



bulletin

České společnosti
experimentální biologie rostlin
a
Fyziologické sekce
Slovenské botanické společnosti



podzim 2009
5. Metodické dny
sborník abstrakt

Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin

Vychází dvakrát ročně
Registrační číslo MK ČR E 13255

podzim 2009
Toto číslo bylo dáno do výroby v říjnu 2009

Toto číslo připravil organizační tým konference 5. Metodické dny

Sazba TFSOFT, www.tfsoft.cz
Tisk SERIFA, s. r. o., Jinonická 80, Praha 5

Praha 2009

1. vydání

Náklad 250 výtisků

Toto číslo neprošlo jazykovou ani redakční úpravou

ISSN 1213-6670

5. METODICKÉ DNY

HOTEL PETR BEZRUČ, BESKYDY
11.–14. ŘÍJNA 2009

VĚDECKÁ RADA SYMPOZIA

Aleš Kovařík (BFÚ AV ČR)
Jiří Macas (ÚMBR AV ČR)
Jan Martinec (ÚEB AV ČR)
Jan Petrášek (ÚEB AV ČR, PíF UK)

ORGANIZAČNÍ TÝM

Tomáš Feltl
Miloslava Fojtová
Daniela Kocourková
Aleš Kovařík
Jiří Macas
Jan Martinec
Přemysl Pejchar
Jan Petrášek



Další informace najdete na www.ueb.cas.cz/methods



Vážené kolegyně, vážení kolegové,

mám tu čest pozdravit Vás při otevření stránek tohoto mimořádného čísla Bulletinu České společnosti experimentální biologie rostlin.

Dovolím si využít i tuto příležitost, abych připomněl nejen existenci naší společné profesní organizace (ČSEBR), ale zejména některé její aktivity. Kromě klasických a snad smím napsat i oblíbených Dnů fyziologie rostlin se činnost ČSEBR sice pomaloučku, ale přeci jen množí. Snad bych mohl napsat, že v souladu s postupným oceňováním významu biodiverzity pro lidstvo snažíme se i my tuto diverzitu iniciovat, podporovat a udržovat.

V letošním roce se v Brně konala velmi úspěšná Konference mladých (Dny mladých), která navázala na předchozí ročníky a bude pokračovat v roce 2010.

Česká společnost experimentální biologie rostlin společně s Katedrou fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy připravila dva celostátní semináře věnované jednak problematice ekologického zemědělství (leden 2009) a jednak fotosyntéze (květen 2009). Některé z přednesených příspěvků vyjdou v dalším čísle Bulletinu na podzim 2009.

S pravidelným, byť politováníhodným zpožděním vyšlo letos na jaře další číslo Bulletinu. Pokud budete mít náladu podívat se na jeho obsah a napsat příspěvek či jen svůj názor, budu vděčný.

Velkou novinkou jsou webové stránky ČSEBR. Zkuste si, prosím, na ně „kliknout“ a podívat se: www.csebr.cz. Věřím, že se nejen na některé informace rádi podíváte, ale že Vás napadne leccos na jejich vylepšení. Ale opět: Vítáno bude i Vaše zdůvodnění, proč nejsou k ničemu.

A poslední sdělení: V roce 2010 ve dnech 14. až 17. září se bude konat Konference experimentální biologie rostlin (dříve Dny fyziologie rostlin) v Praze. Po úspěšných dnech před pěti lety v Bratislavě a neméně krásných i zajímavých před dvěma lety v Olomouci nebude jednoduché prodloužit jejich vzrůstající úroveň i oblibu. Dovoluji si Vás s předstihem na tuto Konferenci 2010 pozvat s prosbou o včasnou rezervaci tohoto termínu ve Vašich diářích.

Přeji Vám krásný pobyt na letošních Metodických dnech. Zajímavý, přínosný i člověcky milý. A organizátorům, těm, kteří Konferenci vlastními hlavami a vlastníma rukama připravili, upřímně děkuji.

Děkuji a těším se na setkání při některých z množících se aktivit České společnosti experimentální biologie rostlin.

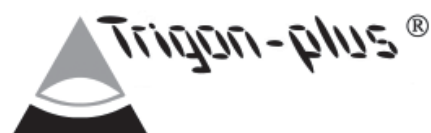
Září 2009

Lubomír Nátr
předseda ČSEBR



S Sponzoři

SYMPOZIUM SE KONÁ DÍKY FINANČNÍ PODPOŘE TĚCHTO FIREM:





Obsah a úvod

OBSAH

Úvodní slovo k 5. Metodickým dnům	5
Program	6
Přednášky (řazeny podle programu).	8
Plakátová sdělení (řazena abecedně podle příjmení prezentujícího autora) . . .	44
Rejstřík autorů	101
Podrobný obsah	102
Seznam účastníků	104

ÚVODNÍ SLOVO K 5. METODICKÝM DNŮM

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

vítejte na pátém ročníku Metodických dnů. Po Jevišovické pahorkatině, Jeseníkách, Žďárských vrších a Šumavě se scházíme v Beskydech. Než se pustíte do čtení souhrnů příspěvků tohoto ročníku a jejich vlastního sledování, dovolte nám pár slov úvodem.

Když jsme v roce 1997 ve Vranovské Vsi uspořádali první metodicky zaměřenou konferenci, vstupovali jsme na velmi neprobádané pole. Byli jsme nicméně přesvědčeni, že je potřebné se jednou za čas sejít na národní úrovni a zaměřit se na metodickou stránku naší práce. Hlavním cílem akce bylo zejména sdílení zkušeností, které jednotlivé laboratoře, či konkrétní lidé, získali často s využitím nově pořizovaných nákladných zařízení. Dobrý ohlas ze strany účastníků, domácích experimentálních rostlinných biologů, nás postupně vedl k uspořádání dalších ročníků v tříletých intervalech. Myšlenka výměny a sdílení experimentálních zkušeností přetrvávala a přilákala na každý další ročník vždy okolo 150 účastníků. Naši snahou bylo nabídnout pohled na co nejširší spektrum metod experimentální práce s molekulami DNA, RNA a proteinů. Snažili jsme se o alespoň stručný přehled instrumentálních metod používaných ke sledování metabolitů, či nejrůznějších fyziologických parametrů. Vždy jsme mysleli na mikroskopické techniky.

Na minulých ročnících byla zařazena sekce „Z jiných světů“, neboť širší náhled na svět a život v něm určitě potřebuje každý výzkumník. Letos byla tato sekce přejmenovaná. V diskuzi jsme si totiž uvědomili, že „Jiné světy“ vlastně žádné jiné světy nejsou, a být ani nemohou, a že je tedy jméno sekce špatné a zavádějící. Dnes tedy máme obecněji pojatou sekci „Mimo nomy“, kam se skryje vše, co je důležité, ale není to ani genom, ani transkriptom, ... ani metabolom. Doufáme, že sekci oceníte.

Vždy je co zlepšovat, vždy je možné dělat věci jinak. Ani letos se nepodařilo realizovat všechny nápady a návrhy, které k nám v souvislosti s konferencí dorazily. Ať už se týkaly programu, či samotné organizace akce. Za jakékoliv připomínky jsme nicméně vděční, jsme otevření kritice, může být jen ku prospěchu nás všech. Nešetřete nás, zpětná vazba je důležitá.

Letos jsme se také rozhodli nově zúročit všechny dosavadní Metodické dny a vytvořit specializovaný web (www.rosmednet.cz). Počáteční sumu informací budou tvořit všechny doposud prezentované příspěvky účastníků Metodických dnů.

Přejeme příjemný pobyt, nová setkání a vzájemné obohacení.

V Praze dne 1. 10. 2009

Jan Petrášek a Jan Martinec

NEDĚLE 11. 10. 2009

16.00–19.30	Registrace	
18.30–19.30	Večeře	
19.30–19.45	Zahájení sympozia	
	Sekce Mimo nomy	
19.45–21.15	<i>D. Storch</i> : Věk Darwina: Původ druhů po 150 letech	8
22.00– 0.00	Welcome party	

PONĚLÍ 12. 10. 2009

7.15– 8.00	Registrace	
	Sekce Genom – Nové technologie (předsedkyně H. Štorchová)	
8.15– 9.05	<i>J. Macas</i> : Nová generace sekvenačních technologií: principy a aplikace	9
9.05– 9.45	<i>Č. Vlček</i> : 454 pyrosekvenování: volba pro nové genomové projekty	9
9.45–10.10	<i>E. Hřibová</i> : Využití 454 sekvenování pro analýzu repetitivní DNA banánovníku (<i>Musa acuminata</i> spp.)	10
10.10–10.40	Přestávka, prezentace firem, registrace	
10.40–11.10	<i>H. Šimková</i> : Chromozomální genomika – klíč ke studiu velkých genomů	11
11.10–11.30	<i>J. Bartoš</i> : Konstrukce fyzické mapy chromozómu 3DS pšenice.	12
11.30–12.00	<i>R. Hobza</i> : Na co se můžeme ptát dvoudomých rostlin?	13
12.00–12.15	<i>H. Kubeková</i> : Srovnávací genomika pohlavních chromozomů rostlin aneb jak číst v „bakových“ knihovnách.	14
12.15–12.35	<i>T. Mandáková</i> : Studium evoluce karyotypu v čeledi brukvovitých (<i>Brassicaceae</i>) metodou komparativního chromosomálního paintingu	15
12.35–14.00	Oběd	
	Sekce Mimo nomy	
14.00–14.45	<i>L. Kohout</i> : Patenty – co, jak, kdy a proč.	16
	Sekce Transkriptom – Expres genové informace a její regulace (předseda J. Macas)	
14.45–15.15	<i>P. Neumann</i> : Analýza transkriptomu pomocí masivně paralelního sekvenování.	16
15.15–16.00	<i>N. Dupláková</i> : Čipové technologie – možnosti a limity	17
16.00–16.30	Přestávka, prezentace firem	
16.30–17.00	<i>S. Hafidh</i> : Cell-specific molecular vectors for functional genomics	18
17.00–17.20	<i>J. Libus</i> : Izolace buněčných typů <i>Arabidopsis thaliana</i> pro studium genové exprese – optimalizace metody	18
17.20–17.40	<i>H. Štorchová</i> : Stanovení hladin transkriptů u rozvětvených rodin rostlinných genů představuje tvrdý oříšek – jde však rozlousknout	19
17.40–18.00	<i>A. Kovařík</i> : Metody analýzy epigenomu	19
18.00–19.00	Večeře	
	Firemní prezentace	
19.30–19.45	<i>East Port</i> : Promega Maxwell 16 – automatická izolace DNA	
19.45–19.55	<i>Dialab</i> : Nabídka přístrojů pro mikrotitrační instrumentaci firmy Biotek	
19.55–20.35	<i>Applied Biosystems</i> : SOLiD3 Plus = NextGen sequencing technology accessible to any lab. A highly sensitive approach in global transcriptome and genome analysis.	
20.35–21.00	<i>PSI</i> : Optické neinvazivní zobrazovací a nezobrazovací techniky v biologii	

ÚTERÝ 13. 10. 2009

Sekce **Proteom – Proteiny a jejich funkce** (předseda A. Kovařík)

8.15– 9.00	M. Novotný: Modelujeme s modely aneb predikce a analýza proteinových struktur.	20
9.00– 9.45	P. Jedelský: Hmotnostní spektrometrie v proteomice	20
9.45–10.05	J. Fíla: Fosfoproteomika	21
10.05–10.35	Přestávka, prezentace firem	
10.35–11.20	J. Horák: Studím protein-proteinových interakcí rostlinných proteinů <i>in vivo</i> : Y2H, BiFC, MeRA	22
11.20–11.40	K. Kosová: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2D-DIGE) a její využití ve výzkumu rostlinného proteomu	23
11.40–12.00	P. Procházková-Schrumpfová: <i>In vitro</i> translace a imunoprecipitace: problémy a jejich řešení . . .	24
12.00–12.30	J. Rolčík: Imunoafinitní purifikace v analýze fytohormonů	25
12.30–14.00	Oběd	
14.00–18.30	Exkurze – Kopřivnice, Bílý Kříž	
18.30–19.30	Večeře	
19.30–20.15	Plakátová sekce – lichá čísla	
20.15–21.00	Plakátová sekce – sudá čísla	

STŘEDA 14. 10. 2009

Sekce **Funkční analýza biomolekul** (předseda J. Petrášek)

8.15– 9.00	B. Vyskot: Epigenetika rostlin	26
9.00– 9.45	T. Nodzyński: A forward genetics screen – perspectives and pitfalls	27
9.45–10.05	T. Moravec: Kterak ze dvou zmetků vytvořit funkční virus a k čemu je to dobré	28
10.05–10.35	Přestávka, prezentace firem	
10.35–11.20	A. Komárek: Biolog statistikem nebo spíše statistika pro biologa?	29
11.20–11.40	K. Hoyerová: Modelování toku auxinu – limity, úskalí a perspektivy	29
12.00–13.30	Oběd	
13.30–14.10	Sekce <i>Mimo nomy</i> J. Berek: Polarografie včera, dnes a zítra – 50 let od udělení Nobelovy ceny.	30
14.10–14.55	Sekce <i>Mikroskopie a analýza obrazu</i> (předseda B. Vyskot) O. Šebesta: Cestou konfokální mikroskopie	31
14.55–15.15	J. Petrášek: Praktický průvodce méně běžnými metodami konfokální mikroskopie u rostlin aneb konfokál není jen foťák na pěkné obrázky	31
15.15–15.45	Přestávka, prezentace firem	
15.45–16.30	D. Chernyavskiy: Practical notes on Fluorescence Lifetime IMaging	32
16.30–17.10	J. Albrechtová: Analýza trojrozměrných dat získaných konfokální mikroskopií aneb co s daty s použitím stereologických metod	33
17.10–17.25	V. Krpeš: Deformace mezofylových pletiv v jehlicích smrku a jejich diferenciaci po oxidativním působení ozonu nebo biotickými faktory	34
17.25–18.05	Sekce <i>Mimo nomy</i> J. Kolář: Proč nás lidi nemaj rádi: popularizace je nutnost, ne luxus. Jak na ni?	35
19.30	Společenská večeře	
20.30	Zakončení sympozia, tombola, hudba k tanci	

VĚK DARWINA: PŮVOD DRUHŮ PO 150 LETECH

DAVID STORCH

Centrum pro teoretická studia, Universita Karlova v Praze, Jilská 1, Praha 1, 110 00

E-mail: storch@cts.cuni.cz, tel.: +420 603 469 579

Čtení Darwinova Původu druhů přirozeným výběrem je i dnes strhující zážitek, inspirativní zvláště ve srovnání se současnou podobou evoluční biologie. Je pozoruhodné, kolik Darwinových představ (v knize často jen letmo nastíněných) přežilo téměř beze změny těch 150 let a kolik z jeho víceméně zapomenutých koncepcí se dnes dokonce znovu vrací na scénu. Neméně pozoruhodné jsou jemné, ale často velmi ilustrativní rozdíly mezi Darwinovými představami a současným pohledem na některé oblasti evoluce. Darwinova teorie není jen jednou z biologických teorií; je to zároveň grandiózní vize světa, kde každá jednotlivost má svůj smysl v rámci kosmického evolučního příběhu, kterému lze rozumět a který lze rekonstruovat. Schopnost rekonstrukce evolučního příběhu je Darwinovým dědictvím, které v současné době zažívá ohromující rozkvět.

P Přednášky

NOVÁ GENERACE SEKVENAČNÍCH TECHNOLOGIÍ: PRINCIPY A APLIKACE

Jiří MACAS

Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 31, 37005 České Budějovice, ČR
E-mail: macas@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 516

Sekvenování DNA je jednou ze základních technik současné molekulární biologie, avšak jeho cena a rychlost mají často negativní dopad na rozsah a zaměření prováděných experimentů. To je zřejmé zvláště při výzkumu genomů a transkriptomů, kde je sekvenování hlavním limitujícím faktorem a nutí experimentátory vybírat si z hlediska analýz co nejjednodušší modelové objekty (např. druhy s co nejmenšími genomy, které však mají pro rostliny netypicky nízký obsah repetitivní DNA). Snahy o zdokonalení klasických sekvenačních postupů optimalizací reakčních podmínek Sangerova sekvenování a zavedením automatizace přípravy a analýzy vzorků sice vedly k urychlení a zlevnění sekvenačních analýz, avšak v mnoha ohledech už zřejmě dosáhly svých limitů. Proto byla pozornost zaměřena na vývoj principiálně nových postupů, které by vedly k řádově rychlejšímu a levnějšímu sekvenování a umožnily např. sekvenovat genom člověka za \$1000. Výsledkem tohoto snažení je zavádění sekvenačních technologií nové generace ("next-generation sequencing"), které jsou založeny na masivní paralelizaci a miniaturizaci sekvenačních reakcí. Přednáška se bude zabývat principy, implementací a dostupností těchto technologií v našich podmínkách, a dále jejich možnými aplikacemi v různých směrech biologického výzkumu.

454 PYROSEKVENOVÁNÍ: VOLBA PRO NOVÉ GENOMOVÉ PROJEKTY

ČESTMÍR VLČEK

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, Praha, 14200
E-mail: vlcek@img.cas.cz, tel.: 606 533 732

Sekvenční platformy nové generace (next-generation sequencing) dávají velkou naději pro rychlejší a hlubší průzkum obrovské genetické diverzity. Nezbytným předpokladem pro úspěšné stanovení neznámých prokaryontních a eukaryontních genomů je schopnost produkovat párová čtení spojená a dosažením průměrné délky těchto čtení v rozsahu několika stovek bazí. Tyto možnosti v současné době nabízí pouze platforma nazvaná 454 pyrosekvenování, kterou dodává firma Roche. V letošním roce je standardem 454 pyrosekvenování produkce 500 Mb sekvenčních dat v jednom běhu sekvenátoru, který trvá 10 hodin. Při průměrné délce čtení kolem 400 bazí to představuje přes milion jednotlivých čtení. Bakteriální genom lze při těchto parametrech stanovit již z dat vyprodukovaných z jednoho běhu a genom jednobuňčného eukaryontního organismu, který má velikost v rozsahu 20 až 100 Mb pak může vyžadovat jen 5 až 10 běhů. Dosavadní zkušenosti z konkrétních genomových projektů však naznačují některá úskalí. Zatímco u bakteriálních genomů je obtížné překlenutí některých vlásečkových úseků s vysokým obsahem bazí guaninu a cytosinu, v genomech nižších eukaryot znemožňuje přesné skládání jednotlivých čtení do dlouhých kontigů výskyt repetitivních úseků. Tyto nesnáze je možné částečně překonat pouze kombinací sekvenčních dat získaných z několika různých párových knihoven a vysoce redundantní shotgunové knihovny. Počítačové programy, které by byly schopné snadno z tohoto kombinovaného souboru sekvencí poskládat genom do kompletnosti nebo velmi věrohodného draftu jsou však zatím stále jen ve vývoji.

VYUŽITÍ 454 SEKVENOVÁNÍ PRO ANALÝZU REPETITIVNÍ DNA BANÁNOVNÍKU (*MUSA ACUMINATA* sp.)

EVA HRIBOVÁ¹, PAVEL NEUMANN², JIŘÍ MACAS², JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Sokolovská 6, 77200 Olomouc

² Laboratoř molekulární cytogenetiky, Biologické Centrum AV ČR, v.v.i., Branišovská 31/1160, 37005 České Budějovice

E-mail: hribova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 854

Většina pěstovaných typů banánovníků jsou sterilní, vegetativně se rozmnožující diploidní, triploidní nebo tetraploidní klony, které pravděpodobně vznikly přirozenou hybridizací různých poddruhů *Musa acuminata* (A genom, $2n=2x=22$) anebo hybridizací diploidních druhů *M. acuminata* a *M. balbisiana* (B genom).

Banánovník patří k plodinám s velkým společenskoeconomickým významem, nicméně jeho výzkumu se věnuje jen několik laboratoří na světě. I přes relativně malou velikost jaderného genomu (1C ~ 550–650 Mbp; Doležel et al. 1994, Bartoš et al. 2005) zůstává znalost struktury a organizace genomu velmi omezená. Dostupnost nových masivně paralelních sekvenačních technologií, a to především 454 technologie umožňuje studovat složení genomů de novo a to díky možnosti v krátké době získat velké množství relativně dlouhých sekvenačních čtení.

V této práci jsme technologií 454 částečně sekvenovali jaderný genom banánovníku *M. acuminata* 'Calcutta 4' a získali jsme 477,699 čtení s průměrnou délkou 206 nukleotidů. Toto množství představuje 15 % jaderného genomu. Jednotlivá čtení byla sestavena do delších kontigů pomocí programového balíku TGICL podle metodiky Macas et al. 2007. Získaná sekvenační data umožnila charakterizovat nejčtenější repetitivní elementy genomu banánovníku a odvodit jejich zastoupení v jaderném genomu. Pro lokalizaci vybraných repetitivních elementů na mitotických chromozomech druhu *M. acuminata* 'Calcutta 4' byla použita metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Získané výsledky ukazují, že jaderný genom banánovníku je tvořen především různými typy Ty1/copia-like a Ty3/gypsy-like retroelementů, z nichž většina byla u banánovníku identifikována poprvé. Vůbec nejčtenějšími retroelementy v genomu banánovníku, na rozdíl od jiných studovaných rostlin jsou Ty1/copia-like retrotransposony a k určení jednotlivých typů Ty1 a Ty3 retroelementů byla použita fylogenetická analýza proteinových domén kódujících reversní transkriptázu. Oproti retroelementům, DNA transposony a satelitní DNA představují jen velmi malou část genomu banánovníku. Kromě různých typů mobilních elementů, byly ve 454 datech rekonstruovány i sekvence genů pro ribosomální RNA (45S rRNA a 5S rRNA geny) a dva nové DNA satelity. Distribuci vybraných retroelementů a obou nově identifikovaných DNA satelitů jsme určili pomocí FISH na mitotických chromozomech.

Jednotlivá sekvenační čtení, která představují charakterizované repetitivní elementy banánovníku, byla použita k analýze repetitivního složení 62 dříve sekvenovaných BAC klonů druhů *M. acuminata* 'Calcutta 4' a *M. balbisiana* 'Pisang Klutug Wulung' (GMGC; <http://www.musagenomics.org/>). Všechny hlavní typy nově identifikovaných a charakterizovaných repetitivních elementů byly použity také k vytvoření databáze, kterou bude možné použít pro anotaci a tzv. repeat masking v průběhu stávajícího sekvenačního projektu banánovníku.

Doleželová M., Novák F. J.: 1994 – Biol Plant, 36: 351-357.

Bartoš J., Alkhimova O., Doleželová M., De Langhe E., Doležel J.: 2005 – Cytogenet Genome Res, 119: 268-274.

Macas J., Neumann P., Navrátilová A.: 2007 – BMC Genomics, 8: 427.

Podporováno granty Grantové agentury AV ČR – KJB 500380901, IAA600380703.

CHROMOZOMÁLNÍ GENOMIKA – KLÍČ KE STUDIU VELKÝH GENOMŮ

HANA ŠIMKOVÁ^{1,2}, JAN ŠAFÁŘ¹, MARIE KUBALÁKOVÁ¹, PAVLA SUCHÁNKOVÁ¹, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ¹, JAN BARTOŠ¹, JAROSLAV DOLEŽEL^{1,2}

¹ Ústav experimentální botaniky, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc

² Katedra buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice

E-mail: simkovah@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 854

Nejvýznamnější obiloviny mírného pásma, ke kterým patří pšenice, ječmen a žito, jsou z pohledu rostlinného genomu velmi náročnými objekty, zejména díky značné velikosti svých genomů (pšenice ~ 16 Gbp, ječmen ~ 5 Gbp, žito ~ 8 Gbp) a vysokému obsahu repetitivních sekvencí (nad 80 %). U pšenice je navíc situace komplikována jejím polyploidním charakterem. Všechny tyto rysy značně ztěžují většinu analýz, zejména genetické a fyzické mapování, ale také případné sekvenování celého genomu.

U takto velkých genomů se získání kompletní genomové sekvence metodou tzv. *shotgun* sekvenování, osvědčenou pro malé genomy, jeví jako nereálné, a to i přes obrovský pokrok sekvenačních technologií, který zaznamenáváme v posledních letech. Alternativním způsobem získání celogenomové sekvence je tzv. sekvenování klon po klonu. Tato metoda vychází z existence fyzických map, které jsou tvořeny fragmenty DNA o velikosti kolem 100 kb uspořádanými tak, jak se vyskytovaly v genomu. Sestavení fyzických map pro genomy o velikosti nad 6 Gbp, zejména pokud jsou polyploidní, však přesahuje současné možnosti klasických postupů genomiky.

V naší laboratoři jsme vypracovali strategii, která umožňuje řešení tohoto problému. Náš postup vychází z rozdělení genomů na malé části – chromozómy nebo jejich ramena – které např. u pšenice představují jen několik procent celého genomu, a navíc jejich použití odstraňuje problémy spojené s polyploidii. Chromozómy natříděné za pomoci průtokové cytometrie jsou vhodné pro přípravu vysokomolekulární DNA, která je nezbytná pro konstrukci knihoven dlouhých inzertů. Tyto knihovny klonované ve vektoru BAC byly v naší laboratoři zkonstruovány již pro polovinu pšeničných chromozómů a staly se základem pro vytváření fyzických map jednotlivých chromozómů, které lze vzhledem k malému počtu klonů již poměrně snadno použít také k sekvenování metodou klon po klonu.

Tříděné chromozómy pšenice, ječmene i žita jsou však dnes již také v několika laboratořích sekvenovány metodou *shotgun* s využitím sekvenačních technologií nové generace (454, Illumina). DNA připravená z tříděných chromozómů je rovněž hojně využívána pro cílené odvozování DNA markerů ze specifických oblastí genomu nebo k lokalizaci dříve odvozených markerů na jednotlivé chromozómy nebo jejich ramena. Takovéto mapování lze provádět jak v malém měřítku – pomocí PCR na přečištěné chromozomální DNA, tak vysoko-kapacitním způsobem, za využití DNA čipů umožňujících paralelní mapování tisíců DNA markerů.

Podporováno grantem GA ČR 521/07/15 a granty MŠMT LC06004 a OC08025.

KONSTRUKCE FYZICKÉ MAPY CHROMOZÓMU 3DS PŠENICE

JAN BARTOŠ, JAN ŠAFÁŘ, HANA ŠIMKOVÁ A JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky, v.v.i., Sokolovská 6,
77200 Olomouc
E-mail: bartos@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 881

Konstrukce uspořádané fyzické mapy je důležitým milníkem na cestě k sekvenování genomu pšenice. Bez její existence si nelze, navzdory bouřlivému rozvoji moderních sekvenčních technologií, sekvenování tak velkého genomu (~ 17 Gbp) představit. Vzhledem k velikosti genomu pšenice byl pro konstrukci fyzické mapy vybrán přístup chromozóm po chromozómu, který řádově snižuje čas potřebný k dokončení fyzické mapy nejen z pohledu práce v laboratoři, ale také výpočetního. Základem pro konstrukci fyzické mapy je získání restrikčního profilu jednotlivých klonů tzv. fingerprintu. Jejich vzájemným porovnáním jsou klony organizovány do větších celků tzv. kontigů.

Celkem bylo fingerprintováno 36 096 klonů BAC knihovny specifické pro chromozomální rameno 3DS. Po odstranění málo informativních a kontaminovaných fingerprintů, bylo pro následnou analýzu použito 27 880 (77,2 %) vysoce informativních fingerprintů. Výsledkem automatického uspořádání klonu je 1362 kontigů zahrnujících 19 304 klonů. Celková délka fyzické mapy (310 Mbp) pokrývá 96,6 % chromozomálního ramene 3DS. Minimální cesta po chromozómu (MTP) je představována 3 825 klony. Tyto klony reprezentují 99 % fyzické mapy chromozomálního ramene 3DS a budou základem pro sekvenování. V současné době probíhá ukotvování kontigů a pilotní sekvenování vybraného lokusu pro stanovení nejvhodnější strategie sekvenování celého chromozomálního ramene.

Tato práce je podporována grantem FP7-212019 'TriticeaeGenome'.

Přednášky

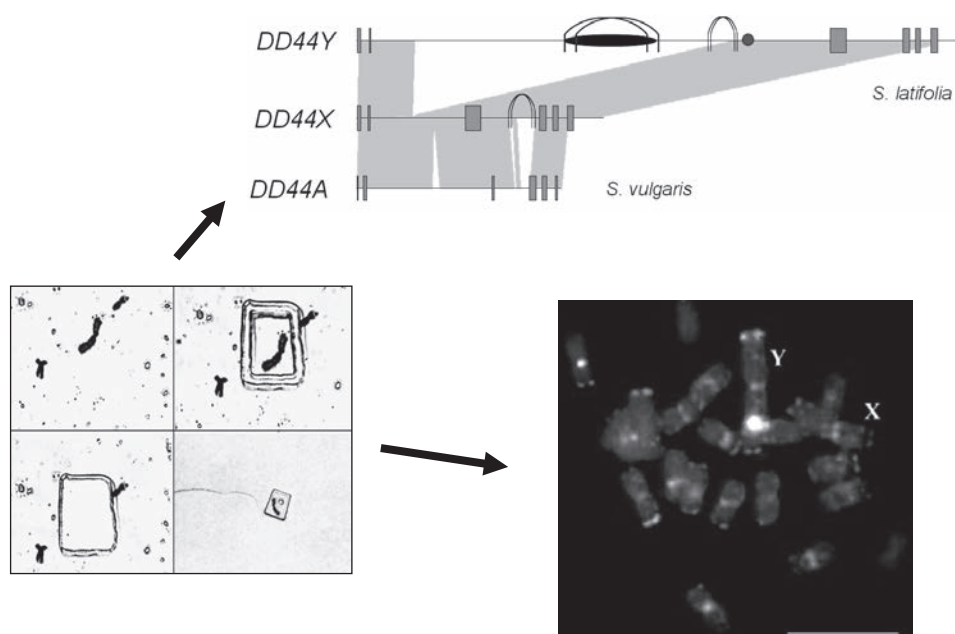
NA CO SE MŮŽEME PTÁT DVOUDOMÝCH ROSTLIN?

ROMAN HOBZA

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

E-mail: hobza@ibp.cz, tel.: +420 541 517 203

Proč se některé rostliny stanou modelovými druhy a jiné jsou v pozadí zájmu? Kromě určitých metodických preferencí už není v současné době mnoho důvodů, proč se bát pracovat s komplexními velkými genomy rostlin, které mají dlouhou generační dobu. Moderní sekvenční metody a možnosti RNAi v laboratorních technikách umožňují za relativně malé náklady etablovat marginální druh modelovým organismem. Byla by za současného stavu poznání a metodické robustnosti *Arabidopsis thaliana* ještě volbou jako „univerzálního“ představitele vyšších rostlin? Hlavním cílem této prezentace je ukázat příklady studia biologických fenoménů vyskytujících se převážně nebo výhradně u některých dvoudomých rostlin (např. existence pohlavních chromosomů). Obecně bude diskutováno, jaké metody molekulární biologie umožňují relativně rychle popsat a pochopit molekulární zákonitosti evoluce genomů. Hlavní důraz bude kladen na využití technik laserové mikrodisekce, cytogenetiky a srovnávací genomiky (viz. ilustrační obrázek).



Marais G, Nicolas M, Bergero R, Chambrier P, Kejnovsky E, Monéger F, Hobza R, Widmer A & Charlesworth D (2008) Evidence for degeneration of the Y chromosome in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Current Biology* 18: 545-549.

Hobza R, Kejnovsky E, Vyskot B, Widmer A (2007) The role of chromosomal rearrangements in the evolution of *Silene latifolia* sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 633-638.

Vyskot B & Hobza R (2004) Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetics* 20: 432-438.

Podporováno granty 522/09/0083, KJB600040901a programem podpory mezinárodní spolupráce AV ČR.

P Přednášky

SROVNÁVACÍ GENOMIKA POHLAVNÍCH CHROMOZOMŮ ROSTLIN ANEB JAK ČÍST V „BAKOVÝCH“ KNIHOVNÁCH

HANA KUBEKOVÁ¹, JAN ŠAFÁŘ², JAN BARTOŠ², ALEX WIDMER³, BORIS VYSKOT¹ A ROMAN HOBZA¹

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

² Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc

³ Institute of Integrative Biology, ETH, Zürich

E-mail: hanka83@gmail.com, tel.: +420 541 517 194

Pohlavní chromozomy se vyvinuly z páru autozomů poté, co jeden z páru získal gen pro determinaci pohlaví. Další vývoj vedl ke vzniku nerekombinující oblasti v okolí genu a k její postupné degeneraci. Pohlavní chromozomy, jak je dnes známe u savců, se ve svém vývoji propracovaly až na pokraj zániku. Pokud chceme studovat spíše počáteční stadia evoluce pohlavních chromozomů, měly bychom svou pozornost obrátit k druhům rostlinným.

Silene latifolia představuje dvoudomý druh s heteromorfními pohlavními chromozomy, kde chromozom Y vykazuje první známky degenerace: dochází zde k hromadění repetitivních sekvencí v genových i mimogenových oblastech. Navíc je exprese alel genů vázaných na chromozom Y ve srovnání s alelami z chromozomu X významně nižší.

Blíže příbuzný druh *S. vulgaris* je gynodioecický a nemá pohlavní chromozomy. Pohlaví jedince, konkrétně zda se jedná o samici nebo hermafrodita, určují geny umístěné na mitochondriální DNA (fenomén známý jako cytoplazmatická samčí sterilita).

S ohledem na skutečnost, že většina druhů rodu *Silene* obsahuje v jádrech 24 chromozomů ($n = 12$), předpokládáme, že během speciace nedošlo k rozsáhlým přestavbám genomu a můžeme pro pohlavní chromozomy druhu *S. latifolia* nalézt jejich autozomální protějšky u *S. vulgaris*.

U obou zmiňovaných druhů máme k dispozici bakovou knihovnu, která nám umožňuje studovat rozsáhlé úseky DNA pocházející z autozomů *S. vulgaris* a ortologních sekvencí z chromozomu X a Y *S. latifolia*. Jejich srovnání nám otevírá dveře k poznání procesů, které probíhaly na chromozomu X a chromozomu Y v průběhu evoluce.

Podporováno granty 522/09/0083, KJB600040901 a programem podpory mezinárodní spolupráce AV ČR M200040905.

P Přednášky

STUDIUM EVOLUCE KARYOTYPU V ČELEDI BRUKVOVITÝCH (*BRASSICACEAE*) METODOU KOMPARATIVNÍHO CHROMOSOMÁLNÍHO PAINTINGU

TEREZIE MANDÁKOVÁ, MARTIN A. LYSÁK

Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, Masarykova Univerzita, 625 00 Brno, ČR
E-mail: tereziam@sci.muni.cz, tel.: +420 549 495 601

Chromosomální přestavby jsou obecně považovány za jednu z nejdůležitějších příčin speciace, vzniku nových druhů prostřednictvím reprodukční izolace mezi rostlinnými populacemi. Evoluční přestavby karyotypu mohou být rekonstruovány pomocí **komparativního chromosomálního paintingu** (KCP). Metoda KCP je založena na vizualizaci homeologických chromosomálních úseků/celých chromosomů sdílených mezi dvěma nebo více druhy. U rostlin je tato technika aplikovatelná jen u zástupců čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). U brukvovitých druhů jsme schopni experimentálně prokázat přestavby zodpovědné za změnu chromosomálního počtu a definovat ancestrální versus odvozené karyotypy. Srovnání našich dat o chromosomální homeologii s molekulárně-fylogenetickými daty poskytuje zcela unikátní vhled do obecných trendů a načasování **karyotypové evoluce v čeledi *Brassicaceae* a role chromosomálních přestaveb v rostlinné speciaci**.

Naším cílem bylo pomocí KCP rekonstruovat způsoby a mechanismy redukce chromosomálního počtu u druhů s nejnižšími chromosomální počty v čeledi *Brassicaceae* ($n = 4-6$) z ancestrálního karyotypu čeledi brukvovitých (ACK, $n = 8$). U tří studovaných druhů, *Stenopetalum nutans* ($2n = 8$), *Arabidella eremigena* ($2n = 10$) a *Ballantinia antipoda* ($2n = 12$) bylo všech 24 genomických bloků ACK nalezeno ve dvou kopiích. Tato data naznačují, že studované druhy prodělaly relativně nedávnou duplikaci celého genomu, která byla následována masivními přestavbami karyotypu a chromosomálními fúzí. Unikátní asociace ancestrálních genomických bloků sdílených mezi ACK a studovanými australskými druhy podporují teorii, podle které tyto redukováné karyotypy brukvovitých ($n = 4-6$) vznikly z ACK ($n = 8$) prostřednictvím polyploidního ancestoru s dosud neznámým chromosomovým počtem. Tato studie je dosud nejrozsáhlejší cytogenetickou evidencí mesopolyploidní události u *bona fide* diploidních rostlinných genomů.

P Přednášky

PATENTY – CO, JAK, KDY A PROČ

LADISLAV KOHOUT

ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
E-mail: kohout@uochb.cas.cz, tel.: +420 220 183 200

Tato přednáška by měla objasnit některé pojmy a postupy týkající se ochrany výsledků výzkumu, zvláště patentů. Během přednášky bude vysvětleno, proč by se vědečtí pracovníci (a nejen oni) měli věnovat i ochraně výsledků, kterých dosáhli, což jim mimo jiné ukládá i zákon¹.

Budou vysvětleny některé pojmy, se kterými se při ochraně výsledků setkáte, například hodnota instituce, intelektuální vlastnictví (IP) atd.

Budou popsány možnosti ochrany získaných poznatků (patenty, průmyslové vzory atd.), proč se vůbec zabývat ochranou výsledků, jaké možnosti ochrany existují, možnost absolutní ochrany výsledků apod. Přednáška se bude týkat hlavně patentů, co je potřeba pro přípravu patentové přihlášky, jak má vypadat, co lze patentovat, co nelze patentovat, čemu se vyvarovat před podáním patentové přihlášky atd., jak postupovat při přípravě patentové přihlášky, kdo Vám pomůže s přípravou patentové přihlášky doma i v cizině, co to stojí atd. Bude zmíněna i možnost stažení patentové přihlášky – kdy je to možné a jaké to má důsledky.

Budou vysvětleny některé patentové pojmy (majitel patentu, původce, datum podání, datum zveřejnění, udělení patentu, platnost patentu, průzkum patentu atd.), patentové pojmy používané v angličtině (inventor, filing date, priority date, publication date, validity, utility design, full search, EPO, WO, EP atd.).

Bude probrán celý postup od zjištění „zajímavé skutečnosti hodné patentování“ až k udělení patentu – a to podle českého patentového zákona². Bude zmíněna i možnost patentování v cizině, výhody patentování v cizině, ale i nevýhody.

Podpořeno výzkumným záměrem Z4 055 0506.

¹ Obchodní zákoník, § 51.

² Patentový zákon (č. 527 a 550/1990 Sb. s inovací č. 21/2002 Sb.)

ANALÝZA TRANSKRIPTOMU POMOCÍ MASIVNĚ PARALELNÍHO SEKVENOVÁNÍ

PAVEL NEUMANN

Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice, ČR
E-mail: neumann@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 516

Nástup metod masivně paralelního sekvenování znamenal obrovský kvalitativní posun v mnoha biologických oborech, transkriptomiku nevyjímaje. Metody paralelního sekvenování nabízejí ve srovnání s konvenčním sekvenováním až několika řádově větší množství dat a dovolují tak detekovat i poměrně vzácné transkripty. Kvantitativní povaha dat z paralelního sekvenování navíc umožňuje odhadovat s velkou přesností četnost jednotlivých transkriptů ve zkoumaném vzorku. Díky příznivému vývoji cen se paralelní sekvenování stává dostupným pro čím dál širší komunitu badatelů a již dnes jej lze považovat za jeden z nejdůležitějších nástrojů transkriptomiky. V této prezentaci se pokusím shrnout hlavní aplikace paralelního sekvenování pro studium transkriptomu s ohledem na jejich přednosti a slabiny.

ČIPOVÉ TECHNOLOGIE – MOŽNOSTI A LIMITY

NIKOLETA DUPEÁKOVÁ^{1,2}, DAVID HONYS^{1,2}

¹ Laboratoř biologie pylu, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 00 Praha 6, ČR

² Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR
E-mail: duplakova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 452

Čipová technologie výrazně změnila tvář molekulární biologie již před více než deseti lety. První zpráva o použití DNA čipu (DNA microarray) se objevila v časopise *Science* v roce 1995 [1]. V dnešní době DNA čipy umožňují komplexní genetické analýzy neuvěřitelně rozmanitého spektra biologického materiálu, od makromolekulárních komplexů až po celé organismy. Od původního „pouhého“ profilování genové exprese se oblast jejich použití značně rozšířila. DNA čipy jsou nyní běžně používány pro genotypování, analýzu genové exprese, detekci jednonukleotidového polymorfismu (SNP), studium exprese mikroRNA, analýzy variací v počtu kopií genů (CNV), detekce CpG metylací a dokonce při studiu interakcí DNA s bílkovinami. V oblasti biomedicíny navíc umožňují detekci patogenů, rezistence vůči antibiotikům, genových mutací a polymorfismů a čipová data tak mohou být vodítkem při výběru vhodné terapie.

DNA čipy reprezentují soubory sond, které jsou pravidelně uspořádány na pevných nosičích, např. nylonových membránách nebo skleněných či silikonových podložkách. Sondy jsou tvořeny řetězci cDNA či kratších oligonukleotidů a jsou navrženy tak, aby jejich sekvence byly specifické pro dané organismy, geny, genetické varianty nebo nekódující oblasti oddělující jednotlivé geny. Pokroky v oblasti syntézy DNA čipů umožnily rychlý a intenzivní vývoj čipové technologie od dnes již většinou historických ručně nanášených macroarrays s nízkou hustotou spotů (řádově stovky sond) až k současným průmyslově vyráběným mikročipům nesoucím až milióny sond syntetizovaných *in situ* ve vysoké hustotě. S dramaticky se zvyšujícím množstvím informací nesených jednotlivými čipy však vyvstaly jiné problémy. Hlavní výzvou se stalo zajištění spolehlivosti a reprodukovatelnosti výsledků čipových experimentů a možnosti standardizace a normalizace dat pocházejících z různých zdrojů. K vyřešení těchto otázek výrazně napomohlo přijetí standardů MIAME (Minimální Informace o Microarray Experiment) a principů MAQC (MicroArray Quality Control) [2]. Robustní transkriptomická data není možné analyzovat bez použití řady bioinformatických a statistických nástrojů. Neustále jsou vyvíjeny nové stále komplexnější a robustnější algoritmy pro analýzu čipových dat kopírující dynamický vývoj „hardware“ – vlastních čipů. [3]. Můžeme říci, že čipová technologie je nyní technologií „dospělou“ představující soubor výjimečně účinných nástrojů pro výzkum nejen rostlinného genomu stejně jako -omů jiných.

