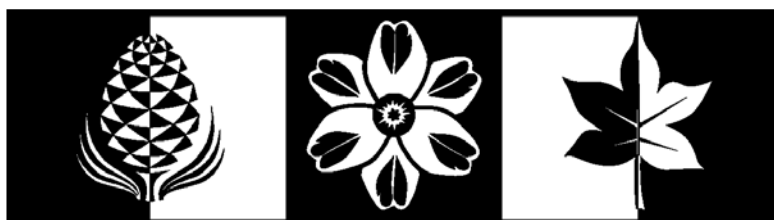




bulletin

České společnosti
experimentální biologie rostlin
a
Fyziologické sekce
Slovenské botanické společnosti



2014

6. Metodické dny
sborník abstrakt

Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin

Bulletin je vydáván s finanční podporou Akademie věd ČR.
Registrační číslo MK ČR E 13255

2014

Číslo 2/2014, ročník 14. Vychází jednou až dvakrát ročně.

Toto číslo bylo dáno do výroby v říjnu 2014.

Hlavní redaktor:

Jan Krekule, e-mail: krekule@ueb.cas.cz

Členové redakční rady:

Lubomír Adamec, e-mail: adamec@bitbn.cas.cz

Jana Albrechtová, e-mail: jana.albrechtova@natur.cuni.cz

Jaroslava Dubová, e-mail: dubova@sci.muni.cz

Helena Hniličková, e-mail: hilickova@af.czu.cz

Ludmila Ohnoutková, e-mail: ludmila.ohnoutkova@upol.cz

Ondřej Prášil, e-mail: prasil@alga.cz

Ludmila Slováková, e-mail: slovakova@fns.uniba.sk

Redaktoři tohoto čísla:

Jana Albrechtová, e-mail: jana.albrechtova@natur.cuni.cz

Jan Martinec, e-mail: martinec@ueb.cas.cz (část: sborník konference)

Lenka Sikorová, e-mail: dvorak27@natur.cuni.cz

Distribuce:

Václav Motyka, e-mail: motyka@ueb.cas.cz

Sazba a zlom: TFSOft, www.tfsoft.cz

Tisk: Tiskárna Osík, 569 67 Osík u Litomyšle 116, www.tiskarnaosik.cz

1. vydání

Náklad 300 výtisků

Toto číslo neprošlo jazykovou ani redakční úpravou.

ISSN 1213-6670

6. METODICKÉ DNY

HOTEL JEZERKA, SEČ
19.–22. ŘÍJNA 2014

PROGRAMOVÁ RADA

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

ORGANIZAČNÍ TÝM

Jan Martinec
Jitka Brouzdová
Michal Daněk
Zuzana Krčková
Přemysl Pejchar
Kateřina Raková
Kateřina Vltavská



Další informace najdete na

<http://www.ueb.asuch.cas.cz/methods>

S Sponzoři

SYMPOZIUM SE KONÁ DÍKY FINANČNÍ PODPOŘE TĚCHTO FIREM:



OBSAH

Úvodní slovo k 6. Metodickým dnům	29
Program	30
Přednášky (řazeny podle programu).	32
Plakátová sdělení (řazena abecedně podle příjmení prezentujícího autora)	73
Rejstřík autorů	128
Podrobný obsah	130
Seznam účastníků.	132

ÚVODNÍ SLOVO K 6. METODICKÝM DNŮM

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

dostalo se mi milé příležitosti napsat pár slov úvodem a přivítat Vás na 6. Metodických dnech.

Nechci připravovat o moment překvapení, přesto mi dovolu, abych Vás seznámil s tím, co Vás v nejbližších třech dnech čeká. Program je opravdu hodně nabitý. Hned první den na nás zaútočí sofistikované technologie odehrávající se převážně v šumu počítačových obvodů a luštící s neomylnou přesností tajemství chromosomů a genomů. Vedle statického popisu sekvencí DNA se seznámíme s metodami, které umožňují jako poprvé v historii cíleně opravit naše poškozené geny. Dostanou se k Vám poznatky o způsobu dešifrování epigenetické informace skryté ve formě složitých nukleoproteinových komplexů. Tím se konference zvolna přehoupne do druhého dne, kdy bude pojednáno o současných možnostech analýzy proteinů a enzymů. Třetí den nám pak poodhalí tajemství mikroskopických struktur buněk, organel a molekulárních komplexů. Historie Metodických dnů se začala psát již v tehdejší Československu kolektivem nadšených třicátníků, kteří byli motivováni snahou nabídnout pohled na co možná nejširší spektrum metod experimentální práce s živými buňkami, molekulami DNA, RNA, proteinů a biologicky aktivními látkami. První konference se konala před více než 15 lety ve Vranovské Vsi nedaleko rakouských hranic. Přednášek bylo tehdy jen pár a řada výsledků byla prezentována mladými začínajícími vědci nebo studenty. Je potěšitelné, že z mnohých se během času staly význačné vědecké osobnosti, z nichž někteří „metody“ pojali jako hlavní součást svého celoživotního bádání. První konference v roce 1997 se zúčastnilo 60 účastníků, zatímco dnes v Seči je nás 150. Že by zákon inflace nebo že by snad šlo dnes více peněz do vědy než tehdy? Chyba lávky, ani jedno ani druhé. Větší zájem je jednoduše dán skutečností, že věda a výzkum jsou stále více hnány kupředu novými technologiemi. Tento trend se dá vysledovat i nazpět v čase. Milníkem se v tomto směru staly Metodické dny 2003 na Červenohorském sedle, kde poprvé zazněly přednášky z bioinformatiky, tehdy ještě přijímané zavilými experimentátory s rozpaky. Dnes *in silico* metody tvoří více než 30 % programu. Proto složení sekcí je takové, jaké je, a já jen doufám, že se Vám náročná tematika bude líbit. Rovněž je mým skromným přáním, aby se nám biologie z přednáškových sálů tak úplně nevytratila. I proto jsou do programu tradičně zařazovány přednášky „Z jiných světů“. Jejich posláním je nejenom zpestření odborného programu, ale i uvědomění, že technologie jsou pouze nástrojem pro získávání poznatků využitelných dále v praxi. Samotné prostředí „Metodických dnů“ je pečlivě vybíráno, tak abyste mohli relaxovat uprostřed přírody, na některém z alternativních výletů nebo při dvojce moravského vína.

Vždy je co zlepšovat, vždy je možné dělat věci jinak. Mnoho dobrých nápadů vzniklo na podkladě kritiky z řad účastníků. Proto nás ani letos nešetřete, zpětná vazba je důležitá.

Přeji Vám krásný pobyt na letošních Metodických dnech a dobrou zábavu.

V Seči, 19. října 2014

Aleš Kovařík

P Program

NEDĚLE 19. 10. 2014

16.00–19.30	Registrace
18.30–19.30	Večeře
19.30–19.45	Zahájení konference
	Sekce: Z jiných světů (moderuje: V. M. Šásek)
19.45	<i>P. Vogelová (Národní muzeum):</i> Jan Calábek / Věda, film a umění k potěše včel, básníků a botaniků 32 Get-together („hovor. – sraz, slezina, seznamovací večírek“)

PONDĚLÍ 20. 10. 2014

7.30– 8.30	Registrace
	Sekce: Genomika a bioinformatika (předseda/předsedkyně: A. Kovařík, H. Štorchová)
8.30– 8.50	<i>H. Šimková (ÚEB AV ČR):</i> Využití BioNano mapování pro analýzu a sekvenování rostlinných genomů 33
8.50– 9.10	<i>V. Hudzieczek (BFÚ AV ČR):</i> Precise genom editing in plants. 34
9.10– 9.40	<i>M. Žurovec (BC AV ČR):</i> Použití programovatelných nukleáz pro cílenou mutagenezi 35
9.40–10.15	Přestávka, prezentace firem, registrace
10.15–10.55	<i>K. Říha (CEITEC, MU):</i> Funkční genomika pro studium buněčného jádra. 36
10.55–11.15	<i>P. Cápál (CRH a ÚEB AV ČR):</i> Representative amplification of DNA from single plant chromosomes . . . 37
11.15–11.30	<i>T. Beseda (CRH a ÚEB AV ČR):</i> „Chromatin conformation capture“ jako nástroj pro studium struktury a funkce chromatinu 38
	Sekce: Z jiných světů (předseda/předsedkyně: A. Kovařík, H. Štorchová)
11.30–12.05	<i>J. Zástěra (Genomac International, s.r.o.):</i> Založení a život biotechnologické firmy v Čechách 39
12.00–13.30	Oběd
	Sekce: Z jiných světů (předseda: J. Macas, J. Hejátko)
13.30–14.15	<i>P. Juračka (PřF UK):</i> Metody zobrazení rostlin v mikro a makroměřítku 40
	Sekce: Genomika a bioinformatika (předseda: J. Macas, J. Hejátko)
14.15–14.55	<i>T. Košnar, D. Antoš, T. Rebok (CESNET):</i> Národní e-infrastruktura CESNET – komplexní informatické nástroje pro potřeby české vědy, výzkumu a vývoje 41
14.55–15.15	<i>P. Novák (BC AV ČR):</i> Využití MetaCentra pro analýzu biologických dat 42
15.15–15.40	<i>A. Domínguez Román (UNAM, Mexico):</i> Gene regulatory networks in the study of plastic cell differentiation in <i>Arabidopsis</i> leaves. 43
15.40–16.10	Přestávka, prezentace firem
16.10–16.50	<i>M. Eliáš (PřF OU):</i> Genomické přístupy ve studiu fylogeneze a makroevoluce (nejen) řas a rostlin 44
16.50–17.25	<i>H. Štorchová (ÚEB AV ČR):</i> The comparative studies of plant transcriptomes generated by RNA-seq 45
17.25–17.45	<i>P. Neumann (BC AV ČR):</i> Identifikace centromerických DNA sekvencí pomocí metody ChIP-seq a klastrovací analýzy 46
18.30–19.30	Večeře
	Firemní prezentace
20.00–20.15	<i>J. Zástěra (Carolina Biosystems):</i> GeneMarker® – unikátní softwarový nástroj pro genotypizaci – představení a aplikace 47
20.15–20.30	<i>Š. Růžicková, J. Nováková (BIO-RAD spol. s r.o.):</i> S3 Cell Sorter: Jednoduché automatizované sortování buněk. 48
20.30–20.40	<i>M. Blažová (BioTech a.s.):</i> Xceed your expectation 49

ÚTERÝ 21. 10. 2014

Sekce: **Proteiny** (předseda/předsedkyně: **J. Petrášek, O. Valentová**)

8.30– 9.00	<i>M. Potocký (ÚEB AV ČR):</i> Modelování struktur proteinu a jejich využití (nejen) v rostlinné biologii	50
9.00– 9.25	<i>R. Pleskot (ÚOCHB a ÚEB AV ČR):</i> Molekulová dynamika jako nástroj moderní biologie.	51
9.25– 9.50	<i>J. Hejátka (CEITEC, MU Brno):</i> structural biology in use: NMR, X-ray and molecular dynamics modeling in study on multistep phosphorelay signaling in plants	52
9.50–10.10	<i>Z. Gelová (CEITEC, MU Brno):</i> The application of immunomodulation approach in the cytokinin signaling research	53
10.10–10.40	Přestávka, prezentace firem	
10.40–11.10	<i>M. Hála (PřF UK):</i> Produkce rekombinantních proteinů a jejich využití v experimentální biologii rostlin. . .	54
11.10–11.30	<i>P. Junková (VŠCHT v Praze):</i> Hmotnostní spektrometrie v membránové proteomice	55
11.30–11.45	<i>B. Petrovská (CRH a ÚEB AV ČR):</i> Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. . . .	56
11.45–12.00	<i>L. Dokládál (BFÚ AV ČR, CEITEC, MU Brno):</i> Aplikace moderních biochemických a molekulárně-biologických metod na studium interaktomu telomerasy z <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
12.00–13.30	Oběd	
14.00–18.30	Exkurze – Hráz vodního díla Seč, skanzen Veselý Kopec, zřícenina hradu Lichnice	
18.30–19.30	Večeře	
19.30–20.15	Plakátová sekce – lichá čísla	
20.15–21.00	Plakátová sekce – sudá čísla	

STŘEDA 22. 10. 2014

Sekce: **Mikroskopie** (předseda: **R. Hobza, M. Potocký**)

8.30– 9.00	<i>J. Petrášek (PřF UK a ÚEB AV ČR):</i> Optical sectioning of plant samples with fluorescence microscopy. . . .	58
9.00– 9.20	<i>J. Humpolíčková (UFCHJH AV ČR):</i> Advanced fluorescence microscopy techniques investigating membrane organization and dynamics	59
9.20– 9.50	<i>G. Komis (CRH):</i> Superresolution structured illumination live imaging of plant cortical microtubule dynamics and organization	60
9.50–10.25	Přestávka, prezentace firem	
10.25–10.55	<i>K. Schwarzerová (PřF UK):</i> In vivo fluorescence probes for plant biology	61
10.55–11.25	<i>M. Pernisová (MU Brno):</i> In vivo fluorescence macroscopy in plants	62
11.25–11.55	<i>J. Fišerová (ÚMG AV ČR):</i> Imaging plant cell ultrastructure by field emission scanning electron microscopy	63
12.00–13.30	Oběd	

