

1.

MODELOVÉ OBJEKTY

Kľúčové slová: *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, *Drosophila melanogaster*, *Chlamydomonas reinhardtii*, mutantné línie, rozmnožovanie, *Saccharomyces cerevisiae*, *Triticum aestivum* L., virulencia, životný cyklus

Princípy dedičnosti prvýkrát opísal Johann Gregor Mendel v 19. storočí a ako experimentálny organizmus použil hrach siaty (*Pisum sativum*). Odvtedy sa na genetické experimenty používa množstvo rôznych modelových organizmov. Pod pojmom modelový organizmus rozumieme vo všeobecnosti taký organizmus, ktorý čo najlepšie umožňuje riešiť určité špecifické otázky a problémy. Genetika ako vedný odbor neustále napreduje s čím súvisí aj nevyhnutnosť hľadať nové organizmy potrebné pre výskum jednotlivých špecifických problémov. V tejto kapitole je uvedený len stručný prehľad najčastejšie používaných modelových objektov, s ktorými sa študenti môžu stretnúť na základných cvičeniach z genetiky.

Vlastnosti, ktoré by mal modelový organizmus spĺňať:

- ♦ relatívne krátky životný cyklus, ktorý pomerne rýchlo umožňuje získať veľký počet generácií,
- ♦ dostatočne početné potomstvo z kríženia,
- ♦ jednoduchá manipulácia s modelovým objektom, t. j. možnosť jednoduchého chovu a kríženia,
- ♦ genetická variabilita medzi jedincami v populácii, t. j. existencia línií s rozdielnymi geneticky podmienenými znakmi,
- ♦ malý počet chromozómov.

Ako modelové objekty sa používajú organizmy s prokaryotickou aj eukaryotickou štruktúrou bunky. Spomedzi prokaryotických sa najčastejšie využíva baktéria *Escherichia coli*, ktorá sa uplatnila najmä pri štúdiu regulácie génovej expresie a s ňou sú takisto spojené začiatky výskumu v oblasti molekulárnej biológie a rekombinantných DNA.

Eukaryotické modelové objekty môžu byť jednobunkové alebo mnohobunkové. Spomedzi jednobunkových sa najčastejšie využívajú kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), prvoky (*Tetrahymena* a *Paramecium*) a zelená riasa (*Chlamydomonas reinhardtii*). Z mnohobunkových organizmov sú to najmä mikroskopická huba (*Neurospora crassa*), rastlinné modelové objekty arábovka thalová (*Arabidopsis thaliana*), hrach siaty (*Pisum sativum*), kukurica siata (*Zea mays*), jačmeň siaty (*Hordeum vulgare*) a pšenica letná (*Triticum aestivum*). Medzi živočíšne modelové objekty patria okrem iných aj nematóda (*Caenorhabditis elegans*), drozofila obyčajná (*Drosophila melanogaster*), myš domáca (*Mus musculus*), kur domáci (*Gallus domesticus*). V neposlednom rade je predmetom genetických analýz i človek so svojimi špecifikami.

Saccharomyces cerevisiae

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jednobunkový heterotrofný eukaryotický mikroorganizmus s komplexnou organizáciou cytoplazmy podobnou bunkám vyšších eukaryotov. Povrch bunky je obklo-

pený silnou bunkovou stenou, pod ktorou sa nachádza cytoplazmatická membrána uzatvárajúca cytoplazmu s rôznymi štruktúrami (jadro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly, Golgiho aparát).