V posledních letech čelí čipová technologie nástupu konkurence vysoce výkonného sekvenování nejnovější generace (next-generation sequencing). Sekvenování nové generace je flexibilnější a předpokládá se, že čipovou technologii postupně nahradí. Ostatně více než 100 článků publikovaných za poslední dva roky dokumentuje jeho obrovský potenciál. Dynamicky se rozvíjející sekvenční technologie je však ještě „mladá“ a mezi její v současnosti řešená slabší místa patří zejména značné náklady a v případě některých aplikací ne zcela optimalizované postupy. Navíc nedávné srovnávací studie ukázaly, že obě strategie jsou velmi efektivní při identifikaci spolehlivých cílových sekvencí (high-ranked targets), kde dávaly srovnatelné výsledky. V případě identifikace sekvencí méně spolehlivých (low-ranked targets) však již byla jejich účinnost nižší a překryv výsledků získaných oběma technologiemi byl výrazně menší. Nejlepší výsledky proto byly získány sloučením dat z obou zdrojů [4, 5, 6]. Je pravděpodobné, že platforma microarrays bude postupně u stále většího počtu aplikací nahrazena sekvenačními technologiemi. Ještě nějaký čas však budou oba přístupy, dnes spíše komplementární než vzájemně se vylučující, koexistovat a nabízet tak biologům co nejširší nabídku metodických řešení.

[1] Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.: 1995 – *Science*, 270: 467-470

[2] Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., et al.: 2001 – *Nat. Genet.*, 29: 365-371

[3] Cordero F., Botta M., Calogero R.A.: 2007 – *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 6: 265-281

[4] Euskirchen G.M., Rozowsky J.S., Wei C.L., et al.: 2007 – *Genome Res.*, 17: 898-909

[5] Oudes A.J., Roach J.C., Walashek L.S., et al.: 2005 – *BMC Cancer*, 5: 86.

[6] Liu F., Jenssen T.K., Trimarchi J., et al.: 2007 – *BMC Genomics*, 8: 153.

Výzkum byl financován prostřednictvím GAČR (Grant 522/09/0858), MŠMT (Centrum základního výzkumu LC06004) a Evropského fondu pro regionální rozvoj, Operačního programu Praha-Konkurenceschopnost (projekt č. CZ.2.16/3.1.00/21159).

CELL-SPECIFIC MOLECULAR VECTORS FOR FUNCTIONAL GENOMICS

SAID HAFIDH^{1,2}, GAEL LE TRIONNAIRE², DAVID HONYS^{1,3}, DAVID TWELL²

¹ Laboratoř biologie pylu, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 00 Praha 6, ČR

² Department of Biology, University of Leicester, University Road, Leicester LE1 7RH, United Kingdom

³ Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR
E-mail: hafidh@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 452

Rapid completion of genome sequencing in several species and the advent of large scale genome sequencing in other plant species have seen the necessity to develop an effective, targeted and high throughput method for screening the function of all the genes in the plant genome. To date, only half of the total genes in *Arabidopsis* have been identified to contain T-DNA insertion, of those 50% possess more than one insert, and there are still >36% of the identified genes with unknown biological function [1]. T-DNA knockouts are limited by gene redundancy, failure to target inserted elements to a gene of interest, multiple insertions, and generation of lethal knockouts that does not provide comprehensive analysis of gene function during development. Chemical mutagenesis has also been exploited successfully, however, the mutant lines generated are always associated with other background mutations other than those of interest as a result of random mutagenesis. As such this has led to the exploitation of silencing RNA methods as an effective reverse genetic tool widely used for manipulating gene expression [2]. The promises of hairpin small interfering RNA (siRNA) and microRNA (miRNA) technology, designated pathways of the small RNA machinery (smRNA) which has been successfully explored in other organisms to down-regulate gene expression, is set to revolutionize reverse genetic approaches in plants. Here we present a set of pollen cell-specific molecular vectors dedicated to manipulate gene expression using siRNA and amiRNA approach in the male gametophyte of *Arabidopsis thaliana*. Application of these technologies to manipulate expression of individual genes or gene family is discussed and is shown to provide excellent tools to address the function of genes of interest in a high throughput, temporal and spatial manner.

[1] The Arabidopsis Information Resource (TAIR): 2009 – <http://www.arabidopsis.org>

[2] Hammond S.M., Caudy A.A., Hannon G.J.: 2001 – *Nat. Rev. Genet.* 2: 110-119

Výzkum byl financován prostřednictvím BBSRC, GAČR (Grant 522/09/0858), MŠMT (Centrum základního výzkumu LC06004) a Evropského fondu pro regionální rozvoj, Operačního programu Praha-Konkurenceschopnost (projekt č. CZ.2.16/3.1.00/21159).

VYUŽITÍ TŘÍDĚNÍ BUNĚK (FACS) PRO VÝZKUM ROSTLIN

JIŘÍ LIBUS

ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6

E-mail: libus@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 429

Rostlinné tělo se skládá z řady typů buněk, které se liší morfologicky, biochemicky i úlohou ve vývoji organismu. V řadě případů závisí úspěch celku na činnosti menšiny buněk – typicky např. organizačních center meristémů. Zkoumat vlastnosti takových vzácných buněčných typů je ovšem velmi obtížné bez předchozího nabohacení. Tento úkol plní v oblasti výzkumu živočichů a hlavně v medicíně metoda třídění buněk na základě fluorescence (FACS). Přes jisté technické obtíže (buněčná stěna atd.) se v posledních letech podařilo využít FACS i pro rostlinný materiál, nejprve kořeny (Birnbaum *et al.* 2003) a posléze i prýt (Yadav *et al.* 2009). Přednáška se pokusí shrnout související údaje z literatury a vlastní praktické zkušenosti autora.

Birnbaum, K. *et al.* A Gene Expression Map of the Arabidopsis Root. *Science* 302, 1956-1960 (2003).

Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M. & Reddy, G.V. Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 4941-4946 (2009).

P Přednášky

STANOVENÍ HLADIN TRANSKRIPTŮ U ROZVĚTVENÝCH RODIN ROSTLINNÝCH GENŮ PŘEDSTAVUJE TVRDÝ OŘÍŠEK – JDE VŠAK ROZLOUSKNOUT

HELENA ŠTORCHOVÁ, DAVID CHÁB

Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02
E-mail: storchova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 433

Měření hladin mRNA pomocí kvantitativní RT PCR (qRT PCR) se začalo již hojně používat i v rostlinné biologii. Pro řadu transkriptů se osvědčilo použití fluorescenční barvy SYBRGreen, vážící se na dvouřetězcovou DNA. V tomto případě je specifita dána výhradně párem primerů, použitých pro amplifikaci. Rostlinné genomy však obsahují četné a rozsáhlé genové rodiny. Často stojíme před nutností porovnat expresi genů, které se jen nepatrně liší v sekvenci. Zde je třeba sáhnout k sekvenci specifické fluorescenční sondě. Situace může být dále komplikována přítomností produktů alternativního sestřihu. Možnosti použití Taqman sond demonstrujeme na příkladu specifického měření sestřižených a nesestřižených forem transkriptů dvou blízce příbuzných genů *CONSTANS LIKE* (*CrCOL1* a *CrCOL2*) z *Chenopodium rubrum*, tedy celkem čtyř různých mRNA. SONDY byly vyvinuty ve spolupráci s firmou TIBmolbiol. Ukázalo se, že specifita qRT PCR esaje je dána jak sekvencí primerů, tak i sekvencí sond. Tuto specifitu jsme ověřovali pomocí amplifikace plazmidů, nesoucích jako inzert cDNA odpovídající čtyřem analyzovaným transkriptům. Výsledky měření potvrdily, že všechny čtyři formy jsou zastoupeny stejnou měrou a za dosud zkoumaných podmínek i shodně regulovány.

METODY ANALÝZY EPIGENOMU

ALEŠ KOVAŘÍK

BFÚ AV ČR v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR
E-mail: kovarik@ibp.cz, tel.: +420 541 517 178

U vyšších eukaryotických organismů se kromě dědičné informace zakódované v primární struktuře DNA (mendelistické) setkáváme s dědičností epigenetickou (nemendelistickou). U živočichů a rostlin je epigenetická informace založena na kovalentních modifikacích DNA a histonových bílkovin. Bylo prokázáno, že epigenetická paměť buňky je klíčovým regulačním nástrojem v regulaci genové exprese, aktivity transposabilních elementů a hraje důležitou roli v udržování integrity genomu. V prezentaci se budu věnovat metodám analýzy epigenomu zejména pak detekci metylace DNA. Tyto metody lze rozdělit podle druhu poskytované informace na globální, lokální, jednoduché i komplexní. Bude pojednáno jak o tradičních přístupech (HPLC, TLC, restriční štěpení, imunohistochemie), tak i o moderních „high-through put“ metodách, které nám poskytují celkový epigenetický obraz buňky.

Užitečné odkazy:

Nástroje pro zpracování dat získaných genomovým sekvenováním:
METHTOOLS – University of Jena (<http://genome.imb-jena.de/methtools/>)
CYMATE – Gregor Mendel Institute, Vienna (<http://www.gmi.oeaw.ac.at/en/cymate-index/>)

Epigenome Network of Excellence – výzkumné projekty, významné laboratoře, laboratorní protokoly, konference atd. – <http://www.epigenome-noe.net/>

Methbase – databáze metylovaných sekvencí – <http://www.methdb.net>

P Přednášky

MODELUJEME S MODELY ANEB PREDIKCE A ANALÝZA PROTEINOVÝCH STRUKTUR

MARIAN NOVOTNY

Katedra buněčné biologie, PŘF UK, Viničná 7, 128 43 Praha 2
E-mail: marian@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 769

Proteinové 3D struktury nabízí detailní pohled na mechanismy buněčných procesů. I přes rychlý rozvoj metod vedoucích k experimentálnímu určení struktury, se neustále rozšiřuje mezera mezi počtem známých sekvencí proteinů a experimentálně určených struktur. K přemostění této mezery slouží predikce struktury proteinů, především metoda homologního modelování. Homologní modelování má jako každá jiná metoda kromě svých předností i své limity. Ve svém příspěvku se pokusím představit nejenom homologní modelování, s jeho limity ale i základní zdroje informací o strukturách makromolekul a nástroje k analýze těchto struktur. A to vše samozřejmě se zvláštním přihlédnutím k rostlinné biologii.

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V PROTEOMICE

P. JEDELSKÝ

PŘF UK, Viničná 7, Praha 2, 128 44
E-mail: jedelsky@natur.cuni.cz, tel.: 606 954 770

Abstrakt nedodán.

P Přednášky

ROSTLINNÁ FOSFOPROTEOMIKA

JAN FÍLA^{1,2,*}, ANDREA MATROS³, VĚRA ČAPKOVÁ¹, JANA FECIKOVÁ¹, HANS-PETER MOCK³, DAVID HONYS^{1,2}

¹ Laboratoř biologie pylu, Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, Praha 6, Česká republika

² Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Viničná 5, Praha 2, Česká republika

³ Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Corensstraße 3, Gatersleben, Německo

*E-mail: fila@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 452

Fosforylace a následná defosforylace proteinů patří mezi významné posttranslační modifikace, které mají klíčovou úlohu v mnohých životních procesech buňky. Pro příklad jmenujme kontrolu buněčného cyklu, roli v signálních kaskádách, regulaci metabolismu a genové exprese. Fosforylace vede ke změně některých významných vlastností proteinu: záporně nabitě fosfáty mění celkový náboj domény daného proteinu nebo dokonce celého proteinu, a tak může dojít ke změně interakcí s doménami stejného proteinu či dokonce s proteiny jinými. Na dvourozměrné elektroforéze je patrný posun pI hodnoty proteinu po defosforylaci – defosforylovaná forma bílkoviny se posouvá do zásaditější oblasti pI než forma fosforylovaná. Fosfát může rovněž ovlivňovat aktivitu enzymu, např. isocitrát dehydrogenáza je inhibována vazbou fosfátu do svého aktivního místa. V neposlední řadě hraje fosforylace roli v buněčné lokalizaci bílkovin, např. při transportu některých transkripčních faktorů do buněčného jádra.

Analýza fosforylace proteinů se, přes svůj význam, ukazuje být jedním z nejnáročnějších úkolů analýzy proteomu, a to zejména díky vysoce dynamické povaze této posttranslační modifikace a nízké stechiometrii. Fosforylovaných proteinů se v buňce obvykle nachází jen několik procent, tudíž je pro dosažení koncentrace dostatečné pro detekci na polyakrylamidových gelech a na hmotnostním spektrometru nezbytné provést obohacení. K obohacení většinou slouží celkový bílkovinný extrakt. V současnosti jsou používány dvě hlavní strategie obohacování proteinového extraktu: před štěpením nebo po štěpení specifickou proteázou (nejčastěji trypsinem). Do první skupiny metod patří obohacování extraktu o fosfoproteiny pomocí metal-oxidové afinitní chromatografie (metal-oxide affinity chromatography, MOAC). Získaný eluát je pak rozdělen na dvourozměrné elektroforéze a vyřezané spoty jsou po následném štěpení trypsinem podrobeny hmotnostní spektroskopii, MS. Velkým pomocníkem při detekci fosfoproteinů na akrylamidových gelech je fluorescenční barvivo ProQ. Jeho velká citlivost a specifita k fosfátům umožnila nahradit jejich původní detekci pomocí Western blottingu. Druhým možným způsobem je obohacování až trypsinem naštěpeného extraktu – tedy obohacení o fosfopeptidy. Oba základní metodické přístupy mají svá specifika, jejichž srovnání je mimo jiné předmětem přednášky.

Obohacování proteinů přináší výhody v tom, že jsme na dvourozměrném gelu schopni vidět pI hodnotu a molekulární hmotnost daného proteinu – tedy údaje, které mohou být velmi nápomocné při prohledávání databází a identifikaci proteinů. Na druhou stranu úskalí této metody spočívají v možné nespecifitě (lze např. očekávat, že Ca-vazebné proteiny se budou ochotně vázat na kovovou chromatografickou matici, přestože nebudou obsahovat fosforylované aminokyseliny), nezahrnutí málo abundantních proteinů či nezahrnutí lipofilních proteinů. Proto bývá velmi vhodné paralelně provést i druhý postup. Obohacené peptidy je pak možné rozdělit podle hydrofobity pomocí kapalinové chromatografie (liquid chromatography, LC). Na chromatografii obvykle přímo navazuje MS.

Velký pokrok v oblasti obohacování extraktu o fosfoproteiny či fosfopeptidy v integraci s nejcitlivějšími analytickými metodami v poslední době umožnil aplikaci metod původně vyvinutých pro srovnávací proteomiku i pro studium fosfoproteomu a rozvoj ještě nedávno obtížně představitelné kvantitativní fosfoproteomiky či studia dynamiky fosforylace bílkovin. Přes značné pokroky ve fosfoproteomice je zapotřebí vnímat tuto vědní oblast za stále se rozvíjející, a tudíž nabízející řadu alternativních postupů, z nichž některé jsou teprve nedávno publikované a na širším spektru modelů ještě neproověřené. Navíc je třeba si uvědomit, že rostlinné buňky mají oproti živočišným svá specifika, příkladně přítomnost buněčné stěny a u mnohých orgánů vyskytující se sekundární metabolity, které mohou komplikovat proteomický výzkum.

Výzkum byl financován prostřednictvím ESF (Akce COST FA0603), MŠMT (Grant OC08011, Centrum základního výzkumu LC06004) a Evropského fondu pro regionální rozvoj, Operačního programu Praha-Konkurenceschopnost (projekt č. CZ.2.16/3.1.00/21159).

STUDIM PROTEIN-PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ *IN VIVO*: Y2H, BIFC, MERA

JAKUB HORÁK, VENDULA HRDINOVÁ, JAN HEJÁTKO

PřF MU, Oddělení FGP, LMFR, Kamenice 5, 625 00 Brno, ČR

E-mail: horakj@sci.muni.cz, tel.: +420 549 493 474

Schopnost interagovat s dalšími proteiny je jednou ze základních charakteristik bílkovin jakožto základního kamene živých organismů. Protein-proteinová interakce je nutným předpokladem pro přenos informace v signálních drahách. Informace se obvykle předává v podobě fosfátové skupiny mezi kinázou a jejím proteinovým substrátem, který je specificky rozpoznáván, anebo je prostřednictvím protein-proteinové interakce přímo ovlivňována aktivita interakčního partnera. Stejně tak je přenos fosfátu signálními drahami typu dvoukomponentních systémů (např. cytokininová dráha) možný jen při interakci přijímačové domény s přenašečovou doménou obsahující histidin. Jednou z prvních otázek, které si klademe při funkční analýze genů rostlinných signálních drah, je ta, se kterými signálními elementy studovaný protein interaguje. K rychlému vyhledání interakčních partnerů používáme několik metod pro *in vivo* analýzu proteinových interakcí v kvasinkách, nebo v transientně transformovaných listech tabáku *Nicotiana benthamiana*.

Kvasinkový dvouhybridní systém (Yeast two-hybrid system, Y2H) je klasickou metodou pro analýzu proteinových interakcí a je vhodné jej použít pro získání prvních interakčních informací. První protein je fúzován s kvasinkovou DNA vazebnou doménou a druhý protein s doménou aktivující transkripci. Jestliže spolu dva studované proteiny interagují, dojde na promotoru reportérového genu v auxotrofním kvasinkovém kmeni ke vzniku transaktivního komplexu a následně k transkripci reportéru, který umožňuje přežití kvasinek na selekčním médiu. Dvouhybridní systém v kvasinkách umožňuje analyzovat pouze interakce solubilních proteinů a musíme počítat s možnými artefakty vlivem exprese rostlinných genů v heterologním systému. Výsledky je proto nutné ověřit jinými nezávislými metodami.

Jednou z takových metod je bimolekulární fluorescenční komplementace (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC). Fluorescenční protein YFP je rozdělen na dvě poloviny a každá polovina je fúzována s jedním ze studovaných proteinů. Pokud spolu proteiny interagují, dojde k rekonstituci YFP, kterou sledujeme konfokálním mikroskopem jako obnovení fluorescence YFP. Fúzní proteiny koexprimujeme nejčastěji v listech tabáku (*N. benthamiana*), anebo v jiném vhodném rostlinném systému, například v protoplastech. Jednou z výhod je možnost studovat vzájemné interakce membránových proteinů.

Pro analýzu interakcí mezi membránovým proteinem a cytosolickými proteiny byla nedávno zavedena metoda zprostředkované vazby na membránu (Membrane Recruitment Assay, MeRA). Membránový protein je spojen s červeným fluorescenčním proteinem RFP, zatímco cytosolický protein je fúzován s GFP fluoreskujícím zeleně. Při interakci takovýchto fúzních proteinů dochází k asociaci GFP signálu s membránou, což je možno jednoznačně potvrdit analýzou fluorescence rostlinných buněk koexprimujících oba proteiny prostřednictvím konfokální mikroskopie, která umožňuje roztříšit buněčné kompartmenty.

Pro konstrukci rekombinantní DNA používáme ve všech třech popsáných případech klonování prostřednictvím Gateway® technologie. Rychlé a univerzální klonování mnoha genů spolu s využitím kvasinek a rostlinných systémů pro transientní expresi umožňuje rychlé získání interakčních dat *in vivo*, na jejichž základě můžeme vytvořit hypotézy ověřitelné například fyziologickou analýzou mutantních rostlin vedoucí k novým poznatkům o přenosu signálu v rostlinné buňce.

Horak J., Grefen C., Berendzen K.W., Hahn A., Stierhof Y.D., Stadelhofer B., Stahl M., Koncz C., Harter K.: 2008 – BMC Plant Biol, 8: 77

Grefen C., Städele K., Růžicka K., Obrdlík P., Harter K., Horák J.: 2008 – Molecular Plant, 1: 13

Podporováno grantem LC06034 a MSM002162241.

METODA DVOUROZMĚRNÉ DIFERENČNÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY (2-D DIGE) A JEJÍ VYUŽITÍ VE VÝZKUMU ROSTLINNÉHO PROTEOMU

KLÁRA KOSOVÁ, PAVEL VÍTÁMVÁS, ZBYNĚK ŠKODÁČEK, ILJA TOM PRÁŠIL

VÚRV, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, ČR
E-mail: kosova@vurv.cz, tel.: +420 233 022 443

Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE) je moderní modifikace dvourozměrné gelové elektroforézy (2-DE; O'Farrell, 1975), která využívá ke značení proteinových vzorků fluorescenčních barviv CyDyesTM (GE Healthcare) a která byla vyvinuta v 90. letech 20. století (Ünlü a kol., 1997). O srovnání metody 2-D DIGE s jinými variantami 2-DE viz např. Vítámvás *et al.* (2009). Užití až tří barviv CyDyes ke značení proteinových vzorků před jejich dělením umožňuje nanášet na jeden gel, resp. jeden proužek s imobilizovaným pH gradientem (IPG proužek) dva různé vzorky a navíc ještě směsný vzorek. Tento vzorek vznikne smísením všech vzorků, s nimiž pracujeme v daném experimentu, a slouží jako interní standard. Tak je výrazně eliminován problém kvantifikace proteinových skvrn v jednotlivých vzorcích, resp. problém opakovatelnosti dvourozměrných gelů, který je hlavním problémem klasické dvourozměrné elektroforézy. Možnost kvantitativně porovnávat dva vzorky v jednom gelu současně spolu s přítomností interního standardu představuje hlavní výhodu 2-D DIGE oproti 2-DE, kde se na jeden IPG proužek nanáší pouze jeden vzorek. 2-D DIGE tak umožňuje rozvíjet a realizovat strategii expresní a srovnávací proteomiky tím, že daleko precizněji porovnává a kvantifikuje změny v proteinové expresi u dvou rozdílných vzorků na jednom gelu.

Na 2-DE gelech lze detekovat až několik tisíc nejčastějších proteinových skvrn v závislosti na vzorku. To už představuje významnou část proteomu, zvláště pokud se jedná o jeho určitou frakci – subproteom (jaderný, mitochondriální, plastidový, membránový, fosfoproteom apod.). V současnosti je 2-D DIGE jedna z vhodných a dostupných proteomických metod, která umožňuje nejen kvantifikovat a identifikovat tisíce proteinů najednou, ale také kvantifikovat různé post-translační modifikace těchto proteinů díky rozdílné pohyblivosti jejich skvrn na dvourozměrných gelech.

O'Farrell P.H.: 1975 – J. Biol. Chem. 250, 4007

Ünlü M., Morgan M.E., Minden J.S.: 1997 – Electrophoresis 18, 2071

Vítámvás P., Kosová K., Škodáček Z., Prášil I.T. (2009) – Chem. listy, přijato

Podporováno projekty MŠMT OC08066, MZe 00027006003 a GAČR GP522/09/P621.

IN VITRO TRANSLACE A IMUNOPRECIPITACE: PROBLÉMY A JEJICH ŘEŠENÍ

PETRA PROCHÁZKOVÁ-SCHRUMPFVÁ¹, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Masarykova univerzita, CZ-62500 Brno, ČR

² Biofyzikální ústav, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, ČR

E-mail: schpetra@centrum.cz, tel.: +420 549 498 137

In vitro translace či následná imunoprecipitace *in vitro* translatovaných proteinů je technikou, která je dnes již běžná v mnoha laboratořích. Často používaná radioaktivní varianta translace ve zkumavce, kdy dochází v průběhu translace k inkorporaci radioaktivně značených aminokyselin, usnadňuje nejen následnou specifickou detekci proteinů, ale napomáhá i při hledání interakčních partnerů technikou imunoprecipitace. Při imunoprecipitaci je protein z *in vitro* translatovaného lyzátu precipitován ve vhodném pufru pomocí imuno-komplexů, které zahrnují antigen (často tag proteinu), primární protilátku a Protein A-, G- agarozový či magnetický konjugát. Na trhu je celá řada různých *in vitro* expresních systémů např.: lyzát z králíčích retikulocytů, lyzát z pšeničných klíčků, lyzáty z *E. coli*, lyzáty ze *Spodoptera frugiperda* a další, a také celá řada A-, G- konjugátů či vhodných protilátek.

V naší laboratoři jsme technikou imunoprecipitace chtěli ověřit výsledky získané v dvojhybridním systému, kde jsme pozorovali zcela nové interakce dvou proteinů z *A. thaliana*, u nichž se předpokládá, že jsou asociovány s telomerami. Jelikož šlo o rostlinné proteiny, vybrali jsme si pro *in vitro* translaci lyzáty z pšeničných klíčků. Rutinní experiment se však protáhl do poměrně dlouhé optimalizace nejen *in vitro* translace, ale také následného imunoprecipitačního experimentu.

Během přednášky budou zmíněny optimalizační kroky, které nakonec vedly ke zdárnému výsledku – tedy k potvrzení nalezených protein-proteinových interakcí. Např.: výběr vhodných A-, G- konjugátů; výběr vhodného tagu; optimalizace vazebných pufrů a aditiv; optimalizace eluce; výběr vhodného substrátu pro *in vitro* translaci; „codon usage“ problematika atd.

Avšak výsledkem veškerých optimalizačních procedur bylo v tomto případě zjištění, že ačkoliv předpokládané telomer-vazebné proteiny z *A. thaliana* jsou evolučně blíže pšenici než králíkovi, proteiny translatované v pšeničném extraktu nejsou schopny interakce během imunoprecipitačních pokusů. Naproti tomu exprese těchto rostlinných proteinů v lyzátu z králíčích retikulocytů vedla k potvrzení předpokládaných interakcí mezi proteiny AtTRB (*Telomere Repeat Binding*) a proteinem AtPOT1b (*Protection of Telomeres*) a bližší charakterizaci jejich interakčních domén.

Prochazkova Schrupfova P., Kuchar M., Palecek J., Fajkus J. Mapping of interaction domains of putative telomere-binding proteins AtTRB1 and AtPOT1b from *Arabidopsis thaliana* 2008

Podporováno grantem GAČR (521/08/P452 and 204/08/1530) a MŠMT ČR (MSM0021622415 and LC06004).

IMUNOAFINITNÍ PURIFIKACE V ANALÝZE FYTOHORMONŮ

JAKUB ROLČÍK

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AV ČR,
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
E-mail: jakub.rolcik@seznam.cz, tel.: +420 585 634 864

Hladiny fytohormonů a jejich metabolitů v rostlinném organismu jsou velmi nízké, typicky na úrovni desítek nanomolů až stovek femtomolů na gram čerstvé hmoty. Jejich kvantifikace tak představuje náročnou úlohu z oblasti stopové chemické analýzy. Situace je dále ztížena tím, že rostlinný materiál sestává ze složité matrice obsahující široké spektrum tzv. balastních látek (sacharidy, listová barviva, fosfolipidy ad.) a také enzymy a radikály schopné molekuly analytu (fytohormonu) velmi rychle destruovat v průběhu odběru a zpracování vzorku. Úspěšné provedení analýzy fytohormonu proto vyžaduje důkladné porozumění dějům, k nimž při zpracování vzorku dochází, a metodám, jež jsou k analýze použity. Nezanedbatelná je rovněž zkušenost.

V současnosti jsou při analýze fytohormonů s úspěchem používány účinné separační metody (např. SPE, Solid-Phase Extraction) a vyspělá instrumentace (nejčastěji HPLC či UHPLC s následnou hmotnostní detekcí). Nejmodernější tandemové hmotnostní detektory se vyznačují vysokou selektivitou a citlivostí umožňující kvantifikaci attomolárních množství analytu.

Ani nejmodernější technologie ovšem nejsou zárukou úspěšné kvantifikace v případech, kdy je studovaná látka přítomna ve velmi nízkých látkových množstvích a/nebo ve velmi složité matrici. Originálním řešením je v takové situaci použití imunoafinitní purifikace (označované již od 80. let dvacátého století jako „imunoafinitní extrakce“ či „imunoafinitní chromatografie“). Princip metody spočívá v navázání protilátek, které jsou schopny specificky interagovat se studovaným fytohormonem (nejčastěji jde o protilátky myší nebo králíčí), na příhodný nosič (gel). Kolonkou obsahující tento afinitní gel se pak nechá prokapat předčištěný rostlinný extrakt, z něž protilátky „vychytají“ přítomný fytohormon. Po promytí imunoafinitní kolonky vodou lze zadržený analyt snadno eluovat např. aplikací methanolu.

Kombinace účinné imunopurifikační metody a moderní instrumentace dovoluje jak kvantifikaci již popsaných, tak izolaci nových metabolitů rostlinných hormonů. Přednáška bude věnována podrobnějšímu popisu metody a ukázkám jejího úspěšného použití.

Výzkum byl podporován grantem MŠMT České republiky MSM 6198959216.

EPIGENETIKA ROSTLIN

BORIS VYSKOT

Oddělení vývojové genetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, 61265 Brno

E-mail: vyskot@ibp.cz, tel.: +420 541 240 500, www.ibp.cz/labs/LPDG

Epigenetiku definujeme jako mitoticky a/nebo meioticky děděné změny genové exprese, ke kterým dochází beze změny primární genetické informace (tedy beze změny sekvencí nukleotidů v DNA). Epigenetika je také charakterizována jako tzv. chromatinová dědičnost, neboť bylo prokázáno, že je způsobena (či lépe provázena) strukturálními i chemickými modifikacemi chromatinu – především DNA a nukleozomálních histonů.

Epigenetika je výrazně charakterizována jako nejistá (nestabilní) dědičnost, která se obvykle neřídí mendelovskými pravidly. Znamená to, že epigeneticky řízené lokusy se zpravidla vyznačují neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. Klasickým příkladem nestabilního (mozaikového) fenotypu je tzv. poziční efekt u drosofil, kdy exprese genu odpovídající za barvu očního pigmentu se může podrobovat epigenetickému umlčování vlivem sousedního heterochromatinu. Jiným dobře popsáním epigenetickým jevem jsou paramutace u kukuřice, kdy dochází k dědičné změně exprese jedné alely vlivem alely druhé. Od 80. let XX. století došlo s nástupem technik molekulární biologie k objasnění dalších epigenetických jevů – genomového imprintingu u placentálních savců a krytosemenných rostlin, epimutací, epigenetického umlčování transposonů a transgenů i jejich kauzálních mechanismů (metylace cytozinu v DNA, RNA interference, acetylace i další modifikace nukleozomálních histonů, úlohy supresorových a aktivátorových vazebních proteinů aj.). Přednáška podává ucelený přehled epigenetických procesů u krytosemenných rostlin členěný do následujících kapitol – rostliny versus živočichové a genomový imprinting, klasické epigenetické systémy (transpozony, paramutace, nukleolární dominance), transgeny a viry zprostředkované umlčování genů a úlohy epigenetických procesů ve vývojových procesech.

ALLIS C.D., JENUWIN T., REINBERG D., CAPARROS M.L.: EPIGENETICS. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2007 (ISBN-13: 978-0-87969-724-2)

JAENISCH R., BIRD A.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. – Nature Genetics 33: 245-254, 2003

JIRTLE R.L., SKINNER, M.K.: Environmental epigenomics and disease susceptibility. – Nature Review Genetics 8: 253-262, 2007

RICHARDS E.J.: Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. – Nature Review Genetics 7: 395-601, 2006

TOLLEFSBOL T.O. (Ed): EPIGENETICS PROTOCOLS. – Humana Press, Totowa, 2004 (ISSN 1064-3745)

VYSKOT B.: The role of DNA methylation in plant reproductive development. – In: Ainsworth C.C., ed.: SEX DETERMINATION IN PLANTS, str. 101-120, Bios Scientific Publishers, Oxford, 1999 (ISBN 1 85 996 042 1)

VYSKOT B.: Přenos epigenetické informace v liniích buněk somatické a zárodečné dráhy. – In: Jonák J. ed: MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENETIKA XII, str. 7-21, ÚMG, Praha, 2006 (ISBN: 80-902588-5-9)

WOLFFE A.: CHROMATIN: STRUCTURE AND FUNCTION. – Academic Press, San Diego, 1998 (ISBN 012-761914-3)

Poděkování:

Tato práce byla podporována MŠMT (LC06004).

A FORWARD GENETICS SCREEN – PERSPECTIVES AND PITFALLS

TOMASZ NODZYŃSKI, HIROKAZU TANAKA, RICARDO TEJOS, ELENA FERARU, JIŘÍ FRIML

Department of Plant Systems Biology, Flanders Institute for Biotechnology (VIB) and Department of Molecular Genetics, Ghent University, 9052 Gent, Belgium
E-mail: jifri@psb.vib-ugent.be, tel.: +32 933 13 913

A forward genetics screen is a procedure in which individuals that possess a certain phenotype are being identified. Forward genetics begins with a phenotype and subsequently identifies the genotype. Whereas the reverse genetics starts with a mutated gene and asks what are the changes of phenotype that the mutation caused.

Application of forward genetics gives the possibility to identify several components (genes) involved in a particular biological process. However the strength of this approach lies largely in the design of the forward genetics screen that has been used to identify the candidate genes. The ability to discriminate specific phenotypes, correlated with a biological process, depends on the stringency of the screen conditions and has a direct impact on the specificity of gathered hits.

Subsequent identification of an altered gene causing a given phenotype can be achieved by positional (map-based) cloning techniques. Several *Arabidopsis* accessions, or ecotypes, are sufficiently divergent to support the design of molecular markers at high density. Most commonly used combination for mapping purpose are crosses between Columbia and Landsberg *erecta*. Those two accessions have been estimated to differ in four to eleven positions every 1000 bp. What is more, extensive genome sequence information is available for those ecotypes facilitating the design of a variety of molecular markers that can be used for fine mapping. Exploiting those possibilities it is possible to identify the target gene in a relatively short time.

P Přednášky

KTERAK ZE DVOU ZMETKŮ VYTVOŘIT FUNKČNÍ VIRUS A K ČEMU JE TO DOBRÉ

TOMÁŠ MORAVEC, HANA HOFFMEISTEROVÁ, JITKA FOLWARCZNÁ, HELENA PLCHOVÁ, NOEMI ČEŘOVSKÁ

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Na Karlovce 1a, Praha 6
E-mail: moravec@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108

V současnosti se mnoho pozornosti soustřeďuje na využití rostlin pro expresi cizorodých proteinů s velkou přidanou hodnotou jako jsou například protilátky, vakcíny, enzymy a podobně.

Jedním ze způsobů jak tohoto cíle dosáhnout je použití expresního vektoru založeného na rostlinném viru. Výhodou těchto vektorů je především rychlost, se kterou lze otestovat expresi studovaného proteinu přímo v rostlinách bez nutnosti přípravy transgenních rostlin. Další výhodou virových vektorů je vysoká maximální koncentrace exprimovaného cizorodého proteinu. Širšímu využití virových vektorů však brání i některé nevýhody. Jde především o nutnost každou jednotlivou rostlinu inokulovat buď virovou RNA, nebo pomocí cDNA klonu aplikovaného buď biolisticky nebo pomocí agrobakteria. Další potenciální nevýhodou mohou být obavy z nekontrolovaného šíření modifikovaného rostlinného viru mimo experimentální rostliny.

V naší přednášce bychom Vás rádi seznámili s jednoduchým systémem, který obě tyto hlavní nevýhody obchází. Systém je založen na simultánní infekci primární rostliny dvěma nepříbuznými rostlinnými viry, které sice nejsou schopny se šířit v rostlině samostatně, ale navzájem si své nedostatky dokáží natolik zkomplementovat, že v infikovaných rostlinných buňkách vznikají zcela funkční virové částice, které lze použít jako inokulum pro mechanickou inokulaci sekundárních rostlin virovým vektorem. V sekundárně infikovaných rostlinách již však plně funkční a infekční virus nevzniká, virus se šíří pouze v listech zasažených inokulem. Kromě přípravy standardizovaného a stabilního inokula lze tento systém využít i pro studium šíření virové infekce rostlinou a pro objasnění mechanismů CPMR (coat protein mediated resistance).

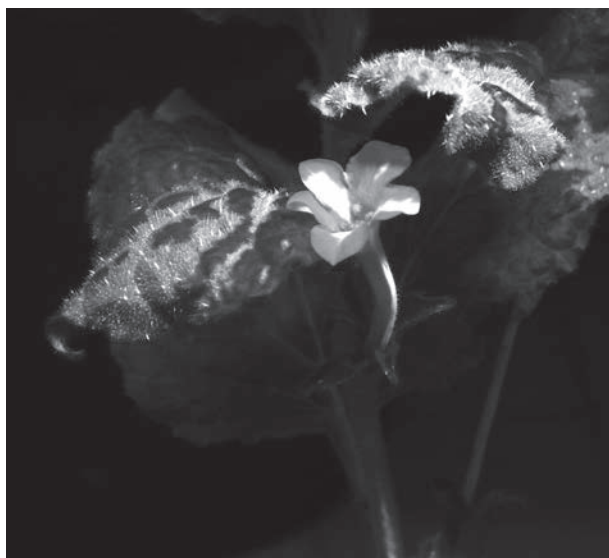


Fig1: Systémová infekce rostlin *N. benthamiana* virovým vektorem, založeným na viru mozaiky tabáku (TMV) jehož obalový protein byl nahrazen zeleným fluorescenčním proteinem (viz světlá místa na fotografii).

Tento výzkum je podporován grantem No. 521/09/1525 GAČR.

P Přednášky

BIOLOG STATISTIKEM NEBO SPÍŠE STATISTIKA PRO BIOLOGA?

ARNOŠT KOMÁREK

Katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky, Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy v Praze,
Sokolovská 83, 186 75 Praha 8 – Karlín
E-mail: arnost.komarek@mff.cuni.cz, tel.: +420 221 913 282

S ohledem na vybavení současných počítačů a dostupnost na první pohled snadno ovladatelného statistického software nabývá mnohý uživatel statistiky (biologa nevyjímaje) pocitu, že je schopen statisticky analyzovat téměř libovolný problém, s kterým se setká, aniž by o statistice měl znalosti přesahující objem manuálu oblíbeného statistického programu. Jedním z nejzákladnějších problémů, s jehož statistickým řešením se seznámí student základního kurzu biostatistiky, je srovnání typické hodnoty daného ukazatele s hodnotou referenční. Navazujícím souvisejícím problémem je srovnání typické hodnoty daného ukazatele mezi dvěma skupinami. V první části příspěvku vyjdeme z jedno- a dvouvýběrového t-testu jakožto typicky používaných (a většinou publiků jistě známých) metod pro statistickou analýzu výše uvedených otázek. Na příkladech upozorníme na často se vyskytující chyby a ukážeme, že bezmyšlenkovitě „mačkání tlačítek“ (byť správných) statistického programu může bez hlubšího porozumění vést k chybným závěrům. V druhé části příspěvku se pokusíme na modelové situaci naznačit, jak by ideálně měl postupovat nestatistik (biolog), jestliže i jenom předpokládá, že řešení nestatistického (biologického) problému bude v jisté fázi vyžadovat statistickou analýzu. Třetí část příspěvku nastíní na konkrétních příkladech z konzultační praxe pro vědce biomedicínských oborů, čeho všeho lze s pomocí statistiky dosáhnout, jestliže nestatistik zavčas spojí síly se statistikem.

MODELOVÁNÍ TOKU AUXINU – LIMITY, ÚSKALÍ A PERSPEKTIVY

KLÁRA HOYEROVÁ¹, PETR HOŠEK², MARCEL JIŘINA², JAN PETRÁŠEK¹, PETR KLÍMA¹, MARTINA LAŇKOVÁ¹,
PETRE I. DOBREV¹, EVA ZAŽÍMALOVÁ¹

¹ ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 16502 Praha, ČR
² FBMI ČVUT, Nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno, ČR
E-mail: hoyerova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 436

Auxiny jsou odpovědné za regulaci širokého spektra fyziologických procesů u rostlin. Rozhodující je zde především tok auxinu pletivem, jeho směr a intenzita, ze které vyplývá koncentrace auxinu dosažená v místě účinku.

Současné modely jsou převážně cíleny na simulaci toku auxinu rostlinným pletivem.

Matematické vztahy, které popisují nezbytné závislosti toku auxinu na nejrůznějších faktorech a které tvoří základ těchto modelů, mají svůj logický původ na úrovni jediné buňky. Přesto probíhá konfrontace zmíněných modelů s reálnými daty až na úrovni pletiva.

Na základě experimentálních dat, která charakterizují kinetiku přenosu auxinu přes membránu pomocí přenašečů, ale i metabolismus auxinů během transportu a další jevy, jsme schopni identifikovat potřebné parametry a realizovat takový model transportu auxinu na úrovni buňky, jehož výstup bude srovnatelný se skutečností.

Zásadním problémem matematických modelů je jejich opravdová platnost, která je nedokazatelná, ale pouze vyvratitelná. Nevyvracený model tak považujeme za platný.

Pozitivem modelu je ale možnost jednoznačného a opakovatelného zpracování komplexních datových sad (data různých typů) a možnost ověřování hypotéz o funkci a chování systému, navrhování nových elementů, závislostí a vazeb v systému.

Příspěvek bude zaměřen na porovnání deterministického a stochastického přístupu k modelování toku auxinu, na úskalí při verifikaci a validaci modelu a na výstupy, které by model mohl poskytovat.

Podporováno grantem GAAP KJB600380702 a projektem MŠMT LC06034.

POLAROGRAFIE VČERA, DNES A ZÍTRA – 50 LET OD UDĚLENÍ NOBELOVY CENY

Jiří BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
E-mail: barek@natru.cuni.cz, tel.: +420 221 951 224

Dne 10. prosince 1959 v 16.30 odevzdal švédský kál Gustav Adolf VI. profesor Jaroslavu Heyrovskému Nobelovu cenu za polarografickou metodu analýzy. Padesáté výročí této události je jistě vhodným důvodem k zamyšlení nad vývojem této metody, její historií, současností i budoucností. A to tím spíše, že historie vývoje nové analytické metody a rozšiřování jejího aplikačního potenciálu může být inspirující i pro ostatní přírodovědné obory, neboť řada souvisejících skutečností je nejen nadčasových ale přesahuje i rámec jedné vědní disciplíny.

V období před 2. světovou válkou se polarografie i díky mimořádným propagačním schopnostem profesora Heyrovského – značně rozšířila v analytických laboratořích, v provozu i ve výzkumu, stala se první analytickou metodou s automatickým záznamem a patřila k nejcitlivějším a nejselektivnějším analytickým metodám. Přestože v padesátých a šedesátých letech ustoupil její význam poněkud do pozadí v souvislosti s bouřlivým rozvojem moderních separačních a spektrometrických metod, může dodnes v řadě případů hrát důstojnou roli.

V každém případě se polarografie stala zárodkem moderních elektroanalytických metod, sensorů či biosensorů pracujících na elektrochemických principech, elektrochemických detektorů pracujících ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií či kapilární zonovou elektroforézou a dodnes může být užitečná při stopové analýze složitých environmentálních či biologických vzorků.

V přednášce bude věnována pozornost historii polarografie, kterou od narození profesora Heyrovského v roce 1890 až do okamžiku udělení Nobelovy ceny v roce 1959 výstižně a kvalifikovaně popsal profesor Zuman, jeden z nejbližších žáků a spolupracovníků profesora Heyrovského (Zuman 2001). Dále budou diskutovány současné možnosti i omezení polarografie a z ní odvozených moderních elektroanalytických metod, které jsou popsány v historických souvislostech např. v přehledných referátech věnovaných 110. výročí narození profesora Heyrovského (Barek et al., 2001), 80. výročí objevu polarografie (Barek, Zima 2003) či 50. výročí udělení Nobelovy ceny za polarografii (Barek 2009a, Barek 2009b). Závěrem bude učiněn pokus o pohled do budoucnosti a o přehled perspektiv moderních analytických metod v souvislosti se stále rostoucími požadavky celé společnosti i jednotlivých přírodních věd. Autor tohoto příspěvku by v něm rád ukázal, že díky nadšení a úsilí elektroanalytických chemiků mohou moderní polarografické a voltametrické metody hrát významnou roli i v dalších dekádách tohoto tisíciletí.