Sekce: **Z jiných světů** (předseda: **R. Hobza, M. Potocký**)

13.30–14.10	<i>M. Stella (FHS UK):</i> Když se kultury střetnou. Sachs, Darwin a disciplína rostlinné fyziologie.	64
14.10–14.50	<i>T. Feltl (TFSof):</i> Bádám, bádáš, bádáme – již od základní školy!	65

Sekce: **Mikroskopie** (předseda: **R. Hobza, M. Potocký**)

14.50–15.05	<i>S. Vosolobě (PřF UK):</i> Nová metoda pro stanovení afinity vazby periferního proteinu k plasmatické membráně.	66
-------------	---	----

Sekce: **Fenotypování, malé molekuly, ostatní** (předseda: **P. Smýkal**)

15.05–15.35	<i>O. Novák (ÚEB AV ČR):</i> High-resolution cell-specific analysis of phytohormones.	67
15.35–16.05	Přestávka, prezentace firem	
16.05–16.25	<i>N. Daňková (CEITEC):</i> Identifikace kandidátních genů signálních drah strigolaktonu u modelové rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> s využitím metody GWAS.	68
16.25–16.45	<i>M. Jansen (LemnaTech, Germany):</i> High-throughput phenotyping – A boost for genomics in the 21 st century	69
16.45–17.05	<i>K. Panzarová-Šimková (Photon Systems Instruments):</i> Chlorophyll fluorescence imaging as a powerful tool for high throughput phenotyping of early stress responses in plants	70
17.05–17.25	<i>J. F. Humplík (CRH a UP, Olomouc):</i> High-throughput biological testing and complex plant phenotyping . .	71
17.25–17.45	<i>T. Moravec (ÚEB AV ČR):</i> Porostou vám vaše rostliny i pod LEDEM?	72

18.30 **Raut**

20.00 **Zakončení konference, vyhlášení a vylosování vyvítězů, hudba k tanci (Kanci paní nadlesní)**

P Přednášky

JAN CALÁBEK / VĚDA, FILM A UMĚNÍ K POTĚŠE VČEL, BÁSNÍKŮ A BOTANIKŮ

PAVLÍNA VOGELOVÁ¹

¹ Národní muzeum, Vinohradská 1, 110 00 Praha 1

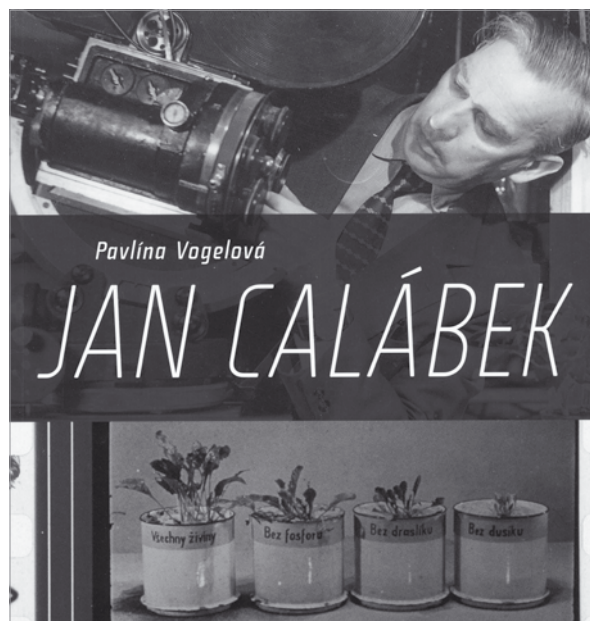
E-mail: pavlina_vogelova@nm.cz, tel.: +420 723 935 138

Fotografie a film obecně se od svého vzniku staly nedílnou součástí vědeckých výzkumů, experimentování a jejich dokumentování. Profesor Jan Calábek (1903–1992), brněnský vědec, botanik, pedagog, filmař a experimentátor v jedné osobě, se řadí k průkopníkům vědecké kinematografie světového významu. Jeho osobnost je propojena nejen s regionální historií Brna a brněnskými středními a vysokými školami, na kterých působil, ale i s dějinami české vědy a vědecké kinematografie, a to v úzkém propojení s Akademií věd České republiky a Krátkým filmem. Calábekův tvůrčí filmový přístup k vědeckému pojetí fyziologie rostlin dává příležitost nahlédnout do úplných počátků vývoje vědecké kinematografie ve světě i u nás. Otevírá diskusi o aplikaci filmu pro vědecké, školní, vzdělávací a osvětové účely, stejně tak nahlíží na fenomén vědeckého obrazu z pohledu vizuální kultury, experimentálního filmu a umění.

Calábekova časosběrná metoda natáčení života rostlinné říše získala významné mezinárodní renomé. Odkazuje na provázanost se světovými osobnostmi dějin vědecké kinematografie a přírodních věd jako byli např. francouzští vědci a experimentátoři Étienne-Jules Marey, Lucien Bull a Jean Painlevé nebo v Německu Wilhelm Pfeffer či Gotthard Wolf. V českém prostředí navazuje na Jana Evangelistu Purkyně, Bohumila Němce nebo Vladimíra Úlehlu. Paralelně s filmovou tvorbou se dotkáme okruhů botanického zájmu Jana Calábka. Byla to například problematika bobtnání agar-agaru, analýza výkonu rostoucí tkáně, aspekty růstu klíčnicích kořenů, fenomén autonomních pohybů rostlin nebo výzkum vlivu giberelinu na autonomní a ovlivněné pohyby rostlin. Během tvůrčí filmové práce se Calábekovi dostalo řady ocenění jak doma, tak i v zahraničí a jeho jméno bylo v roce 2003 zapsáno na seznam významných kulturních výročí UNESCO v Paříži.

Calábekovu tvorbu vymezují ve třech klíčovách obdobích. První je spojeno spoluprací s jeho předchůdcem Vladimírem Úlehlou v letech 1922–1947, tedy dobou experimentování a formování nejen českého vědeckého filmu s botanickou profilací. Léta 1948–1973 mapují samostatnou tvůrčí rovinu vědeckého výzkumu Jana Calábka, jeho pedagogické přístupy k výuce filmem, úspěchy a pronikání českého vědeckého filmu do zahraničí. Třetí období mapuje poslední Calábekovu tvůrčí i životní etapu do roku 1992, kdy se jeho aktivity koncentrují především na aplikaci vědeckého filmu pro vzdělávací a popularizační pořady pro Českou televizi. Škála filmové tvorby Jana Calábka z let 1928–1988 čítá asi 55 filmů. Zahrnuje filmy vědecké, populárně-vědecké, školní, vzdělávací i televizní. K nejvýznamnějším bezesporu patří *Starý smrk vypravuje* (1947), *Povrchové napětí* (1949), *Pohyby rostlin* (1955), *Autonomní pohyby* (1960), *Vliv giberelinu na růst a pohyb rostlin* (1961), *Jak rostliny rostou* (1963) nebo *Rostlina a tíže zemská* (1972). Originalita a vysoká vědecká, ale i umělecká hodnota časosběrné filmové tvorby Jana Calábka je podtržena vědeckou přesností, didaktickou přístupností a obrazovou atraktivností a sdělností.

Výstavní a knižní projekt věnovaný Janu Calábekovi byl realizován za grantové podpory Ministerstva kultury Věda a výzkum. V Moravské galerii v Brně byla realizována výstava „Jan Calábek: Věda, film a umění k potěše včel, básníků a botaniků“ (26. 4.–28. 7. 2013) a ve spolupráci s Nakladatelstvím Akademie múzických umění v Praze byla vydána publikace „Jan Calábek“ (2013).



VYUŽITÍ BIONANO MAPOVÁNÍ PRO ANALÝZU A SEKVENOVÁNÍ ROSTLINNÝCH GENOMŮ

HANA ŠIMKOVÁ¹, ALEX HASTIE², HELENA STAŇKOVÁ¹, JAN VRÁNA¹, PAUL VISENDI³, SATOMI HAYASHI⁴, JACQUELINE BATLEY⁴, DAVID EDWARDS³, JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc, ČR

² BioNano Genomics, 9640 Towne Centre Drive, San Diego, CA 92121, USA

³ Australian Centre for Plant Functional Genomics, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

⁴ School of Agriculture and Food Sciences, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

E-mail: simkovah@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 715

Nástup sekvenačních technologií nové generace (NGS) umožnil rychlé a cenově dostupné sekvenování celých genomů. Nevýhodou většiny NGS technologií je však relativně krátká délka čtení (zpravidla několik stovek párů bazí), což komplikuje sestavování celogenomových sekvencí, zvláště u genomů s vysokým podílem repetitivní DNA. To vyvolalo potřebu najít technologii, která by umožnila uspořádat krátké sekvenční kontigy v rámci delších úseků DNA a překlenout tak problematické oblasti repetice. Toho může být dosaženo párovým sekvenováním obou konců fragmentů DNA o délce několik kilobází (tzv. long mate-pair sequencing) nebo využitím sekvenačních technologií, které čtou úseky DNA o délce 10 kilobází a více (např. Pacific Biosciences nebo Moleculo). Tyto technologie jsou však poměrně nákladné a v případě PacBio zatížené vyšší chybivostí.

Alternativním a cenově dostupným řešením je vytváření map krátkých sekvenčních motivů (6–8 bp) v rámci úseků DNA o délce stovek tisíc až milionů párů bazí, které poskytují vodítko pro uspořádávání sekvenčních kontigů. Tento přístup, využívající analýzy jednotlivých dlouhých molekul DNA, je obecně znám pod názvem optické mapování (shrnují Neely *et al.* 2010). V současné době jsou využívány tři enzymatické přístupy pro vizualizaci krátkých sekvenčních motivů: 1) štěpení DNA fixované na mikroskopickém sklíčku (čipu) restriční endonukleázou, 2) štěpení nicking enzymem a fluorescenční značení jeho rekogničního místa a 3) značení DNA pomocí metyltransferázy.

Technologie firmy BioNano Genomics (Lam *et al.* 2012) využívá druhého zmiňovaného přístupu. DNA s fluorescenčně značeným sedminukleotidovým motivem je analyzována při pohybu sofistikovaným systémem nanokanáleků na mikročipu. Důležitá je dokonalá linearizace molekul DNA. Vysoce citlivá kamera pak umožňuje velmi přesné změření vzdálenosti mezi rekogničními místy použitého nicking enzymu. Výsledná genomová (chromozómová) mapa rekogničních míst může být využita k *de novo* sestavování genomové sekvence, ale také např. ke studiu distribuce tandemových repetice v rámci genomu nebo pro porovnávání struktury více genomů, tedy zejména identifikaci inzercí, delecí, inverzí nebo translokací.

Neely R.K., Deen J., Hofkens J. – *Biopolymers* 95(5): 298-311, 2010

Lam ET *et al.* – *Nat. Biotechnol.* 30(8): 771-776, 2012

Podporováno grantem GAČR P501/12/2554.

P Přednášky

PRECISE GENOME EDITING IN PLANTS

VOJTECH HUDZIECZEK

Institute of Biophysics, Kralovopolska 135, CZ-61200 Brno, Czech republic

E-mail: hudzieczek@ibp.cz

Recent outbreak of the next generation sequencing accelerated the number of genomes assembled and genes annotated. In contrary, the functional validation of newly identified genes and their introduction to the breeding programs remain a significant struggle for plant biologists. While conventional mutagenesis is time consuming and available for a limited number of model organisms, genome editing uses sequence specific nucleases with activity in broad spectra of plant species. The central idea of using nucleases lies in creation of the double strand breaks and using endogenous repair mechanisms to facilitate gene knock-out (targeted gene disruption) or knock-in (gene targeting). The most widely used nucleases – TALENs and CRISPR/Cas9 – are derived from the bacterial proteins and both have been successfully used in plant genome editing recently.

The crucial characteristics of TALENs and CRISPR/Cas9 will be presented as well as the approaches and workflows for their usage in plants. The experience with the genome editing of dioecious plant models studied in our laboratory will be discussed.

This work was supported by MEYS LH 14 002 and CSF P501/12/G090.

GeneMarker®
The Biologist Friendly Software

Unique Tools to Increase Genotyping Speed and Accuracy

Compatible with all Major Sequencing Systems

Embedded Applications Eliminate Data Transfer

SOFTGENETICS®
Software Power-Tools for Genetics Analysis



CarolinaBiosystems

Produkty pro molekulární biologii

Nabízíme kvalitní přístroje, chemii a software vyzkoušené v našich laboratořích za rozumnou cenu.