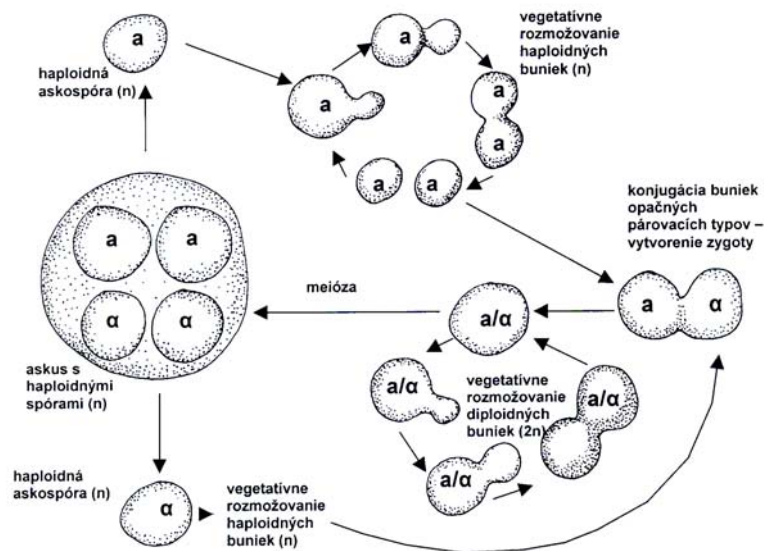
Morfológia kvasiniek – bunky sú najčastejšie elipsoidné, vajcovité až guľovité.

Rozmnožovanie:

- nepohlavne – sa rozmnožuje pučaním. Na povrchu materskej bunky sa v okolí jedného bodu štruktúra bunkovej steny pozmení a na tomto mieste sa objaví púčik. Puk postupne rastie až veľkosťou dosiahne rozmery materskej bunky. Medzitým sa jadro mitoticky rozdelí na dve a jedno z nich prejde do dcérskej bunky, uzavretím septa a dotvorením bunkovej steny sa obe bunky navzájom oddelia. Zriedkavejšou formou vegetatívneho rozmnožovania kvasiniek je priehradkové delenie, ktoré je typické iba pre rod *Schizosaccharomyces*.

- pohlavne – popri vegetatívnom rozmnožovaní je známy aj pohlavný spôsob rozmnožovania (obr. 1.1), ktorý vo všeobecnosti charakterizuje splyvanie dvoch haploidných buniek, dvoch fyziologicky odlišných párovacích typov a a α a ich jadier za vzniku diploidnej bunky – zygoty. Zygoty majú typický piškótovitý tvar. Zygoty môžu vegetatívnym mitotickým delením jadier vytvoriť diploidné potomstvo, ktorého bunky môžu meiózou (v prírode za nepriaznivých podmienok) vytvoriť haploidné spóry. Spóry môžu mitózou vytvoriť vegetatívne haploidné potomstvo. Väčšina kvasiniek tvorí ako výsledok pohlavného rozmnožovania *askospóry*, čo sú endospóry umiestnené v asku. Askus môže mať romboidný, lineárny alebo pyramídálny tvar. Tvar askov závisí od pôvodného tvaru materskej bunky, ktorý je u kvasinkových kmeňov variabilný aj v rámci toho istého kmeňa. V základných parametroch sú však veľkosť a tvar bunky druhovo ba i kmeňovo špecifické.

V súvislosti so sexuálnym správaním sa kvasiniek sa najčastejšie stretávame s termínmi heterotalizmus a homotalizmus. Termínom homotalizmus označujeme schopnosť samo-oplodnenia. Bunky toho istého kmeňa môžu kopulovať aj medzi sebou. Medzi haploidnými kmeňmi heterotalických druhov rozoznávame dve alebo viac skupín z hľadiska ich párovacieho správania sa. Kmene nekonjugujúce medzi sebou tvoria skupinu, ktorú nazývame párovým alebo párovacím typom (mating-type). Tieto párovacie typy sa nelíšia morfológicky, ale iba fyziologicky.



Obr. 1.1 Životný cyklus *Saccharomyces cerevisiae*

Veľkosť bunky je ovplyvnená i ploíditou:

- haploidné bunky – sú najmenšie, okrúhle a často aglutinujú do zhlukov,
- diploidné bunky – sú väčšie, oválne a individualizované – nezhlukujú sa,
- triploidné bunky – sú ešte väčšie, oválne, alebo tvarovo nepravidelné.