Reference

- Barek J., Fogg A.G., Muck A., Zima J.: 2001 – Crit. Rev. Anal. Chem. 31: 291
Barek J., Zima J.: 2003 – Electroanalysis 15:467
Barek J.: 2009a – Crit. Rev. Anal. Chem. 39: 128
Barek J.: 2009b – Rev. Polarography 55:27
Zuman P.: 2001 – Crit. Rev. Anal. Chem. 31: 281

Poděkování

Vývoj moderních elektroanalytických metod je podporován projekty MŠMT ČR. MSM0021620857, LC 06035 a RP 14/6.

P Přednášky

CESTOU KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

ONDŘEJ ŠEBESTA

PřF UK, Viničná 7, 128 44, Praha 2, ČR

E-mail: OndrejSebesta@seznam.cz, tel.: +420 221 951 943

V současnosti lze zaznamenat prudký vzestup zájmu badatelů o mikroskopické fluorescenční techniky. Mikroskopické vybavení a technická dokonalost přístrojů i metod značení kladou zvýšené nároky na porozumění nejen biologickým dějům, ale také na porozumění metodickému přístupu, technickým možnostem přístrojů a analýze získaných dat.

Společně se podíváme na základní možnosti konfokálního mikroskopu, způsoby jak nasnímat použitelná data a jak se ze získaných dat dozvědět požadovanou informaci. Představíme si principy fluorescence a konfokálního mikroskopu. Pohlédneme na vlastnosti optické soustavy čoček v objektivu a probereme základní stavbu digitálního obrazu. Na závěr si ve zkratce ukážeme způsoby zpracování a analýzy obrazových dat.

PRAKTICKÝ PRŮVODCE MÉNĚ BĚŽNÝMI METODAMI KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE U ROSTLIN ANEB KONFOKÁL NENÍ JEN FOŤÁK NA PĚKNÉ OBRÁZKY

JAN PETRÁŠEK^{1, 2}

¹ ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR

² Katedra fyziologie rostlin PřFUK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR

E-mail: petrasek@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 425

Konfokální mikroskop se během posledních let stal prakticky běžnou součástí každého většího biologického experimentálního pracoviště. Díky své schopnosti zaznamenávat obraz pouze z dané roviny ostrosti umožňuje nerušeně nahlédnout do nitra biologického materiálu, který buď fluoreskuje spontánně nebo obsahuje vnesené fluorescenční proteiny. V zásadě se setkáváme se dvěma typy konfokálních mikroskopů. Asi nejrozšířenější jsou dnes laserové skanovací konfokální mikroskopy, které využívají jako zdroj světla lasery o různých vlnových délkách, rastrují snímání vzorek bod po bodu a využívají k odfiltrování neostrého obrazu statickou konfokální šterbinu. Druhou skupinu tvoří konfokální mikroskopy využívající laserů či prosté fluorescenční výbojky a k odfiltrování neostrého obrazu principu kotouče s rotujícími šterbinami. Protože obecným trendem je snaha o rychlé a co nejméně invazní způsoby pozorování s využitím co nejmenší energie UV světla, představují mikroskopy s rotujícím diskem budoucnost pozorování živého materiálu.

Smyslem tohoto příspěvku je představit z praktického hlediska možnosti, které nabízí moderní laserová skanovací mikroskopie v buněčné biologii rostlin se zaměřením na pozorování živého materiálu. Zejména s využitím příkladů z mikroskopu Zeiss LSM5 DUO budou shrnuty metody konfokálního zobrazování u rostlin *Arabidopsis thaliana* a buněčných kultur *Nicotiana tabacum* nesoucích stabilně fluorescenční proteiny, jakož i u rostlin a buněčných kultur *Nicotiana tabacum* exprimujících fluorescenční proteiny transienně. Naprostá většina požadavků uživatelů konfokálních mikroskopů bývá zaměřena na co nejdokonalější zobrazení distribuce daného proteinu či struktury, nejlépe ve více kanálech. Není to ovšem jediná metoda, kterou vybavení moderních konfokálních mikroskopů umožňuje. Popsány budou možnosti sledování dynamiky proteinů v buňkách rostlin (FRAP; fluorescence recovery after photobleaching), jejich výhodnocování a prezentace. Další možnosti odkrývají postupy spektrální analýzy spektra fluorescence daného fluorochromu, které umožňují jak separaci překrývajících se spekter tak např. kvantifikaci přenosu energie mezi dvěma flurochromy (FRET; Förster Resonance Energy Transfer).

Podporováno grantem MŠMT LC06034.

PRACTICAL NOTES ON FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING

OLEKSANDR CHERNYAVSKIY

Institute of Physiology, CAS, Videňská 1083, 140 00 Prague 4 Krc, Czech Republic

E-mail: cernavsky@biomed.cas.cz, tel.: +420 296 442 274

Laser scanning confocal microscopy has already become an every-day tool in a large number of laboratories all around the world. Nowadays, more and more researchers use real 3D imaging capabilities of this technique. Presently, high-power pulsed lasers are available and used for two-photon excitation fluorescent microscopy. Such approach has an advantage of intrinsic 3D capability, so it does not need any confocal pinhole and all emitted photons contribute to the registered signal, providing e.g. enhanced signal-to-noise ratio for visualisation of deep tissue layers. Also, it does not require complicated aligning, necessary for systems with UV pulsed lasers used for conventional one-photon excitation (both wide-field and confocal).

Unlike above mentioned techniques dealing with intensities (i.e., number of registered photons), fluorescence lifetime imaging (FLIM) makes use of the time delay between pulses of excitation laser light, and a moment of photon registration by a detector. Recent advances in electronics providing highly-sensitive detectors for recording low-level light signals made possible the time-correlated single photon counting (TCSPC) with picosecond resolution and extremely high precision.

In the simplest case, the fluorescence lifetime imaging can be used as an additional parameter to separate or identify the emission of different fluorophores. It is particularly useful to distinguish the autofluorescence components in tissues, which have poorly defined fluorescence spectra but can be distinguished by their fluorescence lifetime. Moreover, the fluorescent lifetime of endogenous fluorophores is strongly dependent on the local environment of molecules, such as binding to proteins or lipids. Also, protonated and deprotonated form of the same fluorophore may have different fluorescence lifetime. Since the equilibrium between these forms is pH-dependent, average lifetime can be used as an indicator of local pH.

Since the lifetime does not depend on the concentration of the fluorophores, FLIM is a direct approach to the mapping of cell parameter like pH, ion concentrations or oxygen saturation, protein interaction, FRET and other effects on the molecular level.

Becker W., The bh TCSPC Handbook: 2008, 3rd edition, Becker & Hickl GmbH

Chernyavskiy O., Kubínová L.: Multi-photon excitation microscopy, in.: Proceedings of Advances in Widefield and Confocal Fluorescence Microscopy: 2008, Brno, Librex.Eu, s.20-28

Koenig K., Riemann I., High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution: 2003 – J. Biom.Opt., 8: 432-439

Lakowicz J.R., Szmacinski H., Nowaczyk K., Johnson M.L., Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH: 1992 – PNAS 89: 1271-1275

Supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (grant AV0Z 50110509) and by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (grant LC06063).

ANALÝZA TROJROZMĚRNÝCH DAT ZÍSKANÝCH KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIÍ ANEB CO S DATY S POUŽITÍM STEREOLOGICKÝCH METOD

JANA ALBRECHTOVÁ¹, LUCIE KUBÍNOVÁ², JIŘÍ JANÁČEK², ZUZANA LHOTÁKOVÁ¹

¹ Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2

² Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

E-mail: albrecht@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 694

Pro zpracování sérií optických řezů získaných konfokální mikroskopií trojrozměrnými (3D) strukturami byla v nedávné době vyvinuta řada metod, které umožňují popisovat povrchové i prostorové vlastnosti struktur. Pro měření kvantitativních charakteristik struktur je možno použít celou řadu metod stereologických, digitálních metod analýzy obrazu či 3D prostorových rekonstrukcí.

Klasické stereologické metody umožňují z měření na 2-rozměrných řezech s využitím bodových, čárových či plošných testovacích sond odhadovat prostorové vlastnosti, jako je objem, obsah povrchu, délka mikroskopických vláknitých struktur v prostoru. Pro vyhodnocení sérií optických řezů v rámci jednoho tlustého řezu se využívá prostorových sond, jako je optický disektor, vertikální prostorová mřížka, fakír, kráječ aj. V současné době už jsou k dispozici i pokročilé softwarové systémy se stereologickými moduly, které umožňují automatizovaný či interaktivním způsob měření. Použití stereologických metod má především tu výhodu, že při zachování principu systematického, rovnoměrně náhodného vzorkování, je uplatnitelné pro struktury libovolného tvaru a uspořádání. Navíc nové metody využívající charakteristiky druhého řádu přinášejí možnost popisu prostorového uspořádání struktur a jejich vzájemných vztahů v prostoru (např. kolokalizace).

Aplikace konfokální mikroskopie a stereologických metod pro prostorové charakteristiky struktur je na určitých objektech, jako je jehlice smrku ztepilého, možná i po uchování omezených vzorků zmrazením (Lhotáková a kol. 2008). Navíc u jehlic smrku, díky intenzivní autofluorescenci chlorofylu v chloroplastech a fenolických látek vázaných v buněčných stěnách je možné používat ruční řezy bez předchozího zpracování vzorků (Albrechtová a kol. 2008). S použitím stereologických metod a software *Ellipse* (ViDiTo, Košice, SR) je možné kromě charakteristik mezofylových buněk, jako je objem mezofylu, vnitřní povrch jehlice, počet a průměrný objem mezofylové buňky, určit i nevychýlený odhad počtu chloroplastů v mezofylových buňkách. Vybrané stereologické metody, fakír a disektor, byly prokázány jako dostatečně citlivé pro kvantitativní popis změn ve struktuře mezofylu jehlic smrku ztepilého.

Albrechtová J, Janáček J, Lhotáková Z, Radochova B, Kubínová L. 2007. Novel efficient methods for measuring mesophyll anatomical characteristics from fresh thick sections using stereology and confocal microscopy: application on acid rain-treated Norway spruce needles. *Journal of Experimental Botany* 58, 1451-1461.

Lhotáková Z, Albrechtová J, Janáček J, Kubínová L. 2008. Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* 232, 56-63.

Práce byla podpořena z projektu GAAV A600110507.

DEFORMACE MEZOIFYLOVÝCH PLETIV V JEHLICÍCH SMRKU A JEJICH DIFERENCIACE PO OXIDATIVNÍM PŮSOBNÍ OZONU NEBO BIOTICKÝMI FAKTORY

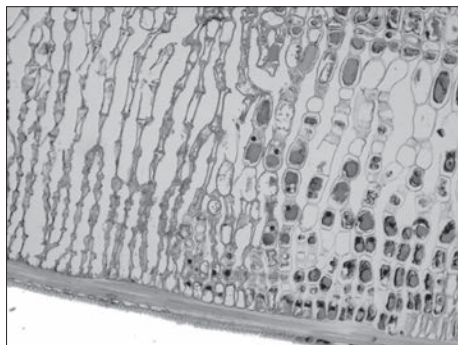
VÁCLAV KRPEŠ

Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, Katedra biologie, ul. 30. dubna 22, Ostrava
E-mail: vaclav.krpes@osu.cz, tel.: 777 676 310

Na krycích pletivech jehlic smrku ztepilého bývají často pozorovány bezbarvé a žlutavé bodové chlorózy. Tyto viditelné symptomy jsou přisuzovány škodlivému působení přízemního ozonu. Podobné příznaky se objevují i po působení savým hmyzem nebo endofytickými houbami. Přesné rozpoznání příčiny poškození nelze zcela spolehlivě určit. Vhodnou aplikací histopatologických a histochemických metod se podařilo hodnověrně rozlišit distinkce mezi působením obu škodlivých faktorů. Analýza mezofylových pletiv poškozených segmentů jehlic ukázala rozdílnost v morfologické stavbě vzniklých deformací.

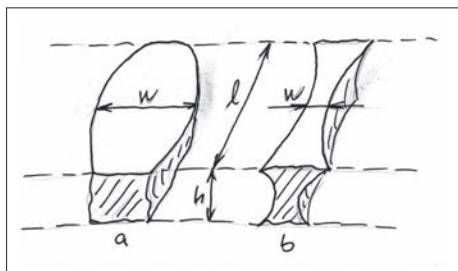
Vzorky byly fixovány fixačním roztokem FAA, byly z nich vytvořeny bloky, příslušný poškozený segment byl vykrojen, separován a zpracován aplikací histopatologických a histochemických metod jako nejvhodnější barvivo byly vybrána malachitová zeleň s kyselým fuchsinem a toluidinová modř, Van Gieson, Groccot. Obraz byl zpracován mikroskopem fy ZEISS Axiostar Plus propojený s kamerou fy OLYMPUS C5060 WZ a multimediálním PC. Pro analýzu obrazu a statistiku byl využit software Quick Photo Camera 2.2, GIMP 2.2.10 a R 2.2.1.

Strukturální analýzy separovaných segmentů, poškozených oxidativním stresem, ukázaly trvalé změny krycích a mezofylových pletiv. Rozsah poškození dosahoval až k vodivým pletivům. Na rozhraní poškozených autonomních oblastí byly nalezeny indukce mitóz. Histologický obraz ukázal kvalitativní deformace v místech vybledlých částí. V mezofylu byly pozorovány časté autonomní zóny atrofovaných buněk se sníženou osmotickou aktivitou, opakovaně přerušovaná kontinuita buněčných seskupení, lokálně se vyskytující hypertrofie plně turgescenčních buněk. V substomatárním prostoru průduchů zjištěny kavity a asymetrie svěřacích buněk (obr. 1). Velmi citlivá impregnační barvení podle Groccota neukázala přítomnost hyf endofytických hub a plísní, které mohou působit sekundárně.



Obr.1 Zřetelné rozhraní mezi trvale poškozenými buňkami oxidativním stresem a mitotickou aktivitou plně turgescenčních buněk.

Předpokládáme, že opakovaným působením ozonu dochází k narušení redoxní rovnováhy buňky a vzniká její následná deformace. Během vysoké insolace dojde ke ztrátám vody, buňka se zužuje pouze v jednom rozměru, šířce (w), přičemž délka (l) a výška (h) buňky zůstává prakticky stejná. V nejjednodušším pohledu proto můžeme považovat relativní objem buňky jako úměrný poměru nynější šířky buňky k šířce buňky zdravé (obr.2). Tento poměr jsme nazvali stupněm deformace buňky.



Obr.2 Schematický náčrtek znázorňující odvození relativního objemu buňky.

P Přednášky

Původní šířku buňky v jejím zdravém stavu (plné turgescenci) zpravidla neznáme. Z měření provedených na souborech zdravých buněk v radiálním řezu mezofylu bylo zjištěno, že jejich šířka je sice hodně proměnlivá, ale dá se zhruba považovat za lineární funkci délky buňky. Tuto funkci lze získat z naměřených dat lineární regresí. Protože délku buňky v procesu urychlené ztráty vody v autonomní oblasti substomatárního prostoru považujeme za konstantní, můžeme nemocné buňce dané délky přes uvedenou funkci přiřadit původní šířku a spočítat stupeň deformace buňky, který v našem jednoduchém modelu považujeme za totožný s relativním objemem buňky.

Bylo zjištěno, že ve zkoumaném souboru poškozených mezofylových buněk jehlic se průměrná délka zdravých a nemocných buněk neliší. Stupeň deformace poškozených buněk, vyjádřený poměrem šířky nemocných buněk k šířce zdravých buněk stejné délky, činil 0,289.

Relativní objem nemocných buněk byl úměrný stupni jejich deformace. Medián vodního potenciálu měl hodnotu – 2,12 MPa; směrodatná odchylka činila 1,1 MPa

Medián tvarového indexu buňky (poměr šířky buňky k její výšce) měl u zdravých buněk hodnotu 0,591, u nemocných buněk 0,187. Směrodatná odchylka činila u zdravých buněk 0,220 a u nemocných 0,081. Tvarový index lze použít jako pomocný indikátor onemocnění.

Působení ozonu narušuje rovnováhu růstových regulátorů v jehlicích a evokuje zvýšenou mitotickou aktivitu; vyvolává fotooxidaci fotosyntetických pigmentů, poškozují buněčné membrány a činí je propustnější pro kationty. Snižuje plný výkon fotosyntézy, narušuje energetický systém smrkových porostů a oslabuje jejich růst.

PROČ NÁS LIDI NEMAJ RÁDI: POPULARIZACE JE NUTNOST, NE LUXUS. JAK NA NI?

JAN KOLÁŘ

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR
E-mail: kolar@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 414

Lidé nás, rostlinné biology, nemají nijak zvlášť rádi. Ne že by nás nesnášeli – spíše se o naši práci nezajímají. Rostliny nejsou tak atraktivní jako roztomilá zvířátka, romantické snímky z vesmíru nebo lékařské objevy. Tento handicap našetřít není nepřekonatelný. Intenzivní propagací úspěchů rostlinné biologie ho lze z větší části eliminovat. Což by měla být jedna z priorit našeho oboru.

Nejen rostlinní biologové, ale všichni badatelé musí komunikovat s veřejností. Podle průzkumů si lidé vědců poměrně váží. Oprávněně se však ptají, jaký prospěch přináší společnosti jejich práce, placená z peněz daňových poplatníků. Navíc stále přežívá předsudek, že vědci jsou darmožrouti, kteří vystudovali za dělnické (dnes už i jiné) peníze a teď za tyto finance zkoumají neužitečné nesmysly.

Popularizace výzkumu a jeho výsledků je proto zcela nezbytná. Umožňuje totiž získat podporu veřejnosti. Letošní situace kolem rozpočtu Akademie věd ČR jasně ukázala, že výzkumná instituce, která by o tuto podporu neusilovala, by byla v dlouhodobé perspektivě odsouzena k zániku. Totéž platí pro jednotlivé vědní obory, tedy i ten náš. Do popularizace by se měli zapojit všichni vědci – alespoň třeba ochotou poskytovat rozhovory novinářům.

Plamenné výzvy ovšem nestačí. Proto se v přednášce zaměříme na praktické rady. Vyplatí se vaší instituci zaměstnat profesionálního popularizátora? Jak informovat média a laiky o vaší práci? Jak psát tiskové zprávy? Jak by měly vypadat internetové stránky pro veřejnost?

Psaní o vědě pro neodborníky je svým stylem naprosto odlišné od vědeckých publikací nebo grantových návrhů. Není však tak těžké tento literární žánr zvládnout. Důležité je dodržovat několik základních pravidel, s nimiž se v přednášce seznámíte.

Nebylo by jistě rozumné chtít všechny badatele přeškolit na popularizátory. Každý vědec by ale měl mít povědomí o hlavních zásadách popularizace. Díky tomu bude moci úspěšně komunikovat s novináři nebo spolupracovat se specialisty, kteří jsou na ústavech či vysokých školách zodpovědní za propagaci výzkumu.

**Přístroje a reagencie
pro klinickou diagnostiku
a biomedicínský výzkum**

**BECKMAN
COULTER.**

Analyzátory buněk

Spektrofotometry
a Readery

Centrifugy

Průtokové
cytometry

Genetické
analýzátory

Automatizace

IMMUNOTECH
A BECKMAN COULTER COMPANY

Immunotech a.s., Radiová 1, 102 27 Praha 10, tel.: 272 017 512, 513 www.beckman.cz

Real-Time PCR cyclers

CFX

BIO-RAD
www.bio-rad.com

TŘEPAČKY BIOREAKTORY INKUBÁTORY

Společnost INFORS HT se zabývá projekty, vývojem a výrobou bioreaktorů a třepaček již více jak 40 let. Jejich produkty jsou známé především pro kvalitní zpracování, snadnou a pohodlnou obsluhu a v neposlední řadě také dlouhou životnost.

INFORS HT je především díky své flexibilitě oblíben u zákazníků se speciálními požadavky pro jejich aplikaci. Navíc jde o výrobce, který nabízí bezplatně tzv. „aplikační servis“, který využívají stávající zákazníci z řad začátečníků, ale i odborníků.

INFORS HT

www.infors-ht.com



*photo-bioreactor
Labfors Lux*

BiTRADE s.r.o.

Šlikova 20, Praha 6, 169 00
www.biotrade.cz | biotrade@biotrade.cz

BioTek

www.biotek.com

KOMPLETNÍ VYBAVENÍ K MIKRODESTIČKOVÉ INSTRUMENTACI VE ŠPIČKOVÉ KVALITĚ OD FIRMY BIOTEK



Výkonná promývačka mikrotitračních destiček s volitelnou ultrazvukovou lázní.



Multifunkční reader Synergy 4, měření absorbance, fluorescence, luminiscence. TRF, FRET, FP, dichroická zrcadla.



Spektrofotometrický reader, rozsah od 200 nm do 999 nm, inkubace, třesení + uživatelský SW v ceně.



Univerzální dispenser, nastavitelné objemy od 1 ul až 10ml.

DIALAB spol. s r.o.
- výhradní zástupce firmy Biotek pro ČR
Náměstí osvoboditelů 1, 153 00 Praha 5 – Radotín

Tel./fax: 257 910 260, 257 910 263
E-mail: office@diablab.cz, www.dialab.cz

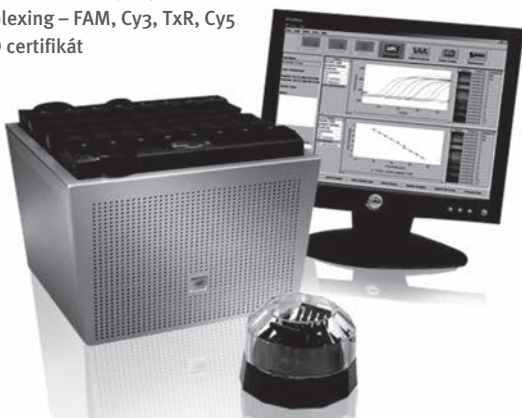
DIALAB

www.dialab.cz

Přístrojové PCR vybavení a sérologická diagnostika pro fytopatologii firmy Dynex

Smart Real Time PCR termocykler

- Flexibilita - 16 na sobě nezávislých pozic pro vzorky
- Robustnost - žádné pohyblivé součásti
- Multiplexing – FAM, Cy3, TxR, Cy5
- CE IVD certifikát



Sérologická diagnostika bakterií a virů firmy Bioreba

- ELISA - soupravy a protilátky pro diagnostiku virů a bakterií užitkových a okrasných plodin
- Protilátky, konjugáty a kontroly samostatně nebo v setu
- AgriStrip – imunochromatografické rychlé testy
- Homex - homogenizátor pro zpracování vzorků



Dynex Technologies spol. s r.o., Na Čihadle 32, Praha 6,
tel.: 800 100 404, +420 220 303 600, fax: +420 224 320 133, www.dynex.cz

DYNEX

Maxwell 16® Personal automation

EAST
PORT



Automatická purifikace nukleových kyselin a proteinů:

- Automatická purifikace pro 1-16 vzorků DNA, RNA nebo proteinů během 20-45 min
- Dvě konvertovatelné platformy: SEV (standard elution volume) a LEV (low elution volume)
- Množství vzorku: 10 – 400 µl, nebo až 50 mg
- Kompaktní přístroj: 314 x 374 x 295 mm

EAST PORT Praha s. r. o., Rubličova 1/969, 161 00 Praha 6, www.eastport.cz
Tel.: 235 318 177, 800 100 529, Fax: 233 312 428, e-mail: eastport@eastport.cz



Kde se kvalita a inovace staly tradicí

New Brunswick byl připojen ke skupině Eppendorf!

Od 1. dubna 2009 jsou produkty New Brunswick prodávány v České republice společností Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.

Společnost Eppendorf vyvíjí, vyrábí a distribuuje systémy pro biomedicínské výzkumné laboratoře po celém světě. Roku 2007 se New Brunswick Scientific připojil ke skupině Eppendorf Group a obohatil portfolio Eppendorf produktů o široké spektrum vysoce kvalitních laboratorních přístrojů a rozšířil tímto směrem i zákaznický servis.

- **Třepačky**

Multifunkční třepačky s moderním designem a vysokým výkonem jsou temperovatelné v rozsahu od 20°C pod okolní teplotu až do 100°C v závislosti na zvoleném modelu. Minimální nastavitelný bod 4°C. Přístroje lze skládat na sebe.

- **Fermentory a bioreaktory**

Přístroje pro přípravu buněčných kultur v objemech až 3 000 litrů. Modulární konstrukce umožňuje kdykoli snadno rozšířit možnosti přístroje.

- **Hlubokomrazicí boxy**

Hlubokomrazicí laboratorní boxy (-86°C) se speciálním těsněním předních dveří jsou energeticky účinné, tiché a spolehlivé, s optickým a akustickým alarmem. K dodání ve skříňovém nebo pultovém provedení.

- **CO₂ Inkubátory**

Zdokonalené laboratorní CO₂ Inkubátory jsou dostupné ve 3 modelech o velikostech 14L, 48L a 170L. Umožňují rychlé a exaktní temperování vnitřního prostoru všemi 6-ti stěnami. Jednoduché a intuitivní ovládání. Ideální pro běžné i speciální buněčné kultury.



» Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o. » Kolovratská 1476 » 251 01 Říčany u Prahy » Česká republika » IČ: 27939031 » DIČ: CZ27939031
Tel/Fax: +420 323 605 454 » E-Mail: eppendorf@eppendorf.cz » Internet: www.eppendorf.cz, www.eppendorf.sk



Dodavatel chemikálií a radiochemikálií

- **Kompletní sortiment amerického výrobce MP Biomedicals:**

- chemikálie pro vědu a výzkum - scintilační koktejly neškodné pro životní prostředí
- stabilizované IsoBlue™ nukleotidy značené ³²P, ³³P

- **Značené chemikálie ³H, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁴⁵Ca, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ¹²⁵I**

MP Biomedicals, Moravak Biochemicals and Radiochemicals, Perkin Elmer, American Radiolabeled Chemicals

- **Protilátky a imunoreagenty**

- **Enzymy, proteiny a peptidy**

- **Ochranné pomůcky pro práci s ionizujícím zářením**

- **Laboratorní pomůcky a přístroje:**

- **Spektrofotometry Nanodrop™**

- Přístroj pro přípravu vzorků FastPrep®

Máte-li zájem o katalog, navštivte naše internetové stránky a vyplňte žádost o zaslání katalogu zdarma.

zelená linka: 800 125 890 www.mgp.cz



Real-Time PCR systém - LightCycler® 480 II

Odhalte možnosti real-time PCR



LightCycler® 480 II - je real-time PCR přístroj používající jako pracovní formát destičky (bílé nebo průhledné) s 96 nebo 384 jamkami. Je to vysoce přizpůsobivý, všestranný a otevřený PCR systém jak pro analýzu genové exprese, tak i nejrozličnějších genetických variací (včetně High Resolution Melting (HRM) analýzy). Inovovaná konstrukce přístroje (stříbrný teplotní blok), jedinečné vlastnosti zdokonaleného software a pro **LightCycler® 480 II** optimalizované reagencie společně maximálně vyhovují moderním požadavkům pro rychlé, přesné a citlivé provádění PCR aplikací v reálném čase.

LightCycler® 480 II - poskytuje výhodu pracovat s různými detekčními formáty (SYBR Green I, hydrolyzační sondy, HybProbe sondy, SimpleProbes sondy, barvičky pro HRM analýzu, ...), což rozšiřuje výběr použitelných aplikací.

Více informací o LightCycler® 480 přístroji naleznete na stránce:

www.lightcycler480.com

Roche s.r.o.

Diagnostická divize

Karlovo náměstí 17

120 00 Praha 2

tel.: +420 220 382 565 (564)

fax: +420 220 382 595

email: czech.appliedscience@roche.com

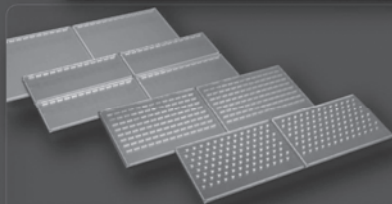


ORIGINS

BY ELCHROM SCIENTIFIC

ELEKTROFOREZA DNA/RNA

400 vzorků
homogenní elektrické pole
kontrola teploty a cirkulace pufru
rovné proužky (ne smiling efekt)



Spreadex®

gely pro analýzu DNA/RNA
(20 bp - 1000 bp)



scintila

www.scintila.cz
market@scintila.cz
537 302 681



Elchrom Scientific
Excellence in Electrophoresis

Komory pro pěstování rostlin a rostlinných TK

Sanyo



MLR 351

Boční osvětlení ze 3 stran
Celková kultivační plocha 0,98 m²
Teplotní rozsah: 0 až +50 °C ±0,3 °C
Osvětlení 0 - 20 000 luxů (nastavitelná intenzita)
5 nastavitelných polic
Verze **351 H** s regulací vlhkosti 55 - 90%

VŠE PRO PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN

A ROSTLINNÝCH TK

DODÁVKY-SERVIS-MONTÁŽ
www.schoeller.cz

Univerzální box pro pěstování rostlin a rostlinných TK

Convion

ADAPTIS A1000

Objem 1000 l
Nerez interier, PU izolace
Teplotní rozsah +4°C až +40°C při zhasnutých světlech
Teplotní rozsah +10°C až +45°C při zapnutých světlech
Regulace vlhkosti



VÝMĚNNÉ KITY PRO ADAPTIS PODLE POŽADOVANÉHO VYUŽITÍ

Kit PG – plant growth: 1 police s lampami pro kultivace rostlin, vertikální proudění, 650 μmol/s/m², 3 úrovně osintenzity, max. výška 106,5 cm, kultivační plocha 0,5 m²

Kit AR – Arabidopsis: 2 nastavitelné police s lampami pro kultivace Arabidopsis, horizontální proudění, 425 μmol/s/m², 3 úrovně osintenzity, max. výška 46 cm, kultivační plocha 1,05 m²

Kit TC – tkáňové kultury: 4 nastavitelné police s lampami pro kultivace TK, vertikální proudění, 200 μmol/s/m², max. výška 20 cm, kultivační plocha 2,1 m²

Kit IN – inkubační: 4 nastavitelné police s armaturami na FI lampu (vhodné pro kličení, hmyz atd.), 125 μmol/s/m², max. výška 25 cm, kultivační plocha 2,1 m²

Extract-N-Amp Your shortcut to PCR

**For the shortest distance between your sample
and data visit: sigma.com/xna**

Rapid, Integrated Extration and Amplification

Extract-N-Amp PCR kits are the world's first **integrated extraction and amplification** process for rapid blood, tissue, plant or seed assays.

A simple „lyse and go“ method eliminates the need for column based or long enzymatic sample purification methods. DNA suitable for PCR applications is available within minutes.

Kits include all reagents, proprietary buffers and PCR enzymes to rapidly extract and amplify DNA of interest from a variety of cells and tissues.

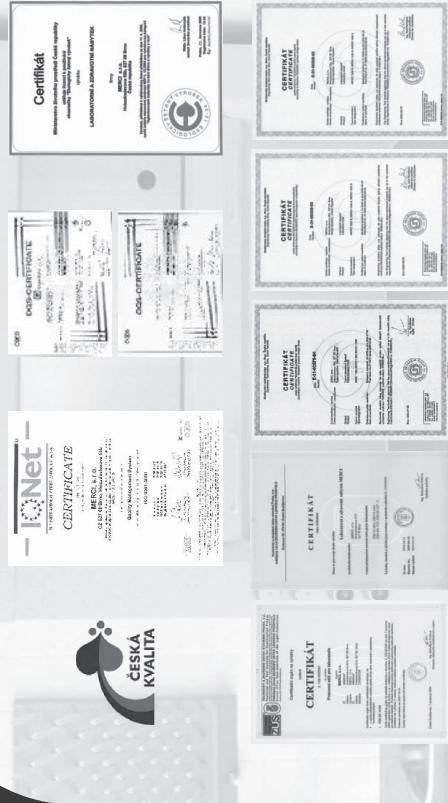
Cat.No.	Description	# Extractions	Price
XNAPS-1KT	REExtract-N-Amp Plant PCR Kit	10	Request Free sample
XNASS-1KT	REExtract-N-Amp Seed PCR Kit	10	Request Free sample

Fast: - 15 min DNA extraction Plant and Seed kits
Accurate: - Hot start antibody for specific genomic DNA PCR amplification
Easy: - Ready to use protocols

**To obtain a free sample, please contact : tatjana.stojnev@sial.com in Slovakia
martin.susla@sial.com in Czech Republic**

SIGMA-ALDRICH®

VŠE PRO KVALITU A VAŠI SPOKOJENOST



- Laboratorní nábytek
- Projektce laboratoří
- Přístroje
- Laboratorní plast
- Laboratorní pomůcky
- Teploměry, hustoměry
- Dávkovací zařízení
- Sklo a porcelán
- Filtrace
- Chemikálie

Brno – Ostrava – Plzeň – Praha – Ústí nad Labem – Bratislava

SOLID3

YOUR TRANSCRIPTOME ANALYSIS EMPOWERED

The SOLID™ 3 System empowers you to discover new insights into gene regulation. With a hypothesis-generating, highly-sensitive assay that preserves the strand information of the original RNA molecule, the SOLID 3 System enables you to detect novel transcripts, including non-coding RNA and distinguish strand-specific expression patterns. The combination of 400 million sequence tags and sample multiplexing capabilities allows for cost-effective analysis of multiple samples in a single run while maintaining the sensitivity to detect low abundance transcripts. Combined with the SOLID Small RNA Expression Kits, Whole Transcriptome Analysis Kits and application specific data analysis tools, the SOLID 3 System provides a comprehensive solution that takes you from RNA to results.

For more SOLID PROOF, visit solid.appliedbiosystems.com



... řešení pro vaši laboratoř

Thermo
SCIENTIFIC



MTX 150 THERMO

nová řada mikroultracentrifug
špičkový výkon 150 tisíc RPM (přes 1 mil xg)
během 80 sec
kompaktní stolní i stojanové provedení
kapacita 30 x 0,5 ml až 6 x30 ml



VARIOSKAN FLASH THERMO

multifunkční reader pro destičky 6 -1536
fotometrické, luminometrické
a fluorometrické aplikace
kontinuální spektrum, špičková přesnost

HERASAFE KS THERMO

nová generace špičkových biohazard boxů tř. II
certifikace podle ČSNEN12469 - ochrana obsluhy
interní prostředí - třída čistoty ISO4
dva nebo tři HEPA filtry, volitelně uhlíkové filtry



GBOX SYNGENE

gel - imaging systém v řadě modifikací
pro všechny fluorescenční
i chemiluminiscenční aplikace
vysoce citlivé kamery a unikátní software



KOMPLETNÍ NABÍDKA LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ A SLUŽEB

BIOHAZARDY, LAMINÁRNÍ BOXY, IZOLÁTORY

BEZODTAHOVÉ DIGESTOŘE

CENTRIFUGY a ULTRACENTRIFUGY

GEL - IMAGING a ANALÝZA

KONCENTRÁTORY VZORKŮ, LYOFILIZÁTORY

MIKRODESTIČKOVÁ INSTRUMENTACE

PŘÍSTROJE PRO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

MRAZICÍ A HLUBOKOMRAZICÍ BOXY

CHLADICÍ BOXY, KRYO TECHNIKA

MYČKY, SUŠIČKY, AUTOKLÁVY

PIPETY, DÁVKOVAČE, PLAST

PŘÍSTROJE PRO VÝROBU ČISTÉ VODY

TERMOSTATY a CO₂ TERMOSTATY

SERVIS, VALIDACE

TRIGON PLUS, s. r. o., Čestlice 93, 251 01 Říčany u Prahy, ČR
tel.: 272680190, 272680370-1, 602313 570-1 fax: 272680914

e-mail: mail@trigon-plus.cz
web: www.trigon-plus.cz

P Plakátová sdělení

MOLECULAR AND CYTOGENETIC ANALYSIS OF THE BIGGEST PLANT GENOMES

KATEŘINA AMBROŽOVÁ¹, JIŘÍ MACAS², PAVEL NEUMANN², ILIA J. LEITCH³, MARTIN A. LYSÁK¹

¹ Department of Functional Genomics & Proteomics, Institute of Experimental Biology, Masaryk University, Czech Republic

² Biology Centre ASCR, Institute of Plant Molecular Biology, Ceske Budejovice, Czech Republic

³ Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK

E-mail: katula@mail.muni.cz, tel.: +420 607 156 127

The genus *Fritillaria* comprises species with the largest genome so far reported for any plant species, and at the same time, it provides extensive genome size variation (30,000–127,000 Mb/C). The genus diverged from *Lilium* c. 12 million years ago and subsequently diversified into two clades within Eurasia followed by a later dispersion of some species to North America. It is known, that genome size variation in plants is caused mainly by large differences in proportion of various repetitive sequences. Hence, the genus *Fritillaria* represents an excellent model for comparative studies on the evolution of repetitive sequences in giant genomes. To identify most abundant dispersed repetitive sequences we have constructed genomic DNA libraries from one species of each group selected so that both have approximately equal genome size (~ 45,000 Mb): *Fritillaria imperialis* (Eurasia) and *F. affinis* (North America). Based on the screening of both libraries with total genomic DNA as a probe, we selected four clones from each library containing highly repeated regions and sequenced them. Our preliminary data suggest that the percentage of different classes of repetitive elements does not differ significantly between the two species, and Ty3/gypsy-type LTR retrotransposons were identified as a dominating component in *Fritillaria* genomes. We also identified several families of Ty1/copia type LTR retrotransposons and one type of non-LTR retrotransposon. Ongoing studies aim to characterize selected repetitive elements in a wide range of *Fritillaria* species and analyze their contribution to genome size variation across the genus.

This work was in part supported by a research grant no. MSM0021622415.

P Plakátová sdělení

EVOLUCE VELIKOSTI GENOMŮ ROSTLIN

RADIM ČEGAN^{1,2}, HANA KUBEKOVÁ², EDUARD KEJNOVSKÝ², JAN ŠAFÁŘ³, BORIS VYSKOT², ROMAN HOBZA^{1,2}

¹ MZLU v Brně, AF, Ústav biologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² BFÚ AV ČR, v.v.i., Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

³ ÚEB AV ČR, v.v.i., Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc, ČR

E-mail: cegan@ibp.cz, tel.: +420 541 517 194

Velikost genomů mnoha kulturních rostlin představuje překážku jak při realizaci sekvenačních projektů, tak při využití určitých rostlinných modelů v biotechnologiích obecně. Pochopení struktury genomu je tudíž nejen zásadní teoretickou biologickou otázkou, ale současně představuje nástroj na efektivnější cestu využití technik molekulární genetiky v praxi. Mezi základní procesy, které formují velikost genomů u rostlin patří polyploidie a zastoupení jednotlivých repetitivních sekvencí v genomu. U většiny rostlinných rodů se oba tyto mechanismy evoluce genomů prolínají a spolupůsobí.

Rod *Silene* je unikátní tím, že téměř všichni jeho zástupci jsou diploidní a mají stejný počet chromozomů ($2n = 24$). Dva nejvýznamnější druhy z hlediska využití v základním a aplikovaném výzkumu jsou *S. vulgaris* a *S. latifolia*. *S. vulgaris* je gynodioecický druh, jež je převážně využíván jako modelový organizmus pro studium rezistence rostlin k těžkým kovům a evoluce cytoplazmatické samčí sterility. *S. latifolia* je jeden z nejzkoumanějších druhů z hlediska vzniku dvoudomosti a evoluce pohlavních chromozomů.

Naším cílem je určit mechanismus evoluce velikosti genomů mezi dvěma blízce příbuznými druhy *S. latifolia* a *S. vulgaris*. Oba druhy jsou diploidní a mají stejný počet chromozomů, přesto má *S. latifolia* přibližně $2,5 \times$ větší genom než *S. vulgaris*. Předběžné výsledky ukázaly, že některé repetitivní sekvence (retrotranspozony a tandemové repetice) jsou unikátní pro jeden či druhý druh. Naším úkolem je provést izolaci všech vysoce repetitivních DNA elementů u *S. vulgaris* a zjistit jejich proporcionální zastoupení v genomu tohoto druhu a mezi druhy *S. vulgaris* a *S. latifolia* (zde byly již tyto analýzy provedeny).

Na základě získaných dat bude možno určit, jak rychle se určité sekvence v genomu vyvíjejí během evoluce co se týče jejich struktury, relativního a absolutního zastoupení v genomu. Mnohé teorie poukazují na to, že expanze repetitivních sekvencí je často příčinou speciace druhů. Naše data pomohou objasnit, které konkrétní DNA sekvence jsou příčinou rychlé expanze genomů mnohých druhů rodu *Silene*.

Podporováno granty IGA AF MZLU, DP 7/2009; KJB600040901; M200040905.

P Plakátová sdělení

ANALÝZA DISTRIBUCE SATELITNÍ DNA V JADERNÉM GENOMU ZÁSTUPCŮ ČLEDI MUSACEAE METODOU FISH

EVA HŘIBOVÁ, LENKA SCHILLEROVÁ, JANA ČÍŽKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, ÚEB AV ČR, v. v. i., Sokolovská6, 772 00 Olomouc, ČR
E-mail: cizkova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 854

Čeď Musaceae obsahuje pouze dva rody – *Ensete* a *Musa*. Rod *Musa* (banánovník) obsahuje více než 50 druhů, které však dosud nebyly přesně určeny. Pěstované, jedlé formy banánovníku jsou sterilní diploidní, triploidní (ty jsou nejpočetnější) a tetraploidní klony, které představují různé kombinace A a B genomů, pocházejících ze dvou diploidních druhů, *M. acuminata* (A genom) a *M. balbisiana* (B genom). Ačkoliv velikost jaderného genomu kolísá v rozmezí hodnot $1C = 500 \sim 650$ Mbp, je u výše zmiňovaných druhů toto množství DNA rozděleno do 11 chromozomů v haploidní sadě, které jsou dlouhé jen 1,5–2,5 μm a po morfologické stránce velmi podobné (lze odlišit jen jeden pár chromozomů, který nese organizátor jádérka – NOR). Chromozomy banánovníku si jsou morfologicky podobné nejen v rámci daného zástupce ale také mezi různými druhy. Tato skutečnost, společně s vysokou mírou podobnosti genomů A a B na úrovni nukleotidové sekvence DNA velmi ztěžuje identifikaci jednotlivých chromozomů a nebo chromozomových sad v mezidruhových hybridech za použití tradičních cytogenetických metod a genomové *in situ* hybridizace.

Dosud byly metodou FISH zamapovány do jaderného genomu banánovníku pouze rRNA geny, některé repetitivní elementy a tři BAC klony, jejichž distribuce na mitotických chromozomech umožnila identifikovat pouze několik chromozomů. Dosud však nebyly izolovány druhově specifické sekvence DNA které by dovolily identifikovat jednotlivé genomy u mezidruhových hybridních klonů.

Díky 454 sekvenování modelového genomu banánovníku – *Musa acuminata* „Calcutta 4“ byly identifikovány dva nové DNA satelity. Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) satelitu CL18 v jaderných genomech druhů *M. acuminata* sp. a *M. balbisiana* sp. byla zjištěna rozdílná (ko)-lokalizace tohoto satelitu CL18 a genů pro 5S rRNA. Této skutečnosti bylo využito pro studium genomového složení u osmi vybraných hybridních klonů banánovníku. Kromě identifikace některých chromozomů banánovníku v jaderných genomech rodu *Musa* bylo možné na základě rozdílné lokalizace značených sond u druhů *M. acuminata* a *M. balbisiana* zrekonstruovat genomové složení hybridních zástupců. Cytogenetické mapování sekvencí DNA, které u zástupců s různým genomovým složením vykazují specifickou lokalizaci na chromozomech může být v případě banánovníku využito pro analýzu genomového složení významných hybridních zástupců.