- pipety
- elektroforézy
- PCR thermocyklery
- izolační RNA, DNA kity
- chemii pro klonování
- spotřební materiál pro DNA sekvenátory
- analytický software

Carolina Biosystems, s.r.o.
Drnovská 1112/60
161 00 Praha 6

www.carolinabiosystems.com

POUŽITÍ PROGRAMOVATELNÝCH NUKLEÁZ PRO CÍLENOU MUTAGENEZI

MICHAL ŽUROVEC¹

¹ B. C. AV ČR, v. v. i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

E-mail: zurovec@entu.cas.cz

Zavedení metod editace genomu u celé řady modelových a nemodelových organismů v posledních několika letech otevřelo cestu využití obrovského množství genetických informací k terapeutickým a biotechnologickým aplikacím. Klíčem pro zavedení těchto metod jsou programovatelné nukleázy (PN), což jsou umělé nukleázy vytvořené na zakázku, schopné vytvářet dvojřetězcové zlomy v molekulách DNA na požadovaných místech. Existuje několik hlavních typů těchto enzymů – nukleázy na bázi zinkových prstů (ZFN), TAL efektorové nukleázy (TALENy) a nukleázy založené na adaptivním prokaryotickém imunitním systému CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR). Při opravách nehomologních konců, vzniklých působením nukleáz dochází často ke vzniku chyb (mutací), případně se mutace vytvářejí pomocí homologní rekombinace s donorovou DNA, jež funguje jako šablona pro opravy DNA. Tímto způsobem je možno označit mutaci dominantním markerem, případně zaměňovat jednotlivé aminokyseliny, vytvářet kondicionální alely atd.

Přednáška bude obsahovat popis jednoduchých aplikací programovatelných nukleáz, sestavování specifických ZFN a TAL modulů, *in vitro* syntéza TALENové RNA, příprava CRISPRových konstruktů, mikroinjikace a detekce mutací pomocí PCR analýzy. Některé postupy umožňují získat mutace již v generaci G1.

Takasu Y, Tamura T, Sajwan S, Kobayashi I, Zurovec M (2014) The use of TALENs for nonhomologous end joining mutagenesis in silkworm and fruitfly. *Methods* 69: 46–57

Takasu Y., Sajwan S., Daimon T., Osanai-Futahashi M., Uchino K., Sezutsu H., Tamura T., Zurovec M. (2013) Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS ONE* 8: e73458

Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M. (2010) Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem Mol Biol.* 40: 759–765

Podporováno grantem GAČR P305/10/2406.

P Přednášky

FUNKČNÍ GENOMIKA PRO STUDIUM BUNĚČNÉHO JÁDRA

K. ŘÍHA

CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

E-mail: karel.riha@ceitec.muni.cz

Metody sekvenování nové generace výrazným způsobem změnily styl práce mnoha výzkumných týmů. Relativně snadná produkce milionů sekvenovaných DNA úseků dává nové možnosti v kvantitativním měření biologických parametrů. Více méně každý fenotyp, který může být převeden na DNA sekvence, je nyní přístupný velice citlivé detekci a snadné kvantifikaci. Ve své přednášce zmíním několik konkrétních příkladů použití metodiky hlubokého sekvenování ke studiu struktury a funkce buněčného jádra.

Get phenotyping up to speed

Plant phenotyping is a rapidly evolving concept aiming at elucidating the functional role of gene networks under natural conditions. How do the interactions between the genome and the environment evolve, with respect to both quality and quantity? Introducing the new high throughput and high content plant phenotyping platform LemnaTec provides the technology to meet the challenge.



- fully automated 3D plant phenotyping
- visual light, chlorophyll fluorescence, near infra red and infra red imaging
- standardized growth conditions with the LemnaTec moving field concept
- automated weighing, watering and spraying of up to 4000 plants per day

REPRESENTATIVE AMPLIFICATION OF DNA FROM SINGLE PLANT CHROMOSOMES

PETR CÁPAL, JAN VRÁNA, MARIE KUBALÁKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Institute of Experimental Botany, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research,
Šlechtitelů 31, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic
E-mail: capal@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 714

Genetic information of eukaryotes is divided into distinct subunits called chromosomes. This property can be exploited to reduce nuclear genome complexity and facilitate its analysis, mapping and sequencing. Current flow sorters are capable of sorting thousands of particles per second, but can also be applied to sort one single particle, be it a chromosome or a nucleus, into appropriate vessel. The minute amounts of DNA obtained in this way, typically picograms DNA or less are not directly useful for downstream processing. Here we have optimized a protocol for amplification of DNA from single copies of plant chromosomes using multiple displacement amplification. The protocol utilizes high fidelity polymerase Phi29, which generates fragments exceeding 10 kbp and produces microgram amounts of DNA. This amount and quality of DNA makes the method suitable for a variety of applications. The fact that only one particle is used as a template opens new opportunities for the application of chromosome genomics, such as the analysis of meiotic recombination, haplotyping and allele phasing, as well as the analysis of genomic heterogeneity at single cell level. Furthermore this method enables obtaining chromosome-specific DNA in species in which individual chromosomes cannot be discriminated and purified.

This work has been supported by the Czech Science Foundation (award no. P501/12/G090) and by the National Program of Sustainability I (LO1204).

„CHROMATIN CONFORMATION CAPTURE“ JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM STRUKTURY A FUNKCE CHROMATINU

TOMÁŠ BESEDA, PETR CÁPAL, JAN VRÁNA, HANA ŠIMKOVÁ, JAROSLAV DOLEŽEL

Centrum Strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Šlechtitelů 31,
783 71 Olomouc

E-mail: beseda@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 728

Výzkum struktury jádra a chromatinu zaznamenal v posledním desetiletí velký rozmach, a to zejména díky zjištění, že DNA není náhodně kondenzovaná molekula v jádře, ale její uspořádání má své funkční opodstatnění na všech úrovních – od nukleosomů až po celé chromosomy. Při studiu vyšších struktur chromatinu jak na lokální, tak celogenomové úrovni se stále více uplatňuje metoda Chromatin Conformation Capture (3C) a různé její varianty (Wit and Laat 2012).

Metoda 3C je založená na statistické analýze kontaktů jednotlivých lokusů v populaci jader. Tyto kontakty jsou zachyceny díky fixaci chromatinových struktur *in vivo*. DNA v intaktních jádrech je fixována formaldehydem, štěpena restriktivní endonukleázou a následně ligována za zředěných podmínek. Takto je vytvořena 3C knihovna „spojů“, které pocházejí z kontaktů jednotlivých lokusů v rámci dané populace jader.

Podle účelu a rozsahu studie rozeznáváme několik variant „C“ metod, lišících se především druhem analýzy vytvořené knihovny a rozlišením; čím větší úsek analýza zahrnuje, tím je rozlišení menší. Při klasické 3C analýze (nejvyšší rozlišení) používáme PCR a studujeme funkční konformaci daného lokusu v závislosti na testovaných podmínkách, tedy porovnáváme dva funkční stavy. Nejčastěji se jedná o strukturně-funkční vlastnosti vzdálených enhancerů. Alternativou je 4C (Chromosome conformation capture-on-chip), kdy porovnáme frekvenci kontaktů způsobem „jeden se všemi“ a výsledkem je panel znázorňující frekvenci kontaktů všech míst v genomu vůči zvolenému cílovému lokusu. I zde jde obvykle o porovnání konformace dvou či více různých fyziologických stavů nebo pletiv. V případě, že si zvolíme více výchozích bodů analýzy po celém genomu, můžeme z dat vyvozovat základní strukturní vlastnosti genomu (např., které oblasti interagují obecně častěji se zbytkem genomu a které méně). Další z metod, 5C (chromosome conformation capture carbon copy) analýza, je založená na sekvenování. Zde porovnáme frekvenci interakcí stylem „mnoho vs. mnoho“ v rámci daného úseku genomu (stovky kb). Z této analýzy již můžeme odvozovat celkovou strukturu daného úseku a opět porovnávat konformaci mezi jednotlivými fyziologickými stavy či pletivy. Pro studium struktury chromatinu v rámci celých genomů či chromosomů slouží Hi-C analýza, která umožňuje analyzovat prakticky všechny zachycené kontakty. Tento přístup předpokládá znalost kompletní sekvence daného genomu (chromosomu), jelikož tyto kontakty musí být zpětně přiřazeny k příslušné genomové sekvenci. Pomocí Hi-C pak můžeme vytvářet modely chromatinové struktury v rámci celých genomů.

3C techniky jsou tedy universálním nástrojem pro studium strukturně-funkčních vlastností chromatinu na všech úrovních, od funkční dynamiky krátkých lokusů až po strukturní modely celých genomů a chromosomů.

Na posteru bude prezentována aplikace metod 3C a Hi-C na jádra rýže purifikovaná průtokovou cytometrií.

de Wit, E. and de Laat, W.: A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization., *Genes Dev.*, 26, 11–24., 2012

Podporováno grantem GAČR P501/12/2554.

P Přednášky

ZALOŽENÍ A ŽIVOT BIOTECHNOLOGICKÉ FIRMY V ČECHÁCH

JAN ZÁSTĚRA

Genomac International, s.r.o., Drnovská 1112/60, Praha, 161 00

E-mail: jzastera@genomac.cz

Společnost **Genomac** byla založena v roce 2001 sourozenci RNDr. Markem Minárikem, Ph.D. a RNDr. Lucií Benešovou, Ph.D., předními českými odborníky v oblasti genetiky a DNA analýz. Genomac se od svého vzniku profiluje jako laboratoř molekulární genetiky a onkologie a zaměřuje se na genetické testování pro potřeby určování otcovství, identifikace, příbuznosti a analýz DNA. V neposlední řadě provádí testování geneticky podmíněných druhů onemocnění a predikci účinnosti jejich léčby.

V roce 2006 společnost v České republice zavedla genetické testy předků pro účely genetické genealogie a stala se dominantním poskytovatelem genetických testů v rámci nového dynamického oboru tzv. rekreační genetiky. V následujících letech přibýly další testy zaměřené na průkaz vloh ovlivňující vlastnosti testovaných osob (fyzická výkonnost, sklony k závislostem apod.)

O rok později byl společnosti udělen statut Znaleckého ústavu pro obor zdravotnictví s rozsahem oprávnění pro genetiku a analýzy DNA včetně určování genetické identity.

V roce 2010 bylo v rámci výzkumu prováděného společností Genomac s podporou Evropského fondu pro regionální rozvoj založeno Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES).

V roce 2012 se společnost Genomac přestěhovala do nových laboratorních a kancelářských prostor administrativní budovy **Carolina centrum** v Praze 6 – Ruzyni.

Genomac je v současnosti jedním z největších soukromých center pro aplikovaný medicínský výzkum v České republice. Výsledky analýz prováděných laboratořemi Genomac se řídí standardizovaným systémem pro zdravotnické laboratoře ISO/IEC 15189.



15 years of solutions for life science



LABORATORY EQUIPMENT:

pipettes, balances, pH meters
centrifuges, cleaners, pumps
bathes, shakers, thermoblocks,
sterilization, decontamination (ClO₂)
refrigerators, freezers, deep freezers
laminary flow and biosafety cabinets
plantgrowth and climate chambers
bioreactors, fermentors, water purification

REAGENTS:

molecular biology
fluorescence detection
microarray, cloning
proteomics and genomics
PCR, qPCR, RT-PCR
expression systems

SPECIAL DEVICES:

freeze dryers, concentrators
PCR devices, cell counters
electrophoresis and blotting
power supplies, microscopes
nucleid acid isolators
detection of mutation, microarray
spectrophotometers
in-vivo imaging, software

OLIGONUCLEOTIDES SYNTHESIS:

primers and assays
probes and quenchers
DNA/RNA synthesis
modifications and freedom dyes
custom gene synthesis
gBlocks gene fragments

www.krd.cz

LABORATORY PLASTIC:

general laboratory plastic
tissue culture plastic
gloves, tips, PCR plastic,
special plastic for microscopy

SERVICES:

service and validation
preventive maintenance
decontamination (ClO₂)
post-warranty service
service laboratory
gene expression, PCR, microarrays
bioinformatics, gene profiling

Přednášky

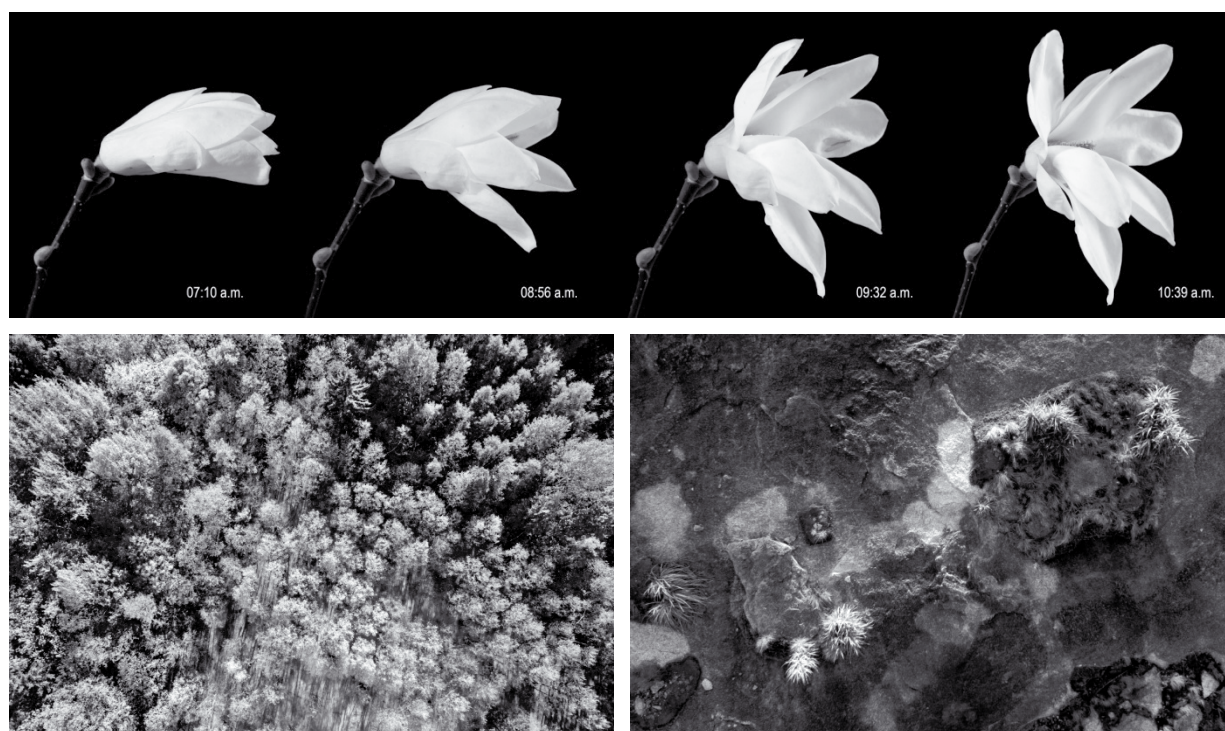
METODY ZOBRAZENÍ ROSTLIN V MIKRO A MAKROMĚŘÍTKU

PETR JAN JURAČKA¹

¹ katedra ekologie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Viničná 7, 128 44 Praha 2, ČR

