikost genomu *A. thaliana* je jen 70 000 kb) má kódující funkci.

V 80. letech došlo k prudkému rozvoji biotechnologií, tento zlom nastává v důsledku rozvoje jednoho metodologického principu: schopnosti „skládat dohromady in vitro DNA molekuly odvozené z různých zdrojů“. Tyto techniky jsou nazývané jako genové manipulace, často je používán také termín technologie rekombinantní DNA.

Zpočátku se technik rekombinantní DNA využívalo pro produkci proteinů - zejména pro farmakologické využití, později pro produkci proteinů pro další průmyslové využití (např. potravinářství) a pro produkci SCP (single cell proteins). Tyto aplikace se ale týkaly manipulace s bakteriální buňkou.

Později se začíná uvažovat o využití biotechnologických a molekulárně biologických technik u rostlin, nejprve na modelových objektech a v současné době dochází i k širší aplikaci těchto přístupů v genetice a šlechtění rostlin.

Techniky genového inženýrství zahrnují základní manipulace s rostlinnými geny, restriční štěpení rostlinné vysokomolekulární DNA pomocí enzymů restričních endonukleáz, klonování rostlinné DNA v bakteriálních plazmidech, konstrukce genových

knihoven, genetické mapování a sekvenování DNA, integraci cizorodé DNA do rostlin (pomocí plazmidů *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, přímé vnášení genů pomocí elektroporace, mikroinjekcí a mikroprojektilů).

Techniky genového inženýrství umožňují řešení taxonomických a fylogenetických otázek na molekulární úrovni, studium organizace rostlinného genomu, studium chloroplastové a mitochondriální DNA. Ve šlechtění rostlin je snaha využít komplex těchto technik pro konstrukci sond pro detekci viroidů, virů a dalších obtížně detekovatelných patogenů a pro vnášení cizích genů do genomu kulturních rostlin.

Tyto techniky jsou v současné době velmi usilovně propracovávány a vyvíjeny, již dostupné jsou metody založené na transformaci kultivovaných tkání, buněk a protoplastů pomocí Ti-plasmidu *Agrobacterium tumefaciens* a Ri-plasmidu *A. rhizogenes*. Zkouší se metody přímého přenosu DNA do protoplastů - PEG a elektroporace, vnášení DNA do intaktních buněk mikroinjekcemi, nebo pomocí mikroprojektilů.

V současné době je ale dostupných jen několik genů, které mají agronomický význam a již byly integrovány do některých rostlin. Jsou to geny rezistence vůči několika ekologicky „čistým“ herbicidům, gen pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis* a geny rezistence vůči virům. Transgenní rostliny se podařilo získat u soji, brambor, rajčat, tabáku, řepky, některých obilovin. Zatím nejsou známy informace o výnosu, kvalitě transgenních rostlin, ale dá se očekávat, že se komerčně objeví během 5-10 let. První transgenní rostliny se objevily již v roce 1983.

U zemědělsky významných plodin (obiloviny, luskoviny) je jejich získávání obtížnější, zejména pro obtíže při regeneraci rostlin a z důvodů obtížné transformovatelnosti. Byly již získány rostliny kukuřice, rýže a soji obsahující gen pro rezistenci ke kanamycinu a dá se očekávat, že v blízké budoucnosti se podaří do těchto rostlin začlenit hospodářsky významné geny (r.1992 - pšenice, kukuřice - gen rezistence vůči PPT - „Basta“ pomocí mikroprojektilů). Do rostlin tabáku se podařilo začlenit gen pro toxin *B. thuringiensis* a tvorba toxinu byla zjištěna i u potomstva po generativním rozmnožování.

Transgenní rostliny mohou být využity i jako „přírodní bioreaktory“ pro produkci celé škály biologicky aktivních peptidů, tvorbu chimerických proteinů - včetně neuropeptidů, krevních faktorů, růstových hormonů.

Pro další rozvoj moderních metod RB je nutné dozvědět se více o růstu a vývoji rostlin, struktuře, funkci a expresi agronomicky důležitých genů, propracovat techniky transgenoze: zatím většina agronomicky důležitých genů nebyla identifikována na molekulární úrovni nebo nebyla klonována, většina důležitých hospodářských vlastností je polygenně založena, metody transformace dovolují integraci jen několika cizích genů (obecně 1 nebo 2), geny jsou integrovány do genomu hostitelské rostliny často v několika kopiích na několik náhodných míst (to může vyústit v poruchy genové regulace, snížení aktivity vnesených i jiných genů, faktickou neopakovatelnost transformačních experimentů).