Podporováno grantem Grantové agentury AV ČR – KJB 500380901.

P Plakátová sdělení

FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTO-BLEACHING (FRAP) IN PLANT CELLS

MILADA ČOVANOVÁ, MARTIN KUBEŠ, JAN PETRÁŠEK, EVA ZAŽÍMALOVÁ

IEB AS CR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Prague 6 – Lysolaje, CR

E-mail: covanova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 431

Fluorescence Recovery after Photo-bleaching (FRAP) is the *in vivo* optical technique that allows to quantify protein dynamics in various intracellular compartments. It could be used for the measurement of both lateral diffusion of integral plasma membrane proteins and the trafficking of cytosolic proteins. FRAP software module is usually inherent part of modern confocal laser scanning microscope (CLSM). The method is based on focusing of intensive UV light (i.e. laser light in case of CLSM) into the small area of plasma membrane or other part of cell containing fluorescently-labelled protein molecules. This pulse of intensive laser light results in the photobleaching (photochemical destruction) of the fluorochrome in this region of interest (ROI). Since all molecules with photodestructed fluorophores can not restore their fluorescence anymore, the rate of the fluorescence recovery in the bleached area reflects purely the migration of unbleached molecules from surrounding area. The tracking of this area over time allows determining how fast and how much of the signal recovers. The ratio between the fluorescence after the recovery and after the bleaching could be normalized with respect to the total fluorescence before the bleaching as well as with respect to the unwanted bleaching during ROI imaging.

We use FRAP at Zeiss META 510 CLSM for the evaluation of the dynamics of auxin plasma membrane carriers. In *Arabidopsis thaliana* dark-grown seedlings, we have demonstrated using AUX1::AUX1:YFP line that the dynamics of auxin influx carriers at plasma-membrane can be different at the outer and inner side of the apical hook (Vandenbussche *et al.*, 2009). In BY-2 tobacco suspension cells, we have followed the dynamics of heterologously expressed *Arabidopsis* GFP-tagged auxin efflux carrier PIN1 at the plasma-membrane. The recovery of PIN1-GFP fluorescence started immediately after the bleach and within 3 min it reached 50% of initial value reflecting both lateral diffusion of PIN1 in the plasma membrane and deposition from endosomal space. By FRAP measurements we also examine possible interactions of PIN1 with other molecules, like Auxin Binding Protein 1 (ABP1) as described in paper by Sauer & Čovanová *et al.*, 2009.

Vandenbussche, F., Petrášek, J., Žádníková, P., Hoyerová, K., Pešek, B., Raz, V., Swarup, R., Bennett, M., Zažímalová, E., Benková, E., Van Der Straeten, D. Auxin influx carriers are involved in auxin-ethylene interactions in apical hook development of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynhold. Provisionally accepted in Development, 2009.

Sauer, M. & Čovanová, M., Robert, S., Naramoto, S., Kleine-Vehn, J., Löffke, C., Teichmann, T., Zažímalová, E., Petrášek, J. and Friml, J. ABP1 mediates feed-back regulation of PIN-dependent auxin transport. Submitted 2009.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project No.: LC06034.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ UPL SOND PRO STANOVENÍ HLADIN EXPRESE JEDNOTLIVÝCH KOMPONENT SIGNÁLNÍ DRÁHY CYTOKININŮ V ROSTLINÁCH *ARABIDOPSIS*

JANA DOBRÁ^{1,2}, HELENA ŠTORCHOVÁ¹, RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹

¹ Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR

² Katedra biochemie PřF UK, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2, ČR

E-mail: dobra@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 426

UPL sondy („Universal Probe Library“) pro kvantitativní PCR jsou systém kombinující možnost univerzálního použití, která je předností barviva SYBR Green, a specifitu, charakteristickou pro TaqMan sondy. UPL systém je použitelný pro geny se známou sekvencí z jakéhokoliv organismu. Kompletní knihovna je tvořena 165 krátkými (8 až 9 nukleotidů) hydrolytickými sondami, značenými na 5'konci fluoresceinem a na 3'konci zhášedlem. Každá sonda je navíc vybavena LNA („Locked Nucleic Acid“), t. j. zamčenou nukleovou kyselinou, analogem nukleové kyseliny s pentosovým kruhem ribosy „zamčeným“ metylenovým můstkem, čímž je zabráněno tvorbě nepřesností při párování („mismatch“). Pro návrh stanovení (sekvence primerů a sondy, umístění, velikost amplikonu atd.) existuje volně přístupný program Probe Finder (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>).

UPL sondy byly využity pro studium regulace signální dráhy cytokininů po vystavení rostlin *Arabidopsis thaliana*, pěstovaných v hydroponii, teplotnímu stresu 40 °C. Byla sledována odezva v apexu, listech a kořenech v počáteční fázi stresu (0 až 6h). Konkrétně byla sledována exprese genů pro receptory cytokininů (*AHK2*, 3 a 4), regulátory odpovědi typu-B (*ARR10* a *ARR12*), transkripční faktory přenášející signál dále a regulátor odpovědi typu-A (*ARR8*), který se účastní vypínání signálu („negative feed-back inhibition“). Vzorky tkání *A. thaliana* byly ihned po inkubaci za zvýšené teploty zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy při –80 °C. Extrakce RNA byla prováděna pomocí RNeasy Plant Mini Kitu (Qiagen). Pro odstranění zbytků DNA byla použita DNase I (kit DNA-free™, Ambion). Pro reverzní transkripci jsme používali oligo dT primery, Protector RNase Inhibitor (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point mutant (Promega). Pro real-time PCR byl používán LC480 Probes Master kit (Roche), UPL sondy (Roche) a primery čištěné pomocí HPLC (Metabion). Primery a sondy byly navrženy s použitím programu ProbeFinder verze 2.45 pro *Arabidopsis* (Roche). Pro normalizaci naměřených hladin exprese byl využit gen pro ubiquitin 10 (*At4g05320*).

V případě cytokininových receptorů a pozitivních regulátorů (*ARR10* a *ARR12*) došlo v počáteční fázi odezvy na teplotní stres v apexu k mírné stimulaci, po 45 minutách stresu následoval prudký pokles exprese. Negativní regulátor odezvy (*ARR8*) vykazoval v apexu nejprve rychlý pokles s minimem po 30 minutách působení stresu, který byl vystřídán pozvolným nárůstem hladiny transkriptu. Listy vykazovaly okamžitý pokles exprese u všech měřených genů, největší změnu vykazoval gen pro negativní regulátor odezvy (*ARR8*). V případě kořenů naopak docházelo k nárůstu exprese těchto genů, která dosahovala maxima mezi 30 a 60 minutami působení stresu, poté následoval prudký pokles hladiny exprese. Odlišný charakter reakce kořenů na stres mohl být ovlivněn uspořádáním pokusu – vzhledem k pomalému ohřevu média po umístění vaničky s rostlinami do 40 °C, byly kořeny vystaveny mírnějšímu a zejména pomalejšímu stresu.

Stanovení exprese genů komponent signální dráhy cytokininů pomocí UPL sond se ukázalo jako výhodné, vzhledem k poměrně snadnému výběru primerů a sond a také díky odstranění problému s dimery primerů.

Podporováno grantem GA ČR, projekt č. 206/09/2062 a MŠMT ČR projekt č. LC06034.

P Plakátová sdělení

ANALYSIS OF DNA-BINDING PROTEINS BY FRAP AND FLIP

MARTINA DVOŘÁČKOVÁ^{1,2}, PASCALE ROSSIGNOL³, JOHN DOONAN³, PETER SHAW³, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Department of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, CZ-60200 Brno, Czech Republic;

² Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

³ John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, UK
E-mail: mdvorackova@ibp.cz, tel.: +420 549 495 601

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and Fluorescence loss in photobleaching (FLIP) have become methods of choice to study protein dynamics in the cell as well as DNA-protein binding properties. In FRAP high laser power of the confocal microscope is used to bleach desired area in the cell and the speed of fluorescence come back serves as a measure of protein turnover. In FLIP the sample is continuously bleached over the time and fluorescence decay in surrounding areas is evaluated. FLIP can typically reveal the protein dynamics as well as the mobile and immobile protein pool in the sample. Here we applied these two high advanced *in vivo* techniques to look at the behaviour of telomere-DNA associated protein AtTRB1 in *Arabidopsis* roots cells.

AtTRB1 protein is a ds-DNA binding proteins of the **SMH** (Single **Myb** **H**istone) protein family containing a telomere-binding Myb domain at the N-terminus, a central H1/H5-like domain and a coil-coiled domain that is C-terminally located. Recently we showed that SMH protein AtTRB1 specifically binds telomeric dsDNA *in vitro* and it is able to interact with other candidate telomere-associated factors – AtTRB1, AtTRB2, AtTRB3 and AtPot1b – in two hybrid system.

It is interesting that H1/H5 domain similar to the domain present in linker histones and binding DNA in sequence-non-specific manner was found to mediate AtTRB1 protein-protein interactions. In addition, this central domain directs AtTRB1 to the nucleolus *in vivo*.

We show here that AtTRB1 appears to be highly dynamic protein. It localizes in the nucleus and nucleolus and its level changes during the cell cycle. In mitosis majority of AtTRB1 is redistributed into the cytoplasm and then progressively re-associates with chromatin during anaphase/telophase. We have shown by FRAP and FLIP that the association of AtTRB1 with interphase chromatin is highly dynamic with rapid protein exchange. AtTRB1 dynamics seems to be much faster than that of histone H2A and more similar to GFP itself.

Supported by EMBO, Marie Curie MEST-CT-2005- 019727, GA AVGR (IAA600040505) and MŠMT (LC06004). Institutional support: MSM0021622415, AVOZ50040507.

P Plakátová sdělení

STANOVENÍ VIABILITY RANÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU ZTEPILÉHO V PRŮBĚHU KRYOPREZERVACE

KATEŘINA ELIÁŠOVÁ, ZUZANA VONDRÁKOVÁ, JAROSLAVA ŠPAČKOVÁ, MARTIN VÁGNER

ÚEB AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02, Praha 6 – Lysolaje, ČR
E-mail: eliasova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 402

Kryoprezervace poskytuje možnost dlouhodobého skladování rostlinného materiálu. Uskladnění při teplotách blízkých $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ je vhodným způsobem jak uchovat geneticky významné druhy či odrůdy rostlin po relativně dlouhou dobu. Tento postup se užívá i pro uchování vybraných tkáňových kultur. Pro úspěšný průběh procesu zamrazování i rozmrazení a regenerace kultury je třeba zachovávat přesný postup jednotlivých kroků, které je nutné optimalizovat zvláště pro každý rostlinný materiál.

Používáme embryogenní suspenzorovou hmotu (ESM), která byla indukována ze zygotických embryí smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst). Je tvořena nezralými somatickými embryi, sestávajícími z meristematických center, na která jsou napojeny dlouhé suspenzorové buňky. ESM je kultivována v tekutém médiu, vystavena působení sorbitolu a DMSO, řízeně ochlazována, zamrzána a skladována v tekutém dusíku. Při rozmrazování je odstraněno DMSO. ESM několik týdnů regeneruje a poté je schopna dalšího vývoje.

Kultura je během přípravy na zamrazení vystavena řadě stresových faktorů. Bylo proto třeba stanovit viabilitu ESM v jednotlivých krocích protokolu, abychom zjistili míru zachování nebo naopak poškození celistvosti a životaschopnosti raných somatických embryí ještě před samotným zamražením. Viabilitu buněk jsme stanovovali také po rozmrazení a během regenerace kultury. K rozlišení živých buněk od mrtvých jsme použili dvojité vitální barvení fluorescenčními barvivými fluoresceindiacetátem (FDA) a propidium jodidem (PI) (Jones and Senft, 1985; Petřek *et al.*, 2005). Tato metoda je založena na rozdílné schopnosti těchto barviv pronikat přes celistvé plazmatické membrány do viabilních buněk. Lipofilní nefluorescentní FDA snadno přechází přes plazmalemu živých buněk, kde je hydrolyzován intracelulárními esterázami na fluorescein, který se v cytoplazmě hromadí. Fluorescein po ozáření modrým světlem (Ex 494 nm) svítí jasně zeleně (Em 518 nm). PI vstupuje pouze do buněk s poškozenou integritou cytoplazmatické membrány, váže se na DNA a barví tak jádra neviabilních buněk. Dochází i k vazbě na RNA, do jisté míry se proto barví i cytoplazma mrtvých buněk. Po ozáření zeleným světlem (Ex 536 nm) svítí jádra jasně červeně (Em 617 nm). K pozorování obarveného materiálu jsme použili konfokální laserový mikroskop Zeiss LSM 5Duo. Fluorescein byl excitován argonovým laserem při 488 nm, emisní filtr set LP 505. Propidium jodid byl excitován DPSS laserem při 561 nm, emisní filter set LP 575.

Stanovení viability buněk pomocí dvojitého barvení FDA/PI je spolehlivější než barvení trypanovou modří. Pro studium tak heterogenního materiálu, jakým ESM smrku je, se metoda ve spojení s konfokální mikroskopií velmi osvědčila. Bezpochyby má také široké použití na jakýkoli jiný rostlinný materiál.

Jones K. H., Senft J. A.: 1985 – J. Histochem. Cytochem., 33(1): 77-79

Petřek J., Víteček J., Vlašínová H., Kizek R., Kramer K.J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: 2005 – Anal. Bioanal. Chem., 383: 576-586

Podporováno grantem MŠMT OC 158.

P Plakátová sdělení

ZMĚNY PLYNNÉHO PROSTŘEDÍ PŘI VÝROBĚ SLADU

HELENA FIŠEROVÁ¹, JOSEF PROKEŠ², ALENA HELÁNOVÁ², VLASTIMIL HANUŠ¹

¹ MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² VÚPS Praha, a. s. Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 612 00 Brno, ČR

E-mail: hfiser@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 015

Sladařské klíčení obilí ječmene sleduje aktivaci a tvorbu enzymů s cílem požadovaného stupně rozluštění obilky (rozštěpení vysokomolekulárních látek na jejich štěpné produkty – rozrušení buněčných stěn, rozštěpení škrobových zrn a bílkovinných řetězců) při omezení ztrát zásobních látek v endospermu. Snahou sladaře je řídit proces klíčení, dýchání s vnitřní přeměnou obilí a vznikem nových buněk v obilkách s cílem vyrobit kvalitní slad v průběhu celého roku z různých odrůd ječmene pěstovaných na odlišných lokalitách. Doba sladování ve vztahu k stupni dormance obilí výrazně zasahuje do procesů klíčení (Prokeš a kol., 2009) a abiotické stresy v průběhu růstu a vývoje obilky ovlivňují životnost obilí, pozměňují jejich anatomickou stavbu v části oplodí, osemení, embrya, ovlivňují chemické složení semen a jejich energetický obsah (Hnilička a kol., 2000).

Obilky při procesu klíčení uvolňují do prostředí oxid uhličitý za současné spotřeby kyslíku, ale i různé množství etylénu a etanu podle stupně dormance či stresových ovlivnění (Fišerová a kol., 2007). Tyto plyny zpětně působí na klíčení obilí a růst kořenů a koleoptile – stříšky. Etylén (plynný hormon, uvolňovaný rostlinou do prostředí, jehož prekurzorem je ACC (1-amino-cyklopropan-1-karboxylová kyselina), vzniká v rostlinách z aminokyseliny methioninu) – zasahuje do fyziologických procesů klíčících semen a jeho tvorba a koncentrace je ovlivněna řadou faktorů (biotické a abiotické stresy, teplota, koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého v prostředí). Oxid uhličitý nepřímo úměrně ovlivňuje metabolismus etylénu v pletivech. Etylén je odbouráván na CO₂ a etylénoxid a tvorba etylénu podléhá autokatalýze i autoinhibici. Hydrofobní molekula etylénu proniká snadno membránami, zvyšuje jejich propustnost pro průchod některých látek, aktivuje příjem některých iontů a zvyšuje aktivaci a tvorbu α-amylázy v obilkách ječmene. Při výrobě sladu je CO₂ využíván jako faktor ovlivňující zejména průběh a výtěžnost sladování.

Pro přesné vymezení jednotlivých rolí plynů – etylén, oxid uhličitý a kyslík – byl vyvinut systém sladování v řízených podmínkách za použití sorbetů jednotlivých plynů – CO₂, etylén – či naopak doplnění plynu, který je klíčící obilkou v procesu klíčení spotřebován – kyslík, etylén. V tomto systému lze pak sledovat vliv jednotlivých plynů – a tím způsobů sladování – na kvalitu sladu vyjádřenou aktivitou α-amylázy, obsahem β-glukanů, homogenitou, modifikací a výtěžností sladu.

Laboratorní pokusy sladování byly provedeny v kultivačních nádobách o objemu 3600 ml, které byly po dobu 24 hodin uzavřeny pružnou membránou vyrovnávající změny objemu plynu a umožňující odběry plynů k analýzám. Do pokusů bylo zařazeno stejné množství obilí ječmene (2000 ks) a byla zvolena technologie vzdušného máčení, označena 3-3-45 %. Číselné údaje uvádějí počet dní namočení, počet hodin, obsah vody při počátku klíčení, teplota vody 14 °C. Klíčení ječmene a hvozďení probíhalo standardní technologií (celkem 6 dní, dotahování 80 °C po dobu 4 h). Složení plynů v kultivačních nádobách bylo chemicky stabilizováno.

Oxid uhličitý produkovaný klíčícím ječmenem byl absorbován 15% vodným roztokem KOH (2 KOH + CO₂ = K₂CO₃ + H₂O), etylén byl z prostředí absorbován reakcí s oxidem rtuťnatým (50 mg/ml) v prostředí 7% kyseliny chloristé (2 HClO₄ + HgO + C₂H₄ = HgCl₂ + 2 H₂CO₃ + H₂O + O₂) – Sembdner a kol., 1988. Kyslík byl do prostředí doplňován katalytickým rozkladem peroxidu vodíku (2 H₂O₂ = 2 H₂O + O₂). Aby reakce neprobíhala příliš bouřlivě, bylo malé množství MnO₂ (cca 2–5 mg) zabaleno do smotku vaty. U pokusů prováděných za zvýšené koncentrace etylénu byl etylén doplňován biologickým rozkladem CEPA (2-chlorethylphosphonová kyselina – 1% vodný roztok CEPA + 5 ks naklíčených obilí). Homogenizace plynů probíhala vzhledem k malému objemu nádoby pouze difuzí. Absorpční i vyvíjecí roztoky byly v kultivačních nádobách umístěny v kádinkách pod košíky s klíčícími obilkami ječmene. Každých 24 h byly odebírány vzorky plynu ve kterých byla plynovou chromatografií stanovena koncentrace etylénu (Fišerová a kol. 2001, 2008) a CO₂ (Prokeš a kol., 2006) a digitálním oxymetrem měřena koncentrace kyslíku.

Kombinací sorbetů a vyvíjecích roztoků lze sledovat, jak jednotlivé plynné složky ovzduší ovlivňují rozluštění obilí. Bylo zjištěno, že ke vzniku kvalitního sladu je nezbytné působení exogenního etylénu, kyslíku, ale naopak vysoká koncentrace CO₂ kvalitu sladu snižuje.

Fišerová H., Kula E., Klemš M., Reinöhl V.: 2001 – *Biologie* 56/4: 405-409.

Fišerová H., Hartmann J., Prokeš J., Helánová A.: 2007 – *Kvasný průmysl*. sv. 53, č. 10: 308-309. ISSN 0023-5830.

Fišerová H., Mikušová Z., Klemš M.: 2008 – *Plant, Soil and Environment* sv. 54, č. (2): 55-60. ISSN 1214-1178.

Hnilička F., Bláha L., Zámečník J., Novák V., Ottová M.: 2000 – *Rostlinná výroba*, 46, (12): 549-554

Prokeš J., Fišerová H., Helánová A., Hartmann J.: 2006 – *Kvasný Prům.* 52, č.11-12: 348-351.

Prokeš J., Fišerová H., Helánová A., Hartmann J.: 2009 – In *32nd EBC CONGRESS*: 74.

Sembdner G., Schneider G., Schreiber K.: 1988 – *Methoden zur Pflanzenhormonanalyse*: 1-296.

Podporováno grantem MŠMT ČR 1M0570 – Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele.

P Plakátová sdělení

TOWARDS AN UNDERSTANDING OF PILIN PROTEIN FUNCTIONS IN THE BIOGENESIS OF CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES IN CYANOBACTERIA

MARKÉTA FOLDYNOVÁ^{1,2}, JOSEF KOMENDA^{1,3}, MARTIN TICHÝ^{1,3}, ROMAN SOBOTKA^{1,2,3}

¹ PřF JU, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR

² MBÚ AV ČR, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň, ČR

³ ÚFB JU, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, ČR

E-mail: meta@email.cz, tel.: +420 384 340 434

Cyanobacteria as well as plants have to strictly regulate processes related to photosynthesis like pigment biosynthesis or biogenesis of the photosynthetic apparatus. Coordination of pigment and protein synthesis is one of the central problems for photosynthetic cell regarding harmful nature of unquenched tetrapyrroles; however mechanism or place of this regulation remains unknown. Its complexity is emerging also from presented data suggesting important role of pilins in this regulation. Pilin proteins, best known to form hair-like appendages on the cell surface in many Gram-negative bacteria and serve primarily as a movement device, are seemingly unrelated to photosynthesis. However, pilins mediate also other cell functions (e.g. transformability competence or secretion). Our interest in pilin structures in cyanobacteria was initiated by an unexpected observation that the PilA1 pilin protein co-migrates on 2D electrophoresis with the D1 protein, a core protein of photosystem II (PSII). Interestingly, deletion of the PilA1 and the related PilA2 proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 apparently affected pigment composition of the resulting $\Delta pilA1/\Delta pilA2$ mutant. Analysis of tetrapyrrole biosynthesis showed that the deletion of these two pilins increased levels of several enzymes per cell more than four times implying close connection between the PilA1/2 proteins and the regulation of chlorophyll/heme metabolism.

Regarding our initial observation of a putative PilA1-D1 protein complex, we introduced a mutation into the $\Delta pilA1/\Delta pilA2$ strain decreasing strongly transcript level of the D1 protein. Importantly, the phenotype of resulting mutant was much closer to the wild type including the enzyme levels in tetrapyrrole pathway and even aggregation characteristic of the $\Delta pilA1/\Delta pilA2$ cells disappeared. It suggests that the $\Delta pilA1/\Delta pilA2$ strain suffers by high (wild-type) rate of the D1 protein synthesis and we thus speculate that pilins are part of a protein complex involved in the D1 transfer – e.g. in delivery of cofactor(s) or providing interaction of the D1 with other PSII subunits. 'Too fast' rate of the D1 transcription combined with a defective complex for the D1 biogenesis is stressful for the $\Delta pilA1/\Delta pilA2$ mutant cells causing radical changes in tetrapyrrole biosynthesis.

Podporováno výzkumným záměrem ÚFB JU.

P Plakátová sdělení

EXPRESSION AND PURIFICATION OF EXPERIMENTAL THERAPEUTIC ANTI-HPV VACCINE USING PLANT VIRUS

JITKA FOLWARCZNA^{1,2}, TOMÁŠ MORAVEC¹, HELENA PLCHOVÁ¹, HANA HOFFMEISTEROVÁ¹, NOEMI ČEŘOVSKÁ¹

¹ Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Karlovce 1a, 160 00 Prague 6, Czech Republic

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 230, 12840 Prague 2, Czech Republic

E-mail: folwarczna@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108

Even though prophylactic vaccine against HPV is currently licensed, infections by the virus continue to be a major health problem mainly in developing countries. Considerable effort is being devoted to preparation of therapeutic vaccine and to cut the production costs of current vaccines. HPV E6 and E7 oncogenes are expressed by all carcinoma cells, making them promising vaccine targets. However both these proteins are known for their poor immunogenicity. In this study we wanted to improve the immunogenicity of HPV E7 by its presentation on highly repetitive and stable plant virus particle and then to optimize the expression of the fusion protein in experimental plants.

The optimized expression of recombinant *Tobacco mosaic virus* (TMV) coat protein (CP) carrying E7 gene from *Human papillomavirus* type 16 (HPV-16) was developed. The expression system is based on TMV amplicon cloned into a binary plasmid derived from pGREEN vector. TMV CP was modified by addition of C-terminal sequence coding for 15 aa β -sheet linker followed by complete E7 gene (98 aa). The virus replication in plants was initiated using *Agrobacterium tumefaciens* carrying appropriate full-length viral cDNA clone. We have compared the levels of accumulation of chimeric TMV CP in non-transgenic *Nicotiana benthamiana* plants with accumulation achieved in transgenic lines carrying genes with known impact on virus replication, accumulation and/or movement – HcPro from PVA potyvirus and movement protein from TMV. The chimeric coat protein was detected in plants by Western blot using antibodies against E7 oncoprotein as well as anti-TMV CP antibodies. The expressed coat protein was purified from plant material by centrifugation on sucrose cushion.

This research was supported by the grant No. 521/09/1525 of the Czech Science Foundation.

P Plakátová sdělení

DETECTION OF VOLATILE CHLORINATED HYDROCARBONS EMITTED FROM THE FOREST ECOSYSTEM

SÁNDOR FORCZEK

Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 263, 165 02 Prague, CR
E-mail: alex067@biomed.cas.cz, tel.: +420 241 062 484

Chlorine is one of the most abundant elements in nature, which undergoes a complex biogeochemical cycle. Chlorine bound in some substances is partly responsible for atmospheric ozone depletion and contamination of some ecosystems. As due to international regulations anthropogenic burden of volatile chlorinated hydrocarbons (VCH) in atmosphere decreases, natural sources (plants, soil, abiotic formation) became significant, but the information on their extent is still scarce. Examples of plant VCH production are methyl chloride, chloroform, 1,1,1-trichloroethane and tetrachloromethane.

Since many anthropogenic sources of halocarbons are currently regulated through the Montreal Protocol, natural sources are expected to dominate VCH production in the near future. Volatile halogenated hydrocarbons are emitted into the atmosphere due to various natural sources. Some examples according to place of occurrence: methyl chloroform, chloroform, methyl bromide and tetrachloromethane measured at coastal salt marshes (Rhew *et al.*, 2000), chloroform, 1,1,1-trichloroethane, tetrachloromethane, tetrachloroethene, bromoform and bromodichloromethane are mainly emitted by temperate forest soils that contain a humic top layer or are covered by wood chips activity ascribed to fungi (Hoekstra *et al.*, 1998). Methyl chloride and bromide are emitted from (sub)tropical ferns (Saito and Yokouchi, 2006), chloroform, tetrachloromethane and 1,1,1-trichloroethane emissions are determined from temperate forest fern and moss (Laternus and Matucha, 2008). Chloroform has also been detected in emissions of volcanoes, hydrothermal sources, and salt mines (Hoekstra *et al.*, 1998). These compounds are taken up and metabolized by other organisms e.g. (Forczek *et al.*, 2008).

The aim of this work is to confirm the formation and identify the formed VCH by forest soil or common forest plant species, hence filling a gap of knowledge in the biogeochemical cycle of chlorine. A combination of methods will be used to measure VCH; cryotrapping/cryofocusing from headspace of plant cultivation glass followed by GC-ECD detection.

Forczek, S. T.; Schröder, P.; Weissflog, L.; Krueger, G.; Rohlenová, J.; Matucha, M. 2008. Trichloroacetic acid of different origin in Norway spruce needles and chloroplasts. *Biologia Plantarum* 52, 17-180.

Hoekstra, E. J.; de Leer, E. W. B.; Brinkman, U. A. T. 1998. Natural formation of chloroform and brominated trihalomethanes in soil. *Environmental Science & Technology* 32, 3724-3729.

Laternus, F.; Matucha, M. 2008. Chloride – a precursor in the formation of volatile organochlorines by forest plants? *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 119-125.

Rhew, R. C.; Miller, B. R.; Weiss, R. F. 2000. Natural methyl bromide and methyl chloride emissions from coastal salt marshes. *Nature* 403, 292-295.

Saito, T.; Yokouchi, Y. 2006. Diurnal variation in methyl halide emission rates from tropical ferns. *Atmospheric Environment* 40, 2806-2811.

Podporováno grantem GAČR 522/09/P394

P Plakátová sdělení

3'RACE AS A METHOD TO STUDY GENE FAMILY MEMBERS IN PLANT GENOMES

JAROSLAV FULNEČEK

BFÚ AV ČR v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR
E-mail: fulnecek@ibp.cz, tel.: +420 541 517 230

Now, thank to genome analyses, it is known that one or more allopolyploidization events occurred in history of majority of plant species and allopolyploidization is one of major evolutionary processes in plants. Even analysis of *Arabidopsis thaliana* nuclear genome composed of only five chromosomes revealed its allopolyploid origin. In allopolyploid nucleus, individual genes of progenitor species are merged and it contributes to formation of gene families. Individual members can be active, epigenetically inactivated or mutated representing inactive pseudogenes. Activity of genes inherited from progenitor species can be additive or later after accumulation of changes under selective forces they can sub-functionalize (acquire new regulation or function). Therefore, before designing gene functional studies in plants, we have to take into account the fact that each gene is usually a member of gene family. The presence of gene families is major complication in obtaining mutant plants by classical methods of gene targeting for example by chemical mutagenesis. Designing RNA-hairpin constructs targeting all or subset of active genes in gene family is attractive alternative. However, to design effective RNA-hairpin construct, which is essential to be successful in so called RNAi induced knock-down technology, requires knowing gene family members sequence data.

While there are many techniques to study gene families (for example high throughput sequencing, pulsed field gel electrophoresis, Southern blot hybridization, real-time PCR, ...) simple and cheap method of choice is 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3'RACE). The method has several advantages: i) Only one gene specific forward primer (sometimes also second nested forward primer) has to be designed according the most conserved motif, ii) only transcribed genes are analyzed and iii) not only part of coding sequence but also 3'UTR is cloned which is usually more divergent among gene family members and can be therefore used to identify individual members.

We used 3'RACE to clone and sequence transcribed chromomethylase 3 genes (*CMT3*) in *Nicotiana sylvestris*. We cloned orthologous *CMT3* gene and its new paralogous gene both showing only 73% and 68% of mutual homology at cDNA and protein level respectively. Newly identified paralogous *CMT3* gene codes for all conserved aminoacid residues which are thought to be essential for chromomethylase catalytic function. We also cloned partial cDNA sequences coding for paralogous *CMT3* from other solanaceae species indicating its possible contribution to high cytosine methylation of CNG sequence motifs in this plant family.

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (AVOZ50040507 and AVOZ50040702).

P Plakátová sdělení

KLONOVÁNÍ cDNA KÓDUJÍCÍ CENTROMERICKOU VARIANTU HISTONU H3 METODAMI RT-PCR A RACE

ZUZANA HELEKALOVÁ^{1,2}, PAVEL NEUMANN², ALICE NAVRÁTILOVÁ², VERONIKA STEINBAUEROVÁ^{1,2}, JIŘÍ MACAS²

¹ Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31,
370 05 České Budějovice, ČR

² Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice,
ČR

E-mail: neumann@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 516

Centromerický histon H3 (CenH3) nahrazuje v nukleozómech centromerického chromatinu histon H3. Jeho přítomnost v centromerách je nezbytná pro vytvoření kinetochoru a tedy i pro funkci centromery. V porovnání s histonem H3, který má u všech eukaryot téměř identickou sekvenci, jsou sekvence CenH3 značně variabilní. Nejkonzervativnější částí je tzv. HFD doména (Histone Fold Domain) nacházející se poblíž C konci proteinu. Tato část je podobná nejen mezi CenH3 z různých druhů, ale také mezi CenH3 a H3. Sekvence CenH3 poblíž N konce jsou oproti tomu velice variabilní a s H3 nemají žádnou podobnost.

Lokalizace CenH3 pouze v centromerách dělá z tohoto proteinu ideální molekulární marker funkční centromery, tj. oblasti chromozómu, na které se vytváří kinetochor. Proto je znalost sekvencí CenH3 velice důležitá pro mapování a studium centromer molekulárními technikami. Širšímu využití CenH3 pro výzkum centromer rostlin ovšem brání neznalost sekvencí tohoto proteinu u řady druhů.

Cílem této práce bylo zjistit sekvence transkriptů CenH3 genů u vybraných druhů leguminóz, které představují modelové objekty v naší laboratoři. Metodický postup spočíval v amplifikaci relativně konzervovaného úseku CenH3 pomocí RT-PCR s degenerovanými primery, které byly navrženy podle známých sekvencí CenH3. Z těchto dílčích sekvencí byly poté navrženy specifické primery pro 3' a 5' RACE, které umožnily amplifikovat chybějící koncové úseky. Tento postup dosud umožnil získat celé kódující sekvence CenH3 genů u 8 druhů leguminóz. Centromerická lokalizace histonu CenH3 byla u *Pisum sativum* ověřena pomocí transformace konstruktem obsahujícím fúzi CenH3 s fluorescenčním proteinem YFP.

P Plakátová sdělení

LOCALIZATION OF PCB ANTENNA COMPLEXES IN THE PHOTOSYNTHETIC PROKARYOTE *PROCHLOROTHRIX HOLLANDICA*

M. HERBSTOVÁ^{1,2}, F. VÁCHA^{1,2,3}

¹ Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

² University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

³ Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Zámek 136, 373 33, Nové Hradky, Czech Republic
E-mail: herbstova@centrum.cz, tel.: +420 387 775 524

Photosynthetic prokaryote *Prochlorothrix hollandica* is a member of a polyphyletic group of an atypical cyanobacteria formerly called „prochlorophytes”. Typical cyanobacteria do not contain chlorophyll *b*, a characteristic pigment of light-harvesting complexes of higher plants and green algae. Cyanobacterial main light-harvesting system is composed of an assemblage of phycobiliproteins, binding a variety of phycobilins, and arranged into so-called phycobilisomes. „Prochlorophytes” lack phycobilisomes, but similar to chloroplasts of higher plants and green algae, they produce light-harvesting complexes containing both chlorophyll *a* (Chl *a*) and *b* (Chl *b*) bound to three types of Pcb antenna proteins (PcbA, PcbB, PcbC). PcbA are closely related to the IsiA (CP 43') proteins of cyanobacteria, an iron deficiency-induced Chl *a*-binding antenna protein, and to the CP 43 protein, a Chl *a* inner antenna of photosystem II.

Our work was based on identification and localization of the Pcb proteins. We aimed at obtaining information about light-harvesting strategy and function of the single types of Pcb antennae.

Pigment-protein complexes of *P. hollandica* were isolated from dodecylmaltoside solubilized thylakoid membranes on sucrose density gradient and characterized by biochemical, spectroscopic and immunoblotting methods.

The individual types of Pcb antenna proteins are expressed depending on irradiance. PcbC protein was found either in higher oligomeric states or coupled to PS I (forming antenna rings around PS I). PcbA and PcbB are most probably only very loosely bound to photosystems; we assume that these pigment-protein complexes function as low light-induced auxiliary mobile antennae.

P Plakátová sdělení

SYSTEMIC MOVEMENT OF C-TERMINALLY MODIFIED POTATO VIRUS X IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANTS

HANA HOFFMEISTEROVÁ^{1,2}, TOMÁŠ MORAVEC¹, HELENA PLCHOVÁ¹, JITKA FOLWARCZNA¹, NOEMI ČEROVSKÁ¹

¹ Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Karlovce 1a, 160 00 Prague 6 – Dejvice, Czech Republic

² Department of Crop Protection, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, 165 21 Prague 6 – Suchbátka, Czech Republic

E-mail: hoffmeisterova@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 320 338

Plants are a promising alternative to the classical expression systems such as bacterial or mammalian cell cultures. Modified plant viruses are widely used as vectors for transient expression of recombinant proteins. Transient expression using viral vector is a safe and rapid way for inexpensive production of many therapeutically and industrially useful proteins and vaccine candidates.

One of the promising strategies for experimental vaccine design is to create recombinant virus particles decorated with small antigenic epitopes from the target pathogen. One of the frequently used vectors is Potato virus X (PVX) with antigenic epitopes fused to the N-terminus of the viral coat protein (XCP). In our experiments we have fused 13 aa epitope from L2 coat protein of Human papillomavirus 16 (HPV16) to the N- and C-termini of the XCP. We successfully expressed chimeric coat protein with N-terminal epitope fusion (L2-XCP) but we could not detect the expression of the chimera with C-terminal epitope (XCP-L2). However, for optimal use of the viral CP as a carrier of relevant vaccine antigens it would be advantageous to express recombinant coat protein with both N- and C-terminal epitopes.

Our aim was to modify the basic XCP-L2 chimera in a way compatible with viral replication and accumulation and/or cell to cell movement. Nontransgenic *Nicotiana benthamiana* (Nb) and transgenic *N. benthamiana* plants expressing the movement protein of the Tobacco mosaic virus (Nb 3H) were used in all experiments. Six to eight weeks old transgenic and nontransgenic plants were agroinfiltrated with recombinant viruses. The leaves were harvested twelve days post inoculation and the presence of viral CP was verified using SDS-PAGE/WB.

Chapman S., Kavanagh T., Baulcombe D.: 1992 – Plant J, 2: 549

Batten J. S., Yoshinari S., Hemengway C.: 2003 – Mol Plant Pathol, 4: 125

Čerovská N., Hoffmeisterová H., Pečenková T., Moravec Z., Synková H., Plchová H., Velemínský J.: 2007 – Protein Expr Purif, 58: 154

This research was supported by the grant 521/09/1525 from the Grant Agency of the Czech Republic and the fellowship CZU 21180/1312/3126 from the Czech University of Life Sciences Prague to Hana Hoffmeisterova.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ METODY PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V EXPERIMENTÁLNÍ BOTANICE A ZOOLOGII

LUCIE HOROVÁ, PETR BUREŠ

pracovní skupina Biosystematika cévnatých rostlin, Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta MU,
Terezy Novákové 64, Brno, 621 00, ČR
E-mail: lhorova@email.cz, tel.: +420 732 939 864

Průtoková cytometrie je moderní technika, která umožňuje mimo jiné rychlou detekci množství DNA v jádrech jak rostlinných tak živočišných buněk. Hlavním těžištěm jejího využití je biomedicinský výzkum, nicméně v poslední době se začíná rozvíjet její použití i v experimentální botanice a zoologii. Metoda průtokové cytometrie se zde používá hlavně k výzkumu příčin a důsledků polyploidizace a variability velikosti jaderného genomu. Dále je používána ke stanovení obsahu nukleotidů v genomu (AT/GC genomic ratio, genomic base composition).

Principem průtokové cytometrie je analýza jednotlivých částic – nejčastěji jader, na základě jejich optických parametrů (fluorescence, absorbance, reflektance), podle kterých je lze i automaticky třídit. Průtokový cytometr využívá jevu zvaného hydrodynamická fokusace. Unášecí kapalina (voda nebo solný roztok) proudí kanylou a je pod tlakem hnána do vstupního otvoru tzv. „průtokové komůrky“ (flow chamber) o mnohem menším průměru. V jeho blízkosti se do středu proudu unášecí kapaliny tryskou vstříkují vzorek (většinou roztok obsahující buněčná jádra). Vlivem velkého tlaku a rychlosti unášecí kapaliny vzniká při ústí trysky podtlak, který způsobí, že se do středu proudu unášecí kapaliny dostává tak tenký proud vzorku, že se částice v něm pohybují velkou rychlostí jedna za druhou. Mohou být tedy analyzovány jednotlivě. Při analýze částic se využívá světelného záření, ve starších cytometrech jsou excitačním zdrojem HBO lampy (maximum při vlnové délce 450nm), novější cytometry používají monochromatické lasery. Analyzuje se buď velikost (detekuje se úbytek množství prošlého světla) nebo povrch částic (detekuje se množství odraženého světla) nebo obsah nukleových kyselin či proteinů. Při analýze obsahu DNA se tato obarví fluorescenčním barvivem – propidium jodid, DAPI, Hoechst. Jádra prochází skrz jeden nebo více světelných paprsků. Záření o určité vlnové délce (podle použité fluorescenční látky) emituje záření o jiné vlnové délce, které je zachycováno detektory. Těmi mohou být fotodiody nebo fotonásobiče, které převádějí světelný signál na elektrický, který je následně digitalizován a zobrazován ve formě histogramu nebo cytogramu.

Naše laboratoř se zabývá určováním velikosti genomu a GC obsahu jako druhově specifických markerů. Většinou pracujeme s rostlinným materiálem (např. rody *Eleocharis*, *Festuca*, *Carex*, *Salix*, *Viola*, *Hieracium*, *Cirsium*), občas s bezobratlými (pavouci – Eresidae, nebo brouci – *Oryzaephilus*, *Silvanidae*). Z rostlin používáme většinou listy, méně často jiné části (stonky, řapíky, báze korunní trubky). U bezobratlých hemolymfu, případně celou část těla (hlava). K přípravě vzorků používáme OTTO pufrý (*Doležel & Göhde Cytometry 19: 103–105, 1995*), případně Tris.MgCl₂ pufr (*Pfösser et al. Cytometry, 21: 387–393, 1995*). Jádra barvíme PI a DAPI a analyzujeme souběžně na dvou cytometrech, z nichž jeden je vybaven HBO lampou a druhý zeleným monochromatickým laserem. Jako standardy jsou používány rostliny, s definovanou velikostí jaderné DNA (buď sekvenované organizmy *Arabidopsis thaliana* ‘Columbia’, *Oryza sativa* ‘Nipponbare’, bílé krvinky *Homo sapiens*, nebo kultivary *Allium cepa* ‘Alice’, *Pisum sativum* ‘Ctirad’, *Lycopersicon esculentum* ‘Stupické polní tyčkové rané’).

P Plakátová sdělení

INTERACTIONS OF THE RECEIVER DOMAIN IN HISTIDINE KINASE RECEPTORS WITH THE AHP PROTEINS

VENDULA HRDINOVÁ, JAN HEJÁTKO, JAKUB HORÁK

¹ PřF MU, Oddělení FGP, LMFR, Kamenice 5, 625 00 Brno, ČR
E-mail: v.hrdinova@email.cz, tel.: +420 549 493 474

Two-component systems belong to important sensing/response mechanisms in higher plants. In *Arabidopsis thaliana* these systems are composed of hybrid histidine kinases (AHKs, 8 genes), histidine-containing phosphotransfer proteins (AHPs, 6 genes) and response regulators (ARRs, 24 genes), that are biochemically linked by His-to-Asp phosphorelay. AHP proteins interact with histidine kinase receptors as well as with response regulators, and therefore link the signal recognition by membrane sensors with regulation of transcription via nuclear-located transcription factors that mediate plant responses to the environmental stimuli. The specific interactions between AHPs and the receiver domains of histidine kinase receptors could represent a potent mechanism how the specificity of cellular responses to different signals is achieved within the complex two-component signaling network.

In our study the interactions of CKI1 receiver domain with all six AHP proteins were analyzed *in vivo*. Using the modified Matchmaker™ yeast two-hybrid system (Clontech) we revealed that CKI1 receiver domain interacts with AHP2, AHP3 and AHP5, but not with AHP1, AHP4 and AHP6. To confirm these results with an independent method, we carried out Bimolecular Fluorescence Complementation analysis (BiFC) in transiently transformed tobacco leaves. In agreement with our yeast two-hybrid results, we observed the interaction of CKI1 only with AHP2, AHP3 and AHP5. Therefore, combining these two methods for analysis of protein-protein interactions *in vivo* we gained a rapid insight into the specificity of elements involved in a signalling cascade downstream of CKI1. Critical aspects and the future outlooks for proving our methodological approach will be discussed.