E-mail: juracka@natur.cuni.cz, tel.: +420 723 119 339

Velké množství přírodovědeckých pozorování, ať již experimentálního, terénního nebo čistě náhodného původu, je spjata s vizuálním vnímáním světa. Barvy, tvary, ale i čas anebo změna perspektivy tak mohou výrazně ovlivnit dojem z právě pozorovaného jevu. Během své přednášky se pokusím nastínit, jaké možnosti skýtá cenově dostupná fotografická technika – od skládané makro a mikrofotografie s působivou hloubkou ostrosti, přes elektronovou skenovací mikroskopii a metody časosběrné, až po leteckou fotografii umožňující analýzu obrazu celých společenstev z ptačího pohledu za pomoci rádiem řízených dronů (multikoptér). Přednáška bude doprovázena praktickými ukázkami přímo na podiu.



NÁRODNÍ E-INFRASTRUKTURA CESNET – KOMPLEXNÍ INFORMATICKÉ NÁSTROJE PRO POTŘEBY ČESKÉ VĚDY, VÝZKUMU A VÝVOJE

TOMÁŠ KOŠNAR, DAVID ANTOŠ, TOMÁŠ REBOK

CESNET, zájmové sdružení právnických osob, Zikova 13a, 160 00 Praha 6
E-mail: kosnar@cesnet.cz, rebok@ics.muni.cz

Národní e-infrastruktura poskytuje celou řadu služeb použitelných pro řešení problémů z oborů, jež se neomezují na přírodní vědy, jako je matematika, fyzika, chemie či informatika, ale zahrnuje i vědy humanitní či umění. S pokračující digitalizací nejruznějších materiálů a rostoucím významem komunikačních technologií lze v současnosti jen stěží najít obor, kterému by e-infrastruktura neměla co nabídnout. Nejde zdaleka jen o komunikační infrastrukturu a síťové služby (až na výjimky postavené na optických vláknech, která umožňují dosahovat nejvyšších přenosových rychlostí), ale také velkokapacitní datová úložiště pro zálohování, archivaci a sdílení rozsáhlých dat (včetně služeb FileSender pro zasílání velkých souborů nebo OwnCloud pro ukládání a synchronizaci dat pro individuální uživatele). Využití výpočetních zdrojů pro řešení velmi náročných úloh, jež přesahuje možnosti samostatného pracoviště v ČR, umožňuje gridová výpočetní infrastruktura (MetaCentrum). Vzájemnou spolupráci a komunikaci distribuovaných týmu, jejichž členové pocházejí z různých institucí, měst, případně států, umožňují nástroje pro virtuální setkávání, obrazovou a zvukovou komunikaci a sdílení podkladů v reálném čase (video konference, web konference, streaming, přenosy v kvalitě HD, 2K, 4K, 3D).



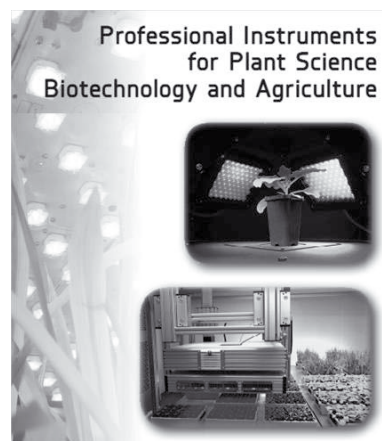
Since 20 years **PSI (Photon Systems Instruments)**, founded in 1994 in Brno, Czech Republic, has been specializing in the design and manufacture of sophisticated, high-end instrumentation for research in biological sciences.

Our products based on the latest techniques and components are used in scientific programs in many countries throughout the world.

The main product lines are: (1) devices for chlorophyll fluorescence measuring and advanced imaging; (2) high-tech photobioreactors and other algal cultivators; (3) intelligent growth chambers; (4) customized PlantScreen Phenotyping Systems; (5) wide range of hand-held instrumentation. Example of instrumentation developed for plant biotechnological research are chlorophyll fluorimeters, fluorescence imaging devices, compact hand-held instruments based on various optical signals, LED panels, growth chambers, large automated screening devices with integrated fluorescence, thermal and hyperspectral imaging and advanced micro-imaging and micro-manipulating devices.

Everyday contacts with researchers are the base of our policy of continuous development.

For more information please refer to our webpage www.psi.cz or contact us directly via email info@psi.cz.



P Přednášky

VYUŽITÍ METACENTRA PRO ANALÝZU BIOLOGICKÝCH DAT

PETR NOVÁK¹

¹ BC AV ČR, v. v. i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR
E-mail: petr@umbr.cas.cz

MetaCentrum je virtuální organizace Národní Gridové Iniciativy, která je volně dostupná všem akademickým pracovníkům i studentům. V době rychle narůstajícího objemu dat a široké dostupnosti nových technologií sekvenování, je výpočetní kapacita MetaCentra hojně využívána právě k řešení biologických problémů. To je usnadněno tím, že na MetaCentru je již k dispozici velké množství předinstalovaných aplikací využitelných v široké spektrum biologických oborů. Jak a jaký software lze na MetaCentru využívat v rostlinné biologii bude představeno v přednášce.

porvair
sciences

**specialista v oblasti
mikrotitračních produktů**

- **Plasty pro tkáňové kultury**
Kultivační láhve, destičky a misky
Sérologické pipety
Syringe filtry
- **Plast pro molekulární biologii**
PCR zkušavky, stripy a destičky
- **Skladování vzorků**
Skladovací destičky Deep Well
Centrifugační zkušavky
- **Ostatní produkty**
Filtrační destičky
Zásobníky pro automatizaci
SPE destičky
Evaporátory
Svářečka fólií

**15% SLEVA
NA VYBRANÉ
PRODUKTY**



M.G.P. spol. s r.o.
Kvítková 1575
760 01 Zlín
Czech Republic

E-mail: mgp@mgp.cz
Zelená linka: 800 125 890
www.mgp.cz
www.porvair-sciences.com

GENE REGULATORY NETWORKS IN THE STUDY OF PLASTIC CELL DIFFERENTIATION IN *ARABIDOPSIS* LEAVES

ANDREA DOMÍNGUEZ^{1,3}, MARIANA BENÍTEZ^{1,2}

¹ Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

² Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

³ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

E-mail: andreacb17@gmail.com, mbenitez@ieecologia.unam.mx

The accumulation of data from molecular genetic studies of development biology and genomics has enabled the generation and development of Gene Regulatory Network (GRN) models of cell differentiation and morphogenesis. In GRNs, genes, mRNA or proteins correspond to the network nodes and the links among nodes stand for regulatory interactions. These GRNs have been used to analyze the temporal change of concerted gene activities and the way in which genes are connected to each other. It has been suggested that the steady states in gene regulatory networks (called attractors) correspond to sustained gene activation profiles characteristic of particular cell types.

Epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana* leaves provides an excellent model for the study of cell differentiation and patterning formation. In particular, GRN models have been used to study cell fate determination and patterning of epidermal hairs, trichomes in the leaves. Dynamic network models and experimental evidence have suggested that cell patterning in this system is sensitive to a wide range of regulatory processes at different levels. For example, it has been shown that in the leaf epidermis, Gibberellins (GA) and Cytokinin (CK) signaling promotes trichome development, which could account for changes in trichome density and patterning during plant development. Plus, it has been found that environmental cues such as stress and herbivory also cause changes in the distribution and density of trichomes.

We set up to integrate the role of genetic and non-genetic mechanisms and the role of phenotypic plasticity in the formation and development of trichomes in the leaf epidermis of *Arabidopsis*. Since it is not yet well known which mechanisms are behind the plastic changes observed in trichomes patterns in response to different environmental stimuli, in our research, we propose to include signaling and interactions of some hormonal pathways and environmental cues such as stress and herbivory in the gene regulatory network determining trichomes that exists in *Arabidopsis*. This, to try to understand the role that these signals and their complex interactions have with *Arabidopsis* and how these interactions contribute with the origin and variation of trichome patterning. This work could help to understand the role of phenotypic plasticity in the development and in the origin of phenotypic variation, contributing in this way to the research program of developmental evolutionary ecology, eco-evo-devo.

GENOMICKÉ PŘÍSTUPY KE STUDIU FYLOGENEZE A MAKROEVOLUCE (NEJEN) ŘAS A ROSTLIN

MAREK ELIÁŠ¹

¹ Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra biologie a ekologie, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, ČR
E-mail: marek.elias@osu.cz, tel.: +420 597 092 329

Genomy organismů jsou v prvé řadě nesmírně složité buněčné struktury nesoucí většinu dědičné informace, která podmiňuje cyklické epigenetické „povstávání živého tvaru“ (tj. „realizaci fenotypu“). Proto jsou genomy předmětem intenzivního zájmu funkční biologie se snahou pochopit, jak se který element genomu na výše uvedených procesech podílí. Vedle toho jsou však genomy historicky vzniklými strukturami, jejichž současná podoba odráží nepředstavitelně komplexní sled evolučních událostí v průběhu miliard let existence života. Obrovskou výzvou pro biology nyní je pokusit se co nejpřesněji zrekonstruovat historii genomů a pochopit, jak tato souvisí s evolucí samotných organismů. Tento výzkumný program se snaží realizovat překrývající se vědecké disciplíny označované jako srovnávací genomika, evoluční genomika či fylogenomika. Základem současného prudkého rozvoje těchto oborů je rapidně se rozrůstající databáze genomových sekvencí z fylogeneticky rozmanitých organismů, což je samo o sobě výsledkem nesmírně rychlého pokroku v technologiích sekvenování DNA v posledních letech (viz „next-generation sequencing technologies“). Studium evoluční historie na genomové úrovni se ovšem potýká s řadou teoretických a metodologických problémů, které výrazně limitují naše možnosti vyčíst z dnešních sekvencí DNA události dávno minulé. Ve své přednášce se pokusím stručně shrnout současný stav srovnávací genomiky (fylogenomiky) a na vybraných příkladech z oblasti studia evoluce eukaryotů, především řas a rostlin, demonstrovat některé výše zmíněné problémy a otevřené otázky.

THE COMPARATIVE STUDIES OF PLANT TRANSCRIPTOMES GENERATED BY RNA-SEQ

HELENA ŠTORCHOVÁ¹, DAGMARA SIROVÁ², JIŘÍ BÁRTA², JAMES D. STONE¹

¹ Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 263, CZ-16500 Prague 6, Czech Republic

² University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31a, 370 05 České Budějovice, Czech Republic
E-mail: storchova@ueb.cas.cz

The number of plant transcriptomes produced by RNA-seq in non-model species is exponentially growing, significantly exceeding the number of completely sequenced plant genomes. The comparison of transcriptomes becomes a suitable tool to analyze evolutionary trends and to reveal the genes important for adaptation. We describe the procedure of reciprocal blast hits capable to identify putative orthologous genes. We discuss the role of the method RNA extraction, cDNA library preparation and sequencing. We focus on the comparison of closely related congeneric species. However, we also mention the comparison between a non-model plant transcriptome (e.g. *Utricularia*) and a distant model (e.g. *Arabidopsis*), which led to surprising results.

Our work was supported by the GAČR project number P504-11-0783 and the project: "Integration of the experimental and population biology using new methods of interdisciplinary issues – the way to excellence with young scientists", Reg.No.: CZ.1.07/2.3.00/30.0048, which is funded by the European Social Fund (ESF) and the state budget of Czech Republic through the Operational Programme Education for Competitiveness (OPEC).