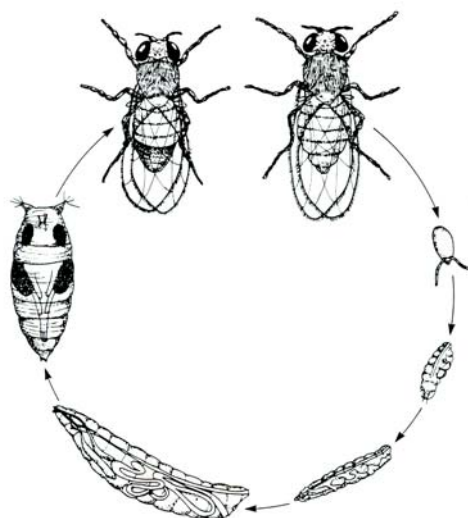
Drosophila melanogaster

Prvým systematicky používaným organizmom pri štúdiu dedičnosti sa stala drozofila obyčajná *Drosophila melanogaster*, ktorá patrí medzi holometabolický hmyz (trieda *Insecta*, rad *Diptera*). Použitie *Drosophila melanogaster* bolo definitívnym dôkazom o tom, že prevažná väčšina génov je uložená v chromozómoch. Výsledky hybridizačných pokusov boli v dokonalom súlade s výsledkami karyologických štúdií, ktoré sú v tomto modeli zjednodušené existenciou polyténnych chromozómov a faktom, že diploidná sada $2n = 8$. Zásluhou Morganovej školy došlo k využitiu drozofily ako genetického modelu v dvadsiatych rokoch 20. storočia a je ním až dodnes. Výhodou je aj veľký počet izolovaných mutantných línií tohto modelového objektu. Niektoré z nich sú uvedené nižšie v texte (tab. 1.1).

Tabuľka 1.1
Ukázkové línie *Drosophila melanogaster*

Línia	Genotyp	Fenotyp
norma	++	štandardný
<i>white (w)</i>	<i>ww</i>	biela farba očí
<i>cut (ct)</i>	<i>ctct</i>	zrezané krídla
<i>vermillion (v)</i>	<i>vv</i>	jasnočervená farba očí
<i>vestigial (vg)</i>	<i>vgvg</i>	zakrpatené krídla
<i>curly (cy)</i>	<i>cycy</i>	vyhnuté krídla, výrez
<i>ebony (e)</i>	<i>ee</i>	čierna farba tela
<i>sépie (se)</i>	<i>sese</i>	hnedočervená farba očí, dospelosťou tmavne

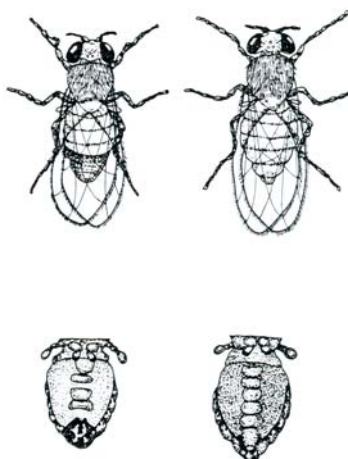
Životný cyklus – *Drosophila melanogaster* má nepriamy vývin charakteristický dvoma kompletne odlišenými fázami (obr. 1.2). Po fertilizácii a vzniku zygoty nasleduje embryonálny vývin. Z vajíčka sa liahne larva, ktorá sa počas metamorfózy transformuje na dospelé štádium (imágo). Dĺžka životného cyklu je závislá od teploty (optimum je 25 °C) i od živného média, v ktorom prebieha vývin.



Obr. 1.2 Životný cyklus *Drosophila melanogaster*. V smere hodinových ručičiek od dospelého jedinca (vľavo samček a vpravo samička) je vajíčko, tri stupne larválneho štádia a kukla

Embryonálny vývin trvá okolo 24 – 25 hodín. Larválny vývin okolo 4 – 5 dní. Štádium kukly 3 – 4 dni. Pri izbovej teplote celkový vývin trvá 14 dní. Vajíčko meria 0,5 mm, má dva výrastky, ktorými sa pridržiava povrchu pôdy. Pri oplodnení je jadro vajíčka len v štádiu metafázy heterotypického delenia meiózy. Po vniknutí spermie do vajíčka, sa dokončí meióza a pri karyogamii vznikne zygota. Samička kladie vajíčka buď hneď po oplodnení, alebo oplodnené vajíčka ostávajú v materskom organizme až do konca embryonálneho vývinu.