Podporováno granty LC06034, MSM002162241 a 204/08/H054.

P Plakátová sdělení

EXTRAKCE VYBRANÝCH KAROTENOIDŮ A FENOLICKÝCH LÁTEK Z KŘÍDLATKY (*REYNOUTRIA* SPP.), UV-VIS SPEKTROFOTOMETRICKÁ A HPLC-DAD ANALÝZA ZÍSKANÝCH EXTRAKTŮ

BARBORA HRVOLOVÁ, JAKUB NEZVAL, JIŘÍ KALINA

KF, PřF, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava 1, ČR
E-mail: B.Hrvolova@seznam.cz, tel.: 605 297 802

Každoročně se ve vybraných oblastech České republiky pořádají rozsáhlé likvidační akce křídlatky (*Reynoutria* spp.). Letos je podobný projekt realizován i v Moravskoslezském kraji. Tyto akce mají jediný cíl – likvidaci této rostliny bez jakéhokoliv následného využití. Za účelem zhodnocení křídlatky byly navrženy dva metodické postupy, jejichž cílem je získání směsi luteinu a zeaxantinu a extrakt fenolických látek z tohoto rostlinného materiálu.

Lutein a zeaxantin se řadí k doplňkovým fotosyntetickým pigmentům se světlosběrnou a fotoprotektivní funkcí. Oba tyto karotenoidy jsou významné antioxidanty. Byl u nich prokázán preventivní účinek proti degenerativnímu onemocnění zraku.

Fenolické látky mají v rostlinách mnoho funkcí – výrazně zvyšují fitness rostliny (UV-stínění, likvidace radikálů, ...). Mohou být také součástí potravinových výrobků, kde jejich antioxidační potenciál zvyšuje kvalitu a trvanlivost potravin. V souvislosti s jejich antioxidačními vlastnostmi je zkoumána i jejich antikancerogenní aktivita.

K separaci luteinu a zeaxantinu byla navržena metodika izolace a selektivní extrakce karotenoidů. Výsledná metodika pro izolaci karotenoidů se skládá ze tří fází přípravných a jedné fáze separační. Přípravné fáze zahrnují ultrazvukovou extrakci ve vodě, ultrazvukovou extrakci ve 100% metanolu a saponifikaci přidavkem KOH. Separací fáze spočívá v oddělení karotenoidů od saponifikovaného extraktu pigmentů. Následně byla vytvořena metodika pro selektivní extrakci karotenoidů, jež byla založena na rozdílné polaritě těchto karotenoidů. Kontrola správnosti jednotlivých kroků byla prováděna pomocí absorpčního spektrofotometru UV550 (Unicam, GB) a HPLC systému (TSP Analytical, USA).

K získání extraktu fenolických látek byla použita jednoduchá extrakce. Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce za použití 40% metanolu, dále byl homogenát ultrasonifikován (Ultrasonic Compact Cleaner, UC 006 DM1, Tesla, ČR) bez chlazení a centrifugován 3 min. při 6000 ot. min⁻¹. Supernatant byl rozdělen na dvě části. První část byla analyzována spektrofotometricky a druhá na HPLC systému. Extrakční metodika fenolických látek byla zvolena tak, aby při minimální časové a instrumentální náročnosti produkovala vysoké výtěžky.

Získáním luteinu, zeaxantinu a fenolických látek z křídlatky a jejich případným využitím ve farmaceutické, dermatologické resp. potravinářské praxi se naskytá možnost kompenzace finančních nákladů vynaložených k odstraňování křídlatky. Nebezpečný plevel by tak mohl být likvidován s daleko menšími náklady a tedy v daleko větším rozsahu.

Poděkování

Tato práce byla vypracována v rámci projektu MŠMT NPVII („INTERVIRON“, 2B06068) a projektu GA ČR 522/09/0468.

P Plakátová sdělení

VLIV TEPLOTY NA RYCHLOST ODUMÍRÁNÍ OLŠÍ ZPŮSOBENÉ *PHYTOPHTHORA ALNI*

JOSEF JANOUŠEK¹, BENOÎT MARÇAIS², CLAUDE HUSSON²

¹ MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² INRA Nancy, Champenoux, 54280, Francie

E-mail: janousek.josef@seznam.cz

Olše lepkavá (*Alnus glutinosa*) má významnou funkci v ekosystémech vodních toků (zpevňování břehů, zvyšování kvality vody, zvyšování biodiverzity) v Evropě. Od počátku 90. let 20. století bylo pozorováno epidemiologické odumírání olší podél vodních toků postupně v celé Evropě (La Porta *et al.*, 2008). Patogen, který způsobuje odumírání olší, byl později identifikován a popsán jako nový druh *Phytophthora alni* (Brasier and Kirk, 2004). Patogen se rozmnožuje zejména pomocí zoospor, které následně infikují především jemné kořínky a borku přes lenticely nebo poranění. Následkem infekce kořenového systému dochází k prosychání koruny, řidnutí, zmenšování a žloutnutí listů. V konečném stadiu stromy odumírají (Jung and Blaschke, 2004).

Hlavním cílem předkládané studie bylo zjistit, zda teplota urychluje rozvoj této nově zjištěné choroby a tedy zda globální oteplování může hrát roli při rozvoji epidemie. Pro zjištění vlivu teploty, byly zvoleny dvě metody: sledování progresu choroby v závislosti na průměrné teplotě vody (v létě/v zimě) a zjištění dynamiky inokula v závislosti na teplotě půdy.

Pozorování bylo realizováno na severovýchodě Francie na 16 lokalitách, které byly vybrány dle následujících kritérií: přibližně stejné procentuální zastoupení symptomatických olší (aby infekční tlak inokula byl přibližně stejný); blízkost stanice, která zaznamenává fyzikálně-chemické vlastnosti vody; zohlednění výškového a teplotního gradientu vody; teplota vody nebyla korelována s rychlostí proudu (aby bylo možné tyto 2 faktory oddělit). Zdravotní stav olší byl v těchto lokalitách zaznamenáván každoročně od roku 2006 na základě vizuálního hodnocení koruny (1 – bez symptomů; 2 – symptomy na listech < 50 %, první usychající větve; 3 – symptomy na listech > 50 %, mrtvé větve; 4 – mrtvý strom).

Pro sledování progresu choroby v jednotlivých lokalitách se zjišťovala incidence (= počet nových případů). Zjištění incidence umožnilo eliminovat vliv rozdílné historie lokalit (různé dlouhá doba přítomnosti patogena). Vzhledem k obtížnostem při stanovení prvních symptomů byla stanovena incidence na základě počtu stromů, u kterých došlo k progresi symptomů v koruně (byly tedy hodnoceny jeden rok v bodovém hodnocení „2“ a následující rok ve skupině „3“). Incidence byla stanovena pro každou lokalitu. Výsledkem byl graf znázorňující incidenci v závislosti na teplotě vody. Zásadním nedostatkem této metody je způsob hodnocení zdravotního stavu stromů, které je značně nepřesné, ovlivněné dalšími faktory (např. pozdní mrazy, škůdci) a především individuální. Přesnější by bylo stanovení incidence na základě stanovení počtu stromů, které jsou jeden rok symptomatické a následující rok odumřelé.

Pro kvantifikaci inokula v půdě byly odebrány vzorky z okolí 6 olší (zdravotní stav „2“, kde je množství inokula nejvyšší) z každé lokality ve dvou termínech na jaře 2009. Množství inokula v půdě bylo následně kvantifikováno pomocí metody „biologické pasti“: vzorky o stejném objemu půdy byly umístěny do nádob s vodou a listy pěnišníků; ty přitahovaly uvolněné zoospory, které způsobily skvrny na těchto listech; proporční část skvrn byla analyzována pomocí kvantitativní PCR; výsledek byl vyjádřen v počtu skvrn způsobených *P. alni* na jednotku plochy listu. Pro sledování teploty půdy byly použity 2 termometry na každé lokalitě umístěné v hloubce 15 cm. Výsledkem byl graf, který vyjadřoval množství inokula v závislosti na průměrné teplotě v dané lokalitě. Tato metoda nebere v úvahu různou rychlost uvolňování zoospor z různých typů půd, které se dá předpokládat. Také spočítání skvrn na listech je značně nepřesné (jsou často špatně rozeznatelné a překrývají se).

Výsledky této studie naznačují, že teplota neurychluje rozvoj odumírání olší způsobené *Phytophthora alni*. Vzhledem ale k řadě nepřesností a krátkému období pozorování je zapotřebí toto ještě ověřit.

Brasier, C., Kirk, S., Delcan, J., Cooke, D., Jung, T. et Man in't Veld, W. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on Alnus trees. *Mycol. Res.* 108 (10): 1172-1184.

Jung, T. et Blaschke, M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197-208.

La Porta, N., Capretti, P., Thomsen, I. M., Kasanen, R., Hietala, A. M. 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Can. J. Plant Pathol.* 30: 177-195.

Vypracováno v rámci diplomové práce ve výzkumném centru INRA Nancy ve Francii.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ PŘI STUDIU DETERMINACE POHLAVÍ A POHLAVNÍCH CHROMOZOMŮ RODU *SILENE*

BOHUSLAV JANOUŠEK, MARTINA MRÁČKOVÁ, JANA KANDALCOVÁ

Oddělení vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno, 612 65, ČR
E-mail: kandalcova@seznam.cz, tel.: +420 608 225 543

Rod *Silene* je vhodným objektem studia pohlavních chromozomů. Vyskytují se zde druhy dvoudomé, gynodioecické a hermafroditní. Pohlavní chromozomy, které se nacházejí u některých zástupců rodu *Silene* jsou vývojově podstatně mladší než doposud více zkoumané pohlavní chromozomy savců. Díky poslední zmíněnému faktu může studium dvoudomých druhů rodu *Silene* usnadnit studium obecných zákonitostí vývoje pohlavních chromozomů v raných fázích.

Toto plakátové sdělení je mimo jiné věnováno problematice determinace pohlaví u dvoudomého druhu *Silene otites*, blízkce příbuzného dvoudomému druhu *Silene colpophylla*, u něž byl typ determinace pohlaví určen nedávno, a to v naší laboratoři (Mráčková et al., 2008). Výsledky práce Mráčková et al. prokázaly, že se u *S. colpophylla* nachází typ determinace pohlaví (XX/XY) podobně jako u *Silene latifolia*. U *Silene colpophylla* jsou ovšem pohlavní chromozomy homomorfní a pravděpodobně se vyvinuly z jiného páru autozomů než pohlavní chromozomy *Silene latifolia*. Jak *Silene colpophylla*, tak *Silene otites* patří do téže skupiny třinácti druhů náležejících do sekce *Otites* (Wrigley, 1986). Údaje v literatuře ohledně typu determinace pohlaví u *S. otites* byly dosud značně rozporuplné, neboť dosud nebyla tato problematika zkoumána moderními metodami. Některé práce však naznačovaly, že by se u *Silene otites* mohl vyskytovat „ptačí“ typ determinace pohlaví (ZW/ZZ). Situace, kdy blízkce příbuzné druhy nebo zástupci téhož druhu mají odlišnou determinaci pohlaví byla dosud popsána pouze u několika málo živočišných rodů (například u žáby *Rana rugosa*; Ogata et al., 2003). V tomto sdělení prezentujeme výsledky, které jsme získali pomocí sledování molekulárních markerů ve dvou následných generacích *S. otites*.

Dalším námi studovaným tématem je studium mechanismů zapojených do potlačení rekombinace mezi chromozomem X a Y. V současnosti je často zdůrazňována úloha chromozomálních přestaveb při tvorbě nerekombinující oblasti pohlavních chromozomů. Naše metoda je založena na testování schopnosti rekombinace u chromozomů Y. Modelovým objektem pro tyto studie jsou speciálně připravené rostliny *S. latifolia* o genotypu XYy, které se vyznačují přítomností dvou chromozomů Y odlišného původu. Zde prezentujeme výsledky získané pomocí sledování dědičnosti markerů z nerekombinující oblasti chromozomu Y a pseudoautozomálního markeru – genu *SEMF* (*Silene* *EM*bryonic *F*lower). Naše výsledky ukazují že na potlačení rekombinace mezi chromozomy X a Y se zřejmě podílejí i jiné mechanismy než chromozomální přestavby.

Podporováno granty: Grantové Agentura Akademie věd ČR (IAA600040801).
Ministerstvo školství (LC06004)
Výzkumný záměr AV ČR (AV0Z50040507)
Výzkumný záměr AV ČR (AV0Z50040702)

P Plakátová sdělení

EVIDENCE FOR A DOMINANT EXPRESSION OF RDNA LOCI ON BIVALENT FORMING CHROMOSOMES IN PENTAPLOID DOGROSES (*ROSA* SECT. *CANINAE*)

LUCIE KHAITOVÁ¹, GUN WERLEMARK², HILDE NYBOM², ALEŠ KOVÁŘÍK¹

¹ Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Královopolská 135, CZ-612 65 Brno

² Balsgård-Department of Plant Breeding and Biotechnology, Swedish University of Agricultural Science, Kristianstad, Sweden

E-mail: khaitova@ibp.cz, tel.: +420 541 517 152

Odd (or asymmetric) meiosis is a unique reproduction system found in pentaploid dogroses ($2n = 5x = 35$) especially in *Rosa* section *Caninae*. One basic genome ($x = 7$) derived from the seven segregating bivalents is transmitted from the pollen, whereas four basic genomes ($4x = 28$, one genome is derived from the segregation of the bivalents and three sets from the segregating univalents) are transmitted by the egg cell.

Chromosomes from all five genomes carry 18-5.8-26S nuclear ribosomal DNA (rDNA). We identified six major rRNA gene families (α , β , β' , γ , δ , ϵ) in pentaploid *R. canina*, *R. rubiginosa*, *R. dumalis*, *R. sherardii*, *R. caesia* and tetraploid ($2n = 4x = 28$) *R. mollis* based on several polymorphic sites in the internal transcribed spacers (ITSs). gDNA from those five pentaploids was isolated, PCR was carried and the ITS clones were sequenced. Sequences were aligned and different polymorphic sites were found. The sequences showed that β family appears to be present among all species while the distribution of other families was more restricted. While in some species (*R. canina*) the β family appears to be a dominant rDNA type, in other species, e.g. *R. rubiginosa*, the β family was reduced in copy numbers. The β family was overrepresented in DNA extracted from pollen grains (compared to leaf) suggesting its occurrence on bivalent forming chromosomes. We also found that in tetraploid *R. mollis* there are four more tetraploid-specific polymorphic sites that were not found in pentaploid dogroses forming new tetraploid-specific rDNA families.

Expression pattern of the rRNA gene families and their distribution in univalent and bivalent chromosomes was carried as follows: RNA was isolated, cDNA was prepared, ITS region was sequenced and different polymorphic sites were found. To confirm our results, gDNA- and cDNA-CAPS was carried with different enzymes. We found that the β family was always expressed irrespective to species. However, there was variation in expression of other gene families and some families (γ) were silenced.

The data show that in addition to the five major rRNA gene families that were found previously in pentaploid roses, a new tetraploid (*R. mollis*)-specific family referred to as ω family was identified. The β rDNA family likely occurs preferentially on bivalent forming chromosomes that are transmitted from the pollen and dominates rDNA expression in all dogrose species. The families originating from univalent chromosomes are, in some cases, being silenced.

Kovarík A., Werlemark G., Leitch A.R., Souckova-Skalická K., Lim YK., Khaitova L., Koukalova B. and Nybom H.: 2008 – *Heredity*, 101: 359-367.

Khaitova L., Werlemark G., Nybom H. and Kovarik A.: 2009 – *Heredity*: 1-8.

P Plakátová sdělení

MATEMATICKÁ ANALÝZA PRODUKČNÍHO PROCESU ROSTLIN HRACHU SETÉHO OVLIVNĚNÉHO XENOBIOTIKY A OSMOTICKÝM STRESEM

MAREK KLEMŠ, JIŘÍ DOKOUPIL, PAVLA SOLNICKÁ, ZDENĚK ŠTĚPÁN, HELENA VÍTKOVÁ

Ústav biologie rostlin, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
E-mail: klems@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 296

Aklimace rostlin představuje hlavní způsob obrany rostlin vůči nepříznivým podmínkám a stresovým faktorům. Velmi důležitou roli v odpovědi rostlin na stres sehrává kyselina abscisová. Kyselina abscisová ovlivňuje procesy regulace zavírání průduchů, ukládání zásobních proteinů v embryogenezi, procesy dormance, růst orgánů a odpovědi na četné stresové faktory. Změny obsahu kyseliny abscisové a jiných markerů stresu hodnocené pomocí matematické a statistické interpretace mohou přispět k verifikaci experimentální hypotézy. Cílem experimentu bylo popsat změny v obsahu sušiny rostlin hrachu (*Pisum sativum* L.) a v produkci semen po ovlivnění herbicidem, xenobiotikem a osmotikem ve vztahu ke změně obsahu ABA a kvantového výtěžku elektronového transportu PS II. Současně byla sledována ukládání zásobních proteinů v semenech. Byla hledána nejvhodnější matematická interpretace pro posouzení vztahu mezi růstem, produkcí rostliny a změnami fyziologických parametrů v odpovědi na stres.

Rostliny hrachu byly kultivovány v Richterově živném roztoku s 20 μM fluridonem (herbicid), 1 μM fluorantenem (polycyklický atromatický uhlovodík) nebo polyetylglykolem 100 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (nepenetrující osmotikum). Během ontogeneze rostlin byly měřeny parametry fluorescence chlorofylu (Fluor Pen fluorometr) a změny hladin obsahu kyseliny abscisové (RIA). Ve zralých a nezralých semenech bylo zjišťováno ukládání zásobních proteinů (SDS-PAGE). Výsledky byly hodnoceny vícefaktorovou analýzou variance (ANOVA) s následným odvozením regresních funkcí.

Hladina kyseliny abscisové byla zvýšena v rostlinách kultivovaných v roztoku s PEG6000 a to v listech i v kořenech. Ošetření fluorantenem snížilo akumulaci sušiny v listech, statisticky nevýznamně zvýšilo kvantový výtěžek elektronového transportu PSII a neovlivnilo hladinu ABA. Fluridon snížil nejenom hladinu ABA v listech, ale také sušinu listů a fluorescenci chlorofylu. Ukládání zásobních proteinů nebylo ovlivněno, pouze v případě fluridonu se obsah proteinů v semenech snížil. Na základě ošetření výsledků pomocí nelineární regrese a vícefaktorové analýzy variance byly určeny kritické momenty v čase pro ovlivnění produkce rostlin..

Tento výzkum byl podporován výzkumným projektem Grantové agentury AF MZLU Brno IGA 19/2009.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ DNA ČIPU DART PRO STUDIUM GENOMU TRÁVNÍKOVÝCH A PÍCNINOVÝCH TRAV

DAVID KOPECKÝ, JAN BARTOŠ, MIROSLAVA HAVRÁNKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Sokolovská 6, 77200 Olomouc

E-mail: kopecky@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 857

Trávy (Poaceae spp.) jsou rozšířeny téměř po celém světě a hrají významnou roli v životě člověka. Jejich využití se pohybuje od produkce siláže, přes pastevní plochy po sportovní a rekreační účely. V mírném pásu hrají prim druhy patřící do komplexu *Festuca-Lolium* (kostřavy a jílky). Jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) jsou využívány jako pícninové a travníkové trávy zejména pro rychlý vývin na jaře, vysoký obsah nutričních látek, dobrou stravitelnost, tmavě zelenou barvu a uniformitu drnu. Jejich velkou slabinou je však nízká tolerance k různým abiotickým i biotickým stresům. Vesměs reciprokými vlastnostmi k oběma jílům se vyznačují druhy kostřav (Jauhar, 1993). Ve šlechtění se nejčastěji využívá kostřava luční (*Festuca pratensis*) a kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea*). Zástupci obou rodů se spolu mohou křížit za vzniku fertálních hybridů, které souhrnně označujeme jako *Festulolium*. Tyto hybridy se stávají vyhledávanými mezi zemědělci a jejich osevní plochy se rok od roku rozšiřují (Kopecký et al., 2006).

Pro studium genomu druhů patřících do tohoto komplexu (*L. perenne*, *L. multiflorum*, *F. pratensis*, *F. arundinacea* a *F. glaucescens*) jsme vytvořili DNA čip typu DArT (Diversity Arrays Technology) (Kopecký et al., 2009). Tento DArTFest čip obsahuje 7680 sond. V prvním experimentu, který zahrnoval 40 genotypů z každého z pěti druhů, jsme identifikovali 3884 polymorfních markerů. DArTFest čip jsme použili k a) analýze mezidruhové a vnitrodruhové genetické variability, b) genetickému mapování, c) fyzickému mapování a d) analýze genomového složení hybridů *Festulolium*.

Výsledkem analýzy 40 genotypů z každého z pěti druhů trav byl dendrogram vystihující **vnitro- a mezidruhovou genetickou variabilitu**. Každý z pěti druhů vytvořil na dendrogramu samostatnou skupinu. Pomocí čipu bylo rovněž možné identifikovat chybně určené položky. Pro **genetické mapování** jsme použili mapovací populace *F. pratensis* a *L. multiflorum*, které byly již dříve použity pro vytvoření genetických map (Alm et al., 2003; Studer et al., 2006). Genetická mapa *F. pratensis* byla díky čipu DArTFest obohacena o 204 DArT markerů a její délka zvětšena o 170 cM na současných 775 cM. Na původní genetickou mapu *L. multiflorum* bylo umístěno dokonce 531 DArT markerů. Pro **ukotvování DArT markerů na jednotlivé chromozómy** jsme použili substituční linie, kde v tetraploidním jílku (*L. multiflorum*) byl nahrazen jeden chromozóm jílku homeologním chromozómem kostřavy (*F. pratensis*) (Kopecký et al., 2008). Všechny sedm linií (pro všechny sedm chromozómů *F. pratensis*) bylo dále zpětně kříženo s tetraploidním jíllem a bylo získáno cca 30 rekombinačních linií (pro každý chromozóm) s různě dlouhými rekombinovanými segmenty chromozómu *F. pratensis*. Tyto rekombinační linie byly použity k ukotvování DArT markerů na jednotlivé segmenty chromozómu („biny“). Možnost využití DArTFest čipu pro analýzu **genomového složení hybridů *Festulolium*** byla testována na třech odrůdách *L. multiflorum* × *F. pratensis*. Výsledky z DArTFest čipu byly ve výjimečné shodě s analýzou genomového složení těchto odrůd zjištěného metodou GISH (genomová *in situ* hybridizace; Kopecký et al., 2006).

V této práci demonstrujeme možnosti využití DArT čipu pro analýzu rostlinných genomů. Tento čip může být rovněž použit pro šlechtění pomocí markerů. Izolace značného množství molekulárních markerů umožní identifikaci markerů v těsné vazbě na agronomicky významné znaky a jejich umístění na genetické a fyzické mapě.

Alm, V., Fang, C., Busso, C.S., Devos, K., Vollan, K., Grieg, Z., Rognli, O.A.: 2003 – Theor Appl Genet 108: 25-40

Jauhar, P.P.: 1993 – Monographs on Theor Appl Genet Vol. 18, pp. 255

Kopecký, D., Bartoš, J., Lukaszewski, A.J., Baird, J.H., Černoch, V., Kölliker, R., Rognli, O.A., Blois, H., Caig, V., Lübberstedt, T., Studer, B., Doležel, J., Kilian, A.: 2009 – BMC Genomics (submitted)

Kopecký, D., Loureiro, J., Zwierzykowski, Z., Ghesquiere, M., Doležel, J.: 2006 – Theor Appl Genet 113: 731-742

Kopecký, D., Lukaszewski, A.J., Doležel, J.: 2008 – Chromosome Res 16: 987-998

Studer, B., Boller, B., Hermann, D., Bauer, E., Posselt, U.K., Widmer, F., Kölliker, R.: 2006 – Theor Appl Genet 113: 661-671

Podporováno granty NAZV QH71267 a GAČR 521/07/P479.

P Plakátová sdělení

CHLOROPHYLL SYNTHESIS UNDER CONTROL – REGULATABLE EXPRESSION OF THE LPOR ENZYME IN *SYNECHOCYSTIS* PCC 6803

JANA KOPEČNÁ^{1,2}, JOSEF KOMENDA^{1,3}, ROMAN SOBOTKA^{1,2,3}

¹ MBÚ AV ČR, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň, ČR

² Pff JU, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR

³ ÚFB JU, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, ČR

E-mail: kopečna@alga.cz, tel.: +420 384 340 434

Stringent control of the chlorophyll (Chl) biosynthesis pathway is essential particularly for oxygenic organisms like plants and cyanobacteria that cope with the problem of photo-oxidation. To prevent accumulation of harmful 'free' tetrapyrroles, it is expected that Chl formation is tightly synchronized with synthesis of cognate apoproteins. In order to understand coordination between Chl and protein biosynthesis we prepared *Synechocystis* pMON:*por*/ Δ *por*/ Δ *chlL* strain enabling to control Chl availability via regulatable expression of the light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR), a penultimate enzyme of this pathway. In the first step, we deleted the *por* gene coding for LPOR. Resulting Δ *por* mutant accumulated significantly less Chl per cell in contrast to dramatically increased carotenoid level and displayed strongly retarded growth rate even at moderate light (35 μ E). As the second step, the *por* gene was introduced back into the Δ *por* strain using the pMON:*por* vector possessing the regulatable *nirA* promoter. This promoter is tightly repressed by ammonium and activated by nitrate providing nice repression/induction system. The phenotype of the pMON:*por*/ Δ *por* strain was similar to wild type suggesting that the expression of the *por* gene from *nirA* promoter fully complemented the Δ *por* mutation. To exclude contribution of the dark-operative POR (DPOR) to the Chl production we finally eliminated the *chlL* gene obtaining the pMON:*por*/ Δ *por*/ Δ *chlL* mutant producing Chl only by the regulatable LPOR enzyme. Although the Chl content decreased after DPOR deletion, growth rate of the final mutant remained similar to wild-type. In contrast, after 14 days of the LPOR repression by ammonia the strain retained only ~17% of Chl level in comparison to the wild type and growth rate was strongly affected. Surprisingly, although the Chl level was lower than in the Δ *por* mutant, we did not observe accumulation of carotenoids indicating an essential role of the LPOR enzyme even at very low concentration per cell. Biogenesis of membrane proteins under limited Chl availability was analyzed using S35 radiolabeling and 2D electrophoresis. It revealed overall very low membrane protein synthesis and also total protein accumulation in membranes was dramatically changed under analyzed conditions. Detailed analysis of the protein biosynthesis and tetrapyrrole metabolism in the pMON:*por*/ Δ *por*/ Δ *chlL* mutant will be presented.

The work was supported by Institutional Research Concept no. AV0Z50200510, by the project AA500200713 of the Grant Agency of the Czech Academy of Sciences and by the project P/044/2008 of the Grant Agency of the University of South Bohemia.

P Plakátová sdělení

HYPOMETHYLACE DNA NEOVLIVŇUJE DÉLKU ROSTLINNÝCH TELOMER

EVA MAJEROVÁ, IVA MOZGOVÁ, JIŘÍ FAJKUS

Laboratoř funkční genomiky a proteomiky Ústavu experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno, Kotlářská 2, Brno 60200, ČR
E-mail: maja.eva2@gmail.com, tel.: +420 776 742 984

Telomery, nukleoproteinové struktury, jsou velmi důležité pro udržení celistvosti eukaryotických chromozomů a změna jejich délky rozhoduje buď o dalším buněčném dělení, nebo o navození buněčné smrti. Je všeobecně známo, že délka telomer je udržována enzymatickým komplexem telomerázou, nebo alternativním prodlužováním telomer (ALT). V minulých letech ovšem byl objeven i vliv epigenetických faktorů – methylace DNA a histonů na délku telomer u myších embryonálních kmenových buněk. Obecně v tomto experimentálním systému vedl úbytek heterochromatinových značek k prodlužování telomer.

Cílem této práce bylo zjistit, zda se vliv methylačního stavu chromatinu na délku telomer uplatňuje i v rostlinných buňkách. Hypomethylace bylo dosaženo působením činidel S-9-(2,3-dihydroxypropyl) adeninu (DHPA), který funguje jako kompetitivní reverzibilní inhibitor hydrolázy S-adenosyl-L-homocysteinu, a zebularinu, cytidinového analogu, který vytváří komplex s DNA methyltransferázami a může být zabudováván do DNA na místo cytidinu. Tyto látky byly jednotlivě, nebo společně, přidávány jak do média pro pěstování suspenzních kultur *N. tabacum* (TBY-2) a *A. thaliana*, tak do živné půdy pro pěstování celých rostlin *A. thaliana*, a to v různých koncentracích. Materiál byl následně podroben analýze stupně methylace DNA a analýze délky telomer pomocí metody terminálních restrikčních fragmentů (TRF).

Hypomethylační účinek byl sledován pomocí štěpení restrikčními enzymy s různou citlivostí k methylaci cílových míst a následnou Southernovou hybridizací se sondami k detekci subtelomerové repetitivní sekvence HRS60 u *N. tabacum* a 5S rRNA genů v genomu *A. thaliana*. Ačkoliv se pomocí uvedených činidel podařilo navodit hypomethylaci DNA, nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny v délce telomer u ani jednoho pozorovaného objektu za žádných testovaných podmínek, tudíž nebyla shledána příčinná souvislost mezi úrovní methylace a délkou telomer u rostlin.

Projekt byl podpořen MŠMT ČR (MSM0021622415, LC06004, AV0Z50040507) a GAČR (204/08/1530). DHPA byl darován dr. Ivanem Votrubou, UOCHAB AV ČR.

P Plakátová sdělení

NOVÉ MOŽNOSTI VYUŽITÍ METODY GISH U ROSTLIN

MICHAELA MARKOVÁ^{1,2}, BORIS VYSKOT², PERT BUREŠ¹

¹ Oddělení biosystematiky rostlin, Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, Brno, 61137, ČR

² Oddělení vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, Brno, 612 65, ČR
E-mail: m.markova@email.cz, tel.: +420 532 146 271

Metoda genomové *in situ* hybridizace (GISH) je známou a všeobecně používanou variantou klasické fluoreescenční hybridizace (FISH). Na chromozomy je při GISH hybridizována celá genomová DNA (gDNA) a je používána především pro rozlišení rodičovských chromozomů v mezidruhovými hybridech či polyploidech a také ke sledování interakce rodičovských genomů. Zde se zaměříme na dvě nové oblasti využití GISH a to pro karyotypování rostlinných chromozomů a pro fylogenetické analýzy rostlinných druhů. Tyto inovace byly otestovány na modelovém rodu *Silene* L. z čeledi *Caryophyllaceae* (hvozdíkovité), který představuje jedinečný systém pro studium determinace pohlaví a evoluce pohlavních chromozomů u rostlin. Výzkum nyní pokračuje na rodu *Eleocharis* R. Br. z čeledi *Cyperaceae* (šáchorovité), který je z cytogenetického hlediska zajímavý rozmanitostí v počtu a velikosti chromozomů u jednotlivých druhů a především přítomností holocentrických (holokinetických) chromozomů.

Druhově (či genomově) specifické repetice mají na chromozomech nenáhodnou distribuci a vytváří heterochromatinové bloky. Hybridizační signály gDNA mají podobné rozložení jako C-pruhy a DAPI pruhy, mluvíme tedy o GISH-pruhování. U druhů s relativně malým genomem se objevují pruhy především v pericentromerických oblastech, zbytek chromozomů zůstává téměř bez signálu. Pro tento hybridizační fenomén, založený zřejmě na centromerických satelitních repeticích, je známo označení centromerická GISH (cenGISH). Dalšími typickými pruhy, detekovatelnými pomocí GISH, jsou N pruhy a pruhy v oblasti subtelomer. Podobnou adaptací je selfGISH neboli hybridizace gDNA na chromozomy pocházející ze stejného druhu. Tato metoda využívá kratší hybridizační časy a menší koncentraci sondy, vzniklé hybridizační vzory také souvisí s velikostí genomu testovaného druhu. Nejvýraznější pruhy lze opět většinou detekovat v pericentromerických oblastech a v rDNA lokusech, čím větší genom, tím více dalších pruhů se na chromozomech vyskytuje. Podobné pruhy vzniknou i při kombinaci DNA sondy a chromozomů z velmi příbuzných druhů, jak jsme pozorovali u mezidruhovými hybridů *S. latifolia* s *S. diclinis* a *S. heuffelii*.

Novou oblastí využití metody GISH je studium fylogenetických vztahů mezi rostlinnými druhy. V tomto případě jde o heterologní GISH – DNA sondy pochází z jiného druhu než jsou rodičovské druhy hybrida, na jehož chromozomy se hybridizuje. Porovnáním charakteru a intenzity hybridizačního signálu na obou sadách chromozomů najednou je možné přímo porovnat a měřit stupeň homologie mezi testovanými druhy. Námi navržený fylogenetický přístup jsme úspěšně otestovali na 14 druzích *Silene* a potvrdili jsme, že existují přesvědčivé rozdíly v intenzitě a lokalizaci signálů, které odpovídají fylogenetické příbuznosti testovaných druhů. Se vzrůstající evoluční vzdáleností druhů se intenzita a charakter signálu mění a klesá schopnost značené DNA testovaného druhu rozlišit mezi chromozomy rodičovských genomů (veličina rozlišovací schopnosti sondy, DA). Cytogenetická data byla ve všech případech v souladu s fylogenetickým stromem zkonstruovaným na základě sekvencí ITS rDNA. Cytogenetické vzdálenosti druhů byly také ve vysoké korelaci (0,98) s fylogenetickými vzdálenostmi vypočítanými z délky větví fylogenetického stromu. Tento přístup může být velmi přínosným doplňkovým parametrem ke klasickým fylogenetickým přístupům založeným na DNA sekvencích.

Marková M., Vyskot B.: Cytogenet. Genome Res., *in press*

Marková M., Michu E., Vyskot B., Janoušek B., Žlůvová J.: 2007- Chromosome Res., 15: 1051

Marková M., Lengerová M., Žlůvová J., Janoušek B., Vyskot B.: 2006 – Genome, 49: 373

Žlůvová J., Lengerová M., Marková M., Hobza R., Nicolas M., Vyskot B., Charlesworth D., Negrutiu I., Janoušek B.: 2005 – Evol. Devol., 7: 327

Podporováno granty: GACR 204/09/H002 a 206/09/1405.

P Plakátová sdělení

DETERMINATION OF POLYAMINES UNDER HEAT STRESS IN TOBACCO PLANTS

OLGA MARTINCOVÁ, RADOMÍRA VAŇKOVÁ AND MILENA CVIKROVÁ

Institute of Experimental Botany v.v.i., ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, Rozvojová 236, 16502 Prague 6, Czech Republic
E-mail: martincova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 405

Polyamines (PAs) are ubiquitous low-molecular-weight aliphatic amines that are involved in regulation of plant growth and development and they also play important roles in responses to both abiotic environmental stresses and biotic stressors. Because of their polycationic nature at physiological pH, PAs are able to interact with proteins, nucleic acids, membrane phospholipids and cell wall constituents, thereby activating or stabilizing these molecules. The most commonly found PAs in higher plants are the diamine putrescine (Put), the triamine spermidine (Spd) and the tetraamine spermine (Spm). In plant cells, PAs occur as free molecular bases and covalently linked to small molecules, especially hydroxycinnamic acids (soluble conjugated PAs), as well as to high molecular-mass substances like hemicelluloses and lignin and in small amounts also to proteins (insoluble conjugated PAs). However, plants have the ability to synthesize also uncommon PAs (previously reported only in thermophilic bacteria) when challenged with heat –stress. We have examined changes in the levels of free and conjugated PAs in the defence response of tobacco plants to heat stress.

The determination of PAs are commonly achieved by chromatographic methods such as thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC). A major problem in the determination of PAs is the lack of sensitive analytical techniques. Therefore, chemical derivatization is usually applied. The most common derivatizing reagents used are dansyl and benzoyl chlorides which react with either the primary or secondary amines, providing very stable products that exhibit both fluorescence and UV–vis absorbing properties.

For the analysis of PAs in heat stressed plants we used the modified method of HPLC analysis described by Slocum *et al.* (1989). The plant material was ground in liquid nitrogen and extracted with 5% perchloric acid (PCA). 1,7- Diaminoheptane was added as an internal standard. The extracts were centrifuged, and then PCA-soluble free PAs were analyzed in one-half of the supernatant. The remaining supernatant was acid hydrolysed in 6 M HCl to obtain PCA-soluble conjugates of PAs. PCA-soluble free PAs, and acid hydrolysed PA conjugates were benzoylated with benzoyl chloride. Benzoyl-amines were analyzed by HPLC using a Beckman Liquid Chromatograph equipped with a UV detector (monitoring the eluate at 254 nm) and a C₁₈ Spherisorb 5 ODS2 column (particle size 5 µm, column length 250 × 4.6 mm).

The HPLC analysis of PAs determined in tobacco plants under heat stress revealed enhanced production and accumulation of free and conjugated PAs as well as the presence of two uncommon PAs – norspermidine and norspermine.

Slocum, R.D., H.E. Flores, A.W. Galston and L.H. Weinstein. 1989. Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. *Plant Physiol.* 89: 512-517.

This work was supported by Institutional Grant AV0Z 50380511 and by Ministry of Education, the project OC 08013.

P Plakátová sdělení

KONCE CHROMOZÓMOV U RASTLINNEJ ČELADE *ALLIACEAE*

MARTINA MARTONOVÁ, JIŘÍ FAJKUS

Oddelenie funkčnej genomy a proteomiky, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5,
625 00 Brno, ČR

E-mail: kartonka@sci.muni.cz, tel.: +420 549 494 003

Teloméry – nukleoproteínové štruktúry tvoriace konce chromozómov.

U väčšiny eukaryot je telomerická DNA tvorená krátkymi repetitívnymi sekvenciami, ktoré sú typické pre určité skupiny organizmov.

Rad *Asparagales* združuje zástupcov, ktorých telomerický motív tvorí tri varianty:

TTTAGGG – typ *Arabidopsis*

TTAGGG – ľudský typ

neznáme alternatívne sekvencie

V priebehu evolúcie došlo v prípade radu *Asparagales* k zmenám.

Typické rastlinné teloméry (TTTAGGG)_n, boli plne alebo čiastočne nahradené ľudským typom telomerických repetícií (TTAGGG)_n. V prípade rodu *Allium*, boli stratené oba telomerické motívy. Evolučné zmeny, ktoré postihli čeľaď *Alliaceae*, umožnili vytvorenie nových telomerických variant. Pomocou metód ako reštrikčné štiepenie, klonovanie, fluorescenčná in situ hybridizácia, mapovanie umelých bakteriálnych chromozómov pomocou fluorescenčnej in situ hybridizácie, sme sa snažili o identifikáciu a lokalizáciu kandidátnej telomerickkej sekvencie v rode *Allium*. Modelovým organizmom bol zvolený *Ipheion uniflorum*, z fylogeneticky blízkeho rodu *Ipheion*.

Práve jeho sekvenčné motívy mohli vtisnúť podobu telomerickému motívu v rode *Allium*.

Podporované grantom GA ČR 204/08/H054.

P Plakátová sdělení

NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO DIAGNOSTIKU PATOGENŮ ROSTLIN POMOCÍ PCR

PAVEL MATUŠINSKY, LUDVÍK TVARŮŽEK, TOMÁŠ SPITZER

Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, ČR

E-mail: matusinsky@vukrom.cz, tel.: +420 573 317 113

Vývoj primerů specifických k cílovým organismům (např. houbovým patogenům rostlin) je u diagnostiky pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) klíčovým krokem. Jeden z možných postupů začíná vyhledáním sekvence genu nebo jiného úseku DNA z databáze např. Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nejčastěji bývají cílové úseky zaměřeny na oblast ribozomální DNA (rDNA) a to zejména na ITS oblast (*Internal Transcribed Spacer*), či další konzervativní geny např. β -tubulin, geny pohlavních typů, elongační faktor, nebo mitochondriální DNA (mtDNA), či geny uplatňující se při tvorbě mykotoxinů. Další možností je zacílit primery na anonymní unikátní úsek DNA odvozený např. z RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (v takovém případě hovoříme o tzv. SCAR markerech (*Sequence-Characterized Amplified Region*)). Vybrané sekvence jsou pak porovnány (aligned) za pomoci software např. T-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk>) (software k tomuto účelu je celá řada) s příbuznými druhy, nebo s DNA organismů, u kterých hrozí shoda. Tento krok se doporučuje nepodcenit a použít co největší množství organismů, protože strukturní geny se vyznačují nízkou substituční rychlostí během evoluce (ve srovnání s úseky genomu, které nejsou pod přísnou kontrolou selekce), což může při lokalizaci primerů do takové oblasti vést k nasedání primerů u příbuzných druhů.

Primery je možno navrhnout pomocí počítačových programů, kterých je také celá řada např. Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Navržené primery je pak dobré analyzovat z hlediska tvorby sekundárních struktur (vlásenek), tvorby dimerů a stanovit teplotu tání. Zde opět poslouží některý software např. Net Primer (<http://www.premierbiosoft.com>). Specifita primerů se ověří pomocí BLAST vyhledávání v databázi Genbank. Poté následuje obtížnější část práce a to důsledné testování na biologickém materiálu. Primery se testují jednak z hlediska specifity (tj. zda detekují jen a pouze cílový organismus a nic jiného), dále z hlediska spolehlivosti detekce ve vzorku sestávajícího převážně z DNA hostitele (DNA patogena je ve vzorku získaného izolací DNA z rostlinné tkáně většinou málo). Ve vzorku se může vyskytovat navíc DNA dalších organismů (což může být u vzorku odebraného ve volné přírodě cokoli). Samozřejmě se primery testují také z hlediska citlivosti tj. je nutno stanovit práh detekovatelnosti, tedy minimální množství DNA patogena, které ještě může být touto technikou spolehlivě prokázáno.

A k čemu je to vše dobré? Přesná a včasná diagnostika patogena má velký význam v systému ochrany polních plodin či ve šlechtitelském procesu při výběru odolných genotypů. Klasické metody diagnostiky jako vizuální hodnocení symptomů, mikroskopické či kultivační metody mají mnohdy limitované možnosti. Vnější příznaky se mohou překrývat, obzvláště v případě infekce více patogeny současně. Příznaky mohou být značně variabilní nebo se nemusí v časných stádiích infekce vyskytovat. Při mikroskopickém vyšetření se hodnotí většinou morfologie konidií či spor, které se vyznačují také určitou mírou variability. Mikroskopická metoda klade obzvláště vysoké nároky na erudici, zkušenosti a taxonomické znalosti fytopatologa. Kultivační techniky zase mohou zvoleným živným médiem preferovat některé druhy patogenů, kterým dané médium lépe vyhovuje a to může být příčina nepřesné diagnózy, navíc je tato metoda časově náročná. S příchodem PCR je postupně v diagnostice patogenů využíváno molekulárních metod. Výhodou je citlivost a přesnost s výsledkem analýzy v relativně krátkém čase. Diagnostiku může teoreticky provádět člověk bez znalostí taxonomie, který pouze zvládá běžnou techniku izolace DNA a PCR.