IDENTIFIKACE CENTROMERICKÝCH DNA SEKVENCÍ POMOCÍ METODY CHIP-SEQ A KLASTROVACÍ ANALÝZY

PAVEL NEUMANN

Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR
E-mail: neumann@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 513

Centromera je oblast chromozómu, kde se při dělení buňky vytváří kinetochor a připojují mikrotubuly dělicího vřeténka. Morfologicky je centromera rozpoznatelná jako zaškrcení, neboli primární konstriktce. S kinetochorem je ovšem asociovaná jen část chromatinu, který se nachází v primární konstriktci. Moderní definice proto zužuje centromeru pouze na tu oblast DNA, která je v přímém kontaktu s kinetochorovými proteiny. Jedním z takových proteinů je histon CenH3 vyskytující se výhradně v nukleozómech centromerického chromatinu, v nichž nahrazuje histon H3.

O tom, zda a jakou roli má složení DNA pro funkci centromery, se stále vedou spory. Centromerická DNA je mezidruhově velmi variabilní na úrovni primární sekvence, avšak společným rysem centromer většiny dosud studovaných druhů je přítomnost vysoce repetitivní DNA s tandemovým uspořádáním monomerů, tzv. satelitní DNA. Překážkou pro detailní zkoumání složení a funkce centromerické DNA je jednak velmi omezený počet druhů, u kterých byly centromery alespoň částečně osekvenovány, a jednak problémy spojené s analýzou sekvencí vysoce repetitivní DNA.

Centromerickou DNA je možné izolovat metodou imunoprecipitace chromatinu (ChIP) s využitím protilátky specifické pro histon CenH3. Analýza vzorků DNA připravených metodou ChIP se dnes téměř výhradně provádí sekvenováním (ChIP-seq) některou z moderních, tzv. „next generation“, sekvenačních technologií umožňujících získat desítky milionů sekvencí v jediné reakci. Mapováním sekvencí získaných pomocí ChIP-seq na referenční genom daného druhu je možné centromeru identifikovat jako oblast s výrazně vyšším pokrytím zamapovanými sekvencemi. Velkým problémem tohoto přístupu je, že centromerické sekvence je díky jejich vysoce repetitivní povaze velmi složité seskládat a proto v referenčních sekvencích často buď částečně nebo úplně chybí. Referenční genomové sekvence jsou navíc dostupné pro poměrně malý počet druhů.

Velmi silným nástrojem pro vytvoření referenčních sekvencí repetitivní genomové DNA a následnou analýzu dat získaných metodou ChIP-seq je klastrovací analýza na principu grafů^{1,2}. Využití této metody u hrachu (*Pisum sativum* L.) vedlo k objevu neobvykle složitých centromer složených ze tří až pěti jasně oddělených domén obsahujících histon CenH3 a tvořených třinácti různými rodinami satelitní DNA³.

¹ Novák, P., Neumann, P., Macas, J.: 2010 – BMC Bioinformatics 11: 378

² Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J.: 2013 – Bioinformatics 29: 792–793

³ Neumann, P., Navrátilová, A., Schroeder-Reiter, E., Koblížková, A., Steinbauerová, V., Chocholová, E., Novák, P., Wanner, G., Macas, J.: 2012 – PLoS Genetics 8: e1002777

Podporováno granty GAČR P501/11/1843 a P501/12/G090.

GENEMARKER® – UNIKÁTNÍ SOFTWAREOVÝ NÁSTROJ PRO GENOTYPIZACI – PŘEDSTAVENÍ A APLIKACE

JAN ZÁSTĚRA

Carolina Biosystems, s. r. o., Drnovská 1112/60, Praha, 161 00
E-mail: jzastera@genomac.cz

GeneMarker® software je jedinečný nástroj pro genotypovou analýzu. Integruje nové technologie zvyšující rychlost, přesnost a snadnost analýzy. Vyznačuje se uživatelsky velmi přátelským prostředím a je vynikající alternativou k softwarům od Applied Biosystems jako je Genotyper®, GeneScan® nebo GeneMapper®; SAGA od Licor, MegaBACE® Genetic Profiler a Profiler Fragment, SequencePilot® nebo Coffalyser.Net software MRC Holland. Software je kompatibilní s výstupy ze všech hlavních sekvenčních systémů, tj. ABI®PRISM, Beckman-Coulter® nebo MegaBACE®. Je postavený na operačním systému Windows a tedy kompatibilní s XP, Vista 7 a 8. Je výrazným zjednodušením aplikací jako např. Amplified Fragment Length analýza (AFLP®), t-RFLP, SSR a mikrosatelitních analýz a genotypizačních aplikací obecně. GeneMarker zahrnuje integrované moduly pro MLPA®, MS-MLPA, LOH, SNaPShot®, SNPLex®, SNPWave®. TILLING® (cílené indukované místních poškození v genomu), mikrosatelitovou nestabilitu (MSI), Haplotypovou analýzu. Obsahuje rovněž nástroje pro analýzu příbuzenství volně žijících populací; Fylogenetického klastrování; porovnávání projektů.

P Přednášky

S3 CELL SORTER: JEDNODUCHÉ AUTOMATIZOVANÉ SORTOVÁNÍ BUNĚK

ŠÁRKA RŮŽIČKOVÁ¹, JANA NOVÁKOVÁ²

¹ Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

² BIO-RAD spol. s r. o.

E-mail: jana_novakova@bio-rad.com

S3 Cell Sorter je automatizovaný stolní průtokový cytometr se sortovacím modulem, plně srovnatelný se známými buněčnými sortery. Na rozdíl od standardně používaných systémů, které mají vysoké nároky na prostor a vyžadují přítomnost zkušeného operátora, S3 umožňuje uživateli třídit buňky nebo buněčné populace bez asistence ve vlastní laboratoři. Je to dáno zejména způsobem tvorby kapek a kontroly jejich kvality pomocí sofistikovaného softwaru. Navíc lze buňky jednoho a téhož typu sortovat do více zkumavek najednou, za kontrolované teploty (do 37 °C), akvizice dosahuje 100 000 událostí za sekundu. Zařízení je vybaveno buď jedním nebo dvěma lasery (488 nm anebo 488 nm plus 642 nm), až čtyřmi fluorescenčními detektory, detektory čelního a bočního rozptylu (FSC a SSC) a tzv. „drop delay“ je softwarově vypočítán.

Přístroj je vhodný na třídění jednotlivých buněk nebo buněčných populací do zkumavek, a to v nezávislém režimu, do stripů a také na mikroskopická sklíčka. Sortování lze provádět při použití speciálního nástavce za sterilních podmínek, aniž by byl zapotřebí speciální biohazard box.

BIO-RAD

S3TM Cell Sorter



**SIMPLE
SET UP
SORT**

Využijte tréninkové centrum k proměření vlastních vzorků - Biotechnologický ústav AV ČR v.v.i., Praha

Více se dozvíte na přednášce Dr. Šárky Růžičkové:

20. října 2014 – Metodické dny

www.bio-rad.com/cellsorter

XCEED YOUR EXPECTATION

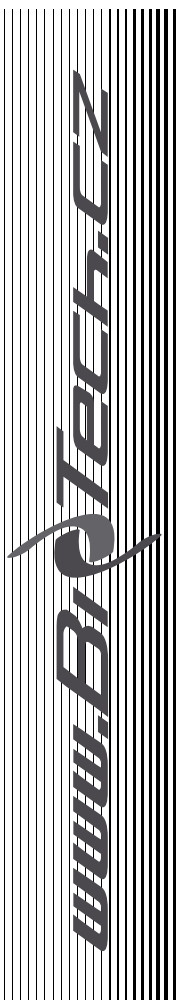
M. BLAŽOVÁ

BioTech a.s., Tymiánová 619/14, 101 00 Praha 10

E-mail: blazova@biotech.cz



CZ: 800 124 683, biotech@biotech.cz, www.biotech.cz



Vaše volba pro Real-Time PCR

MODELOVÁNÍ STRUKTUR PROTEINŮ A JEJICH VYUŽITÍ (NEJEN) V ROSTLINNÉ BIOLOGII

MARTIN POTOCKÝ¹, ROMAN PLESKOT^{1,2}, VIKTOR ŽÁRSKÝ^{1,3}

¹ ÚEB AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 00 Praha 6, ČR

² ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ČR

³ Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK, Viničná 5, 128 00 Praha 2, ČR

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

Při studiu role proteinů ve všech odvětvích biologie představuje znalost jejich terciální struktury často zásadní informaci k určení či pochopení molekulárních detailů mechanismu jejich funkce. V posledních 15 letech došlo díky pokroku v metodách rentgenové krystalografie a nukleární magnetické rezonance, které umožňují určení 3D struktur biomakromolekul, k rapidnímu nárůstu experimentálně vyřešených struktur, které ale v naprosté většině pochází z obratlovců, kvasinek či prokaryotních organismů. Z celkového počtu více než 102 000 známých struktur jich např. na *Arabidopsis thaliana* připadá pouhých 817. Rostlinný biolog, jehož zajímají strukturní aspekty biologie, je tak v podstatě odkázán na predikční techniky, v nichž prim hrají metody homologního modelování. Princip homologního modelování vychází z předpokladu, že proteiny s podobnou sekvencí a společným evolučním původem mají i podobnou terciální strukturu. V případě, že studovaný rostlinný protein má homologa s experimentálně určenou strukturou, může se i rostlinný biolog pokusit o konstrukci 3D modelu a jeho následnou analýzu.

Přednáška stručně shrne vývoj, který prodělaly techniky predikce proteinových struktur v posledních letech, ukáže možné metodické přístupy a na příkladech bude demonstrovat slasti a strasti homologního modelování v podání rostlinných biologů.

Podporováno grantem GAČR 13-19073S.

MOLEKULOVÁ DYNAMIKA JAKO NÁSTROJ MODERNÍ BIOLOGIE

ROMAN PLESKOT

Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i. a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha, ČR
E-mail: pleskot@ueb.cas.cz

Simulace molekulové dynamiky se v posledních letech stává standardní metodou studia proteinů a membrán s výsledky velice obtížně získatelnými (v některých případech nedosažitelnými) experimentálním přístupem. Současně nárůst výpočetní kapacity počítačů, zlepšení algoritmů používaných při výpočtech a speciální výpočetní postupy umožnily simulovat a popsat detaily chování proteinů a lipidů v biologicky relevantních časových škálách. V přednášce se zaměřím na obecný popis simulace molekulové dynamiky a krátce zmíním základy použitých postupů. Největší důraz bude však v přednášce kladen na konkrétní příklady a jejich přínos k pochopení struktury a funkce proteinů a lipidových membrán. Simulace molekulové dynamiky pomohly objasnit otevírání a zavírání mechanosensitivních kanálů, transport iontů iontovými kanály, mechanismus působení antimikrobiálních peptidů a vazbu mnoha periferních membránových proteinů na lipidovou dvojvrstvu. Hrubozrné (*coarse-grained*) modely lipid-lipid a lipid-protein interakcí umožnily simulovat sebeuspořádání lipidových dvojvrstev, agregaci membránových komponent do domén a fúzi váčků. Na závěr přednášky v krátkosti popíšu výzkum v naší laboratoři zaměřený na interakci proteinů se signálními lipidy v regulaci polárního růstu rostlinných buněk.

Podporováno grantem GAČR 13-19073S.

STRUCTURAL BIOLOGY IN USE: NMR, X-RAY AND MOLECULAR DYNAMICS MODELING IN STUDY ON MULTISTEP PHOSPHORELAY SIGNALING IN PLANTS

OKSANA DEGTJARIK^{1,2*}, RADKA DOPITOVÁ^{1,2*}, BLANKA PEKÁROVÁ^{1*}, TOMÁŠ KLUMPLER¹, JAKUB HORÁK¹, PETRA BORKOVCOVÁ¹, ELIŠKA NEJEDLÁ¹, DAVID ŘEHÁ², SANDRA PUEHRINGER³, OLGA OTRUSINOVÁ¹, SÉVERIN JANSEN¹, MICHAL KUTÝ², MANFRED S. WEISS³, VLADIMÍR SKLENÁŘ¹, JAROMÍR MAREK¹, VERONIKA PAPOUŠKOVÁ¹, LUKÁŠ ŽÍDEK¹, IVANA KUTÁ-SMATANOVÁ², LUBOMÍR JANDA¹ AND JAN HEJÁTKO¹

¹ Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic

² Academy of Sciences of the Czech Republic, Inst. of Nanobiology and Structural Biology GCRC, Nové Hradky, Czech Republic

³ Helmholtz-Zentrum Berlin for Materials und Energy BESSY-II, Berlin, Germany

* Contributed equally

E-mail: hejtko@sci.muni.cz

In multistep phosphorelay (MSP) pathway, the His-containing phosphotransmitters encoded by *AHP* genes in Arabidopsis act as signaling intermediates integrating signaling inputs from diverse sensor histidine kinases. In comparison to prototypical two-component signaling in bacteria displaying high level of specificity, the level of specificity in related plant MSP signaling remained unclear. Here I will describe our results employing both experimental and computational approaches in the identification of structural determinants of specificity in MSP signaling in Arabidopsis.

