

Konstrukce syntetického tabáku

KAMILA SKALICKÁ, ROMAN MATYÁŠEK, ALEŠ KOVAŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř molekulární epigenetiky, Královopolská 135, 61265 Brno, (tel.: 541 517 179, e-mail: skalicka@ibp.cz)

V Laboratoři molekulární epigenetiky se zabýváme studiem struktury a funkce repetitivní DNA u allopolyploidních rostlin. Allopolyploidní druhy vznikají křížením dvou a více příbuzných druhů. Potomstvo takového křížení je sterilní, protože v jádře je přítomna jedna sada chromosomů od každého rodiče a v meiose dochází k nondisjunkci. Teprve po zdvojení chromosomových sad se rostlina stává fertilní (každý chromosom má svého partnera) a může dát vznik novému druhu. Zatímco u některých rodů (například *Tragopogon*) dochází v přírodě ke spontánní allopolyploidizaci s relativně vysokou četností (Cook *et al.* 1998), umělá syntéza fertilních rostlinných hybridů bývá zpravidla málo úspěšná.

Nicotiana tabacum L. (tabák virginský) je allotetraploidní druh ($2n=4x=48$), který vznikl před 5 až 6 miliony lety křížením předků diploidních druhů *N. sylvestris* ($2n=24$; donor mateřského genomu) a *N. tomentosiformis* ($2n=24$; donor otcovského genomu). Asi nejvíce prozkoumanou repetitivní sekvencí je rodina genů kódující ribosomální RNA (rDNA). Na genom připadá řádově tisíce rDNA jednotek, které jsou uspořádány v klastrech. Jednotka rRNA genů 35S se skládá z konzervativních sekvencí (geny pro 26S, 18S a 5,8S rRNA) a nekódujících oblastí (intra- a intergenový spacer), jejichž sekvencí variabilita se využívá k odlišení rDNA jednotlivých druhů. Z předchozích prací (Kovarík *et al.* 1996, Volkov *et al.* 1999) vyplývá, že v průběhu evoluce u tabáku došlo k eliminaci mateřských rDNA. Z otcovských jednotek vznikly mechanismem genové konverze (zahrnuje interlokusovou homogenizaci) tabákově specifické jednotky, které se od otcovských liší strukturou a délkou intergenového *spaceru*.

Byl vývoj rDNA u tabáku rychlý nebo probíhal postupně? Jakou roli hraje v evoluci rDNA allopolyploidie? Jaké další faktory řídí nebo ovlivňují směr evoluce rDNA? Odpověď na tyto a mnoho dalších otázek může dát studium časných stádií evoluce rDNA u linií syntetického tabáku. Většina pokusů o rekonstrukci tabákového genomu skončila neúspěšně. Příčinou je patrně velká evoluční vzdálenost rodičovských druhů (předkové *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* divergovali před 70 miliony lety - Okamuro a Goldberg 1985).

Jednou z dostupných linií syntetického tabáku je linie Th37 (křížení ♀ *N. sylvestris* ($2n=24$) × ♂ *N. tomentosiformis* ($2n=24$)). Klíčivá semena byla získána samosprašením jedné rostliny regenerované v kalusové kultuře vzniklé z F1 generace (Burk 1973). Časnou evoluci rDNA jsme sledovali u čtvrté generace této linie. Z dvaceti náhodně vybraných rostlin jsme u sedmnácti identifikovali nejméně tři nové rDNA varianty otcovského typu (odlišná struktura a délka intergenového *spaceru*). Jejich přítomnost byla většinou provázena úplnou eliminací původních otcovských jednotek. U tří rostlin byly otcovské jednotky zachovány. Mateřské jednotky zůstaly v obou případech nezměněny. Evoluce rDNA u linie Th37 byla tedy potvrzena, avšak zatím probíhá jinak než u tabáku.