Podporováno granty NAZV číslo: QH71213 a QH71254

P Plakátová sdělení

DOUBLE STRANDED CONFORMATION POLYMORPHISM ANALYSIS OF PARENTAL SATELLITE REPETITIVE SEQUENCES IN ALLOTETRAPLOID *NICOTIANA ARENTSII*

ROMAN MATYÁŠEK

BFÚ AV ČR v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, CR
E-mail: matyasek@ibp.cz, tel.: +420 541 517 230

Allopolyploidy, defined as interspecific hybridization and genome multiplication, has been considered as a major force in the evolution of angiosperm plants. Newly united genomes undergo a very rapid and in some cases directed process of genome reorganization. *Nicotiana arentsii* is a natural allopolyploid ($2n = 4x = 48$) with ancestors related to *N. undulata* ($2n = 2x = 12$) and *N. wigandioides* ($2n = 2x = 12$). These species are closely related in phylogenetic reconstruction of the genus and belong to section *Undulatae*. Satellite DNA (satDNA) is a species- or genus-specific, nearly universal component of eukaryotic genomes and it consists of numerous head to tail tandemly arranged repeats that are non-coding, late-replicating in S-phase, and mostly located in the constitutive heterochromatin at centromeric and subtelomeric locations. One of the most widespread characteristics of satellite DNA is an intrinsically bent structure. Intrinsic curvature is a sequence-dependent property of the DNA molecule. The high proportion of A-T as well as the existence of clusters of $d(A-T)_{n \geq 3}$ periodically spaced along the DNA molecule with a period close to that of the helical repeat usually leads to curvature of the DNA helix axis, which is characteristic of approximately 50% of satDNAs. These bent sites can be detected by several assays, including electrophoretic mobility, computational analysis, and atomic force microscopy. The tandem repeat NUNSSP, isolated from *N. undulata*, is present at subtelomeric regions of chromosomes of diploid *N. undulata* and *N. wigandioides* although the distribution slightly differs between species. A comparison of the U-genome present in *N. arentsii* with *N. undulata* and W-genome with *N. wigandioides* reveals little change in the distribution patterns of NUNSSP. Neither sequencing nor restriction analysis showed differences in NUNSSP sequences originated from *N. undulata* and *N. wigandioides*. The curvature pattern of satDNA has been studied by examining its mobility in cold non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The fragments with the bending site in the center (*Ssp*I digest in Figure) show the maximum retardation on the polyacrylamide gel compared to fragments where the bending site is at the end (*Bfa*I digest in Figure). Moreover, this double stranded conformation polymorphism analysis (DSCP) showed differences in an average mobility of individual monomeric NUNSSP units originated from *N. undulata* and *N. wigandioides* (Figure). Units in *N. undulata* have higher electrophoretic mobility than those in *N. wigandioides*. Thus units in *N. wigandioides* have more bent structure compared with units in *N. undulata*. In *N. arentsii* the bimodality in electrophoretic mobility of NUNSSP units was observed, indicating that homogenization of parental units have not occurred during evolution of both conformational types of NUNSSP units in common nucleus. Electrophoretic mobility of cloned units correlates with computer analysis of their sequences. The availability of this approach for detection of parental highly related repetitive sequences in other hybrid species is discussed.

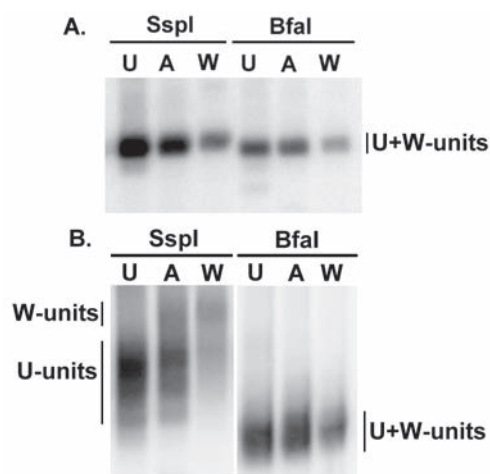


Figure. Genomic DNA of *N. undulata* (U), *N. wigandioides* (W) and *N. arentsii* (A) was digested with indicated restriction endonucleases, separated on 7% (panel A.) or 15% (panel B.) polyacrylamide gels at 50 °C (panel A.) or at 4 °C (panel B) and Southern hybridized to ³²P labeled NUNSSP probe. Note: *Ssp*I digest in lane A on panel B. shows additive (bimodal) distribution of signal compared with lanes U and W. No bimodality is observed after *Bfa*I digestion or on panel A.

Funded by the Grant Agency of the Czech Republic 206/09/1751

P Plakátová sdělení

VLIV EXOGENNÍ ABA NA STRESOVOU ODEZVU RŮZNÝCH ODRŮD JEČMENE HODNOCENOU NA ÚROVNI ZMĚN VE VODIVOSTI PRŮDUCHŮ A EXPRESE DEHYDRINOVÝCH GENŮ

LUCIE MELIŠOVÁ¹, MARIE HRONKOVÁ², MARTINA VAŠKOVÁ² A LUDMILA HOLKOVÁ¹

¹ MZLU AF, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, ČR

² ÚMBR AV ČR, České Budějovice, ČR

E-mail: xmelisov@node.mendelu.cz, tel.: +420 545 133 124

U pěti odrůd jarních ječmenů jsme hodnotili časový nástup a intenzitu reakce rostlin po aplikaci exogenní kyseliny abscisové (ABA). Tento fytohormon se podílí na regulaci vodního režimu rostlin, tím že aktivuje uzavírání průduchů vlivem jejího navázání na vnější povrch plazmalemy svéracích buněk a je zapojen jako signální molekula v jedné ze dvou hlavních indukčních drah (dráha ABA) regulace exprese ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (Zhang et al. 2004).

Hodnocení jsme prováděli u rozdílných genotypů jarního ječmene pěstovaného v hydroponické kultuře za přídavku exogenní ABA a to na úrovni fyziologické a úrovni molekulárně biologické. Odrůdy byly vybrány s ohledem na prokázanou nebo předpokládanou míru odolnosti vůči suchu. Fyziologická úroveň byla posuzována změnami ve vodivosti průduchů metodou IR termografie s použitím IR termovizní kamery (FLIR P660) (Jones, 1999). Metoda hodnotí termální energii emitovanou z povrchu listu. Při stavu otevřených průduchů odpařující se voda ochlazuje list. ABA vyvolá zavření průduchů, zabraňuje tak ztrátám vody, ale zároveň způsobuje zvýšení teploty listu.

Stresovou reakci na molekulární úrovni je možno hodnotit kvantifikací exprese ABAou regulovaných genů *Dhn4*, *Hsdr*, *HVA1* (Mikulková et al. in press, Suprunova et al. 2004, 2007, Rodriguez et al. 2005, Bahieldin et al. 2005) metodou stanovení relativní exprese genů Real Time RT PCR (Pfaffl 2001)

ABA o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l byla formou roztoku přidána po čtrnácti dnech růstu ke kořenům testovaných rostlin a ve stanovených časových intervalech byly prováděny odběry pro expresi genů. Zároveň probíhaly odběry a měření u rostlin kontrolních. Použity byly odrůdy *Malz*, *Amulet*, *Jersey* – české odrůdy (*Hordeum vulgare*) a *Er/Apm*, *Tadmor* – syrské odrůdy (*Hordeum spontaneum*). Odběry byly v termínech – kontrola, 1, 3, 6, 12, 24 hodin a 3, 7 dní po aplikaci ABA. Snímání povrchu listů IR kamerou bylo provedeno 3 hodiny a 7 dní po aplikaci ABA.

U všech odrůd byla zaznamenána reakce na ABA. Vodivost průduchů se snížila, avšak rozdíly mezi odrůdami nebyly vyšší než kolísání vodivosti průduchů závislé pouze na růstové fázi a délce osvětlení u kontrolních ABAou neošetřených rostlin. Nicméně naše výsledky ukazují, že v rámci testovaného souboru odrůd nejcitlivěji reaguje na fytohormon ABA odrůda *Amulet*. Prokazatelně odolnější syrská odrůda *Tadmor* se v zjištěných hodnotách vodivosti průduchů významně nelišila od ostatních odrůd. Tato odrůda zřejmě reaguje na přirozené stresové podmínky (sucho) intenzivnější aktivací ABA nezávislé dráhy (Mikulková et al. in press).

Na úrovni exprese vybraných *Cor/Lea* genů byly v závislosti na době působení kyseliny abscisové hodnoceny genotypově závislé rozdíly, které však jednoznačně neodpovídaly rozdílům ve vodivosti průduchů zjištěných metodou IR termografie. Získané výsledky jsou pouze předběžné a budou dále ověřovány a doplněny.

Bahieldin A., Hesham T. Mahfouza, Hala F. Eissaa, Osama M. Salehc, Ahmed M. Ramadana, Ismail A. Ahmedd,

William E. Dyere, Hanaiya A. El-Itribya and Magdy A. Madkour et al (2005) – Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the *HVA1* gene for drought tolerance, *Physiologia Plantarum* 123: 421–427

Jones H.G. (1999) – Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell and Environment* 22, 1043–1055.

Mikulková P., L. Holková, M. Hronková, M. Klemš, M. Bradáčová (In Press) – Efficiency of differential laboratory methods for selection of drought tolerant barley genotypes, *Suppl Cereal Research Communications* Vol. 37,

Pfaffl M. W. (2001) – A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29(9): E45–E45

Rodriguez E. M., Svensson J.T., Malatrasi C. M., Choi D. W., Close J. T. (2005) – Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression, *Theor Appl Genet* 110: 852–858

Suprunova T., Krugman T., Distelfeld, Fahima T., Nevo E., Korol A. (2007) – Identification of a novel gene (*Hsdr4*) involved in water-stress tolerance in wild barley, *Plant Molecular Biology* Volume 64, Issue 1–2, 17–34

James Z. Zhang*, Robert A. Creelman, and Jian-Kang Zhu, (2004) From Laboratory to Field. Using Information from Arabidopsis to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops, *Plant Physiology*, Vol. 135, pp. 615–621,

Podporováno grantem IG290071a NAZV QH91192

P Plakátová sdělení

ENHANCED *IN VITRO* ACTIVITY OF CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE IN PLANT CRUDE ENZYME PREPARATIONS IN THE PRESENCE OF 2,6-DICHLOROINDOPHENOL (OR OTHER ELECTRON ACCEPTORS) IN THE RADIOISOTOPE ASSAY

VÁCLAV MOTYKA¹, BLANKA SÝKOROVÁ¹, SILVIA GAJDOŠOVÁ^{1,2}, EVA ŽIŽKOVÁ^{1,2}, PETRE I. DOBREV¹, MIROSLAV KAMÍNEK¹

¹ Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 263, CZ-165 02 Prague 6, Czech Republic

² Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 2, CZ-128 44 Prague 2, Czech Republic

E-mail: vmotyka@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 437

Cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX, EC 1.4.3.18/1.5.99.12) is the key enzyme catalyzing cytokinin degradation in plants. The CKX activity in plant samples can be measured *in vitro* by either radioisotope or spectrophotometric methods. Rather low sensitivity and reliability of CKX spectrophotometric analyses compared to radioisotope ones was repeatedly reported to be improved by introducing various electron acceptors such as 2,6-dichloroindophenol (DPIP) to the reaction solution (Galuszka *et al.* 2001, Frébort *et al.* 2002). However, the DPIP spectrophotometric assay requires sufficiently purified enzyme preparations (Laskey *et al.* 2003), which makes the procedure time consuming and could cause partial losses of CKX activity.

We report here modification of CKX radioisotope method by introducing DPIP or other artificial electron acceptors to the assay mixture and its applicability for determining the CKX activity in crude plant extracts. For crude enzyme preparations from pea (*Pisum sativum* L. cv. Gotik) leaves as well as other plant species and tissues, a significant increase in the sensitivity of the radioisotope assay (ca. 20- to 50-fold) has been demonstrated by introducing DPIP, Toluidine Blue O or phenazine methosulfate to the reaction solution. The *in vitro* degradation of the substrate cytokinin [³H]N⁶-(2-isopentenyl)adenine ([³H]iP) to [³H]adenine by the pea leaf enzyme proceeded in the presence of DPIP in a time-dependent manner with optimal conversion (20–40 %) after 30 to 70 min incubation. The highest stimulatory effect of DPIP on the CKX activity from pea leaves was achieved at 90 μM concentration. The analysis of pH dependence of CKX revealed no shifts in the pH optima of the enzyme (pH 8.5–9.0) in response to DPIP. Optimized and automatized HPLC procedure provided fast and reliable separation of the radiolabelled substrate [³H]iP from the product of the CKX catalyzed reaction proceeding in the presence of DPIP.

The elevated sensitivity of the improved CKX radioisotope assay allows easy and reliable detection of the enzyme activity even in crude extracts from various plant materials. Moreover, the described DPIP-sensitized CKX assay is highly specific and, in contrast to spectrophotometric analyses, enables determination of degradation of substrate cytokinins at concentrations (2 μM) close to the enzyme *K_m* values (*K_m* for iP 2.8 μM, Bilyeu *et al.* 2001) corresponding to the actual contents of cytokinins in plants.

Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O. : 2001 – Plant Physiol. 125: 378-386

Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T., Schmulling T., Peč P.: 2002 – Anal. Biochem. 306: 1-7

Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P.: 2001 – Eur. J. Biochem. 268: 450-461

Laskey J.G., Patterson P., Bilyeu K.D., Morris R.O.: 2003 – Plant Growth Regul. 40: 189-196.

Supported by grants from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAA600380701) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LC 06034, 1M06030).

P Plakátová sdělení

ANALÝZA DÉLKY TELOMER U MUTANTŮ CAF1 *ARABIDOPSIS THALIANA*

Iva MOZGOVÁ¹, Jiří FAJKUS^{1,2}

¹ OFGP, ÚEB, Masarykova univerzita, CZ-62500 Brno, ČR

² BFU, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, ČR

E-mail: iva.mozgova@gmail.com, tel.: +420 549 495 281

CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) je H3/H4 histonový chaperon zodpovědný za sestavování nukleozomů v návaznosti na replikaci DNA. U rostlin se CAF1 skládá ze tří podjednotek – FAS1 (FASCIATA 1), FAS2 (FASCIATA 2) a MSI1 (MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1). Mutace v genech *fas1* a *fas2* rostlin mají za následek narušení struktury apikálních meristémů, změnu regulace endoreduplikace, zpomalení buněčného cyklu, rozvolnění heterochromatinu a zvýšenou míru homologní rekombinace.

Naše práce je zaměřena na porovnání délek telomer u rostlin divokého typu a rostlin *fas1*^{-/-} a *fas2*^{-/-} pomocí metod TRF (Terminal Restriction Fragments) a PETRA (Primer Extension Telomere Repeat Amplification), které budou prezentovány. Zatímco metoda TRF umožňuje pouze analýzu délek všech telomer, metoda PETRA, která je založená na PCR, umožňuje analyzovat délku telomer na jednotlivých chromozomálních raménkách. Z výsledků vyplývá, že u postupujících generací mutantních rostlin dochází ke zkrácení telomer o několik set bp z původní délky 3 kb na výslednou délku 1,5–2 kb, která se stabilizuje ve 3.–5. generaci.

Práce je financovaná ze těchto zdrojů: GAČR (204/08/H054), MŠMT (MSM0021622415, LC06004), AV ČR (AVOZ50040507, AVOZ50040702) a Program rektora MU (MUNI/g/0104/2009).

MAPPING OF MITOCHONDRIAL *ATP1* mRNA TERMINI IN *SILENE VULGARIS* BY PRIMER EXTENSION AND RNA LIGATION

KAREL MÜLLER, HELENA ŠTORCHOVÁ

Institute of Experimental Botany, Academy of Science of Czech Republic

E-mail: muller@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 420

Mitochondrial genomes of seed plants belong to the largest ones investigated so far. However, they encode only small set of genes. Transcription of mitochondrial genes frequently starts from several promoters, which generates multiple precursor RNAs. They are subsequently processed in various ways. Complexity of processing events contributes to the regulation of mitochondrial gene expression.

Northern hybridization using probes specific to several mitochondrial genes revealed high diversity of *atp1* transcription profiles in *S. vulgaris* plants collected in Europe, Asia and North America. We chose the plant with a single major *atp1* transcript and performed RNA circularisation followed by reverse transcription as primary approach to map its 5' and 3' transcript ends. Products of inverse PCR were cloned and sequenced. We obtained sequence of full *atp1* mRNA which length matched exactly to the transcript visualised by Northern blot.

Primer extension was performed using non-radioactively labelled primer and Alf2 sequencer. Multiple peaks corresponding to variable transcription starts were obtained for silene haplotypes with more than one band visualised by Northern blot.

Although yet preliminary, our results suggest enormous variation in the *atp1* gene transcription at within-species and also even within-individual level in *S. vulgaris*.

Financial support was provided through the grant MŠMT LC06004.

P Plakátová sdělení

POUŽITÍ GENOVÝCH SEKVENCÍ PRO OBJASNĚNÍ FYLOGENETICKÝCH VZTAHŮ V RÁMCI ČELEDI MUSACEAE

PAVLA NĚMCOVÁ, MIROSLAV VALÁRIK, EVA HŘIBOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR v. v. i., Sokolovská 6, 77200 Olomouc, ČR

E-mail: nemcova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 860

Banánovník (*Musa* spp., čeleď *Musaceae*) patří mezi nejvýznamnější plodiny světa, jako důležitý zdroj obživy mnoha obyvatel zejména v rozvojových zemích a také jako významná vývozní komodita. Navzdory svému společenskému a ekonomickému významu však doposud nebyly plně vysvětleny a popsány fylogenetické vztahy v rámci čeledi *Musaceae* a rovněž zůstává nedořešena otázka klasifikace a charakterizace jednotlivých druhů a poddruhů této čeledi. Různí autoři se ve svých studiích s větším či menším úspěchem zabývali použitím rozličných typů molekulárních markerů pro objasnění fylogeneze banánovníku, nicméně celkový a podrobný přehled zatím nebyl získán. Jedna z možností, která dosud u *Musaceae* nebyla použita, je srovnání sekvencí DNA odvozených z genů s jedinou kopií v genomu pro různé druhy banánovníku. Touto cestou je možné velmi detailně porovnat oblasti s homologními úseky mezi jednotlivými genomy, což by při použití sekvencí s vysokým počtem kopií nebylo možné. Vývoj takového typu markerů byl v této práci proveden podle následující strategie. Databáze dostupných sekvencí EST z čeledi *Musaceae* byla srovnána s genomovou sekvencí rýže, která je pro banánovník nejbližší příbuznou rostlinou se sekvenovaným genomem. Byly vybrány ty EST sekvence, které vykazovaly vysokou homologii k jedinému lokusu v genomu rýže a výskyt intronů v rámci tohoto lokusu, pro zvýšení pravděpodobnosti výskytu druhově specifických mutací v odvozených markerech. Jako počáteční záměr bylo stanoveno získat alespoň jeden kandidátní gen pro každé z ramen rýžových chromozómů, tak aby byla zajištěna co nejvyšší míra pravděpodobnosti náhodné distribuce kandidátních genů v genomu banánovníku. Následně bylo v první fázi projektu vybráno 13 zástupců z čeledi *Musaceae*, tak aby co nejlépe reprezentovali diverzitu v rámci čeledi a jeden outgroup, druh *Strelitzia nicolai* z příbuzné čeledi *Strelitziaceae*. Soubor kandidátních genů byl po amplifikaci z genomové DNA vybraných druhů sekvenován. Analýza získaných sekvencí a fylogenetická analýza potvrdily monofyletický původ rodu *Musa*. Dále byla jasně potvrzena blízká příbuznost sekce *Eumusa* a *Rhodochlamys*, stejně jako blízký evoluční původ sekcí *Australimusa* a *Callimusa*, což je v souladu s předešlými zjištěními. V rámci sekce *Eumusa* je navíc patrná samostatná evoluční větev tvořená zástupci A genomu banánovníku, jasně separovaná od zástupců B genomu. Dokončení analýzy by mělo vést k datování divergence jednotlivých rodů čeledi *Musaceae* a sekcí rodu *Musa*. Předpokládáme, že další detailní analýza sekvenčních dat z většího množství genů a rozšíření studie o další druhy poskytne podrobný obraz fylogeneze čeledi *Musaceae* a cenný zdroj markerů pro charakterizaci jednotlivých druhů banánovníku.

Tato práce byla podpořena grantem IAA600380703 Grantové Agentury České republiky.

P Plakátová sdělení

APLIKACE 5-AZACYTIDINU UMOŽŇUJE *DE NOVO* REGENRACI ROSTLIN BRAMBORU S OBNOVENOU EXPRESÍ UMLČENÝCH TRANSGENŮ

EVA NOCAROVÁ A LUKÁŠ FISCHER

Katedra fyziologie rostlin PřFUK v Praze, Viničná 5, Praha 2, 128 44, ČR
E-mail: evanocarova@seznam.cz, tel.: +420 221 951 707

Modifikace genetické informace transgenozí patří mezi základní přístupy rostlinné biologie mající široký potenciál v aplikované vědě. Vnesení cizorodých genů je však často doprovázeno umlčováním jejich exprese. U rostlin je umlčování transgenů na transkripční úrovni zpravidla spojováno s metylací DNA. Exprese takto umlčených genů může být obnovena na buněčné úrovni aplikací inhibitorů DNA metylace.

5-azacytidin (demetylační agens) byl použit k obnovení exprese dvou reportérových genů (zeleného fluorescenčního proteinu, *GFP* a neomycin fosfotransferázy, *NPTII*) u rostlin transgenního bramboru (*Solanum tuberosum*) a buněk tabáku BY-2 (*Nicotiana tabacum*).

Analýzou vlivu různých koncentrací 5-azacytidinu na růst *in vitro* rostlin bramboru byl stanoven poločas rozpadu 5-azacytidinu v kultivačním médiu. Následně byla nalezena jeho optimální koncentrace a podmínky pro reaktivaci transgenů v buňkách u obou experimentálních modelů. Kombinací postupu *de novo* regenerace a přechodného ošetření 5-azacytidinem byl optimalizován postup získání rostlin bramboru s transientně nebo stabilně obnovenou expresí transgenů.

Jelikož regenerované rostliny nevykazovaly žádné viditelné fenotypové změny, tento postup může být použit nejen k analýzám mechanismu umlčování transgenů, ale také k obnovení exprese umlčených transgenů u geneticky cenného rostlinného materiálu.

Podporováno projektem COST 843.30 – *Explantátové kultury bramboru a výzkumným centrem (MŠMT) LC06004 – Integrovaný výzkum rostlinného genomu.*

P Plakátová sdělení

TOWARDS FINE MAPPING OF THE *QFT.CRI-3B.1* QTL IN WHEAT USING NEW GENIC MARKERS

ZBYNĚK MILEC¹, SIMON GRIFFITHS², JOHN SNAPE², KATEŘINA PÁNKOVÁ¹

¹ Crop Research Institute, Drnovská 507, Prague 6, CZ-161 06, Czech Republic

² John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK

E-mail: k.pankova@vurv.cz, tel.: +420 233 022 331

Exploiting variation for genes controlling differences in flowering time is the main way in which wheat (*T. aestivum* L.) can be adapted to different environmental conditions. Genes of small effect, commonly referred to as earliness *per se* genes, can be used for the “fine-tuning” of flowering time. A recent study (Pankova *et al.*, 2008) identified the effect of such a QTL, *QFt.CRI-3B.1* on chromosome 3B in the Czech wheat alternative variety Ceska Presivka. This flowering time QTL was mapped on the long arm of 3B distal to marker *Xbarc164* in two populations of recombinant substitution lines (RSL) from crosses of Sandra × Sandra (CP3B) and Zlatka × Zlatka (CP3B). To narrow the QTL region for fine mapping, near isogenic lines are being produced and new Conserved Orthologous Sequence (COS) markers are being designed from ESTs located within the region. To date, forty -nine COS marker primers have been designed and screened for polymorphism using the parental varieties Zlatka, Sandra and CP. Unfortunately, none of these markers were polymorphic between these related parents. Nevertheless other mapping populations could be used to map some of these markers – doubled haploid (DH) populations for the UK wheat varieties Spark × Rialto, Charger × Badger, Avalon × Cadenza, and the ITMI RIL population, Opata × Synthetic.

To date, 3 out of 49 markers were polymorphic and mapped. Two of them (cos24 and cos30) were mapped in the Opata × Synthetic population and were distal to *Xbarc164*, and one was proximal to *Xbarc164* in the Avalon × Cadenza population. These markers will be used as anchor points for designing new COS markers using rice chromosome 1 sequence for the target parents.

Podporováno grantem MŠMT VSGM9 a MZe ČR 0002700602.

P Plakátová sdělení

PRE-SYMPTOMATIC DETECTION OF *PLASMOPARA VITICOLA* INFECTION IN GRAPEVINE LEAVES USING CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IMAGING

JULIE OLEJNÍČKOVÁ^{1,2}, LADISLAV CSÉFALVAY^{1,2}, GABRIELE DI GASPERO^{3,4}, KAREL MATOUŠ^{1,2}, DIANA BELLIN³,
BENEDETTO RUPERTI^{3,5}

¹ Laboratory of Physiology and Ecology, Department of Biological Dynamics, Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Zámek 136, CZ-37333 Nové Hradky

² Department of Systems Biology, Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Zámek 136, CZ-37333 Nové Hradky

³ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, University of Udine, via delle Scienze 208, 33100 Udine, Italy

⁴ Istituto di Genomica Applicata, Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli, via Jacopo Linussio 51, 33100 Udine, Italy Present Address:

⁵ Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, University of Padua, viale dell'Università 16, Legnaro, 35122 Padua, Italy

E-mail: olejnickova@greentech.cz, tel.: 775 961 972

Plasmopara viticola is an economically important pathogen of grapevine. Our study aimed to determine whether chlorophyll fluorescence (Chl-F) imaging can be used to reveal early stages of *P. viticola* infection under conditions similar to those occurring in field, in vineyards. Maximum (F_v/F_m) and effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) were identified as the most sensitive reporters of the infection. Heterogeneous distribution of F_v/F_m and Φ_{PSII} in artificially inoculated leaves was associated with the presence of the developing mycelium three days before the occurrence of visible symptoms and five days before the release of spores. Significant changes of F_v/F_m and Φ_{PSII} were spatially coincident with localised spots of inoculation across the leaf, where the photosynthesis was impaired by the pathogen attack.

Because *P. viticola* does not expand systemically in the host tissues and the effects of infection are localised, Chl-F imaging at high resolution is necessary to reveal the disease in the field.

P Plakátová sdělení

CESTRUM (KLADIVNÍK) – ZÁSTUPCE DVOUDĚLOŽNÝCH ROSTLIN S NEOBVYKLÝMI TELOMERAMI

VRATISLAV PEŠKA^{1,2}, EVA SÝKOROVÁ^{1,2}, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i.

² Oddělení FGP, Ústav experimentální biologie, PřF MU

E-mail: vpeska@sci.muni.cz, tel.: 739 439 215

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy, které (i) tvoří fyzické konce chromozomů (ii) zabraňují koncovým chromozomálním fúzím (iii) ve spolupráci s telomerázou kompenzují efekt nedokončené syntézy chromozomálních konců v důsledku semi-konzervativní replikace DNA u lineárních eukaryotických genomů. Minisatelitní sekvence T(x)A(y)G(z) je konzervována na koncích chromozomů napříč eukaryotickou fylogenezí a zdá se tedy, že je ancestrálním telomerickým motivem. Známe několik výjimek z tohoto pravidla: například kvasinky vykazují značnou variabilitu v telomerické sekvenci; telomerický aparát byl v evoluci od základu změněn u modelového organismu *Drosophila* a funguje na principu retrotranspozonové DNA HeT-A a TART elementů; mezi rostlinami jsou odpadlíky od telomerázového dogmatu zástupci rodu *Allium* u jednoděložných a u dvouděložných jsou to blízké příbuzné rody *Cestrum*, *Vestia* a *Sessea*. Pokusili jsme si odpovědět na otázku, jak telomerické proteiny zareagovaly na ztrátu telomerázové aktivity a vymizení typické telomerické sekvence z konců chromozomů. Zaměřili jsme se na proteiny asociované s ancestrálním typem telomer: (a) Myb-like dsDNA-vazebné teloboxové proteiny (b) ssDNA-vazebné OB-fold POT1-like proteiny. Biochemický skrínink jaderných proteinových extraktů pomocí EMSA (retardační analýza s radioaktivně značeným telomerickým hexametrem) a přístupy reverzní genetiky (RT-PCR, klonování) ukázaly, že oba typy proteinů jsou nadále přítomny v proteomu *Cestrum parqui*. Přítomnost a exprese těchto proteinů znamená, že se adaptovaly na změněnou telomerickou sekvenci a pokračují ve své roli na telomeře a/nebo jsou esenciální pro další netelomerické buněčné procesy. Další možnost souvisí s hypotézou, že většina dnešních telomerických proteinů byla pravděpodobně rekrutována telomerovým systémem při jeho invazi do pretelomerázového světa.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou AV ČR (IAA600040505; IAA500040801), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM0021622415, LC06004) a institucionální podporou (AV0Z50040507, AV0Z50040702).

P Plakátová sdělení

IN SILICO ANALYSIS OF LIPID KINASES

ROMAN PLESKOT¹, VIKTOR ŽÁRSKÝ^{1, 2} & MARTIN POTOCKÝ¹

¹ Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 263, 165 02 Prague 6, Czech Republic

² Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

E-mail: pleskot@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 457

Phosphatidic acid, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate are important signalling lipids for the eukaryotic cell. These molecules are produced by related enzymes, members of lipid kinase family. However, no comprehensive study about origin and evolution of lipid kinase gene family has been done yet. We therefore performed phylogenetic and motif analysis of this family in 52 eukaryotic genomes with special interest to plants. To obtain a broader insight into the origin of lipid kinase family we also searched for lipid kinases in eubacteria and archaeobacteria. The main signature of this family is diacylglycerol kinase catalytic motif (Pfam00781, Smart DAGKc). Diacylglycerol kinases (DGKs) contain so-called diacylglycerol kinase accessory domain (Pfam00609, Smart DAGKa), but at least weak homology to this domain can be found in the other members of lipid kinase family. Apart from these signatures, some DGKs, particularly in streptophyta and unikonta group further have extra regulatory domains, e.g. C1 domain, EF-hand. On the basis of our phylogenetic analysis, we speculate that the last common ancestor of eukaryotes already had separated DGK and sphingosine/ceramide kinase subfamily. Many duplications and secondary losses occurred during the evolution of the lipid kinase family, e.g. fungi lost DGK subfamily and replaced it by the enzyme with CTP transferase domain. Streptophyta and *Trichomonas vaginalis* have specific lipid kinases, which resemble bacterial enzymes. Our analysis suggests that the presence of this groups is probably result of two independent horizontal gene transfers. We also constructed model of the catalytic core of the members of different plant lipid kinase subfamilies in an effort to uncover similarities in the reaction mechanism and the membrane docking with their bacterial homologs with known 3D structures.

Financial support from grants IAA601110916 and LC06034 is acknowledged.

P Plakátová sdělení

CHIMERIC PLANT VIRUSES AS TOOLS FOR PEPTIDE DISPLAY AND EXPERIMENTAL VACCINE DEVELOPMENT

HELENA PLCHOVÁ, NOEMI ČEŘOVSKÁ, TOMÁŠ MORAVEC, HANA HOFFMEISTEROVÁ

ÚEB AV ČR, v.v.i., Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6, ČR
E-mail: plchova@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 320 338

Plants offer several advantages for the production of vaccine antigens and other therapeutic proteins, including lack of contamination with animal pathogens, relative ease of genetic manipulation, eukaryotic protein modification machinery, and economical production. Whereas generation of stable transgenic plant lines is very time consuming, labor intensive, expensive and difficult process and the level of antigenic protein produced by transgenic plants is relatively low, viral vectors allow rapid and high-level transient expression of proteins in whole plants.

Recent studies have shown that plants and plant viruses can be used for antigen production and delivery. Coat proteins (CPs) of different plant viruses are permissive to genetic modifications in which foreign peptides are inserted in surface-exposed loops or at their N or C termini. These genetically altered plant viruses usually propagate at the same level as wild-type viruses, producing high quantities of chimeric proteins. Virus coat proteins function as carrier molecules for fused antigenic peptides. Such carrier proteins may have the potential to self-assemble and form recombinant virus like particles (VLPs) displaying the desired antigenic epitopes on their surfaces. Such chimeric VLPs exposing foreign epitopes possessing antigenic determinant used as vaccines often induce immune responses. A commonly used carrier molecule is the CP of viruses that infect bacteria, animals and plants.

We used the CP of Potato virus X (PVX) and fused its N or C terminus to L2 epitope (amino acids 21–32 or 108–120), E7 epitope (amino acids 44–60) and to whole protein E7 of human papillomavirus (HPV) type 16. Virus particles formed from the chimeric PVX CP were purified from the infected plant tissue and used to immunize mice resulting in an antigen specific humoral immune response, with virus-neutralizing antibodies.

This research was supported by the grant No. 521/09/1525 of the Czech Science Foundation.

P Plakátová sdělení

STUDIUM STRESOVÉ ODPOVĚDI ROSTLIN NA ÚROVNI PROTEOMU POMOCÍ 2D-PAGE (MOŽNOSTI A ÚSKALÍ)

RADKA PODLIPNÁ, ZUZANA VAVŘÍKOVÁ, JITKA OSTRÁKOVÁ A TOMÁŠ VANĚK

Společná laboratoř ÚEB AV ČR v. v. i. A VÚRV v. v. i., Rozvojová 263, Praha 6
E-mail: podlipna@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 022 21

Pro hodnocení genové exprese na úrovni proteinů ve velkém měřítku se nejvíce používají metody dvourozměrná polyakrylamidová elektroforéza (2-D PAGE) a kapalinová chromatografie, které se kombinují s hmotnostní spektrometrií (MS). Během 2-D PAGE se proteiny v komplexní směsi separují v polyakrylamidovém gelu na základě svého náboje (izoelektrického bodu) při izoelektrické fokusaci (IEF) a poté dle své molekulové hmotnosti při PAGE v přítomnosti záporně nabitého detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS). Po analýze získaných 2-D map jsou vybrané proteiny naštěpeny vhodným enzymem na peptidy. Hmotnosti peptidů (MS), případně jejich sekvence aminokyselin, umožňuje přiřadit původní protein k odpovídajícímu genu v databázi. Alternativní proteomickou metodou je značení proteinů z různých vzorků specifickými značícími molekulami (izotopově kódované afinitní značky, ICAT; isobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci, iTRAQ), následné štěpení proteinů na peptidy a jejich separace pomocí LC. Pro konečnou kvantifikaci a identifikaci peptidů daných bílkovin se využívá tandemová MS (Pandey and Mann, 2000, Cullis, 2004, Joyce and Palsson, 2006, Šamaj and Thelen, 2007).

Používané metody tvoří zpravidla velké množství dat, jejichž uchování, následná analýza a interpretace jsou obtížné. Navíc je zde větší nebezpečí výskytu artefaktů, ať už při tvorbě nebo analýze výsledků.

I přes tyto částečné nevýhody jsou tyto metody hojně využívány pro sledování změn genové exprese ve vzorku po působení podnětu, např. abiotického stresu. Umožňují celkem efektivně nalézt geny, proteiny a biochemické dráhy tvořící odpověď organismu, jelikož není třeba hledání předem omezit na vybrané kandidáty (Lockhart and Winzeler, 2000, Joyce and Palsson, 2006).

CULLIS, C. A. 2004. Plant Genomics and Proteomics. New Jersey (USA), Canada: Wiley.

JOYCE, A. R. & PALSSON, B. O. 2006. The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 198-210.

LOCKHART, D. J. & WINZELER, E. A. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405, 827-836.

PANDEY, A. & MANN, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405, 837-846.

ŠAMAJ, J. & THELEN, J. J. 2007. Plant Proteomics. Berlin, Heidelberg: Springer

Poděkování:

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT 2B06187 a 2B08058.

P Plakátová sdělení

STANOVENÍ TVRDOSTI ZRNA U ČESKOSLOVENSKÝCH ODRŮD PŠENICE SETÉ (*T. AESTIVUM*) PROSTŘEDNICTVÍM MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ

MILAN POUCH, KATEŘINA VACULOVÁ, JARMILA MILOTOVÁ

Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, ČR
E-mail: milpouch@centrum.cz, tel.: +420 573 317 113

Tvrdość zrna je jakostním ukazatelem, významným z hlediska predikce konečného užití zrna pšenice seté (*T. aestivum*). Radíme ji mezi parametry, které například určují, zda je daná odrůda vhodná pro pekárenské či pečivářenské využití. Tento znak je kódován lokusem *Hardness* na chromozómu 5DS, ve kterém jsou lokalizovány geny *Puroindoline a* (*Pina-D1*) a *Puroindoline b* (*Pinb-D1*). Pšenice s měkkým zrnem mají standardní alely v obou puroindolinových genech (*Pina-D1a/Pinb-D1a*), naopak pšenice s tvrdým zrnem nesou mutaci v jednom či obou genech.

V dané práci byla hodnocena genetická i fenotypová variabilita tvrdosti zrna u souboru 113 odrůd ozimé pšenice seté, vyšlechtěných a pěstovaných na území bývalého Československa.

Haplotyp vybraných odrůd byl stanoven prostřednictvím CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), dCAPS (derived CAPS) a STS (Sequence-Tagged Site) markerů alelově specifických k *Pin* genům v kombinaci se sekvenováním kódujících oblastí těchto genů. Tvrdość zrna byla měřena metodou SKCS (Single Kernel Characterization System).

Z celkového počtu 113 odrůd mělo 43 měkké zrna a zároveň haplotyp *Pina-D1a/Pinb-D1a*, zatímco u 70 pšenic s tvrdým zrnem byly zjištěny mutantní alely v *Pin* genech. Mezi tvrdými pšenicemi převládal haplotyp *Pina-D1a/Pinb-D1b* (57 odrůd), ostatní haplotypy byly zastoupeny pouze okrajově: *Pina-D1a/Pinb-D1c* (1), *Pina-D1a/Pinb-D1d* (2) a *Pina-D1b/Pinb-D1a* (1). Devět odrůd bylo heterogenních, a to pouze v *Pinb-D1* genu. U všech těchto materiálů byla detekována současná přítomnost alel *Pinb-D1a* a *Pinb-D1b*.

Zastoupení mutací v *Pinb-D1* genu u studovaných československých odrůd korespondovalo s výsledky analýz provedených metodou pyrosekvenování na evropských odrůdách pšenice (Huang a Roder, 2005), avšak frekvence jednotlivých alel se lišily v závislosti na zemi původu testovaných odrůd.

Prezentovaná metodika může být využita ke studiu odrůd či genových zdrojů a lze ji aplikovat i ve šlechtitelské praxi při selekci na tvrdost zrna prostřednictvím molekulárních markerů (Molecular Marker Assisted Selection).

Huang X.Q. a Roder M.S.: 2005 – J Agric Food Chem, 53: 2070-2075

Podporováno projekty MZe č. QH72251 a „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity“.

P Plakátová sdělení

INOVOVANÁ METODIKA TEKUTÝCH ŽIVNÝCH PŮD PRO TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ LÁTEK (*IN VITRO*)

DAGMAR POUVOVÁ^{1,2}, BLANKA KOKOŠKOVÁ², PAVEL RYŠÁNEK¹

¹ Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát

² Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně

E-mail: pouvova@af.czu.cz, tel.: 736 434 618

Hledání nových antimikrobiálních látek (*in vitro*), které by byly využitelné v boji proti bakteriálním patogenům, má dlouhou historii vývoje. Zahrnuje metody na pevných půdách, ale i v tekutých živných médiích. Nejběžnější metodou, která je často využívána pro účely antibakteriálních studií, je metoda testování na pevných živných půdách. Principem této metody je aplikace antibakteriálního agens na povrch pevných půd kontaminovaných vybranou bakterií. Po několikadenním růstu bakterií je změřen průměr inhibičních zón, které se objeví v místech aplikace látky, je-li účinná. Testování účinnosti látek v tekutých médiích je využíváno méně. Tato metoda využívá kultivačních zkumavek, které obsahují tekuté médium s bakterií o známé počáteční koncentraci, která je proměřována na spektrofotometru. Důvody nižší frekvence používání této metody spočívají v řadě nejasností, které jsou s touto metodou spojené a zároveň v náročnosti jejího provedení. Tento způsob testování nevypovídá nic o tom, jsou-li testované bakteriální buňky v médiu živé ani jaký je jejich počet.

Cílem naší práce bylo tyto nedostatky vyjasnit a zjednodušit metodu tak, aby podávala komplexnější informace o antibakteriálních účincích zkoumaných látek. Hlavním inovačním krokem, který jsme v rámci našeho testování zavedli, bylo využití ELISA destiček místo kultivačních zkumavek. Organismem testovaným v této práci byl *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), který způsobuje bakteriální vadnutí u rajčat. Bakteriální inokulum v tekutém médiu (Sniezko a Bonde, 1943) bylo připraveno v koncentraci $OD_{620} \sim 0,1$ a použito ve všech testech. Byly použity 2 kontrolní ELISA destičky, a to jedna pouze s tekutým médiem a druhá s bakteriálním inokulem, kde byl sledován růst bakterie v přirozeném prostředí. Do dalších dvou ELISA destiček byly k inokulu přidány antibakteriální látky, a to streptomycin (0,02 %) do jedné a Kuprikol (0,5 %) do druhé v následujících objemech 1, 3, 5, 10, 20 a 30 μ l. Každá varianta objemu měla tedy 16 opakování. Celkový objem v každé jamce destičky činil 200 μ l. Koncentrace bakterií v ELISA destičkách byla proměřována 2x denně po dobu 4 dnů na ELISA readru. Pátý den od založení byly provedeny roztěry na pevná média, aby byla ověřena životnost bakterií. Z vybraných jamek bylo od každé varianty odpipetováno 20 μ l a byl proveden roztěr na pevné médium. Narostlé kolonie byly odečteny 4 den od založení. Pokud byla koncentrace bakterií příliš vysoká, bylo provedeno desetinné ředění tak, aby bylo možné kvantifikovat výsledek počtem kolonií na misce. Tato metoda prokázala zajímavé výsledky, kde bylo možné sledovat vliv testované látky přímo na růst bakteriální populace v každé jamce, což metoda pevných půd neumožňuje. Další nespornou výhodou bylo ověření životnosti bakteriálních buněk na pevných médiích. Inovace metody za využití ELISA destiček se ukázala být jednodušší a efektivnější oproti testování v kultivačních zkumavkách, neboť takto bylo možno jednoduchým způsobem otestovat antibakteriální látky v širokém rozsahu dávek s větším počtem opakování. Metodika testování v ELISA destičkách by mohla nalézt široké uplatnění v řadě laboratoří, nicméně je ještě potřeba provést testy s jinými druhy bakterií, abychom získali podrobnější informace.

Práce byla sepsána za podpory MZe ČR, projekt číslo QH71229 a Ministerstva školství, projekt číslo MSM6046070901.