Via extensive screen, we have shown that sensor histidine kinase CYTOKININ-INDEPENDENT 1 (CKI1) acting in MSP is able to distinguish specific subset of AHPs both in vitro and in vivo. We have demonstrated that the C-terminal receiver domain of CKI1 (CKI1_{RD}) is necessary and sufficient for this specificity. We determined the structure of CKI1_{RD} using X-ray crystallography. By NMR measurements we described the dynamic rearrangement of active center of CKI1_{RD} upon its phosphorylation and binding of Mg²⁺, the cofactor necessary for MSP signaling, both of which affect the relative affinity of CKI1_{RD} to AHPs. In order to identify the molecular determinants of the observed interaction specificity at the atomic resolution, we determined the structure of AHP2 via experimental phasing after lutetium soaking of AHP2 crystals at 2.53 Å resolution. The key residues responsible for the AHP2-CKI1_{RD} interaction revealing strong protein-protein binding were identified via molecular dynamic simulations for 100 ns. The AHP2-CKI1_{RD} interaction was confirmed via NMR measurements and resulting chemical shifts agree with the model. Comparison of the AHP2-CKI1_{RD} model with the recently published structure of AHP1-AHK5_{RD} suggests that the interacting surfaces differ between both complexes, particularly in the amino acid residues mediating hydrophilic interactions. Detailed structural comparison between AHP2-CKI1_{RD} and AHP1-AHK5_{RD} allowed us to determine the individual amino acid residues responsible for the specific recognition of subset of AHPs via CKI1_{RD}. Thus, in spite the vast majority of interacting residues in the AHP proteins is recruited from highly conserved residues, small structural differences of both AHPs and AHK_{RD}s seem to be sufficient for determination of specific molecular recognition as could be seen by our bioinformatical and structural comparisons. Thus, combining of both experimental and modelling approaches allowed us to determine the amino acids responsible for specific protein-protein interaction of the receptor with its downstream signaling partner, the first example of structural determinants of MSP specificity in higher organisms.

Supported by CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and P305/11/0756.

THE APPLICATION OF IMMUNOMODULATION APPROACH IN THE CYTOKININ SIGNALING RESEARCH

ZUZANA GELOVÁ¹, MATEJ ZABRADY², PETRA TEN HOOPEN³, VÁCLAV MOTYKA⁴, UDO CONRAD³, LUBOMÍR JANDA² AND JAN HEJÁTKO¹

¹ Functional Genomics and Proteomics of Plants, Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 5/A2, Brno, CZ-62500, Czech Republic

² NMR Spectroscopy, Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 5/A2, Brno, CZ-62500, Czech Republic

³ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstrasse 3, Gatersleben, D-06466, Germany

⁴ Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 263, Prague 6, CZ-16502, Czech Republic

E-mail: zuzana.gelova@email.cz

Immunomodulation allows specific modification of molecular regulators at the level of effector molecules ranging from small organic molecules to macromolecules, typically proteins. Target regulators are affected via direct interaction with single-chain variable fragments (scFvs) of specific antibodies. scFvs could be fused with short signal sequences to increase protein expression and stability. Moreover, it enables targeting of scFvs localization into specific cell compartments, allowing thus targeted manipulation with subcellular resolution and high specificity. Here we present the use of immunomodulation approach in manipulating perception of plant hormones cytokinins (CKs), both at the level of CKs as well as proteins from the CK signaling pathway.

For targeting the CK molecules, we screened Tomlinson Human I+J scFv Library by trans-zeatin riboside (tZR), one of the active and relatively stable CKs conjugated with BSA and selected scFv specifically recognizing tZR (α tZR_scFvs). *Nicotiana tabacum* stable transgenic lines ectopically expressing α tZR_scFvs targeted to endoplasmatic reticulum (ER) (35S:KDEL- α tZR_scFv) exhibited CK over-sensitizing response on meristematic levels. The 35S:KDEL- α tZR_scFv lines further revealed elevated CK oxidase/dehydrogenase activity, the first response to upregulated CK signaling. Using transient expression of TCS::LUC reporter in tobacco protoplasts, we showed the ability of 35S:KDEL- α tZR_scFv construct to upregulate CK signaling. Our results from α tZR_scFvs experiments provide the first evidence for the functional importance of ER-located CKs in plants.

For targeted immunomodulation of CK signaling pathway, the scFvs specifically recognizing AHP3 protein (α AHP3_scFvs), the member of CK signaling pathway were cloned from mice hybridomas producing anti-AHP3 monoclonal antibody. We have shown the ability of α AHP3_scFvs to interact with AHP3 both in vitro and in vivo. Using transient expression of TCS::LUC reporter in protoplasts, we showed the ability of α AHP3_scFvs to attenuate AHP3-mediated CK signaling.

Altogether, the aforementioned results evidence the immunomodulation as an efficient tool for targeted manipulation of diverse regulatory events in plants.

Supported by the Czech Science Foundation (P305/11/0756) and European Regional Development Fund (Central European Institute of Technology project no. CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ A JEJICH VYUŽITÍ V EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGII ROSTLIN

MICHAL HÁLA

ÚEB AV ČR, v.v.i., Rozvojová 265, Praha 6
KEBR PřF UK, Viničná 5, Praha 2
E-mail: hala@ueb.cas.cz

Při studiu protein-proteinových nebo protein-lipidových interakcí se velmi často využívá technika rekombinantních proteinů. Tyto proteiny vznikají jako produkt exprese (transkripce a translace) rekombinantní DNA v nerostlinných expresních systémech, zejména prokaryotických.

Podoba rekombinantní DNA závisí na účelu rekombinantního proteinu, jeho rozpustnosti a dalších vlastnostech (toxická apod.). Zejména je důležitá volba vhodného promotoru, síla exprese často ovlivňuje správné sbalení proteinu do nativní konformace. Získání proteinu v nedenaturované nativní konformaci je většinou hlavním cílem produkce. Pokud se nedaří získat protein v nativní konformaci, lze využít chaperony, které mohou být koexprimovány s připravovaným proteinem a usnadnit tak správné sbalení proteinu. Podobně v případě např. komplexů lze koexpresí více podjednotek dosáhnout jejich sbalení do nativního stavu a vytvoření nativního komplexu.

V případě, že protein má být purifikován, je vhodné položit si otázku, jakou metodou. Kromě běžných separačních metod (SEC, ionexy) se hlavně využívá afinitní chromatografie. K rekombinantnímu proteinu je přidána afinitní značka, jejíž pomocí může být protein purifikován a která může být posléze odstraněna.

Výše uvedené aspekty budu demonstrovat na produkci rekombinantní protilátky proti GFP v bakteriích.

Podporováno grantem GAČR P305-11-1629.

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V MEMBRÁNOVÉ PROTEOMICE

PETRA JUNKOVÁ, LUCIE MARŠÁLOVÁ, RADOVAN HYNEK, OLGA VALENTOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Techniká 5, 166 28 Praha 6, ČR

E-mail: junkovap@vscht.cz, tel.: +420 220 443 216

Proteomika je vědní obor, který se zabývá studiem kompletní proteinové sítě v buňce za definovaných podmínek. Ambicemi tohoto oboru však není jen pouhá identifikace a kvantifikace proteinů, ale též objasnění jejich funkčních či strukturních závislostí v buňce. Zásadním předpokladem pro analýzu takto komplexního souboru proteinů je použití postupů, které umožňují jejich účinnou separaci, purifikaci a detekci. Standardní postupy, vhodné pro analýzu rozpustných proteinů, však nemohou být využity pro analýzu hydrofobních proteinů membránových. Právě hydrofobní charakter těchto proteinů znesnadňuje jejich studium. Přesto bylo vynaloženo značné úsilí na modifikaci stávajících postupů, a to hlavně kvůli nespornému významu těchto proteinů pro funkční chod buňky. Membránové proteiny se totiž nacházejí na rozhraní vnitřního a vnějšího prostředí buněk, a proto právě ony zodpovídají za reakce buňky na vnější podmínky. Hrají roli například v mezibuněčné komunikaci, specifickému transportu látek přes membránu či jako receptory vnějších signálů spouští signální dráhy uvnitř buňky. Bioinformatické analýzy navíc prokázaly, že průměrně 30 % otevřených čtecích rámců organismů náleží membránovým proteinům.

Vynálezem měkkých ionizačních technik u hmotnostně spektrometrických analyzátorů, které umožnily analýzu biomakromolekul, došlo k masivnímu rozvoji proteomických přístupů a hmotnostní spektrometrie se za velmi krátkou dobu staly analyzátoři první volby v proteomice. Na poli membránové proteomiky došlo nejprve ke spřažení tradičně využívaných elektroforetických technik, sloužících k separaci membránových proteinů, s hmotnostně-spektrometrickými technikami umožňujícími identifikaci těchto proteinů ze souboru jejich tryptických štěpů extrahovaných přímo z gelu. Vzhledem k nízkému výtěžku především hydrofobních peptidů z gelu se však membránová proteomika v posledních letech snaží o zavedení tzv. gel-free postupů. Ty využívají možnost předřazení multidimenzionální chromatografické separace peptidů získaných tryptickým štěpením komplexního souboru proteinů přímo v roztoku před samotnou hmotnostně-spektrometrickou koncovkou. Nejčastější překážkou, se kterou se při použití těchto přístupů můžeme setkat, je nutnost rozpouštění membránových proteinů v činidlech jako jsou organická rozpouštědla, kyseliny, detergenty či chaotropní činidla, která většinou nejsou kompatibilní s tryptickým štěpením proteinů v roztoku, chromatografickou separací či samotnou hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Další komplikací může být nízké zastoupení zkoumaných membránových proteinů, které vyžaduje jejich nabohacení oproti vysoce abundantním rozpustným proteinům. I přes tato úskalí již dnes existuje celá řada protokolů, které nám umožňují nejen získat informaci o zastoupení až stovek membránových proteinů během jedné analýzy, ale současně poskytují též informaci o jejich množství. Metody umožňující studium konkrétních proteinových komplexů nacházejících se na membráně navíc mohou přispět k pochopení jejich buněčné funkce.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014) a grantu GAČR 14-09685.

PROTEOMIC ANALYSIS OF BARLEY CELL NUCLEI PURIFIED BY FLOW SORTING

BEÁTA PETROVSKÁ¹, HANA JEŘÁBKOVÁ¹, IVO CHAMRÁD², JAN VRÁNA¹, RENÉ LENOBEL², JANA UŘINOVSKÁ², MAREK ŠEBELA², JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Institute of Experimental Botany, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Slechtilu 31, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

² Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Slechtilu 11, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

E-mail: petrovska@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 721

The function of nuclear genome cannot be completely understood without a better knowledge of the composition, structure and behavior of nuclear proteins, which represent the most abundant component of cell nuclei. Nuclear proteins participate in a majority of processes, which include DNA replication and chromosome reduplication, DNA repair and recombination, as well as transcription. However, there is almost no specific information available about this class of proteins in plants, except for histones and a few other nuclear proteins.

Proteomics is a powerful approach for large-scale protein identification and may contribute to better understanding of the main structural and functional components of plant cell nuclei and chromosomes. However, biochemical composition of sub-cellular components may be altered during their isolation and during subsequent protein purification. Moreover, a series of preparatory steps is employed to obtain purified nuclei. This is time consuming, laborious and the isolated fractions may be contaminated by cytoplasmic proteins. We have developed an alternative and efficient method for purification of nuclei, which does not affect their protein content and which comprises only a single step. The new protocol involves flow cytometric sorting of cell nuclei in G1, S, and G2 phases of the cell cycle. It is important that this approach avoids contamination by non-nuclear proteins.

Our preliminary results indicate that the flow cytometric sorting coupled with mass spectrometry will permit a comprehensive characterization of the subproteome of plant cell nuclei at various phases of cell division cycle.

This research was supported by grants from the Czech Science Foundation (14-28443S, P501/12/G090), the National Program of Sustainability I (LO1204), the European Social Fund (Operational Program Education for Competitiveness CZ.1.07/2.3.00/20.0165), and Internal Grant Agency of Palacký University, Olomouc (Prf/2013/003).

APLIKACE MODERNÍCH BIOCHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH METOD NA STUDIUM INTERAKTOMU TELOMERASY Z *ARABIDOPSIS THALIANA*

LADISLAV DOKLÁDAL^{1,2}, EVA BENKOVÁ^{2,3}, STANTON BRUCE GELVIN⁴, EVA SÝKOROVÁ^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno

² Přírodovědecká fakulta a CEITEC Masarykovy univerzity, Kamenice 5/A2, 625 00 Brno

³ Institute of Science and Technology Austria, Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg, Rakousko

⁴ Department of Biological Sciences, Purdue University, IN-47907, West Lafayette, USA

E-mail: ldokladal@volny.cz

Telomerasa je ribonukleoprotein s reverzně transkriptasovou aktivitou zodpovědný za prodlužování telomer v tkáních a pletivech s vysokou proliferační potřebou. Její správné fungování a zapojení do řady buněčných procesů je regulováno řadou protein-proteinových, protein-RNA a protein-DNA interakcí.

Obsahem příspěvku je ukázka a srovnání různých molekulárně-biologických přístupů pro studium interaktomu telomerasy z *A. thaliana*, jako např. bimolekulární fluorescenční komplementace (screen cDNA knihovny a přímé studium interakcí), kvasinkový jedno-, dvou- a trojhybridní test, koimunoprecipitace či electromobility shift assay. Dále jsou prezentovány výsledky charakterizace T-inzerčních mutantů v genech At4g33945 a At5g10350, jejichž produkty jsme identifikovali jako proteiny interagující s C-terminální doménou proteinové podjednotky telomerasy z *A. thaliana*.