Praktické využití metod GI je orientováno zejména na:

- odolnost proti virovým chorobám - získání odolnosti je možné po vnesení sekvencí DNA kódující gen pro plášťový protein viru, celý genom slabého kmenu viru, antisence RNA, virovou satelitní RNA, sence RNA
- odolnost herbicidům - např. glyfosátu, fosfinitricínu (transformace geny rezistence vůči glyfosátu a fosphinothricinu, resp. mutantním genem pro 5-enolpyruvylshikimát-3-phosphoshát syntázu, k němuž má glyfosát nižší afinitu, a genem pro fosphinothricinacetyltransferázu, která inaktivuje PPT)
- odolnost proti hmyzu - transformace **Bt** genem gen pro specifický δ -endotoxin vůči některým skupinám hmyzu z *Bacillus thuringiensis*
- zlepšení spektra aminokyselin v zásobních bílkovinách
- navození rezistence vůči hád'átku u brambor a řepy
- zvýšení odolnosti proti fyzikálním stresovým faktorům

**/ podrobné informace jsou obsaženy v kurzu „Genové inženýrství rostlin“*

Genetický polymorfismus.

Polymorfismus na úrovni DNA.

Pomocí DNA markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, kterou sledovaní jedinci/buňky nesou. DNA markery jsou tedy postaveny na polymorfismu sekvencí DNA obsažených dvěma nebo více jedinci nebo populacemi. DNA markery umožňují neustále se rychle rozrůstající množství různých aplikací. Zejména jsou využívány v systému DNA fingerprintingu použitelného pro odlišení (discrimination) různých genotypů, odrůd nebo pro zjišťování genetické čistoty osiva, sledování zajímavých genů během šlechtitelského programu, testování otcovství, začínají být používány pro genetické mapování, studia molekulární evoluce...

Sekvence DNA se v genomu mohou vyskytovat jako jedinečné sekvence (single copy), jako středně- nebo vysoce repetitivní (opakující se) sekvence s rozličnou funkcí a významem, tj. kódující, regulační a nekódující sekvence. Úroveň variability je určována řadou faktorů, např. frekvencí mutací, frekvencí rekombinací, různými formami selekce...

V polymorfních regionech se můžeme setkat se dvěma typy variability - s jednoduchými substitucemi nukleotidů nebo s variabilitou v počtu tandemových opakování v repetitivních lokusech (VNTR).

Zdrojem variabilních DNA oblastí je více - studium je zaměřeno na rDNA (ribosomální DNA), tDNA (tRNA geny), minisatelity (repetitivní sekvence 10-30 bp dlouhé lokalizované poblíž telomér), mikrosatelity (1-4 bp dlouhé tandemově opakované nukleotidové sekvence - např. [AT]_n mikrosatelity u sóji).

Kromě tohoto typu polymorfní DNA jsou v genomu obsaženy náhodné genomické sekvence většinou používané v RFLP a RAPD analýzách.

V genetice a šlechtění rostlin jsou nejčastěji využívány následující markerovací systémy založené na polymorfismu DNA:

- RFLP markery
- RAPD markery
- MAAP

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - polymorfismus délky restričních fragmentů) je metoda založená na restričním štěpení DNA, elektroforetické separaci štěpů a hybridizaci se specifickou sondou (Southern blotting). Mutace v restričním místě změni velikost restričních fragmentů a tedy i pozici proužků po hybridizaci.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - polymorfismus náhodně amplifikované DNA) je technika založená na technologii PCR (polymerázová řetězcová reakce). Při RAPD jsou používány náhodně generované krátké primery - o délce 6-10 nukleotidů. Během reakce dochází k amplifikaci řady produktů, lišících se délkou a interním nukleotidovým složením. Fingerprint genomu je získán po gelové elektroforéze a vizualizaci produktů.