P Plakátová sdělení

POZIČNÍ KLONOVÁNÍ GENU PRO REZISTENCI K MŠICI ZHOUBNÉ (DIURAPHIS NOXIA)

HEDA ROBERT-QUATRE¹, NORA L. V. LAPITAN², MIROSLAV VALÁRIK¹, HELENA STAŇKOVÁ¹, JAN ŠAFÁŘ¹,
MINGCHENG LUO³, JAROSLAV DOLEŽEL¹, HANA ŠIMKOVÁ¹

¹ Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Sokolovská 6, CZ-772 00 Olomouc, Czech Republic

² Department of Soil and Crop Sciences, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80524, USA

³ Department of Plant Sciences, University of Carolina, One Shields Ave., Davis, CA 95616-8780, USA
E-mail: robert-quatre@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 860

Poziční klonování představuje experimentální postup vedoucí k izolaci neznámého genu založený na znalosti jeho polohy v genomu. Prvním krokem je vývoj vysokohustotní genetické mapy pokrývající daný lokus. Fyzická mapa může být zkonstruována po identifikaci markerů v blízkosti studovaného genu (ve vzdálenosti do 2 cM) (Keller et al., 2005). Fyzická mapa vzniká uspořádáním klonů DNA z knihovny s dlouhými inzerty (většinou BAC knihovny) do kontigů na základě fingerprintingu (Luo et al., 2003). Krátké vzdálenosti mohou být překlenuty metodou „chromosome walking“. Molekulární markery jsou mapovány v blízkosti lokusu kontrolujícího fenotyp a následně jsou použity k izolaci BAC klonů, které jsou subklonovány a sekvenovány. Takto se získají kandidátní sekvence DNA. Daný gen se potvrdí pomocí transformace kandidátní sekvence DNA do mutantního popř. wild-type lokusu nebo opakovaným sekvenováním mnoha alel v jednom lokusu a stanovením silné korelace mezi mutantním fenotypem a změnou v molekule DNA.

Mšice zhoubná (*D. noxia*) je významným škůdcem pšenice a ječmene, který se globálně rozšiřuje a od roku 1900 způsobil ztráty v hodnotě přibližně 1 bilion dolarů. V Severní Americe působí tato mšice o téměř 50% nižší úrodu pšenice a ječmene. Mšice zhoubná se rozšířila i v České republice (Starý et al., 2000). Jedním z nejúčinnějších způsobů ochrany obilí je vnášení genů pro rezistenci do zemědělsky používaných kultivarů. Bylo identifikováno několik rezistentních linií pšenice, mezi nimi i CI2401. Tato linie nese na krátkém rameni chromozomu 7D gen rezistence *Dn_{CI2401}*. Cílem naší práce je izolovat tento gen metodou pozičního klonování. V první fázi jsme se zaměřili na zahuštění genetické mapy v okolí genu. Zamapovali jsme několik mikrosatelitních markerů do okolí genu. Nejbližší markery *cf68* a *gwm473* ohraničují úsek chromozomu 7D dlouhý 3,2 cM.

Z natříděných chromozomových ramen 7DS byla zkonstruována BAC knihovna. Tato knihovna čítá 49 152 klonů o průměrné délce 112 kb. Pokrytí ramene chromozomu 7D je 12,2x. Na bázi fingerprintingu BAC klonů byly sestaveny přilehlé, částečně se překrývající sekvence BAC klonů (kontigy). Ke skrínování knihovny pomocí PCR byly vytvořeny 3D pooly. Knihovna byla skrínována markery *cf68* a *gwm473* a byly identifikovány BAC klony s těmito markery. Byly sestaveny kontigy s pozitivními BAC klony. Naše úsilí spěje k překlenutí regionu s *Dn_{CI2401}* genem jediným kontigem.

Keller, B., Feuillet, C., Yahiaoui, N.: Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a superset genome. – Genet. Res. Camb. 85: 93-100, 2005.

Luo, M.C., Thomas, C., You, F.M. et al.: High-throughput fingerprinting of bacterial chromosomes using the SNaPshot labeling kit and sizing of restriction fragments by capillary electrophoresis. – Genomics 82: 378-389, 2003.

Starý, P., Lukášová, H.: Increase of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) in hot and dry weather (Hom., Aphididae). – Anzeiger für Schädlingkunde-J. Pest Sci. 75: 6-10, 2000.

Podporováno grantem GA ČR 521/07/1573.

P Plakátová sdělení

DIGITÁLNÍ ZPRACOVÁNÍ OBRAZU V GENETICKÝCH KOLEKČÍCH PLODIN

SMÝKALOVÁ IVA, VINKLÁRKOVÁ PETRA

Agritec Plant Research Ltd., Zemědělská 16, Šumperk, Česká republika
E-mail: smykalova@agritec.cz, tel.: +420 583 382 120

Proces digitalizace obrazu dal základ metodě, digitální obrazová analýza (DOA), která je stále více uplatňována v nejrůznějších odvětvích aplikované vědy i v praxi. Metoda je založena na pořízení kvalitního digitálního snímku digitální kamerou a nově i skenerem, snímek je uložen a analyzován ve speciálním programu (př. Nis-Elements od LIM, Praha). Součástí softwaru je segmentace obrazu, kdy na snímku se označí pozadí a objekt(y), které chceme dále měřit. Obraz se převede do černo-bílé verze, na označených plochách zájmu se provedou denzitometrická a morfometrická měření, jejichž výsledkem jsou informace o vlastnostech obrazu př. plocha (Area), obvod (Perimetr), délka (Length), kulatost (Circularity), nebo intenzita barevné složky (RGB, L a b apod.).

DOA nebo také image analysis (IA) nachází uplatnění v laboratořích, v průmyslu i na „poli“ – více (1). V aplikovaném zemědělském výzkumu má tato metoda nedoceněné postavení, hlavně proto, že umožňuje analyzovat velká množství vzorků, jako jsou soubory genotypů v genových zdrojích polních plodin (genové banky). V této oblasti vhodně doplňuje pasportní data a morfologické popisy položek v kolekci odrůd (2), třídí odrůdy na základě velikostních a barevných charakteristik semen (3), pomáhá diagnostikovat houbová napadení rostlin (4) a napadení rostlin škůdci (5). Přesný a podrobný popis fenotypových a molekulárních charakteristik odrůd je cenným zdrojem pro šlechtitelskou praxi, farmaceutický a potravinářský průmysl i základní výzkum.

V rámci projektu byly hodnoceny genové zdroje hrachu a lnu – tradičních plodin, bohužel s klesající tendencí zájmu o tyto plodiny. Firma Agritec, s.r.o. je hlavním a tradičním šlechtitelem těchto plodin v ČR. Proto se zde nachází genofond materiálů, které byly použity ke zpracování prostřednictvím DOA. Hodnocení rostlin vyšetěných k tomuto účelu na poli proběhlo v laboratoři – rostliny a jejich části odebrané v různé vývojové fázi byly snímány digitální kamerou Nikon (5 Mpixel) s řídicí jednotkou Nikon DSU-1 a optikou Pentax Cosmimar (Nikon Instruments, Czech Republic) s externím osvětlením (světelný box Kaiser Prolite Basic a tubulární světla Schott, Germany). Ke snímání semen byl využit scanner Canon 4400F (Canon, Japan). K determinaci výskytu spor se využilo mikroskopu Eclipse 50i (Nikon Instruments, Czech Republic). Snímky byly vyhodnoceny prostřednictvím softwaru NIS Elements AR v. 2.30 (LIM), měření parametrů a naměřená data statisticky vyhodnocena (Statistica ver.8.0 software package, USA).

Výsledky DOA v genových zdrojích lnu ukazují na použití metody ke stanovení statisticky průkazných duplicit a multiplicit položek na základě hodnocení plochy koruny (Area, MaxFerret, MinFerret, Perimetr), k zařazování naměřených parametrů (délka stonku, tvar a barva korunních lístků atd.) do databáze morfologických deskriptorů, k determinaci odrůdových klastřů na základě tvaru a barvy semen (MeanDensity, HueTypical, MeanRed, MeanGreen, MeanBlue atp.). Zde byl využit skener vzhledem k jeho rychlému zpracování vzorku (př. 288 semen hrachu/snímek). Použitý software umožnil vyřazení poškozených semen nebo příměsí. Základním předpokladem pro porovnávání odrůd je reprodukovatelné snímání – neměnnost podmínek barevného snímání, které je nutné ošetřit kalibrační snímáním zařízení například prostřednictvím MunsellColor kalibrační barevné tabulky pro nastavení bílé nebo černé barvy. Stejná kalibrace musí proběhnout pro stanovení velikosti pixelu (Px), tj. přiřazení reálné měřicí jednotky (př. mm) jednotce obrazu.

Přes široké použití DOA je nutné neustále zdokonalovat software, vytvářet nové programy nebo konstrukční řešení pro realizaci speciálních projektů.

Literatura

- 1 Čejka P.: Biologické Listy, 64(2):119-135, 1999.
- 2 Pavelek M., Smýkal P., Horáček J.: RGZ a AGRITEC s.r.o., Šumperk, 29.zář, s.39-43, 2005.
- 3 Wiesnerová D., Wiesner I.: Computer Computers and Electronics in Agriculture 61: 126-135, 2008.
- 4 Wijekoon C.P., Goodwin P.H., Hsiang T.: J.Microbiol.Methods 74(2-3):94-101, 2008.
- 5 Seideglanz M.: Agromanuál, 4(7): 32 – 34. ISSN 1801-7673, 2009.

Podporováno grantem MŠMT č.MSM2678424601(2004-2010)

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ SUSPENZNÍ KUTURY BY-2 PRO STUDIUM VLIVU ORGANICKÉHO POLUTANTU

PAVLA SOLNICKÁ¹, MAREK KLEMŠ¹, HELENA FIŠEROVÁ¹, ŠTĚPÁN ZEŽULKA², LADISLAV HAVEL¹

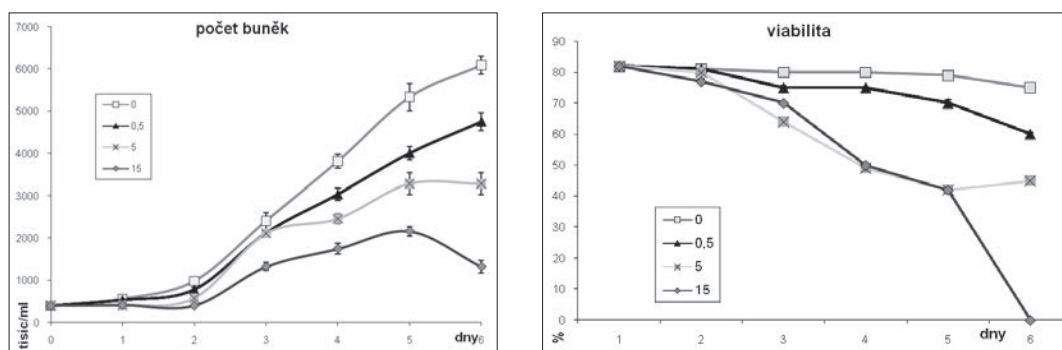
¹ Ústav Biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² Ústav experimentální biologie rostlin, Oddělení fyziologie a anatomie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

E-mail: Pavla.Solnicka@seznam.cz, tel.: 724 111 757

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) patří mezi významné kontaminanty životního prostředí. Výskyt PAH je kromě přírodních zdrojů (přírodní požáry, erupce sopek) dán především nedokonalým spalováním hmoty. Díky velkému rozšíření těchto látek dochází k pronikání do potravního řetězce. Jsou to látky vysoce škodlivé na lidské zdraví především svými potenciálními toxickými, karcinogenními, mutagenními a teratogenními účinky. Doposud byl účinek PAHs studován na celých rostlinách, kde se zjistilo, že mají vliv na všechna stadia ontogeneze. Pro studium na buněčné úrovni byla vybrána suspenzní kultura tabáku (BY-2) a fluoranten (FLT), jako indikátor výskytu ostatních PAHs. BY-2 je velmi populární biologický objekt pro studium přenosu signálů různého druhu v rostlinných buňkách. Pro tyto účely má linie BY-2 vysokou růstovou rychlost a viabilitu. Za standardních podmínek je fenotypově stabilní, tvoří vícebuněčné řetězky, které spontánně nedisociují na jednotlivé buňky. Tabáková buněčná suspenze BY-2 je závislá na přítomnosti 2,4-D v kultivačním médiu. Pomocí FLT v různých koncentracích, které jsou blízké koncentracím vyskytujících se v prostředí, byl studován vliv na růst, viabilitu, morfogenezi fyziologické parametry buněčné suspenze kultury tabáku.

Suspenzní kultura byla kultivována při laboratorních podmínkách na LS (Linsmayer a Skoog) médiu s přidavkem 1 μM 2,4-D (dichlorfenoxycetová kyselina) a polycyklického aromatického uhlovodíku (fluoranten) v koncentracích 0, 0,5, 5, 15 μM . Během šestidenní kultivace byly denně pozorovány tyto parametry: počet, viabilita a morfologie buněk, sušina, produkce etylénu, etanu, CO_2 a ACC, obsah ABA, proteinů a GST.



BY-2 reaguje velmi citlivě na přítomnost organického polutantu. FLT v médiu významně ovlivnil morfogenezi buněk. S rostoucí koncentrací FLT docházelo k inhibici dělení buněk, snížení obsahu vody v buňkách. Vlivem vzrůstající koncentrace FLT v médiu docházelo ke snížení počtu buněk až 3násobně během kultivace a to na médiu s přidavkem 15 μM FLT. S rostoucí koncentrací se snížila i viabilita buněk. Produkce etanu a CO_2 se zvyšovala zejména v exponenciální fázi růstu u nejvyšší koncentrace FLT. Naproti tomu produkce etylénu byla u 15 μM FLT snížena. Pík koncentrace kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové (ACC) v buňkách kontrolní varianty předcházela pík etylénu. V souvislosti s opožděným dělením buněk u vysoké koncentrace FLT byl i pík ABA opožděn (3. a 4. den kultivace). Obsah kyseliny abscisové (ABA) byl velmi malý (1–8 ng/g čerstvé hmotnosti).

FLT významně ovlivňuje růst a fyziologické parametry buněčné suspenze.

Podporováno granty GAČR (522/09/0239, IGA 19/2009).

P Plakátová sdělení

PŘÍPRAVA CHROMOZÓMOVĚ SPECIFICKÝCH BAC KNIHOVEN DNA PRO GENOMIKU PŠENICE

JAN ŠAFÁŘ, HANA ŠIMKOVÁ, MARIE KUBALÁKOVÁ A JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky, v. v. i., Sokolovská 6, 772 00 Olomouc

E-mail: safar@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 880

Hexaploidní pšenice je agronomicky významná plodina. Studium jejího genomu je obtížné především díky velikosti dědičné informace s převahou repetitivních sekvencí a navíc je komplikováno polyploidí. V současné době existuje všeobecná shoda řešit analýzu genomu pšenice pomocí tzv. přístupu chromozomové genomiky, která vychází z možnosti třídit jednotlivé chromozómy pšenice pomocí průtokové cytometrie. Z tříděných chromozómů jsou konstruovány BAC knihovny DNA a následně fyzické mapy pro každý chromozóm zvlášť. Tato strategie spojuje výhody snížení komplexity genomu pšenice s eliminací problému polyploidie. Navíc umožňuje práci časově a prostorově rozdělit mezi jednotlivé laboratoře. První chromozómově specifická BAC knihovna byla konstruována pro chromozóm 3B pšenice. Následovaly další knihovny první generace těchto unikátních zdrojů, které však měly menší průměrnou délku inzertů (obvykle 75–85kb). Vylepšená procedura umožnila zařadit druhou velikostní selekci DNA fragmentů a vedla k přípravě druhé generace chromozómově specifických BAC knihoven DNA s průměrnou délkou inzertů přesahujících 100kb. V současné době je chromozómově specifická DNA klonována do T1 a T5 rezistentních buněk Mega DH10B z důvodu ochrany proti těmto bakteriofágům. Tyto knihovny představují třetí generaci těchto materiálů. Pro přípravu chromozómově specifických knihoven a pro sekvenování byl vybrán kultivar Chinese Spring. Jelikož tento kultivar nemusí obsahovat některé geny rezistence, byla vyvinuta metoda přípravy chromozómově specifických knihoven i z jiných kultivarů. Takovéto zakázkové knihovny jsou užitečné při klonování genů ze specifických kultivarů. Dokončení konstrukce chromozómově specifických knihoven DNA hexaploidní pšenice kultivaru Chinese Spring je předpokládáno v roce 2011.

Tato práce je podporována grantem FP7-212019 'TriticeaeGenome' a grantem LC06004 Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky.

P Plakátová sdělení

TRANSFORMACE FYTOPATOGENNÍCH HUB REPORTÉROVÝMI GENY PRO VIZUALIZACI MYCELIA V ROSTLINNÝCH PLETIVECH

VLADIMÍR ŠAŠEK^{1,2}, SHINICHI OIDE³, CHRISTINA DIXELIUS³, LENKA BURKETOVÁ¹

¹ ÚEB AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6, ČR

² FAPPZ ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, ČR

³ VBSG SLU, PO Box 7080, 750 07 Uppsala, Švédsko

E-mail: burketova@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108

Studium interakcí rostlina-patogen se neobejde bez mikroskopického pozorování a kvantifikace patogena, případně symptomů choroby. Infekce rostlin mnoha houbovými patogeny probíhá v klíčových počátečních fázích zcela bezpříznakově a k vizualizaci mycelia je třeba využít barvicích technik. Zatímco u hub rostoucích během infekce na povrchu listů nebo penetrujících pouze pokožku lze získat klasickým barvením uspokojivé výsledky, v našich dosavadních zkušenostech s hemibiotrofním patogenem *Leptosphaeria maculans* kolonizujícím vnitřní pletiva listu se tyto metody neosvědčily. Drobné hyfy této askomycety prorůstají řídce mezibuněčnými prostory a po obarvení trypanovou nebo anilinovou modří splývají s buňkami rostliny. Také pro kvantifikaci růstu patogena pomocí analýzy obrazu na úrovni celých listů se barvicí metody neosvědčily. Mnoho fytopatogenních hub bylo v minulosti za účelem vizualizace transformováno reportérovými geny zahrnujícími různé fluorescenční proteiny nebo β -glucuronidázu (GUS). Tato metoda zaručuje nesrovnatelně vyšší specifitu než konvenční barvení.

Čtyři izoláty *L. maculans* jsme transformovali dvěma konstrukty získanými z jiných laboratoří. Plasmid pSO1 (Persson *et al.*) nese gen pro GUS a plasmid pCMBgfp (Sesma *et al.*) nese gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Oba plasmidy vycházejí z binárních vektorů určených primárně pro transformaci rostlin. Expres reportérových genů je řízena silnými konstitutivními promotory z jiných druhů askomycet a selekční marker je v obou případech gen pro rezistenci k hygromycinu. Transformace byla provedena kokultivací agrobakteria nesoucího plasmid a spor *L. maculans* podle publikovaného protokolu (Gardiner *et al.*).

Transformované linie se morfologií ani rychlostí růstu nelišily od divokého typu. Rozdíly mezi rychlostí a intenzitou barvení jednotlivých linií nesoucích GUS byly velmi malé. Zdá se tedy, že místo integrace do genomu nemá na expresi genu výrazný vliv. Pro inokulaci rostlin byly doposud testovány pouze linie nesoucí GUS. Hyfy v listech byly po odbarvení chlorofylu intenzivně modře zbarveny a to i v případě klíčících spor. V porovnání s konvenčním barvením byly preparáty výrazně lepší jak pro mikroskopické, tak makroskopické pozorování. Nevýhodou je velká spotřeba drahého substrátu pro GUS.

Persson M., Staal J., Oide S., Dixelius C. 2009 – New Phytologist, 182: 470-482

Sesma A., Osbourn A. 2004 – Nature, 431: 582-586

Gardiner D.M., Howlett B.J. 2004 – Curr Genet, 45: 249-255

Podporováno grantem GA ČR (522/08/1581) a NAZV (QH81201).

P Plakátová sdělení

IDENTIFICATION OF REGULATORY CIS-ELEMENTS IN PROMOTERS OF POLLEN-EXPRESSED GENES

KATARZYNA ŠOLCOVÁ¹, ANTÓNIA GIBALOVÁ², DAVID HONYS^{1,2}

¹ Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic

² Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44, Prague 2, Czech Republic

E-mail: matczuk@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 451

For better understanding of regulatory mechanisms specifying and controlling male gametophytic developmental program, it is necessary to identify regulatory sequence motifs (*cis*-elements) in promoters of pollen-expressed genes and to isolate interacting protein partners responsible for their transcriptional activation or repression. Regulatory elements present in gene promoters include several classes of functional DNA sequence motifs (*cis*-elements) recognized by appropriate proteins (*trans*-elements), essential components of the RNA polymerase transcription machinery (GTF, general transcription factors) and complementary specific transcription factors. Several pollen regulatory *cis*-elements have been characterized so far, particularly GTGG and GTGA identified in promoters of several pollen-expressed genes *lat52* (*Lycopersicon esculentum*), *chi-A* (*Pentunia hybrida*), *Zm13* (*Zea mays*), *TUA1* (*Arabidopsis thaliana*) and *Npg1* (*Nicotina tabacum*). Here we demonstrate identification and analysis of several gene promoters by combination of bioinformatic tools and experimental methodology. Analysed promoters were selected from a substantial fraction of putative pollen-specific genes showing early or late expression profiles and candidate motifs were identified using bioinformatic tools such as MAST&MEME, Motif Sampler, YMF 3.0, Improbizer, (respective links shown below). Putative regulatory motifs were functionally analysed. First, the activity of candidate promoters was tested using appropriate promoter::eGFP::GUS constructs. Consequently, selected motifs were excluded from corresponding genes using PCR-based mutagenesis and altered promoters were subcloned into eGFP::GUS-harboring vectors. Both stable and transient transformation into *Arabidopsis* and tobacco pollen was performed and followed by the measurement of promoter activity based on spectrofluorometry assay.

MAST&MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>),

Motif Sampler (<http://homes.esat.kuleuven.be/~thijs/BioDemo/MotifSampler.html>),

YMF 3.0 (<http://wingless.cs.washington.edu/YMF/YMFWeb/YMFInput.pl>),

Improbizer (<http://users.soe.ucsc.edu/~kent/improbizer/improbizer.html>),

PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>)

Authors gratefully acknowledge the financial support from Grant Agency of the Czech Republic 522/09/0858, from Ministry of Education of the Czech Republic LC06004 and from the European Fund for Regional Development, the Operational Programme Prague – Competitiveness, project no.: CZ.2.16/3.1.00/21159.

P Plakátová sdělení

POUŽITÍ STATISTICKÝCH A MATEMATICKÝCH METOD PŘI ANALÝZE FAKTORŮ OVLIVŇUJÍCÍCH TUBERIZACI *IN VITRO*

ZDENĚK ŠTĚPÁN¹, PAVLA SOLNICKÁ¹, MAREK KLEMŠ¹, HELENA VÍTKOVÁ¹, HELENA FIŠEROVÁ¹, IVO MOLL²

¹ Ústav biologie rostlin, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

² Ústav statistiky a operačního výzkumu, PEF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

E-mail: xstapa20@node.mendelu.cz, tel.: +420 545 133 296

V procesu ontogeneze rostlin dochází k růstovým změnám charakteristickým obnovou homeostáze mezi koncentrací fytohormonů a vlivem vnějších faktorů. Etapy růstu a vývoje rostlin (např. dormance, indukce kvetení, tvorba plodů, senescence, aj.) jsou tak regulovány složitými vztahy. Zachycení celého spektra tak komplikovaných vztahů, které fytohormony podmiňují vyžaduje složité fyziologické a biochemické analýzy. Ty lze při izolaci či eliminaci faktorů v experimentu simulovat za pomoci matematických a statistických metod. Právě takováto matematická simulace může poukázat na kritický moment v růstu a vývoji rostliny a může napomoci predikci výnosu žádaného produktu na základě srovnání s bilancí ztrát a výtěžku fyziologického procesu. Cílem práce bylo aplikovat výsledky indukce tvorby hlízek bramboru (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*, kde byla tuberizace ovlivněna složením kultivačního média, na matematicko-statistickou analýzu odhalující v čase klíčové momenty procesu. Matematická analýza odlišuje efekt látek vyvolávajících (koncentrace benzyladeninu a sacharózy) a ovlivňujících indukci hlízek (koncentrace anorganického dusíku). Průběh odezvy byl vyjádřen exponenciální regresní funkcí, vybranou z obecných řešení diferenciálních rovnic vyjadřujících tuberizaci v čase.

Pro indukci tvorby hlíz byly rostliny kultivovány ve třech variantách: varianta se sníženým obsahem anorganického dusíku v médiu (10^{-12} μ M), varianta se zvýšeným obsahem dusíku v médiu (65–70 μ M) a kontrola (přibližně 40 μ M anorganického dusíku). Média všech tří variant obsahovala 80 g/l sacharózy 10 mg/l BA pro indukci hlízek. Kultivace jednododálních segmentů stonku probíhala na fotoperiodě 8/16 (8 hodin světla a 16 hodin tmy). Byla hodnocena frekvence tvorby hlízek (%) od čtvrtého týdne po založení kultury jednododálních segmentů, obsah ABA a cytokininů v jednotlivých částech rostlin (RIA, HPLC a ELISA), produkce etylénu (GC). Pro stanovení obsahu ABA a CK byla provedena 4 opakování vzorků, pro stanovení produkce etylénu a CO₂ 5 opakování a morfologické hodnocení bylo provedeno v 6 opakováních. Před vlastním vyhodnocením fyziologických pokusů se osvědčilo nejprve provést důkladnou kontrolu správnosti naměřených hodnot a vyloučit odlehle hodnoty např. pomocí Grubbsova nebo Dixonova testovacího kritéria.

Při vlastním statistickém posouzení, se ve většině případů jedná o prokázání významnosti rozdílů u více jak dvou středních hodnot zkoumaných faktorů (např. může se jednat o různé koncentrace anorganického dusíku v indukčním médiu tedy o faktor se třemi úrovněmi – kontrola, snížený dusík, zvýšený dusík. V tomto případě je vícefaktorová (multivarienní, vícenásobná) ANOVA tj. MANOVA, kde jednotlivými faktory jsou skokové změny analyzovaných faktorů (např. zmíněná koncentrace anorganického dusíku v indukčním médiu) a dalším hodnocení frekvence tuberizace možným řešením. MANOVA prokáže existenci významných rozdílů, ale to, mezi kterými středními hodnotami existují, prokáže až následné testování podle Tukaye. Jednou z podmínek použití ANOV-y je vzájemná nezávislost všech měření uvnitř skupin i mezi skupinami, homogenita rozptylu ověřená testem podle Cochranova nebo Bartleeta a normální rozdělení odečtených dat. Jestliže nemůžeme použít ANOV-u užíváme neparametrický Friedmanův test s následným mnohonásobným porovnáním podle Neményiho. Z výsledků byly navrženy obecné regresní funkce s řešením jejich parametrů metodou nejmenších čtverců v Řešiteli Microsoft Excel a obecnými principy homeostatické regulace.

Základní fyziologická interpretace výsledků charakterizuje, že snížení obsahu anorganického dusíku v médiu vedlo k intenzivnější tvorbě hlíz. Tato varianta měla nejvyšší frekvenci tvorby hlíz z celkového počtu založených explantátů a tvorba a růst hlíz byly u této varianty nejrychlejší. Etylén obsažený v plynném prostředí kultury *in vitro* ovlivňoval tvorbu hlíz obdobně, protože největší počet baněk v nichž došlo alespoň na jednom explantátu ke tvorbě hlízky byl charakteristický pro kultivační variantu se sníženým obsahem dusíku. Nejvyšší obsah kyseliny abscisové byl zaznamenán nejprve v listech jednododálních segmentů stonku. Později došlo ke zvýšení obsahu ABA v pupenech a v rostoucích stolonech. Dále budou v posteru budou prezentována data frekvence tuberizace, změny obsahu ABA, CK a etylénu, včetně statistického zpracování a výše uvedené matematicko-statistické analýzy a regresní závislosti.

Tento výzkum byl podporován výzkumným projektem Grantové agentury AF MZLU Brno IGA 19/2009.

P Plakátová sdělení

HLEDÁNÍ DNA POLYMORFNÍCH SEKVENCÍ SPOJENÝCH S VYŠŠÍ VITALITOU OBILEK JARNÍHO JEČMENE

KAMILA ULLMANOVÁ¹, JANA ŘEPKOVÁ², LUDMILA HOLKOVÁ¹, OLDŘICH CHLOUPEK¹

¹ MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

E-mail: xullman0@node.mendelu.cz, tel.: +420 545 133 123

Při identifikaci polygenů determinujících šlechtitelsky významné znaky se s výhodou využívá genetické mapování prostřednictvím DNA markerů. Využití DNA markerů je založeno na polymorfismu, tedy variabilitě v sekvencích DNA. Podle cíle a rozsahu studované problematiky je potřeba zvolit vždy ten nejvhodnější typ DNA markerů. U ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) používáme markery SSR (Simple Sequence Repeats) založené na PCR (Polymerase Chain Reaction). S podporou grantu Interní Grantové Agentury MZLU jsme ve spolupráci s přírodovědeckou fakultou MU používali u sledovaných linií jarního ječmene také CAPS markery (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

Vitalita semen je definována jako potenciál semene pro rychlé a uniformní vzejití a pro vývoj normálního semenáčku za širokého spektra polních podmínek. Oficiální metodika hodnocení vitality platí pouze u luskovin (hodnocení dle elektrické vodivosti výluhu ze semen). Fenotypový projev vitality obilek ječmene hodnotíme v laboratorních podmínkách jako klíčivost za fyziologického sucha –2 bary (bod trvalého vadnutí) v roztoku PEG 6000 (polyethylenglykol – Serva) a za chladu (10 °C).

V této fázi výzkumu hledáme polymorfismus u dvou genotypů jarního ječmene Derkado a B83-12/21/5 mezi nimiž jsme zjistili dostatečnou rozlišnost ve fenotypovém projevu vitality obilek. Tyto dvě linie byly použity pro křížení a následné odvození 156 dihaploidních linií. U dihaploidních linií zjišťujeme fenotypový projev vitality obilek pro pozdější použití výsledků při genetických studiích tohoto znaku.

DNA je izolována z rostlin ve fázi 2. nebo 3. pravého listu za pomoci DNeasy Plant Mini Kit Qiagen. PCR reakční směs je tvořena komponenty Tag PCR Core Kit podle standardního protokolu, primery (50 pM/μl) a templátovou DNA (0,5–5 ng). Reakční podmínky jsou specifické pro každý marker. Detekce PCR produktu probíhá na 2% agaróзовé gelové elektroforéze a 7,5% polyakrylamidovém gelu.

Pro detekci polymorfismu mezi odrůdou Derkado a linií B83-12/21/5 na čtyřech chromozomech ječmene bylo testováno prozatím celkem 99 markerů, na chromozomu 1H bylo sledováno 33 markerů, na chromozomu 5H 17 markerů, na chromozomu 6H 7 markerů a nejvíce vysycen byl chromozom 7H s 42 markery. Celkem bylo polymorfních 23 markerů SSR. Pět markerů na 1H, tři na 5H, pět na 6H a 10 na chromozomu 7H. Na chromozomu 1H bylo polymorfních 15,2 % z celkového počtu markerů sledovaných na tomto chromozomu (markery: Bmac0154, WMC1E8, AWBMS80, RGH1a11b, MGB402), na 5H byl detekován polymorfismus u 17,6 % sledovaných markerů (GMS027, Bmag0223), na chromozomu 6H byl detekován 62,5 % polymorfismus (Bmag0500, Bmac0040, Bmag0173, EBmac 0639, Bmac0316) a sledované markery na 7H chromozomu byly z 23,9 % polymorfní (markery: Bmag0120, Bmac0162, AF022725A, HVM49, Bmac0156, Bmag0135, Bmag0007, EBmag0794, GBM1326, Bmag0206).

Polymorfismus markerů CAPS byl detekován na základě rozdílné pozice produktu restrikčního štěpení Derkado a B83-12/21/5. Bylo analyzováno šest markerů CAPS s využitím 26 restrikčních enzymů pro každý marker. Ze šesti sledovaných CAPS markerů byly čtyři markery po štěpení restrikčními enzymy polymorfní mezi sledovanými rodiči. Ze 156 restrikčních štěpení PCR produktů na 7H chromozomu bylo 14 reakcí polymorfních. Marker CAPS MWG599 byl polymorfní při štěpení s pěti enzymy Ava II, Nla III, ScrFI, Taq I, Xho I. Polymorfismus byl detekován u markeru ABG704 v reakci s enzymem Alu I, BamHI, Hinf I, Nla III, Mbo I. U markeru MWG2062 byl polymorfismus identifikován po štěpení s enzymy Hpa II, Msp I a marker MWG539 byl štěpen restrikčními enzymy Msp I a ScrFI.

Markery, u kterých byl prokázán polymorfismus, budou po rozšíření dalšími polymorfními markery použity pro mapování genů řídících vitalitu obilek u dihaploidních linií z křížení Derkado × B83-12/21/5.

Podpořeno grantem IGA 280061

P Plakátová sdělení

POZIČNÍ KLONOVÁNÍ U VELKÝCH A KOMPLEXNÍCH GENOMŮ: STUDIE KOLINEARITY GENOMŮ JAKO NÁSTROJ PRO KLONOVÁNÍ GENU REZISTENCE K PADLÍ TRAVNÍ *QPM.TUT-4A*

MIROSLAV VALÁRIK¹, IRENA JAKOBSON²; LJUDMILLA TIMOFEJEVA², KADRI JÄRVE², JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, CZ-77200 Olomouc

² Department of Gene Technology, Tallinn University of Technology, Akadeemia tee 15, Tallinn 12618, ESTONIA

E-mail: valarik@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 857

Nemoc Padlí travní je u pšenice způsobena napadením houbou *B. graminis*. Nedávno byl gen pro rezistenci vůči *B. graminis* identifikován na konci dlouhého ramene chromosomu 4A. Gén byl nazván *QPm.tut-4A* a lokalizován v přibližně 10 cM oblasti mezi markery *gwm160* a *wmc232*. Prvním krokem k úspěšnému klonování *QPm.tut-4A* genu je nezbytné tuto oblast genetické mapy dalšími markery. Hlavními nástroji pro identifikaci nových markerů zacílených do oblasti genomu s konkrétním genem jsou sekvence genomu a fyzické kontigové mapy pokud existují a studie kolinearit s mapami a sekvencemi příbuzných druhů. Pro odvozování nových markerů u pšenice studiemi kolinearit se nejčastěji používají genetické mapy ostatních pšeničných kultivarů a druhů, genetické mapy ječmene a sekvence genomů rýže a *Brachypodium distachyon*. Marker *gwm160* byl mapován do posledního binu deleční mapy chromozomálního ramene 4AL. Všechny 91 jedno-kópiových EST bylo mapováno v rýži, 48 EST mělo svého ortologa v genomu rýže a největší skupina 20 EST byla zamapována pohromadě na konci krátkého ramene chromosomu 6 v oblasti velké 1,6 Mb. Porovnáním lokalizace markeru *gwm160* na genetických mapách ostatních pšeničných mapovacích populací byl marker *psr119* lokalizován opakovaně 1,5 cM od markeru *gwm160* a zamapován uprostřed regionu s 20 EST na krátkém rameni rýžového chromosomu 6. Oba tyto výsledky naznačují, že tato oblast je kolineární s pšeničnou oblastí genu *QPm.tut-4A*. Kolineární rýžová oblast obsahuje 173 genů, které mohou být použity jako markery pro kolineární pšeničnou oblast. Tato oblast vykazuje velmi konzervovanou kolinearitu s přibližně 1Mb oblastí chromosomu 1 *Brachypodium distachyon*. Konec rýžového chromosomu 6 je kolineární s oblastí konce krátkého ramene ječmenového chromosomu 7H a obsahující 48 EST a 19 z nich mapuje do stejné oblasti jako pšeničné EST a jeden je ortologní k pšeničnému EST. Tato studie kolinearit umožnila identifikovat 191 genů vhodných jako nové markery pro oblast genu *QPm.tut-4A* a odhalila jeho kolinearitu k oblastem chromosomů skupiny 7 ječmene a pšenice co potvrzuje komplexní mozaikovou stavbu chromosomu 4AL.

Tato práce byla podpořena grantem 521/08/1629 Grantové Agentury České republiky.

P Plakátová sdělení

IZOLACE PROTEINŮ ZPROSTŘEDKOVÁJÍCÍCH INTERAKCI MEZI PLASMATICKOU MEMBRÁNOU A MIKROTUBULÁRNÍM CYTOSKELETEM

STANISLAV VOSOLSOBĚ, JANA KOBRLOVÁ, KATEŘINA SCHWARZEROVÁ

Katedra fyziologie rostlin, PŘF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR
E-mail: vosolsob@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 695

Vzájemná interakce plasmatické membrány a mikrotubulárního cytoskeletu je významná pro řadu procesů probíhajících v rostlinné buňce, například pro syntézu buněčné stěny a přenos signálů. Poznatky o proteinech, které zprostředkovávají funkční či strukturní propojení plasmatické membrány s cytoskeletem, jsou však zatím kusé. Za účelem identifikace nových membránových proteinů se schopností vazby na cytoskelet jsme vyvinuli novou metodu izolace proteinů z membránových svlečků, tedy útržků plasmatické membrány, jež jsou získávány během lyze protoplastů a jež obsahují membránu včetně asociovaného kortikálního cytoskeletu s vazebnými proteiny. Membránové svlečky lze použít buď přímo k mikroskopickým pozorováním, nebo k proteomické analýze. Proteiny schopné interagovat s mikrotubuly jsou ze svlečků selektivně získány metodou kosedimentace s mikrotubuly polymerovanými *in vitro* a dále analyzovány prostřednictvím 2D-PAGE a identifikovány MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

Druhý námi využívaný přístup vychází z hrubé mikrosomální frakce a dalších frakcí odvozených z této ultracentrifugací na sacharosovém gradientu. K analýze proteomu je využívána blue native elektroforéza, jež umožňuje separovat intaktní proteinové komplexy z různých subcelulárních frakcí, především membránových. Migrace proteinových komplexů v elektrickém poli je umožněna díky ošetření barvivem Coomassie blue G, které zároveň napomáhá solubilizaci komplexů, avšak ve srovnání s SDS nemění strukturu proteinů. Nativní separace komplexů je následována denaturující SDS elektroforézou ve druhém rozměru, která rozdělí komplexy na jednotlivé komponenty, jež mohou být nakonec identifikovány imunoblotováním. Naším cílem je detegovat ve frakci membránových proteinů komplexy obsahující tubulin a identifikovat jejich další komponenty, představující interagující proteiny, prostřednictvím MALDI-TOF.

Podporované granty: Centrum základního výzkumu LC06034 (MŠMT ČR), projekt dvoustranné spolupráce MEB100904 (MŠMT ČR, DAAD).

P Plakátová sdělení

OXIDATIVE DAMAGE TO ISOLATED CHLOROPLASTS INDUCED BY *IN VITRO* SYSTEM

NAĎA WILHELMOVÁ¹, HELENA HORÁKOVÁ^{1,2}, JIŘÍ WILHELM³, JIN K YU KIM⁴

¹ Institute of Experimental Botany, ASCR Na Karlovce 1160 00 Praha 6, Czech Republic,

² Faculty of Sciences, Charles University, Albertov 2030, Praha 2, Czech Republic

³ 2nd Medical School, Charles University, Prague, Plzeňská 221, 150 06 Praha 5, Czech Republic

⁴ Korea Atomic Energy Research Institute, 1266 Shinjeong-dong, Joenbuk, 580-185 Korea

E-mail: wilhelmova@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 109

Abiotic stresses lead to a series of morphological, physiological, biochemical and molecular changes that adversely affect plant growth and productivity. Common feature of various adverse conditions is oxidative stress that can finally lead to premature senescence and to an organ or a plant death. The involvement of ROS was demonstrated also in senescence (Zimmermann and Zentgraf 2005, Wilhelmová *et al.* 2004, 2006a, b). Cells of all aerobes produce reactive oxygen species (ROS) even under optimal conditions in natural metabolism. ROS act as signal molecules controlling various processes including pathogen defence, programmed cell death or stomatal behaviour (Miller *et al.* 2008). However, these compounds are toxic and harmful for a cell when uncontrollably increased. Actually, during stress and ageing their production has been highly elevated. These oxygen derivatives are very reactive and cause accumulation of oxidative products of all cellular components, namely proteins, lipids, and nucleic acids. Such irreversible modifications hamper their regular functions e.g. as enzymes, signals or structural constituents, leading to a cell death.

We decided to employ the *in vitro* approach for the study of oxidative damage of chloroplasts as these organelles are the most sensitive to oxidative stress. Further, chloroplasts are organelles in which the first symptoms of senescence are visible.

The system based on Udenfriend mixture (Udenfriend *et al.* 1953) consists of iron ions plus ascorbate and produces mixture of free radicals. It has been used almost exclusively for animal cells. We isolated chloroplasts from primary mature bean leaves and optimized the incubation conditions. The best results were provided with 0.3 mM Fe²⁺ and 0.3 mM ascorbate. The peroxidation effects were tested in lipid phase as malonaldehyd formation, and in proteins, where the oxidation was assayed as protein carbonyls. The maximum lipid peroxidation was achieved after 2 h-incubation whereas in proteins the maximum was found after as much as 24 h-incubation. The proteins might be more resistant to free radical attack. The peroxidation products of both lipids and proteins will be studied in more detail. This system will serve as a basis for future research with the aim of characterization of oxidation products and elucidation their role in the initiation of senescence and abiotic stress tolerance.

References

- Miller G, Coutu J, Shulaev V, Mittler R. (2008) In: Yang Z (ed.) Intracellular Signaling in Plants. Ann. Plant Rev. 33, 189-201
- Udenfriend S, Clark CT, Axelrod J, Brodie BB. (1953) J.Bio.Chem. 208: 731-750
- Wilhelmová N, Procházková D, Macháčková I, Vágner M, Srbová M, Wilhelm J. (2004) Biol. Plant. 48: 523-529
- Wilhelmová N, Domingues PMDN, Srbová M, Fuksová H, Wilhelm J. (2006 a) Biol. Plant. 50, 559-564
- Wilhelmová N, Fuksová H, Mýtinová Z, Procházková D, Schwippelová Z, Vytášek R, Wilhelm J. (2006 b) BioFactors 27, 203-211
- Zimmermann P, Zentgraf U. (2005) Cell. Mol. Biol. Lett. 10: 515-534

P Plakátová sdělení

QUANTIFICATION OF RETROTRANSPOSONS IN GENUS *ELEOCHARIS* USING DEGENERATE REAL-TIME PCR

FRANTIŠEK ZEDEK, OLGA ROTREKLOVÁ, LUCIE HOROVÁ, PETR BUREŠ, JAKUB ŠMERDA

Plant Biodiversity & Biosystematics Group, Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

E-mail: bures@sci.muni.cz, tel.: +420 532 146 271

E-mail: fzedek@gmail.com, tel.: +420 775 908 409

The genus *Eleocharis* (Cyperaceae) comprises about 200 species of marsh and wetland habitats. Compared to the most of angiosperm genera *Eleocharis* species are unique in their karyological features. They differ considerably in 1C genome sizes (21.4 fold from 0.42 pg in *E. cellulosa* to 9 pg in *E. uniglumis* subsp. *sternerii*) and average chromosome sizes (roughly 150 fold from about 2 Mbp in *E. cellulosa* to 299 Mbp in *E. xyridiformis*). In *Eleocharis*, genome size and average chromosome size increase towards phylogenetically advanced species. The aim of this study was to consider the role of retrotransposons in such phenomenon.