Tato práce byla podpořena granty Evropského sociálního fondu (CZ.1.07/2.3.00/20.0189), MŠMT ČR (projekt Interaktom, LH10352) a GAČR (13-06943S).

OPTICAL SECTIONING OF PLANT SAMPLES WITH FLUORESCENCE MICROSCOPYJAN PETRÁŠEK^{1,2}¹ Charles University, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology, Viničná 5, CZ-12844 Praha 2, Czech Republic² Institute of Experimental Botany, AS CR, Rozvojová 263, CZ-15202 Praha 6, Czech Republic

E-mail: petrasek@ueb.cas.cz, tel.: +420 221 951 692

Past two decades are characterized by an impressive boom in the number of methods of fluorescence light microscopy. They could be used for various imaging purposes, but they could also provide rich source of data for quantitative measurements. Besides other things, there are two main technical obstacles, which are being overcome by various technical solutions. Firstly, the fluorescence emitted by the sample above and below the focal plane and secondly, the diffraction limit of light microscopy. While the first point is effectively solved by various methods of confocal microscopy, the second point needs more sophisticated approaches of total internal reflection microscopy, nonlinear optical microscopy and structured illumination. Here I would like to make a synopsis of modern methods of confocal fluorescence microscopy and super-resolution optical microscopy in plants and point to their advantages and drawbacks.

This work is supported by the Czech Science Foundation, project GAP305/11/2476.

ADVANCED FLUORESCENCE MICROSCOPY TECHNIQUES INVESTIGATING MEMBRANE ORGANIZATION AND DYNAMICS

JANA HUMPOLÍČKOVÁ

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic
E-mail: jana.humpolickova@jh-inst.cas.cz

Membrane organization and dynamics is crucial for many membrane-related pathways in living cells, such as signaling events or cell-to-cell communication. Investigating plasma membranes under physiological conditions requires non-invasive observation techniques such as visible light microscopy. Thus fluorescence microscopy providing additionally high contrast and selectivity became the most widespread visualization technique in molecular biology. The accessible spatial and temporal resolution of the conventionally performed fluorescence imaging is however not sufficient to observe processes of biological interest on the level of single molecules and/or on sub-milliseconds to millisecond timescales. Even though nowadays techniques improving the spatial resolution are available allowing almost a molecular resolution in theory, their real performance is subjected to many factors. It has to be however pointed out, that apart from the direct visualizing of the membrane architecture, other features, such as molecular motion or mutual co-localization, can be easily monitored and may report indirectly, yet convincingly on the nanoscale membrane arrangement.

In this contribution, single molecule based fluorescence techniques (fluorescence correlation spectroscopy, raster image correlation spectroscopy) reporting on lipid/protein dynamics will be introduced. Further, analysis of fluorescence intensity fluctuations by evaluating of either so called “number and brightness”, or fluorescence antibunching can be employed to address clustering and co-localization. Eventually, a technique combining conventional Förster resonance energy transfer with analysis of complex donor fluorescence decays by means of Monte Carlo simulations will be shown to be a tool for detecting and characterizing membrane nano-heterogeneities. Examples of applications of the introduced techniques either in plasma or model membrane investigation will be given.

SUPERRESOLUTION STRUCTURED ILLUMINATION LIVE IMAGING OF PLANT CORTICAL MICROTUBULE DYNAMICS AND ORGANIZATION

GEORGE KOMIS^{1,*}, MARTIN MISTRIK², OLGA ŠAMAJOVÁ¹, ANNA DOSKOČILOVÁ¹, MIROSLAV OVEČKA¹, PETER ILLÉS¹, JIRÍ BARTEK^{2,3} AND JOZEF ŠAMAJ¹

¹ Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Cell Biology, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, CZ-77900 Olomouc, Czech Republic

³ Danish Cancer Society Research Center, DK-2100 Copenhagen, Denmark

*E-mail: georgios.komis@upol.cz, tel.: +420 585 634 734

Plant cortical microtubule arrays fulfil essential functions during cell growth and differentiation. Their formation and organization is driven by unique acentrosomal nucleation, plant specific dynamics and interactions with multiple microtubule associated proteins. By means of structured illumination microscopy (SIM) adopted for imaging of intact *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) hypocotyl epidermal cells, dynamic cortical microtubules labeled with green fluorescent protein fused to the microtubule-binding domain of the mammalian microtubule-associated protein MAP4 (GFP-MBD) and with green fluorescent protein-fused to the alpha tubulin6 were recorded in wild-type *Arabidopsis* plants and in the mitogen-activated protein kinase mutant *mpk4* expressing the GFP-MBD. The *mpk4* mutant shows extensive microtubule crosslinking, owing to overexpression and reduced phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP65-1, providing a powerful genetic tool to record intrabundle microtubule dynamics at the subdiffraction level. SIM imaging revealed nano-sized defects in microtubule bundling, resolved microtubule branching and release below Abbe's limit, and finally allowed the quantification of microtubule bundle architecture. Live SIM imaging allowed the time-lapsed documentation of subdiffraction length fluctuations of the microtubule plus end, and dynamic instability behavior of both ends during free, intrabundle, or microtubule-templated microtubule growth and shrinkage. Finally, short, rigid, and nondynamic microtubule bundles in the *mpk4* mutant were observed to glide along the parent microtubule in a tip-wise manner. In conclusion, this study demonstrates the potential of SIM for superresolution time-lapse imaging of plant cells, showing unprecedented details accompanying microtubule dynamic organization.

This work was supported by the Czech Science Foundation GAČR (grant no. P501/11/1764), by the Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research (grant no. LO1204 NPU I), and by European Community project Biomedreg (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

IN VIVO FLUORESCENCE PROBES FOR PLANT BIOLOGY

KATEŘINA SCHWARZEROVÁ

Department of Experimental Plant Biology, Faculty of Science, Charles University Prague, Viničná 5, CZ-12844 Praha 2, Czech Republic
E-mail: schwarze@natur.cuni.cz

In vivo fluorescence microscopy is a standard method of modern cell biology. Together with the GFP technology, it contributed vastly to the progress on the cell biology field. In plant cells, fluorescence visualization faces several problems. Endogenous autofluorescence and the existence of the cell wall, a barrier for large molecules, are the greatest problems that need to be overcome. Therefore, the spectrum of suitable fluorescence probes is limited for plant cell. In this lecture, methods used in our laboratory for successful *in vivo* plant cell organelles and structures visualization will be presented and advantages and disadvantages of these methods will be discussed.

eppendorf

Eppendorf Tubes® 5.0 mL



Chybějící mezičlánek

5 ml zkumavka má všechny výhody svých menších příbuzných „eppendorfek“.

Nová 5 ml Eppendorf zkumavka

je vybavena připojeným víčkem, které se snadno otevírá i zavírá jednou rukou, má vysokou mechanickou odolnost, zvládne centrifugaci do 25 000 x g. Vyrábí se podle vysokých kvalitativních standardů firmy Eppendorf, pouze z nejkvalitnějšího plastu, nejsou používána žádná aditiva, která by

mohla ovlivnit následné aplikace. Zkumavka je dostupná v různých certifikovaných stupních čistoty (PCR clean, Sterile, Biopur, Protein LoBind, DNA LoBind), odolná pro práci a skladování v intervalu teplot -86 °C až 80 °C. Lze inkubovat i nad 80 °C, pro práci v těchto teplotách je však doporučeno použít pojistku na víčko.

IN VIVO FLUORESCENCE MACROSCOPY IN PLANTS

MARKÉTA PERNISOVÁ, JAN HEJÁTKO

FGPP, CEITEC, Masaryk University, Kamenice 5/A2, Brno, CZ-62500, Czech Republic

E-mail: pernisov@sci.muni.cz, tel.: +420 549 496 470

Many microscopic techniques exist in plant biology and microscopic slides are necessary to use usually. Together with Nikon company we developed horizontally oriented confocal microscope for in-vivo plant imaging on plates directly. Optical system with objectives is horizontally oriented and thus plants can grow vertically similarly to real conditions in soil. This setup allows observing plant's biological processes in a real time, for example protein relocalization, changes in metabolite concentration, cell elongation and division or root growth. No transmitted light is a small disadvantage but it is possible to use plant lines with fluorescent protein labelled plasma membranes. Taken together, horizontal confocal microscope is very useful instrument for real-time imaging of growing plants.

Supported by grants: CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068, GACR P501/11/1150 and GACR 14-30004P.

IMAGING PLANT CELL UTRASTRUCTURE BY FIELD EMISSION SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

JINDŘIŠKA FIŠEROVÁ¹, MARTIN W. GOLDBERG²

¹ ÚMG AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1084, CZ-14000 Praha 4, ČR

² School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, South Road, DH1 3LE, UK

E-mail: jindriska.fiserova@img.cas.cz, tel.: +420 241 063 161

Microscopy technics have grossly contributed to our knowledge of the cell structure and function. Scanning electron microscopy (SEM) is a powerful technique that can image exposed surfaces in 3D. Importantly, the resolution of modern scanning electron microscopes with field emission sources and in-lens specimen chambers can be better than 0.5 nm and, thus, ultrastructural details of inner cellular structures or even macromolecular complexes can be viewed. Obtaining a reliable image is, however, dependent on sample preparation methods that would accurately preserve cellular structures. In plants, exposing the object of interest may be even more difficult due to the existence of the cell wall. Using appropriate methods, however, ultrastructural details of nuclear surfaces, endomembranes and associated cytoskeletal structures can be viewed in tissue culture cells as well as in root or leaf cells.



MedChemBio

klastr medicínální chemie a chemické biologie



- poradenská činnost pro česká vědecká pracoviště v oblasti přenosu technologií
- vznik spin-off firem v dané oblasti
- zhodnocení duševního vlastnictví
- organizace testování látek
- převod mezi laboratoří a poloprovozem
- certifikace a legislativa
- investice v dané oblasti rozvoj regionu
- kontakty se zahraničními komerčními partnery

Klastr MedChemBio si klade za cíl pomáhat rozvoji medicínální chemie a chemické biologie. Konkrétním cílem klastru je vytvoření platformy pro výměnu informací, propagace medicínální chemie a chemické biologie ve společnosti, rozvoj konkrétních projektů na rozhraní mezi vědou a průmyslem, rozvoj malých a středních podniků v oblasti vývoje nových léčiv a nových diagnostických přístupů a také komunikace mezi českými a evropskými subjekty v dané oblasti.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



www.medchembio.cz

P Přednášky

KDYŽ SE KULTURY STŘETNOU. SACHS, DARWIN A DISCIPLÍNA ROSTLINNÉ FYZIOLOGIE

MARCO STELLA

Katedra filosofie a dějin přírodních věd, PřF UK v Praze
E-mail: marco.stella@email.cz

Příspěvek pojednává o disciplinaci rostlinné fyziologie a rostlinných fyziologů v posledních dvou desetiletích 19. století. Pro ní byl konstitutivní spor Julia Sachse a Charlese Darwina, nesporných dobových vědeckých velikánů. Ten je pojednán nikoliv jako spor osobní, ale jako střetnutí dvou velmi odlišných vědních kultur, tj. rozdílných tradic toho, jak a jakými prostředky se dělá věda. Tento spor ostatně i dobově rezonoval s tzv. „krizí darwinismu“ mezi roky 1880–1930. To je obdobím úpadku ortodoxně darwinistických interpretací, které následovalo po prvotním nadšení a širokém přijetí Darwinových tezí po jeho vystoupení v roce 1859. Docházelo k hledání jiných vysvětlovacích mechanismů pro přírodní fenomény a procesy a také ke snahám o (znovu)ukotvení charakteru vědy na jiných než darwinistických základech, které byly v čím dál větší míře chápány jako spekulativní. Jako jednu ze svých posledních větších prací publikoval Charles Darwin v roce 1880 *Power of Movement in Plants*, ve které publikoval výsledky svých dlouhodobých domácích experimentů s vlivem zemské přitažlivosti a světla na růst rostlin. Jeho výsledky byly v příkrém rozporu s pozorováními které provedl Julius Sachs a které sepsal ve své práci *Lehrbuch der Botanik* (1868), která se dočkala i anglického překladu. Mezi oběma došlo ke sporu a stupňujícímu se vzájemnému neporozumění – Sachs Darwinovu práci doslova opovrhoval. Ve *Vorlesungen über Pflzenphysiologie* (1882) podrobil Darwinovu práci ostré kritice. Příspěvek shrne důvody Sachsova odmítnutí výsledků Darwinova experimentu na pozadí Sachsovy vlastní recepce darwinismu a počínajícího období pocíťované „krize darwinismu“ po roce 1880 a analyzuje jej jako případ střetu vědeckých kultur.

BÁDÁM, BÁDÁŠ, BÁDÁME – JIŽ OD ZÁKLADNÍ ŠKOLY!