Přístupy ke konstrukci syntetického tabáku

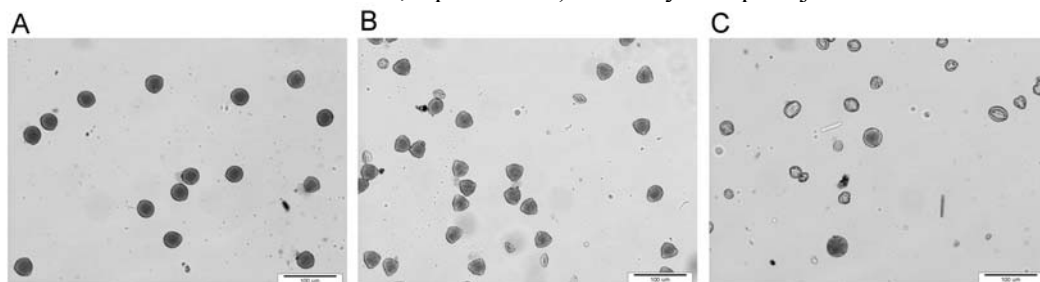
Cílem je získat fertilního křížence s dvěma sadami chromosomů od každého rodičovského druhu.

Námi zvolený přístup kopíruje pravděpodobný vznik tabáku - křížení diploidních rodičovských rostlin (moderní *N. sylvestris* - mateřská rostlina a *N. tomentosiformis* – pylový dárce) a následné zdvojení chromosomových sad u potomků (F1). Další přístup je založen na použití rodičovských rostlin se zdvojeným počtem chromosomů. Křížení tetraploidních rodičů vede k fertilnímu potomstvu. Konečně také křížením tetraploidní *N. sylvestris* a diploidní *N. tomentosiformis* lze získat malé množství fertilních potomků, protože přibližně 1 % pylových zrn má neredukovaný počet chromosomů.

Kromě spontánní diploidizace regenerací kalusových buněk F1 generace můžeme zdvojení chromosomových sad indukovat pomocí inhibitorů dělicího vřeténka (mitotické jedy). Kolchicin, oryzalin, trifluralin, amiprofosmetyl a další látky se přidávají do herbicidů a uplatňují se také ve šlechtitelských programech. Kolchicin a oryzalin byl s úspěchem použit ke zdvojení chromosomových sad například u banánovníku (Hamill *et al.* 1992, vanDuren *et al.* 1996), bramboru (Chauvin *et al.* 2003) nebo cibule (Geoffriau *et al.* 1997). Práce se liší použitím různých vývojových stádií a částí rostlin, koncentrací a dobou působení inhibitorů.

Pracovní postup

1. Křížení. U mateřské rostliny (*N. sylvestris*) zabráníme samosprašení odstraněním tyčinek před otevřením květu (kastrace). Na zralou bliznu (zvlhne 2 až 3 dny po kastraci) aplikujeme dvakrát denně pyl *N. tomentosiformis* až do jejího zaschnutí. Lze použít i pyl zamražený. Semena necháme vyklíčit na MS médiu (Murashige a Skoog 1962) (světelný režim 12 hod tma/12 hod světlo, teplota 26°C). Rostliny dále pěstujeme ve skleníku.



Obr. 1. Pyl *Nicotiana sylvestris* (A), *N. tomentosiformis* (B) a potomka křížení ♀ *N. sylvestris* × ♂ *N. tomentosiformis* ovlivněného oryzalinem (C). Barvení acetokarmínem (vitální pylová zrna jsou šedá, abortovaná jsou bezbarvá). Úsečka = 100 µm.