Larva – larválne štádium pozostáva z dvoch lienení, ktoré sa končia zakuklením. Pred zakuklením larva meria okolo 4 – 5 mm. Larvy sa zavrtávajú do pôdy. **Kukla** – larvy tesne pred zakuklením vyliezajú z pôdy na steny skúmaviek. Mladé larvy sú priehľadné, biele, larvy z posledného lienenia sú žltkasté až hnedasté s tvrdším povrchom. **Imágo** – mladé, nedávno vyliahnuté jedince majú skrčené krídla, predĺžené telo a sú slabšie vyfarbené. Muchy sa môžu oplodniť po 8 hodinách od vyliahnutia. Ak potrebujeme pri krížení virgínne (neoplozené) samičky musíme ich čo najskôr od vyliahnutia izolovať (ideálne po 3 – 4 hodinách od vyliahnutia). Samička má na konci tela kladielko, zašpicatený análny otvor a je zvyčajne väčšia ako samček. Samček je menší, koniec tela má tmavo pigmentovaný a zaokrúhľený (obr. 1.3).



Obr. 1.3 *Drosophila melanogaster* samček ♂ (vľavo) a samička ♀ (vpravo), v spodnej časti obrázku abdomen samčeka ♂ (vľavo) a samičky ♀ (vpravo)

Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii je jednobunková zelená riasa. Tento modelový organizmus nesie vlastnosti, vďaka ktorým stojí na rozhraní rastlinnej aj živočíšnej ríše. Rastlinnú ríšu tu charakterizuje fotoautotrofný spôsob výživy (prítomnosť chloroplastu) a živočíšnu ríšu schopnosť heterotrofnej až mixotrofnej výživy (len za určitých podmienok prostredia), prítomnosť bičíkov a stigmy. Bunková stena nie je typicky rastlinná, namiesto celulózy ju tvoria glykoproteíny.

Morfológia – bunky majú oválny až guľovitý tvar. Pohybujú sa pomocou dvoch anteriórne umiestnených bičíkov. Pri kultivácii buniek na pevnom médiu sa bičičky strácajú, v tekutom médiu sa obnovujú a majú význam aj pri pohlavnom rozmnožovaní. Za fototaktickú odpoveď bunky zodpovedá stigma, ktorá leží pod cytoplazmatickou membránou. Bunkové organely sú podobné ako pri ostatných rastlinných bunkách. Kým mitochondrie zaberajú len 1 – 3 % objemu bunky, jediný pohárkovitý chloroplast vyplňa až 40 % objemu bunky. Na vyrovnávanie osmotického tlaku slúžia dve kontraktilné vakuoly uložené v prednej časti bunky.

Charakteristika jadrového genómu: Chromozómy *C. reinhardtii* sú veľmi malé a nedajú sa vizualizovať svetelným mikroskopom. Počet väzbových skupín stanovených základnými genetickými metódami je 17.

Charakteristika mimojadrových genómov: Mimojadrový genetický materiál je lokalizovaný v mitochondriách a chloroplaste. Chloroplastový genóm tvorí 195 kb kruhová molekula DNA, ktorá je v chloroplaste prítomná v 75 – 80 kópiách. Tieto molekuly sú organizované do 8 – 10 nukleoidov. Pri krížení dochádza k nemedelisticému, uniparentálnemu prenosu genetického materiálu po rodičovi mt^+ párovacieho typu do všetkých zoospór. Mitochondriálny genóm má dĺžku 15,8 kb, je lineárny a v bunke sa nachádza v 40 – 60 kópiách. Vykazuje uniparentálnu dedičnosť po rodičovi mt^+ párovacieho typu.

Životný cyklus – za určitých restriktčných podmienok prostredia sa z haploidných buniek diferencujú gaméty, ktoré sa rozpoznávajú prostredníctvom špeciálnych glykoproteínov (aglutiníny) na povrchu ich bičiek. Opačné párovacie typy (mt a mt^+) sa spájajú do štvorbičikatých zygot. Po fúzii cytoplazmy odhadzujú bičiky a pôvodnú bunkovú stenu nahrádzajú novou. Zygota sa v tomto štádiu nazýva zygospórou. Po krátkom období prechádza meiózou, ktorej výsledkom sú štyri vegetatívne haploidné bunky. Za štandardných podmienok sa *C. reinhardtii* rozmnožuje nepohlavne. Diploidný stav sa udržiava len krátko na úrovni zygoty. Bunkový cyklus trvá približne 24 hodín. Skladá sa z dvoch hlavných fáz: rastovej (za prítomnosti svetla) a reprodukčnej (za tmy), ktoré sa periodicky opakujú. Výsledkom je rozdelenie materskej bunky na 2, 4, 8, 16, 32 alebo až 64 buniek v závislosti od dĺžky svetelnej fázy. Po degradácii materskej bunkovej steny uvoľnené dcérske bunky vstupujú do nového cyklu.