MAAP (Multiply Arbitrary Amplicon Profiling) je charakterizována jako metoda využívající jeden nebo více krátkých oligonukleotidových primerů libovolné sekvence k inicializaci amplifikace DNA a generování charakteristického fingerprintu pro neznámý genom. Kromě těchto technik existuje řada dalších modifikací a technik detekujících DNA polymorfismus, např. AP-PCR, DAF, SRFA, AFLP...

Polymorfismus na úrovni zásobních proteinů a isoenzymů.

Polymorfismem bílkovin se označuje výskyt dvou nebo více typů bílkovinné molekuly (u různých jedinců téhož druhu, v různých orgánech téhož jedince nebo v různých částech jedné buňky) se stejnou funkcí, které se poněkud liší svojí strukturou (jsou kódovány jinými alelami téhož genu, jinými geny nebo jsou různě posttranslačně modifikovány), lze je oddělit metodami používanými k separaci bílkovin. Molekulární varianty se nazývají *isobílkoviny*.

Použití nových metod separace bílkovin (a histochemických technik) vedlo ke zjištění, že tutéž katalytickou funkci může vykonávat více různých forem téhož enzymu. Enzymy tedy jeví obdobně jako jiné kategorie bílkovin polymorfismus.

Isoenzymy (nebo *isozymy*) jsou mnohočetné molekulární formy enzymu, které se postupně nahrazují během vývoje organismu, nebo formy které katalyzují stejnou reakci (mají společný alespoň jeden substrát) v různých částech organismu nebo buňky. Na vzniku isoenzymů se podílejí buď alely jednoho lokusu, pak se většinou označují jako *alozymy*, nebo více lokusů, více strukturních genů. Isoenzymy tak mohou být zřetelně rozdílné

bílkovinné molekuly se stejnými enzymatickými vlastnostmi nebo mohou být „jen“ výsledkem sekundárních změn ve struktuře jednotlivých polypeptidů.

Isoenzymy lze rozčlenit na následující typy: *geneticky determinované elektroforetické varianty* (mutační změna, způsobující změnu na aminoacylovém zbytku, která vede ke změně „čistého celkového“ náboje bílkoviny a změně elektroforetické mobility), *homopolymery* (bílkoviny sestávající z více identických podjednotek, variabilita ve velikosti molekuly vyplývá z variability v počtu podjednotek, které skládají enzym), *heteropolymery* (bílkovina sestávající ze dvou nebo více odlišných typů podjednotek, isoenzymy jsou výsledkem různých kombinací podjednotek), *konformační isoenzymy* (konformační změny působené odlišnostmi v terciální struktuře bílkovinné molekuly), *isokinetické isoenzymy*.

Jako molekulární příčiny polymorfismu enzymů se uvádějí:

- geneticky nezávislé proteiny kódované samostatnými geny jako např. isoenzymy malát dehydrogenázy (jedna forma je v cytosolu, druhá v mitochondriích)
- polymerické isoenzymové systémy jako např. laktát dehydrogenáza, ve kterém jsou podjednotky kódovány více než jedním lokusem
- isoenzymy kódované alelickými geny
- isoenzymový systém založený na sérii polymerů jednotlivých podjednotek
- epigenetické modifikace primárního proteinu - posttranslační kombinace proteinu s jinými - molekulami
- částečná proteolýza původního polypeptidu
- různé konformační uspořádání stejného proteinu

Polymorfismus proteinů a isoenzymů tak vychází jak z geneticky kódované a zmapovatelné variability, tak i z procesů posttranslační modifikace proteinů. Rozsah posttranslační modifikace proteinů (kovalentní a nekovalentní) může být značný. Příkladem je 140 aminokyselin a jejich derivátů nacházených v bílkovinných molekulách různých organismů. Kovalentní modifikace proteinů se např. týká jevů štěpení peptidické vazby nebo modifikace jednotlivých aminokyselin.

V některých zdrojích jsou jako iso(en)zymy, resp. allozymy označovány jen formy mající geneticky podmíněné rozdíly v primární struktuře, tj. řízené různými geny (alelami). Jako *pseudoisoenzymy* jsou pak označovány mnohočetné formy enzymu, katalyzující stejnou

reakci, ale rozdíly v jejich vlastnostech nejsou způsobeny geneticky podmíněnými rozdíly v primární struktuře. Jejich existence je důsledkem enzymových a neenzymových modifikací enzymu s jednou primární strukturou *in vivo*. K modifikaci může docházet i během izolace, potom jde o artefakty.