For that purpose we quantified partial DNA sequences of reverse transcriptases (*rt*) of Ty1-*copia*, Ty3-*gypsy* and of one subgroup of Ty1-*copia* (called Helos1) by degenerate real-time PCR in 14 species of *Eleocharis*. Because we used degenerate primers, linearized recombinant plasmids containing *rt* sequences with different primer binding sites were mixed together and used as external standards. Specificity of the reaction was verified by melting analysis. Since the ploidy levels of *Eleocharis* species remain unknown, the density of retrotransposons (copies per pg of genomic DNA) was correlated with average chromosome size, which is not affected by possible polyploidy and therefore more suitable for this kind of analysis. Spearman correlation of these parameters was positive for *copia* ($p=0,001$) and Helos1 ($p<0,001$) and negative for *gypsy* ($p<0,025$). The ranges of retrotransposon densities were estimated to be 1007–4290 for *copia*, 2–677 for Helos1 and 89–241 for *gypsy*.

To our knowledge this is the first study using degenerate real-time PCR for quantification of retrotransposons. Based on our results we conclude: (i) genome sizes and especially average chromosome sizes of *Eleocharis* species are mainly shaped by *copia* retrotransposons, whereas *gypsy* remain inactive or nearly inactive, (ii) since the density of *copia* increases along the phylogeny of *Eleocharis*, we suggest that their amplification may have also played major role in speciation, (iii) real-time PCR is suitable for quantification of retrotransposons in closely related species, where a similar pool of retrotransposon families can be expected. Unlike quantification based on hybridization, real-time PCR requires minimum amount of genomic DNA. It's fast, very specific and relatively cheap method that can be widely used in combination with retrotransposon sequence analysis.

This work was supported by Czech Science Foundation (research project GA ČR 206/09/1405) and by the Ministry of Education of the Czech Republic (long time research projects MSM0021622416 and LC06073).

P Plakátová sdělení

THE USE OF BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS FOR EVALUATION OF PHYTOTOXICITY OF ORGANIC COMPOUNDS

ŠTĚPÁN ZEŽULKA, MARIE KUMMEROVÁ, LUCIE VÁŇOVÁ

Dep. of Plant Physiology and Anatomy, IEB, FSc, MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
E-mail: zezulka@sci.muni.cz, tel.: +420 532 146 225

Terrestrial and aquatic ecosystems are affected by a number of noxious organic compounds, mostly of antropogenic origin. The effects of these toxicants on higher plants have significant ecological and economic consequences. In addition, plants have a high capability for their bioconcentration and bioconversion with potentially adverse implications for organisms higher up the food chain. With the increasing level of environmental loading by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) a development and use of new methods for early indication of stress or affection caused by organic compounds in vegetation becomes more acute. A close attention is paid to molecular, biochemical and physiological indicators of the exposure to organic compounds, which could precede the visible injury of plants.

The aim of this study was to compare the potency of toxicity tests like germination, growth of the seedlings and changes in primary photosynthetic processes in pea plants treated by fluoranthene (FLT). FLT is one of the most widespread PAHs, a prevalent group of toxic contaminants to soils and atmosphere, with mutagenous and teratogenous effects. Selected concentrations of FLT represent low (0.01 and 0.1 mg/L) and high (1 and 5 mg/L) loading of the environment.

Germination (%) and the growth of seedlings (the length of root and shoot, dry weight) were assessed by means of standard phytotoxicity tests according to OECD and US EPA.

An inhibition of photosynthetic processes in plants is very often a key mechanism of toxic effects of many noxious substances. Assessments of changes in photosynthetic pigments content and changes in primary photosynthetic processes belong to most commonly used methods.

Chlorophyll *a*, *b* and carotenoids were extracted by 100% acetone and their content was measured spectrophotometrically (absorbance at 662 nm, 646 nm and 470 nm, UV-VIS Spectrophotometr, Shimadzu, Japan) and calculated according to Lichtenthaler (1987).

Analysis of the chlorophyll fluorescence induction curve, or Kautsky curve, is well-known tool for monitoring the physiological status of the photosynthetic apparatus in photosynthesis research. Potential quantum yield of photosystem II F_v/F_m was used as an indicator of stress affecting photochemical pathway of utilization of absorbed light energy (Mallakin *et al.* 2002). Measurements were performed by means of fluorometer PAM 2000 (Walz, Germany) and fluorescence parameter was derived from slow induction kinetics supplemented with saturation pulses.

Hill reaction activity (activity of oxygen evolving complex) was measured spectrophotometrically (630 nm) as the rate of DCIP (2,6-dichloro-indophenol) reduction (%) by the chloroplasts suspension affected by FLT (Kummerová *et al.* 2006).

Parameters of primary processes of photosynthesis were detected and compared in 18 and 25 days old plants.

The content of contaminants in plant biomass supports their uptake and translocation in plant and often it is an indicator of the environmental pollution degree. The content of FLT in plant biomass after 25 days was determined using GC-MS (Finnigan MAT, USA).

Obtained results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) at $P=0.05$.

Our results proved that selected physiological and biochemical characteristics (germination test, root elongation test, induced chlorophyll fluorescence, Hill reaction activity) show a sensitive response even to very low environmental loading (0.01 mg/L). The biomass production is a reliable external indicator of the internal disturbance of plant metabolism, therefore the impact on it was recorded in higher loading or longer cultivation period, respectively. Due to this the assessment of plant growth is not reliable for early indication of stressors effect.

Kummerová, M., Krulová, J., Zezulka, Š., Tříška, J., 2006. Chemosphere. 65, 489-496.

Lichtenthaler H.K., 1987. Methods Enzymol. 148, 350-382.

Mallakin, A., Babu, T.S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 2002. Environ. Toxicol. 17, 462-471.

This work was financially supported by grants GAČR 522/09/0239 and GAČR 522/09/P167.

P Plakátová sdělení

QUANTITATIVE DIFFERENTIAL ANALYSIS OF PLANT PROTEOME IN A RESPONSE TO HORMONAL REGULATIONS

MARKÉTA ŽDÁRSKÁ¹, PAVLÍNA KOVÁŘOVÁ¹, ZBYNĚK ZDRÁHAL², JAN HEJÁTKO¹

¹ LMPP FGP, Masaryk University, Kamenice 5/A2, 625 00 Brno, Czech Republic

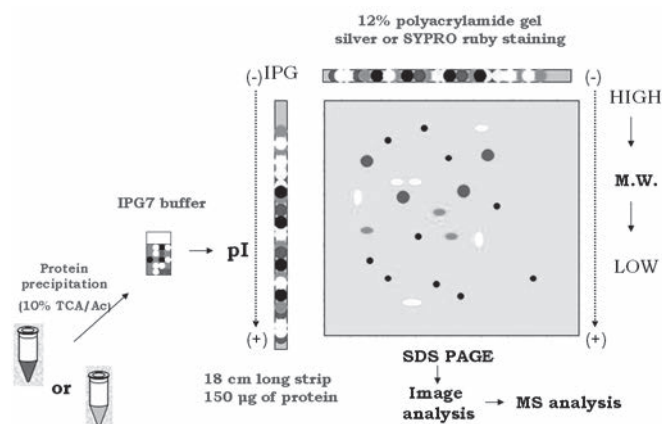
² CL FGP, Masaryk University, Kamenice 5/A2, 625 00 Brno, Czech Republic

E-mail: marketa.zdarska@gmail.com, tel.: +420 732 220 256

Cytokinins (CKs) have been discovered as factors promoting cell division in tobacco tissue cultures. Since their discovery, CKs have been implicated to play a role in many aspects of plant growth and development including shoot meristem initiation and growth, leaf senescence, vascular patterning, seeds development, etc. Interestingly, cytokinins seem to play opposite roles in the regulation of growth of shoot and root. The role of CKs in the diverse aspects of plant development has been studied in experiments with exogenous CKs application and/or modulation of endogenous cytokinins levels. In contrast to the manipulations of endogenous cytokinins, the exogenous cytokinin application allows studying early cytokinin responses.

The role of CKs in plant development was studied mostly on the level of regulation of gene expression. Here we present the method for the quantitative differential analysis of the early cytokinin response of the *Arabidopsis* proteome. Six days old seedlings of *Arabidopsis thaliana* (Col-0) were treated with 5 μ M 6-benzylamino purine (BAP). The roots and shoots were collected separately and proteins were isolated using 10% TCA/Ac extraction method (Tsugita and Kamo, 1999). The extract was dissolved in IPG7 buffer and protein concentration was determined by RC/DC kit, Biorad.

The proteome analysis was based on two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). 2-DE couples isoelectric focusing (IEF) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to resolve denaturated proteins according to two independent parameters, isoelectric point and molecular mass. In the first dimension, IEF, we applied 150 micrograms of protein to 18 centimetres long strip with nonlinear pH gradient 3–10 and in the second dimension we used 12% SDS-PAGE. For the protein detection we used luminescent SYPRO Ruby protein gel stain to obtain both qualitative and quantitative results. From the map of intact proteins we were able to differentiate approximately one thousand seven hundred proteins and subsequently, individual proteins were identified by MALDI TOF MS/MS and LC MS/MS.



Kieber J.: 2002 – The *Arabidopsis* book: 1-25

Görg A. et al.: 2000 – Electrophoresis, 21: 1037-1053

Supported by LC06034, MSM002162241 and 204/08/H054.

R

Rejstřík autorů

- Albrechtová 33
 Ambrožová 44
 Barek 30
 Bartoš 11, 12, 14, 66
 Bellin 80
 Bureš 59, 69, 98
 Burketová 91
 Cséfalvay 80
 Cvikrová 70
 Čapková 21
 Čegan 45
 Čerovská 58
 Čerovská 28, 53, 83
 Číhalíková 11
 Čížková 46
 Čovanová 47
 Di Gaspero 80
 Dixelius 91
 Dobrá 48
 Dobrev 29, 75
 Dokoupil 65
 Doležel 10, 11, 12, 46, 66, 77, 87, 90, 95
 Doonan 49
 Dupláková 17
 Dvořáčková 49
 Eliášová 50
 Fajkus 24, 49, 68, 71, 76, 81
 Feciková 21
 Feraru 27
 Fíla 21
 Fischer 78
 Fišerová 51, 89, 93
 Foldynová 52
 Folwarczna 53, 58
 Folwarczna 28
 Forczek 54
 Friml 27
 Fulneček 55
 Gajdošová 75
 Gibalová 92
 Griffiths 79
 Hafidh 18
 Hanuš 51
 Havel 89
 Havránková 66
 Hejátko 22, 60, 100
 Helánová 51
 Helekalová 56
 Herbstova 57
 Hobza 13, 14, 45
 Hoffmeisterová 28, 53, 58, 83
 Holková 74, 94
 Honys 17, 18, 21, 92
 Horák 22, 60
 Horáková 97
 Horová 59, 98
 Hošek 29
 Hoyerová 29
 Hrdinová 22, 60
 Hronková 74
 Hrvolová 61
 Hřibová 10, 46, 77
 Husson 2 62
 Cháb 19
 Chernyavskiy 32
 Chloupek 94
 Jakobson 95
 Janáček 33
 Janoušek B. 63
 Janoušek J. 62
 Järve 95
 Jedelský 20
 Jiřina 29
 Kalina 61
 Kamínek 75
 Kandalcová 63
 Kejnovský 45
 Khaitová 64
 Kim 97
 Klemš 65, 89, 93
 Klíma 29
 Kobrlová 96
 Kohout 16
 Kokošková 86
 Kolář 35
 Komárek 29
 Komenda 52, 67
 Kopecký 66
 Kopečná 67
 Kosová 23
 Kovařík 19, 64
 Kovářová 100
 Krpeš 34
 Kubaláková 11, 90
 Kubeková 14, 45
 Kubeš 47
 Kubínová 33
 Kummerová 99
 Laňková 29
 Lapitan 87
 Leitch 44
 Le Trionnaire 18
 Lhotáková 33
 Libus 18
 Luo 87
 Lysak 15
 Lysák 44
 Macas 9, 10, 44, 56
 Majerová 68
 Mandáková 15
 Marçais 62
 Marková 69
 Martinová 70
 Martonová 71
 Matouš 80
 Matros 21
 Matušinsky 72
 Matyášek 73
 Melišová 74
 Milec 79
 Milotová 85
 Mock 21
 Moll 93
 Moravec 28, 53, 58, 83
 Motyka 75
 Mozgová 68, 76
 Mráčková 63
 Müller 76
 Navrátilová 56
 Němcová 77
 Neumann 10, 16, 44, 56
 Nezval 61
 Nocarová 78
 Nodzyński 27
 Novotny 20
 Nybom 64
 Oide 91
 Olejníčková 80
 Ostráková 84
 Pánková 79
 Peška 81
 Petrášek 29, 31, 47
 Pleskot 82
 Plchová 28, 53, 58, 83
 Podlipná 84
 Potocký 82
 Pouch 85
 Pouvová 86
 Prášil 23
 Procházková-Schrumpfová 24
 Prokeš 51
 Robert-Quatre 87
 Rolčík 25
 Rossignol 49
 Rotreklová 98
 Ruperti 80
 Ryšánek 86
 Řepková 94
 Shaw 49
 Schillerová 46
 Schwarzerová 96
 Smýkalová 88
 Snape 79
 Sobotka 52, 67
 Solnická 65, 89, 93
 Spitzer 72
 Staňková 87
 Steinbauerová 56
 Storch 8
 Suchánková 11
 Sýkorová B. 75
 Sýkorová E. 81
 Šafář 11, 12, 14, 45, 87, 90
 Šašek 91
 Šebesta 31
 Šimková 11, 12, 87, 90
 Škodáček 23
 Šmerda 98
 Šolcová 92
 Špačková 50
 Štěpán 65, 93
 Štorchová 19, 48, 76
 Tanaka 27
 Tejos 27
 Tichý 52
 Timofejeva 95
 Tvarůžek 72
 Twell 18
 Ullmannová 94
 Vaculová 85
 Vágner 50
 Vácha 57
 Valárik 77, 87, 95
 Vaněk 84
 Vaňková 48, 70
 Váňová 99
 Vašková 74
 Vavříková 84
 Vinklárková 88
 Vítámvás 23
 Vítková 65, 93
 Vlček 9
 Vondráková 50
 Vosolsobě 96
 Vyskot 14, 26, 45, 69
 Werlemark 64
 Widmer 14
 Wilhelm 97
 Wilhelmová 97
 Zažímalová 29, 47
 Zdráhal 100
 Zedek 98
 Zezulka 89, 99
 Žárský 82
 Žďárská 100
 Žižková 75



Podrobný obsah

PŘEDNÁŠKY

Věk Darwina: Původ druhů po 150 letech	8
Nová generace sekvenačních technologií: principy a aplikace	9
454 Pyrosekvenování: volba pro nové genomové projekty	9
Využití 454 sekvenování pro analýzu repetitivní dna banánovníku (<i>Musa Acuminata</i> sp.)	10
Chromozomální genomika – klíč ke studiu velkých genomů	11
Konstrukce fyzické mapy chromozómu 3DS pšenice	12
Na co se můžeme ptát dvoudomých rostlin?	13
Srovnávací genomika pohlavních chromozomů rostlin aneb jak číst v „bakových“ knihovnách	14
Studium evoluce karyotypu v čeledi brukvovitých (<i>Brassicaceae</i>) metodou komparativního chromosomálního paintingu	15
Patenty – co, jak, kdy a proč	16
Analýza transkriptomu pomocí masivně paralelního sekvenování	16
Čipové technologie – možnosti a limity	17
Cell-specific molecular vectors for functional genomics	18
Využití třídění buněk (FACS) pro výzkum rostlin	18
Stanovení hladin transkriptů u rozvětvených rodin rostlinných genů představuje tvrdý oříšek – jde však rozlousknout	19
Metody analýzy epigenomu	19
Modelujeme s modely aneb predikce a analýza proteinových struktur	20
Hmotnostní spektrometrie v proteomice	20
Rostlinná fosfoproteomika	21
Studium protein-proteinových interakcí <i>in vivo</i> : Y2H, BiFC, MeRA	22
Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití ve výzkumu rostlinného proteomu	23
<i>In vitro</i> translace a imunoprecipitace: problémy a jejich řešení	24
Imunoafinitní purifikace v analýze fytohormonů	25
Epigenetika rostlin	26
A forward genetics screen – perspectives and pitfalls	27
Kterak ze dvou zmetků vytvořit funkční virus a k čemu je to dobré	28
Biolog statistikem nebo spíše statistika pro biologa?	29
Modelování toku auxinu – limity, úskalí a perspektivy	29
Polarografie včera, dnes a zítra – 50 let od udělení Nobelovy ceny	30
Cestou konfokální mikroskopie	31
Praktický průvodce méně běžnými metodami konfokální mikroskopie u rostlin aneb konfokál není jen foťák na pěkné obrázky	31
Practical notes on fluorescence lifetime imaging	32
Analýza trojrozměrných dat získaných konfokální mikroskopií aneb co s daty s použitím stereologických metod	33
Deformace mezofylových pletiv v jehlicích smrku a jejich diferenciace po oxidativním působení ozonu nebo biotickými faktory	34
Proč nás lidi nemaj rádi: popularizace je nutnost, ne luxus. Jak na ni?	35

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Molecular and cytogenetic analysis of the biggest plant genomes	44
Evoluce velikosti genomů rostlin	45
Analýza distribuce satelitní dna v jaderném genomu zástupců čeledi <i>Musaceae</i> metodou FISH	46
Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) in plant cells	47
Využití UPL sond pro stanovení hladin exprese jednotlivých komponent signální dráhy cytokininů v rostlinách <i>Arabidopsis</i>	48
Analysis of DNA-binding proteins by FRAP and FLIP	49
Stanovení viability raných somatických embryí smrku ztepilého v průběhu kryoprezervace	50
Změny plynného prostředí při výrobě sladu	51
Towards an understanding of pilin protein functions in the biogenesis of chlorophyll-protein complexes in <i>Cyanobacteria</i>	52
Expression and purification of experimental therapeutic anti-HPV vaccine using plant virus	53



Podrobný obsah

Detection of volatile chlorinated hydrocarbons emitted from the forest ecosystem	54
3' race as a method to study gene family members in plant genomes	55
Klonování cDNA kódující centromerickou variantu histonu H3 metodami RT-PCR a RACE	56
Localization of Pcb antenna complexes in the photosynthetic prokaryote <i>Prochlorothrix hollandica</i>	57
Systemic movement of C-terminally modified Potato virus X in <i>Nicotiana benthamiana</i> plants	58
Využití metody průtokové cytometrie v experimentální botanice a zoologii	59
Interactions of the receiver domain in histidine kinase receptors with the AHP proteins	60
Extrakce vybraných karotenoidů a fenolických látek z křídlatky (<i>Reynoutria</i> spp.), UV-vis spektrofotometrická a HPLC-DAD analýza získaných extraktů	61
Vliv teploty na rychlost odumírání olší způsobené <i>Phytophthora alni</i>	62
Využití genetických markerů při studiu determinace pohlaví a pohlavních chromozomů rodu <i>Silene</i>	63
Evidence for a dominant expression of rDNA loci on bivalent forming chromosomes in pentaploid dogroses (<i>Rosa</i> sect. <i>Caninae</i>)	64
Matematická analýza produkčního procesu rostlin hrachu setého ovlivněného xenobiotiky a osmotickým stresem	65
Využití DNA čipu DART pro studium genomu trávnickových a pícninových trav	66
Chlorophyll synthesis under control – regulatable expression of the Ipor enzyme in <i>Synechocystis</i> PCC 6803	67
Hypomethylace DNA neovlivňuje délku rostlinných telomer	68
Nové možnosti využití metody GISH u rostlin	69
Determination of polyamines under heat stress in tobacco plants	70
Konce chromozómů u rostlinnej čeľade Alliaceae	71
Navržení primerů pro diagnostiku patogenů rostlin pomocí PCR	72
Double stranded conformation polymorphism analysis of parental satellite repetitive sequences in allotetraploid <i>Nicotiana glauca</i>	73
Vliv exogenní ABA na stresovou odezvu různých odrůd ječmene hodnocenou na úrovni změn ve vodivosti průduchů a exprese dehydrinových genů	74
Enhanced <i>in vitro</i> activity of cytokinin oxidase/dehydrogenase in plant crude enzyme preparations in the presence of 2,6-dichloroindophenol (or other electron acceptors) in the radioisotope assay	75
Analýza délky telomer u mutantů CAF1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
Mapping of mitochondrial <i>atp1</i> mRNA termini in <i>Silene vulgaris</i> by primer extension and RNA ligation	76
Použití genových sekvencí pro objasnění fylogenetických vztahů v rámci čeledi <i>Musaceae</i>	77
Aplikace 5-azacytidinu umožňuje <i>de novo</i> regeneraci rostlin bramboru s obnovenou expresí umlčených transgenů	78
Towards fine mapping of the <i>QFt.CRI-3B.1</i> QTL in wheat using new genic markers	79
Pre-symptomatic detection of <i>Plasmopara viticola</i> infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging	80
<i>Cestrum</i> (Kladivník) – zástupce dvouděložných rostlin s neobvyklými telomerami	81
<i>In silico</i> analysis of lipid kinases	82
Chimeric plant viruses as tools for peptide display and experimental vaccine development	83
Studium stresové odpovědi rostlin na úrovni proteomu pomocí 2D-PAGE (možností a úskalí)	84
Stanovení tvrdosti zrna u československých odrůd pšenice seté (<i>T. aestivum</i>) prostřednictvím molekulárních markerů	85
Inovovaná metodika tekutých živných půd pro testování antibakteriálních vlastností látek (<i>in vitro</i>)	86
Poziční klonování genu pro rezistenci k mšici žhoubné (<i>Diuraphis noxia</i>)	87
Digitální zpracování obrazu v genetických kolekcích plodin	88
Využití suspenzní kultury BY-2 pro studium vlivu organického polutantu	89
Příprava chromozómově specifických BAC knihoven DNA pro genomiku pšenice	90
Transformace fytopatogenních hub reportérovými geny pro vizualizaci mycelia v rostlinných pletivech	91
Identification of regulatory <i>cis</i> -elements in promoters of pollen-expressed genes	92
Použití statistických a matematických metod při analýze faktorů ovlivňujících tuberizaci <i>in vitro</i>	93
Hledání DNA polymorfních sekvencí spojených s vyšší vitalitou obilí jarního ječmene	94
Poziční klonování u velkých a komplexních genomů: studie kolinarit genomů jako nástroj pro klonování genu rezistence k Padlí travní <i>QPm.tut-4A</i>	95
Izolace proteinů zprostředkávajících interakci mezi plasmatickou membránou a mikrotubulárním cytoskeletem	96
Oxidative damage to isolated chloroplasts induced by <i>in vitro</i> system	97
Quantification of retrotransposons in genus <i>Eleocharis</i> using degenerate real-time PCR	98
The use of biochemical and physiological parameters for evaluation of phytotoxicity of organic compounds	99
Quantitative differential analysis of plant proteome in a response to hormonal regulations	100



Seznam účastníků

Albrechtová Jana	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Katedra fyziologie rostlin Viničná 5, 128 44 Praha 2 albrecht@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 694
Ambrožová Kateřina, Mgr.	MU Brno, PřF, ÚEB, OFGP Kotlářská 2, Brno, 611 37 katula@mail.muni.cz, tel.: +420 607 156 127
Barek Jiří, Prof. RNDr., CSc.	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie Albertov 6, Praha 2, 12843 barek@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 224
Bartoš Jan, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 bartos@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 881
Bradáčová Marta, Ing.	MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 bradacov@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 136
Burketová Lenka, Ing., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 burketova@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108
Čegan Radim, Ing.	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně Zemědělská 1/1665, Brno, 613 00 cegan@ibp.cz, tel.: +420 541 517 194
Čeřovská Noemi	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 cerovska@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 320 338
Čížková Jana, Mgr.	Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 cizkova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 861
Čovanová Milada, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha, 165 02 covanova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 431
Dědič Petr, Ing.	Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 580 01 dedic@vubhb.cz, tel.: +420 605 875 454
Dinh Kim Phuong, Ing.	VŠCHT Technická 3, Praha 6, 166 28 dinhkimp@vscht.cz, tel.: 776 464 686
Dobrá Jana, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 dobra@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 426
Drdová Edit	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 drdova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 449



Seznam účastníků

Dupláková Nikoleta, RNDr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje , 165 02 duplakova@ueb.cas.cz, tel.: 225106452
Dvořáčková Martina, Mgr.	BFÚ AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, Brno, 612 65 mdvorackova@ibp.cz, tel.: +420 549 495 601
Dvořáková Lenka	Přírodovědecká fakulta UK v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 43 dvorakova.lenka@gmail.com, tel.: +420 221 951 688
Eliášová Kateřina	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 eliasova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 402
Fíla Jan	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 fila@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 452
Fišerová Helena, Dr. Ing.	MZLU v Brně Zemědělská 1, Brno, 613 00 hfiser@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 015
Foldynová Markéta, Mgr.	Ant. Barcala 29, České Budějovice, 370 05 meta@email.cz, tel.: +420 737 835 360
Folwarczna Jitka, RNDr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 folwarczna@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108
Forczek Sándor, Ph.D.	Institute of Experimental Botany AS CR, v.v.i. Rozvojová 263, Prague 4, 165 02 alex067@biomed.cas.cz, tel.: +420 241 062 484
Fulneček Jaroslav, Mgr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, Brno, 612 65 fulnecek@ibp.cz, tel.: +420 541 517 230
Gajdošová Silvia	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 gajdosova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 436
Gardian Zdeno, Ph.D.	Biology Centre AS CR, v.v.i., Institute of Plant Molecular Biology Branišovská 31/1160, České Budějovice, 370 05 gardian@greentech.cz, tel.: 776 377 889
Gibalová-Bérešová Antónia, Mgr.	Univerzita Karlova v Praze, Katedra fyziologie rostlin Albertov 6, Praha 2, 128 43 gibalova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 451
Grunt Michal, Mgr.	Univerzita Karlova v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 43 grunt.m@centrum.cz, tel.: +420 774 557 377
Hafidh Said, Dr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 00 ssh7@leicester.ac.uk, tel.: 225 106 450



Seznam účastníků

Helekalová Zuzana, Bc.	Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Ústav molekulární biologie rostlin Branišovská 31/1160, České Budějovice, 370 05 sutura@centrum.cz, tel.: +420 387 775 511
Herbstová Miroslava, Mgr.	Biologické centrum, Ústav molekulární biologie rostlin Branišovská 31, České Budějovice, 370 05 herbstova@centrum.cz, tel.: +420 387 775 524
Hobza Roman	Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, Brno, 61265 hobza@ibp.cz, tel.: +420 541 517 203
Hoffmeisterova Hana	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 hoffmeisterova@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108
Horák Jakub, Dr.	ÚEB-OFGP PřF MU Kotlářská 2, Brno, 611 37 horakj@sci.muni.cz, tel.: +420 732 752 842
Horová Lucie, Mgr.	Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta MU Kotlářská 2, Brno, 611 37 lhorova@email.cz, tel.: +420 732 939 864
Hoyerová Klára, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 hoyerova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 436
Hrdinová Vendula, Ing.	ÚEB-OFGP PřF MU Kotlářská 2, Brno, 61137 v.hrdinova@email.cz, tel.: +420 608 124 010
Hrvolová Barbora, Bc.	Masarykova 410, Bohumín 1, 735 81 B.Hrvolova@seznam.cz, tel.: 605 297 802
Hřibová Eva, Mgr., Ph.D.	Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 hribova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 854
Husáková Eva, Mgr.	Přf UK, Katedra fyziologie rostlin Albertov 6, Praha 2, 128 43 e.hu@seznam.cz, tel.: +420 221 951 697
Chernavskiy Olexandr, Mgr.	Oddělení biomatematicy, Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i. Vídeňská 1083, Praha 4 Krč, 142 20 chernavsky@biomed.cas.cz, tel.: +420 296 442 274
Chocholová Eva, Ph.D.	Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Ústav molekulární biologie rostlin Branišovská 31/1160, České Budějovice, 370 05 zevka@email.cz, tel.: +420 387 775 545
Jana Feciková, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha, 165 02 fecikova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 451
Janečka Libor	MERCI, s. r. o. Hviezdoslavova 55b, Brno, 627 00 janecka@merci.cz, tel.: 602 410 197



Seznam účastníků

Janoušek Josef, Bc.	Mendlova Zemědělská a Lesnická Univerzita Zemědělská 1, Brno, 613 00 janousek.jose@gmail.com
Jedelský Petr, Mgr.	PřF UK Viničná 7, Praha 2, 128 44 jedelsky@natur.cuni.cz, tel.: 606 954 770
Kaiserlichová Jana	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, Brno, 612 65 kaiserlichova@ibp.cz, tel.: +420 541 517 152
Kandalcová Jana, Ing.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, Brno, 612 65 kandalcova@seznam.cz, tel.: 608 225 543
Khaitová Lucie, Mgr.	Oddělení molekulární epigenetiky – Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, Brno, 612 65 khaitova@ibp.cz, tel.: +420 541 517 152
Klemš Marek, RNDr.	MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 klems@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 296
Klímová Michala	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 klimovam@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 416
Koblížková Andrea, Mgr.	Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav molekulární biologie rostlin Branišovská 31/1160, České Budějovice, 370 05 andrea@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 513
Kocourková Daniela	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 kocourkova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 416
Kohout Ladislav, RNDr., DrSc.	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Flemingovo nám. 2, Praha 6, 166 10 kohout@uochb.cas.cz, tel.: +420 220 183 200
Kolář Jan, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 kolar@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 414
Komárek Arnošt	Katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy v Praze Sokolovská 83, Praha 8 – Karlín, 186 75 arnost.komarek@mff.cuni.cz, tel.: +420 221 913 282
Kopecký David	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 kopecky@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 857
Kopečná Jana, Mgr.	Ústav fyzikální biologie Zámek 136, Nové Hradky, 373 33 kopečna@alga.cz, tel.: +420 384 340 434



Seznam účastníků

Kordiovský Richard, Mgr.	Dynex Laboratories, s. r. o. Na Hanspaulce 6, Praha 6, 160 00 office@dynex.cz, tel.: +420 220 303 600
Kosová Klára, RNDr., Ph.D.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně, 161 06 kosova@vurv.cz, tel.: +420 233 022 443
Kovařík Aleš, RNDr.	Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky Královopolská, Br. 612 65 kovarik@ibp.cz, tel.: +420 541 517 178
Kozubek Aleš	Scintila, s. r. o. Mahlerova 25, Jihlava, 586 01 kozubek@scintila.cz, tel.: 731 565 104
Králová Eva, Ing.	Immunotech, a. s. Radiová 1, Praha 10 – Hostivař, 102 27 ekralova@beckman.com, tel.: 737 624 963
Krčková Zuzana	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 cajdz@seznam.cz, tel.: 739 436 787
Krpeš Václav, Doc. Dr.	Přírodovědecká fakulta 30. dubna 22, Ostrava, 701 03 vaclav.krpes@osu.cz, tel.: 777 676 310
Křeček Pavel	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 krecek@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 431
Kubeková Hana, Mgr.	Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, Brno, 612 65 hanka83@gmail.com, tel.: +420 541 517 194
Kummerová Marie	ÚEB PřF MU Brno Kotlářská 2, Brno, 611 37 kumerova@sci.muni.cz, tel.: +420 532 146 225
Langhansová Lenka, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 langhansova@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 022 213
Laňková Martina	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 lankova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 431
Libus Jiří, RNDr., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 libus@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 429
Lukšanová Hana	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 luksanova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 426
Macas Jiří	Biologické centrum AV ČR Branišovská 31, České Budějovice, 370 05 macas@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 516



Seznam účastníků

Majerová Eva	Masarykova Univerzita Brno, PřF, ÚEB ABVMK Kotlářská 2, Brno, 611 37 maja.eva2@gmail.com, tel.: +420 776 742 984
Mandáková Terezie, Mgr.	Masarykova univerzita Kotlářská 2, Brno, 611 37 tereziem@sci.muni.cz, tel.: +420 549 495 601
Marcela Kalousová, Bc.	VŠCHT Technická 3, Praha 6, 166 28 kalousom@vscht.cz, tel.: +420 220 444 341
Marková Michaela, RNDr.	Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta Kotlářská 2, Brno, 611 37 m.markova@email.cz, tel.: +420 532 146 271
Martincová Olga	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 martincovao@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 405
Martinec Jan, RNDr., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 martinec@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 416
Martonová Martina, RNDr.	Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experim. biologie 4010 Kotlářská 2, Brno, 611 37 fajkus@sci.muni.cz, tel.: +420 549 494 003
Matoušková Jindřiška, PharmDr.	VŠCHT Technická 3, Praha 6, 166 28 jinmat@centrum.cz, tel.: +420 220 444 341
Matušínský Pavel, Mgr., PhD.	Agrotest fyto, s.r.o. Havlíčková 2787, Kroměříž, 767 01 matusinsky@vukrom.cz, tel.: +420 573 317 113
Matušová Kateřina, Ing.	Masarykova univerzita Kotlářská 2, Brno, 611 37 matusova@sci.muni.cz, tel.: +420 549 495 601
Matyášek Roman, RNDr., CSc.	BFÚ AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 matyasek@ibp.cz, tel.: +420 541 517 230
Melišová Lucie, Ing.	MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 xmelisov@node.mendelu.cz, tel.: +420 545 133 124
Milec Zbyněk, Ing.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, Praha 6, 161 06 milec@vurv.cz, tel.: +420 233 022 390
Mokroš Petr	MU Brno, PřF, ÚEB, OFGP Kotlářská 2, Brno, 611 37 mokros@sci.muni.cz, tel.: +420 549 494 537



Seznam účastníků

Moravec Tomáš, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Na Karlovce 1a, Praha 6, 16000 moravec@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 108
Motyka Václav, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 16502 vmotyka@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 437
Mozgová Iva	Masarykova univerzita, PřF, ÚEB – ABVMK Kotlářská 2, Brno, 61137 iva.mozgova@gmail.com, tel.: +420 549 495 281
Müller Karel, Ph.D.	Institut Experimentální Botaniky AC ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 16502 muller@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 420
Návarová Hana, Ing.	Plant Biology, Department of Biology, University of Fribourg Route Albert Gockel 3, CH-1700 Fribourg, Switzerland hance.n@email.cz, tel.: 776 151 412
Navrátilová Alice, Ph.D.	Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Ústav molekulární biologie rostlin Branišovská 31/1160, České Budějovice, 37005 navratil@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 511
Němcová Pavla, Mgr.	Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Sokolovská 6, Olomouc, 77200 nemcova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 860
Neumann Pavel, Ing.	Biologické centrum AV ČR, v. v. i. Branišovská 31, České Budějovice, 37001 neumann@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 516
Niedermeierová Hana, RNDr.	BC AV ČR, ÚMBR, v. v. i. Branišovská 31, České Budějovice, 37005 hani@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 515
Nocarová Eva, RNDr.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy Albertov 6, Praha 2, 12843 evanocarova@seznam.cz, tel.: +420 221 951 707
Nodzynski Tomasz	Ghent University Technologiepark 927, Ghent, 9052 tonod@psb.vib-ugent.be, tel.: 0032 933 13 809
Novák Petr	Biologické centrum Akademie věd České republiky, v. v. i. Branišovská 31, České Budějovice, 37005 petr@umbr.cas.cz
Nováková Lucie, Mgr.	M.G.P., spol. s r. o. Kvítková 1575, Zlín, 76001 novakova@mgp.cz, tel.: 777 771 274
Novotný Marian, Ph.D.	PřF UK Univerzita Karlova v Praze Viničná 7, Praha 2, 12843 marian@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 769



Seznam účastníků

Olejníčková Julie, Mgr., Ph.D.	Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, v. v. i. Na Sádkách 7, České Budějovice, 370 05 olejnickova@greentech.cz, tel.: 775 961 972
Pánková Kateřina, Mgr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Drnovská 507, Praha 6, 161 06 k.pankova@vurv.cz, tel.: +420 233 022 331
Pařezová Markéta, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 parezova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 431
Patzak Josef, Ing., Ph.D.	Chmelařský institut, s. r. o. Kadaňská 2525, Žatec, 438 46 j.patzak@telecom.cz, tel.: 415 732 109
Pejchar Přemysl	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 pejchar@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 418
Peška Vratislav, Mgr.	BFÚ AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, BRNO, 617 65 vpeska@ibp.cz, tel.: 739 439 215
Petrášek Jan, RNDr., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 petrasek@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 425
Pičmanová Martina	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 picmanov@natur.cuni.cz, tel.: 732 502 473
Pleskot Roman	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 pleskot@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 457
Plchová Helena	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 plchova@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 320 338
Podlipná Radka, Dr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha, 166 00 podlipna@ueb.cas.cz, tel.: +420 233 022 21
Potocký Martin, Ing., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 potocky@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 457
Pouch Milan, Mgr.	Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s. r. o. Havlíčková 2787, Kroměříž, 767 01 milpouch@centrum.cz, tel.: +420 573 317 113
Pouvová Dagmar, Ing.	Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra ochrany rostlin Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbát, 165 21 pouvova@af.czu.cz, tel.: 736 434 618



Seznam účastníků

Prášil Ilja Tom, Dr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby Drnovská 507, Praha 6, 161 06 Prasil@vurv.cz, tel.: 605 100 566
Predajňa Lukáš, Mgr.	Virologický ústav SAV Dúbravská cesta 9, Bratislava, 845 05 viruluke@savba.sk, tel.: +421 259 302 447
Procházková-Schrumpfová Petra, Ph.D.	Masarykova universita, Přírodovědecká fakulta, ÚEB, ABVMK Kotlářská 2, Brno, 611 37 schpetra@centrum.cz, tel.: +420 549 498 137
Ptáček Jiří, RNDr.	Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 580 01 ptacek@vubhb.cz, tel.: +420 569 466 231
Rejthárková Ivana	Scintila, s. r. o. Mahlerova 25, Jihlava, 586 01 rejtharkova@scintila.cz, tel.: +420 567 302 681
Robert-Quatre Heda, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 robert-quatre@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 860
Rolčík Jakub	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Šlechtitelů 11, Olomouc, 783 71 jakub.rolcik@seznam.cz, tel.: +420 585 634 864
Roman Vlček, Ing.	Immunotech, a. s. Radiová 1, Praha 10 – Hostivař, 102 27 rvlcek@beckman.com, tel.: 737 251 897
Řezka Milan, RNDr.	EPPENDORF Czech & Slovakia, s. r. o. Kolovratská 1476, Říčany u Prahy, 251 01 milan.rezka@eppendorf.cz, tel.: 724 111 874
Sedláček Tibor, Ing.	Výzkumné centrum SELTON, s. r. o. Stupice 24, Sibřina, 250 84 laborator@selgen.cz, tel.: 281 012 458
Seifertová Daniela	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 seifertova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 425
Smetana Ondřej	Katedra Fyziologie rostlin PřF UK v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 43 ondrejsmetana@centrum.cz, tel.: +420 221 951 688
Smykalová Iva, Ing., Ph.D.	Agritec Plant Research, Ltd. Zemědělská 16, Šumperk, 787 01 smykalova@agritec.cz, tel.: 583 382 120
Sofrová Danuše	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta Albertov 6, Praha 2, 128 43 sofrova@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 276
Solnická Pavla, Ing.	MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 Pavla.Solnicka@seznam.cz, tel.: 724 111 757



Seznam účastníků

Srba Miroslav, RNDr.	Přírodovědecká fakulta UK Albertov 6, Praha 2, 128 44 srba@sarracenia.cz, tel.: +420 221 951 707
Steinbauerová Veronika,	Biologické centrum AV ČR, ÚMBR Branišovská 31, České Budějovice, 370 05 v.steinbauerova@post.cz, tel.: +420 387 775 511
Storch David, Doc.	Centrum pro teoretická studia, Universita Karlova v Praze Jilská 1, Praha 1, 110 00 storch@cts.cuni.cz, tel.: +420 603 469 579
Šafář Jan, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 safar@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 880
Šašek Vladimír	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00 sasek@ueb.cas.cz, tel.: 732 628 651
Šebesta Ondřej, Mgr.	PřF UK Viničná 7, Praha, 128 44 OndrejSebesta@seznam.cz, tel.: +420 221 951 943
Šimková Hana, Ing., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 simkovah@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 854
Škodáček Zbyněk, Ing.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně, 161 06 skodacek@vurv.cz, tel.: 605 716 903
Šolcová Katarzyna, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 matczuk@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 451
Štěpán Zdeněk, Bc.	MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 klems@mendelu, tel.: +420 545 133 296
Štorchová Helena, RNDr., CSc.	Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 storchova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 433
Šušla Martin, RNDr.	Sigma-Aldrich, spol. s r.o. Sokolovská 100/94, Praha 8, 186 00 martin.susla@sial.com, tel.: +420 246 003 200
Tichá Ingrid, Doc. RNDr., CSc.	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, kat. fyziol. rostlin Viničná 5, Praha 2, 128 44 iticha@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 683
Toupalová Hana	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 toupalova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 458
Udavský Martin, Ing.	Dialab, spol. s r.o. Nám. Osvooboditelů 1, Praha 5 – Radotín, 153 00 martin@dialab.cz, tel.: 602 302 159



Seznam účastníků

Ullmannová Kamila, Ing.	MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 k.ullmannova@seznam.cz, tel.: +420 545 133 123
Valárik Miroslav, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 valarik@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 205 857
Váňová-Nečasová Lucie, RNDr.	ÚEB PřF MU Brno Kotlářská 2, Brno, 611 37 vanoval@sci.muni.cz, tel.: +420 532 146 225
Vlček Čestmír, Ph.D.	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. Vítězská 1083, Praha, 142 00 vlcek@img.cas.cz, tel.: 606 533 732
Vosolsobě Stanislav, Bc.	Katedra fyziologie rostlin, lab. prof. Opatrného Viničná 5, Praha 2, 128 44 vosolsob@natur.cuni.cz, tel.: 728 460 417
Vyskot Boris, Prof. RNDr., DrSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 vyskot@ibp.cz, tel.: +420 541 240 500
Wilhelmová Naďa, Dr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6, 165 02 wilhelmova@ueb.cas.cz, tel.: +420 224 310 109
Zachová Dagmar, RNDr.	Masarykova univerzita PřF 4010 Ústav experimentální biologie Kotlářská 2, BRNO, 611 37 dasaz@sci.muni.cz, tel.: +420 549 495 601
Zedek František, Mgr.	Masarykova univerzita Kotlářská 2, Brno, 611 37 fzedek@gmail.com, tel.: 775 908 409
Zezulka Štěpán	ÚEB PřF MU Brno Kotlářská 2, Brno, 611 37 zezulka@sci.muni.cz, tel.: +420 532 146 225
Zima Jan, RNDr., CSc.	CHROMSPEC, spol. s r.o. Jindřicha Plachty 28, Praha 5, 150 21 zimachromspec@vol.cz, tel.: 318 599 083
Žabová Jana	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 zabovaj@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 431
Žďárská Markéta, Mgr.	ÚEB – OFGP PřF MU Kotlářská 2, Brno, 611 37 marketa.zdarska@gmail.com, tel.: +420 732 220 256
Žižková Eva, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje, 165 02 zizkova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 436

bulletin

České společnosti experimentální biologie rostlin
a Fyziologické sekce Slovenské botanické společnosti

podzim 2009
5. Metodické dny
sborník abstrakt

ISSN 1213-6670