Pšenica letná (*Triticum aestivum* L.) – múčnatka trávová na pšenici (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*)

Tieto dva biologické druhy, z ktorých jeden je hosťiteľom (pšenica) a druhý patogénom (múčnatka) slúžia ako modelové objekty na štúdium genetickej determinácie hosťiteľsko-parazitického vzťahu. Tak schopnosť hosťiteľa odolávať napadnutiu patogéna, ako aj schopnosť patogéna prekonať obranné mechanizmy hosťiteľa sú dedične podmienené. Pri monogénne podmienenej odolnosti bývajú zvyčajne gény odolnosti (rezistencie) dominantné, kým náchylnosť (senzitivitu) podmieňujú väčšinou recesívne alely. V prípade patogéna je to naopak, schopnosť prekonať obranné reakcie hosťiteľa zabezpečujú recesívne alely virulencie, kým dominantné alely avirulencie nie sú schopné zabezpečiť prekonanie týchto reakcií. Vzájomné vzťahy medzi genetickými systémami hosťiteľa a patogéna prvýkrát opísal Flor v roku 1955. Podľa jeho hypotézy „gén proti génu“ konkrétnemu génu rezistencie hosťiteľa zodpovedá konkrétny gén virulencie patogéna. Alebo tiež, koľko génov rezistencie má hosťiteľ, minimálne toľko zodpovedajúcich génov virulencie musí mať patogén, aby bol schopný hosťiteľa napadnúť (tab. 1.2).

Tabuľka 1.2
Schéma hosťiteľsko-parazitických vzťahov

Genotyp hosťiteľa	Genotyp patogéna	
	V_1^-	V_1V_1
R_1^-	-	+
r_1r_1	+	+

V schéme je znamienkom (-) označená výsledná fenotypová reakcia odolnosti (inkompatibilná reakcia) a znamienkom (+) fenotypová reakcia náchylnosti (kompatibilná reakcia). Z týchto reakcií zároveň vyplýva, že gén rezistencie R_1 môže zabezpečiť odolnosť len v tom prípade, ak je rastlina inokulovaná (nainfikovaná) iba avirulentným patogénom V_1^- . V prípade, že patogén nesie zodpovedajúce recesívne alely virulencie (v_1v_1), gén rezistencie R_1 je prekonaný a výsledkom je kompatibilná reakcia (na rastline sa prejaví príznaky ochorenia).

Pri existencii viacerých génov rezistencie a viacerých génov virulencie platia rovnaké pravidlá (vzťahy) ako v prípade jedného génu rezistencie voči jednému génu virulencie.

Príklad:

Odroda pšenice letnej Walter má vo svojom genotype gény rezistencie $Pm1+Pm2+Pm4b+Pm9$. Ktorý z nasledujúcich genotypov (patotypov P1 – P3) patogéna s uvedenými virulenciami:

P1: $v1 + v4b + v9$,

P2: $v1 + v2 + v4b + v9$,

P3: $v1 + v2 + v4b + v17 + v24$,

je túto odrodu schopný napadnúť (parazitovať na odrode)?

Iba patotyp P2, pretože má všetky zodpovedajúce gény virulencie voči génom rezistencie, ktoré má odroda Walter. Patotyp P3 nebude schopný napadnúť túto odrodu i napriek tomu, že má sumárne až 5 génov virulencie, pretože mu chýba gén virulencie *v9*. Ostatné virulencie (*v17* a *v24*) sú nadbytočné.

Inkompatibilná fenotypová reakcia je prejavom pôsobenia génu rezistencie, kým kompatibilná reakcia je prejavom pôsobenia buď génu virulencie, alebo avirulencie.