Genetické bílkovinné markery v genetice a ve šlechtění rostlin.

Genetický marker (signální gen) se používá pro označení jasně se fenotypově projevujícího znaku s jednoduchou dědičností. Označení marker pak předpokládá spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními či kvalitativními znaky. Genetické biochemické markery se musí vyznačovat dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrancí a rovněž vysokou heritabilitou, tj. nezávislostí na podmínkách prostředí.

Bílkoviny mohou velmi dobře splňovat kritéria pro genetické markery, neboť se vyznačují vysokým stupněm geneticky fixovaného polymorfismu, kodominantní dědičností, rozlišitelností alel v individuích, jistou mírou nezávislosti na vnějších podmínkách. Takovými systémy mohou být zásobní bílkoviny nebo isoenzymy (molekulární formy enzymů). V principu všechny bílkoviny vykazující genetický polymorfismus, mohou být využity jako diferenční markery u odrůd, a to s větším efektem než klasické morfologické markery.

Morfologické znaky mají několik nevýhod, pokud jsou používány jako markery v rostlinné genetice a šlechtitelských postupech. Recesivní alely genů kódujících morfologický projev (znak) se v homozygótním stavu neprojevují. Také epistatický nebo pleiotropický efekt takových genů může limitovat počet markerů použitelných v jednom souboru. Naproti tomu alely (alozymy) většiny isoenzymových lokusů jsou kodominantní a mohou se pak projevit i v případě recesivity nebo pleiotropie. Tato kodominance také umožňuje rozlišit heterozygoty od homozygotů. Isoenzymy jen zřídka vykazují epistatický projev, což pak umožňuje použít u daného materiálu značně rozsáhlejší počet markerů. Molekulární markery jsou oproti morfologickým i více nezávislé na vnějších podmínkách prostředí.

V roli biochemických markerů se kromě isoenzymů používají i neenzymatické bílkoviny (např. zásobní proteiny), markery na úrovni DNA (RFLP markery, mající kodominantní charakter, RAPD markery charakterizované dominantním charakterem a řada dalších

technik, např. AP-PCR, DAF, MAAF, metody izotopového i neradioaktivního fingerprintingu), je možné použít i jiných metabolitů, např. mastných kyselin, u nižších rostlin i sekundárních metabolitů a pigmentů. I tyto biologické makromolekuly, markerovací systémy, v různé míře splňují požadavky biochemických markerů, tj. nezávislost na podmínkách prostředí, genetický polymorfismus, přítomnost vhodné separační a detekční techniky.

Další výhodou biochemických markerů bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu, tento proces je nedestruktivní, tj. pro analýzu se používá jen malá část rostlinné tkáně. Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým klasickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků. Navíc velmi často je možné testovat rostliny v klíčném stavu a dále si ponechat jen rostliny vhodného genotypu, tento fakt je příznivý zejména pro aplikace v genetických studiích a ve šlechtění.

Isoenzymy se používají jako markery v genetickém výzkumu mnoha druhů a jsou i vhodné jako biochemické markery pro identifikaci odrůd. Některé proteiny bez detekovatelné enzymatické aktivity (např. zásobní proteiny) jsou rovněž vysoce polymorfní a jsou vhodné jako biochemické markery pro tyto účely. V principu, všechny enzymy nebo proteiny, které vykazují genetickou variabilitu mohou být použity jako markery k označení odrůd.

Volba vhodného biochemického markerovacího systému (na úrovni DNA, proteinu nebo enzymu) je založena na následujících požadavcích:

- dostatečná frekvence genetických variant u daného druhu
- exprese nezávislá na podmínkách prostředí
- vhodná elektroforetická a detekční technika.

V následujícím přehledu jsou uvedeny některé nejvýznamnější aplikace použití isoenzymů a proteinů, separovaných elektroforetickými technikami, jako biochemických genetických markerů:

- taxonomické a populačně genetické studie
- genetická analýza somatických a vzdálených hybridů
- markerování morfologických a fyziologických znaků, konstrukce genových map

- využití biochemických markerů ve studiu interakcí patogen-hostitel, v populační genetice fytopatogenních organismů
- využití isoenzymů a proteinů ve šlechtění a semenářství, a pro účely identifikace odrůd.