2. Zdvojení počtu chromosomů u F1 generace – toto je pravděpodobně nejkritičtější fáze experimentu. Lze použít několik následujících metod.
 - 2.1. Regenerace rostlin z kalusové kultury. Kalusovou kulturu založíme ze segmentů listů na MS médiu s přidavkem 2 mg.l⁻¹ kyseliny α-naftyloctové (NAA) a 0,2 mg.l⁻¹ N6-benzyladeninu (BA). Po třetí pasáži (pasáž ~ tři týdny) přemístíme kalus na MS

- médium bez hormonů nebo s obráceným poměrem NAA a BA. Regenerované rostliny po zakořenění přesadíme do skleníku a necháme vykvést.
- 2.2. Působení mitotických jedů. Kromě oryzalinu (v protokolu) se dá použít i kolchicin (pracovní koncentrace 0,01 – 1 %). V porovnání s oryzalinem je však více fyto-toxický.
- 2.2.1. Působení oryzalinu na kalusy. Kalus po třetí pasáži přemístíme na MS médium s oryzalinem. Použijeme více kombinací koncentrace oryzalinu (0,003 - 0,05 %) a doby působení (jeden až sedm dní). Po dobu působení udržujeme médium ve tmě. Pokračujeme regenerací viz. bod 2.1.
- 2.2.2. Působení oryzalinu na vzrostné vrcholy. Použijeme rostliny ze skleníku ještě před vykvetením. Buničitou vatu upevníme na vrchol rostliny nebo do úžlabí listů pomocí parafilmu tak, aby byl zajištěn co největší kontakt s apikálním respektive axilárním meristémem. Vatu prokapáváme dvakrát denně vodným roztokem oryzalinu. Můžeme použít různé kombinace koncentrace oryzalinu (0,003 - 0,05 % vodný roztok) a doby působení (jeden až sedm dní). Po dobu působení rostlinu umístíme do tmavého a vlhkého prostředí. Rostliny pak necháme vykvést.
- 2.2.3. Působení oryzalinu na rostlinné segmenty. Na vrcholové a stonkové segmenty rostlin působíme vodnými roztoky oryzalinu viz. bod 2.2.2. (na třepačce, tma). Po ukončení působení segmenty přemístíme na MS médium a po zakořenění je přesadíme do skleníku.
- 2.2.4. Působení oryzalinu na semena a klíčící rostlinky. Semena necháme klíčit ve vodných roztocích oryzalinu nebo na MS médiu s oryzalinem (viz. body 2.2.1 nebo 2.2.2). Potom klíčící rostlinky přemístíme na MS médium a později do skleníku.
3. Ověření fertility rostlin.
- 3.1. Barvení pylu acetokarmínem. Vitální pylová zrna se barví červeně, abortovaná se nebarví.
- 3.2. Tvar pylových zrn. Vitální pylová zrna jsou větší a kulatá, abortovaná menší a svrasklá.
- 3.3. Produkce semen.

V prezentaci budou uvedeny a diskutovány dosažené výsledky.

Literatura

- Burk, L. G. 1973. - J. Hered. **64**: 348.
- Cook, L.M., Soltis, P.S., Brunsfeld, S.J., Soltis, D.E. 1998. - Mol. Ecol. **7**: 1293.
- Geoffriau, E., Kahane, R., Bellamy, C., Rancillac, M. 1997. - Plant Sci. **122**: 201.
- Hamill, S.D., Sharrock, S.L., Smith, M.K. 1992. - Plant Cell Tissue Organ Cult. **33**: 343.
- Chauvin, J.E., Souchet, C., Dantec, J.P., Ellis-seche, D. 2003. - Plant Cell Tissue Organ Cult. **73**: 65.
- Kovarík, A., Fajkus, J., Koukalová, B., Bezdek, M. 1996. - Theor. Appl. Genet. **92**: 1108.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. - Physiol. Plant. **15**: 473.
- Okamuro, J.K., Goldberg, R.B. 1985. - Mol. Gen. Genet. **198**: 290.
- vanDuren, M., Morpurgo, R., Dolezel, J., Afza, R. 1996. - Euphytica **88**: 25.
- Volkov, R.A., Borisjuk, N.V., Panchuk, I.I., Schweizer, D., Hemleben, V. 1999. - Mol. Biol. Evol. **16**: 311.

Poděkování Tato práce je podporována z grantových projektů 204/01/0313 a 521/01/0037.