TOMÁŠ FELTL

TFSoft, E. Vencovského 1140, 572 01 Polička, ČR

E-mail: t.feltl@tfsoft.cz, tel.: +420 774 403 995

V posledních letech se začínají i na našich školách objevovat různé moderní výukové pomůcky. Především v přírodních vědách můžeme dnes využívat takové prostředky, o kterých se nám před časem skutečně „ani nesnilo“. A není to jen doména středních škol, situace je obdobná i na školách základních. Přírodní vědy jsou vědami experimentálními. Experiment, který si žák v rámci výuky sám provede, je nejlepší cestou k „poznání“. Tendence, které se snažily pokusy ze škol vytlačit pomocí videa a různých simulací na počítači, jsou již dávno pryč.

Mezi pomůcky přímo podporující experimentální činnost můžeme zařadit různé laboratorní měřicí přístroje, především pak ucelené měřicí systémy – školní experimentální systémy. A právě na tyto systémy se zaměříme v první části i my. Ukážeme si, jak takový systém vypadá a jaké je jeho využití při výuce. Zrealizujeme si pár školní experimentů zaměřených na studium rostlin. A to není vše... Podíváme se ještě na jednu velice univerzální výukovou pomůcku. Určitě znáte stavebnici LEGO. Není ovšem LEGO jako LEGO. Stavebnice LEGO Mindstorms obsahuje různé aktivní komponenty a dá se programovat. Ve druhé části vystoupení si ukážeme, jak děti využily stavebnici při poznávání rostlin a péči o ně.

NOVÁ METODA PRO STANOVENÍ AFINITY VAZBY PERIFERNÍHO PROTEINU K PLASMATICKÉ MEMBRÁNĚ

STANISLAV VOSOLSOBĚ¹, KATEŘINA SCHWARZEROVÁ¹, JAN PETRÁŠEK^{1,2}

¹ KEBR, PŘF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR

² ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR

E-mail: vosolsob@natur.cuni.cz, tel.: +420 728 460 417

Vazba periferních membránových proteinů k plasmatické membráně bývá zpravidla reversibilní a protein se může vyskytovat jak na membráně, tak v cytoplasmě. Tato změna lokalisace proteinů v rámci buňky bývá podstatou regulace aktivity řady proteinů a přenosu signálů v regulačních kaskádách. Přehlíženým problémem je však exaktní stanovování poměru cytoplasmatické a membránové frakce zkoumaného, fluorescenčně značeného proteinu. Buď jsou vazebné parametry zjišťovány sofistikovanými postupy (např. FRAP a pod.), které však nejsou praktické pro případy, kdy je potřeba rychlá metoda, nebo se lze setkat s prostým konstatováním poměru intenzity fluorescence v cytoplasmě a v oblasti membrány, která je určena kolokalisací se styrylovou membránovou sondou FM4-64. Tento zjednodušený pohled na věc může vést ke zkresleným výsledkům, zejména pokud je intenzita signálu v cytoplasmě srovnatelná, či vyšší, než na membráně. S ohledem na fakt, že signál bodového zdroje v konfokálním mikroskopu detekujeme jako difrakční strukturu Airyho disků, snímáme membránový signál jako pás šířky 500–1000 nm, což je více než o řád více, než je reálná tloušťka membrány. Navíc červený signál membránového markeru FM4-64 poskytuje kvůli odlišné vlnové délce širší pás než zelený signál GFP. Obdobně i u cytoplasmatického signálu pozorujeme pozvolný náběh signálu se začátkem vně buňky a maximem, kterého je dosaženo až zhruba 500 nm od plasmatické membrány. Výsledný pozorovaný signál je tedy v oblasti membrány součtem jak membránové, tak cytoplasmatické složky a dosahuje maxima v jiném místě než signál FM4-64 odpovídající poloze plasmatické membrány. Tento příspěvek navrhuje exaktní postup, kterým lze určit přesný poměr membránové a cytoplasmatické frakce na základě kolokalisace GFP signálu se sondou FM4-64. Vychází z experimentálně modelované křivky průběhu cytoplasmatického signálu (pomocí sledování distribuce signálu ryze cytoplasmatického proteinu) a modelovaného membránového signálu, který je odvozen ze změřeného průběhu signálu FM4-64 s použitím přepočtu difrakční křivky mezi červeným a zeleným světlem. Pozorovaný signál vyšetřovaného proteinu je potom fitován dílčími modelovými křivkami a z jejich poměru je odvozen poměr membránové a cytoplasmatické frakce proteinu. Metoda byla použita k analýze způsobu vazby proteinu DREPP na plasmatickou membránu a bylo zjištěno, že se na jeho interakci s membránou podílí myristoylace, palmitoylace i interakce polybasické domény s membránovými lipidy.

HIGH-RESOLUTION CELL-SPECIFIC ANALYSIS OF PHYTOHORMONES

ONDŘEJ NOVÁK^{1,2}, LENKA PLAČKOVÁ¹, IOANNA ANTONIADI^{2,3}, BIJANA SIMONOVIC², ALEŠ PĚNČÍK^{1,2}, EVA HENYKOVÁ¹, KAREL DOLEŽAL¹, COLIN TURNBULL³, MIROSLAV STRNAD¹, KARIN LJUNG²

¹ LRR, CRH, ÚEB AV ČR, v.v.i., & PřF UP, Šlechtitelů 11, CZ-78371 Olomouc, ČR

² UPSC, Dept. of Forest Genetics and Plant Physiology, SLU, Umeå, Sweden

³ Dept. of Life Sciences, Imperial College London, UK

E-mail: novako@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 634 853

Auxin and cytokinins (CKs) play crucial roles in the control of various physiological processes. Whilst metabolism provides the energy and the building blocks for plant growth and development, the phytohormonal groups are essential to control the rate of growth of individual plant parts (cells, tissues and organs) and to integrate the activities of these parts. Control of auxin gradients and the formation of CK maxima/minima most likely involve regulation of both metabolic and transport processes. High-resolution measurements of phytohormones in plant tissues are therefore necessary for physiological studies of their metabolism and mode of action.

Application of targeted metabolomics shows an optimal method for phytohormonal screening in combination with a miniaturized purification and a highly sensitive mass spectrometry-based detection. Our work is focused on the development of high-throughput purification methods for minute amounts of plant tissue (1–10 mg). Two novel approaches, a simple one-step purification protocol based on in-tip microSPE (micro Solid-Phase Extraction) and a class-specific miniaturized immunoaffinity chromatography method were utilized. In order to verify the effect of complex sample matrix of the whole method as well as its efficiency and analytical accuracy, the appropriate stable isotope-labelled internal standards have been prepared by the organic synthesis. We have also developed several fast chromatographic separations (UHPLC) and sensitive tandem mass spectrometry (MS/MS) methods for simultaneous profiling of the auxin or CK metabolites.

Moreover, we applied fluorescence-activated cell sorting of green fluorescent protein (GFP)-marked cell types, combined with a highly sensitive LC-MS method for analysis of phytohormonal biosynthesis and homeostasis at cellular resolution. We modified the new micro-scale isolation procedures and applied the method to auxin/cytokinin metabolite profiling in the root tip. To confirm that the procedures of protoplast isolation and cell sorting did not alter the endogenous cytokinin levels, several control experiments were conducted. Together with the development of more sensitive and accurate MS-based methods, cell-specific analyses have provided the opportunity for phytohormone detection in four different Arabidopsis lines, expressing GFP in specific cell types of the root apex.

Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., Strnad, M.: 2008 – *Phytochem*, 69:2214-2224

Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K.: 2012 – *Plant Methods*, 8:17

Novák, O., Hénková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., Ljung, K.: 2012 – *Plant J*, 72:523-536

Pěnčík A., Simonovic B., Petersson S.V., Hénková E., Simon S., Greenham K., Zhang Y., Kowalczyk M., Estelle M., Zažímalová E., Novák O., Sandberg G., Ljung K.: 2013 – *Plant Cell*, 25:3858-3870

This work was supported by the "Návrat" program LK21306 and the National Program for Sustainability I Nr. LO1204 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and the grant project 14-34792S from the Czech Science Foundation.

IDENTIFIKACE KANDIDÁTNÍCH GENŮ SIGNÁLNÍCH DRAH STRIGOLAKTONU U MODELOVÉ ROSTLINY *ARABIDOPSIS THALIANA* S VYUŽITÍM METODY GWAS

NELA DAŇKOVÁ¹, RADKA SLOVAK², VILEM REINOHIL¹

¹ CEITEC – Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, CZ-61300 Brno, Czech Republic

² GMI – Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology, Dr. Bohr-Gasse 3, 1030 Vienna, Austria

E-mail: NellaDankova@email.cz

Metoda GWAS – genom-wide association studies, dříve využívaná primárně ve výzkumu lidských chorob, se v současné době stává velmi rozšířenou technikou pro studium přirozené fenotypové variability všech organismů včetně *Arabidopsis thaliana* jakožto ideálního modelového objektu pro oblast obecné genetiky i molekulární biologie. Podstatou této metody je určení genetického lokusu na chromozomu, který je zodpovědný za přirozenou variabilitu u rostlin *Arabidopsis thaliana*. Na základě běžné genetické variability jednotlivých rostlin se vyhodnocuje, jak je určitá genetická změna asociována se zkoumaným znakem – tedy jak významně jsou SNPs – single nucleotide polymorphisms – asociovány se studovanými vlastnostmi *Arabidopsis thaliana*.

Provedená studie byla založena na sledování vlivu nedávno objeveného rostlinného hormonu strigolaktonu na kořenovou architekturu rostlin *Arabidopsis thaliana*, kdy bylo sledováno a s využitím GWAS metody stanoveno, jak strigolakton ovlivňuje fenotypovou variabilitu vybraných ekotypů. Na základě této analýzy byly identifikovány kandidátní geny biosyntetické a signální dráhy strigolaktonu, tak i geny, které se podílejí na interakci s hormonem auxinem, a také geny související s utvářením cytoskeletu buňky. V rámci experimentu byly na sterilních agarových deskách pěstovány vybrané ekotypy *Arabidopsis thaliana* na médiu s přidavkem strigolaktonu, respektive na médiu kontrolním a skenovány po dobu 3 týdnů. Snímky byly vyhodnoceny počítačovým programem BRAT pro získání parametrů 16 znaků kořenové architektury a následně analyzovány GWAS technikou.

This work was supported by the project “CEITEC – Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

HIGH-THROUGHPUT PHENOTYPING – A BOOST FOR GENOMICS IN THE 21ST CENTURY

MARCUS JANSEN*, MATTHIAS EBERIUS, DIRK VANDENHIRTZ, LEMNATEC GERMANY

Lemnatec, 59 Pascalstr., Aachen 52076, Germany

E-mail: marcus.jansen@lemnatec.de

Due to the development of highly automated genetic analysis, plant genomics has immensely enlarged our understanding of the genetic structure of plants over the last two decades.

The fast evolving need to identify interactions between genes and environmental factors (biotic and abiotic) that brings about a certain plant phenome made it necessary to develop quantitative, reproducible and highly automated plant phenotyping systems for large plant numbers.

Phenotyping systems such as these have to integrate reproducible plant management (randomization, watering) and comprehensive imaging of root and shoot far beyond human vision (visible light, PS2-fluorescence, near infrared, infrared, hyper spectral, NMR, X-rays, THz) as well additional chemical analysis methods. Immediate and automated image analysis of the stored images and further data transformation using plant shape and plant growth models are the important intermediate steps before undertaking statistical data analysis of the phenotyping results to characterize plant phenotypes quantitatively. Such quantitative data contributes in a decisive way to the further analysis of gene functions (tilling, QTL etc.), especially under fluctuating or stress-induced environmental conditions with a special focus on complex traits like yield or drought tolerance.

This presentation will provide a survey on existing and new phenotyping technologies, especially field phenotyping and root phenotyping as well as the close interaction between phenotyping technologies, modelling approaches and the new opportunities of fast and automated high-throughput genomics.

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IMAGING AS A POWERFUL TOOL FOR HIGH THROUGHPUT PHENOTYPING OF EARLY STRESS RESPONSES IN PLANTS

KLÁRA PANZAROVÁ-ŠIMKOVÁ, ZUZANA BENEDIKTY, MIROSLAVA SUCHOMELOVÁ, RADKA MEZULANÍKOVÁ AND MARTIN TRTÍLEK

Photon Systems Instruments, Ltd., Drasov 470, CZ-66424 Drasov, Czech Republic

E-mail: panzarova@psi.cz

Chlorophyll fluorescence is popular technique in plant physiology used for rapid non-invasive measurement of photosystem II activity. PSII activity is very sensitive to range of biotic and abiotic factors and therefore chlorophyll fluorescence technique is used as rapid indicator of photosynthetic performance of plants in different developmental stages and/or in response to changing environment.

Here we used automated high-throughput chlorophyll fluorescence imaging technique together with other non-invasive imaging techniques in order to quantify and visualise early stress response of plants to nonselective, broad-spectrum, postemergence herbicide glyphosate. The herbicide glyphosate reduces plant growth and subsequently causes plant death by inhibiting the biosynthesis of aromatic amino acids. The aim of this study was to quantitatively investigate the time course of glyphosate mode of action in *Arabidopsis thaliana* and identify signatures informative of early onset of stress by using multi-factorial analysis approach as hyperspectral image analysis, morphometric analysis and in-depth analysis of chlorophyll fluorescence kinetics. These signatures can be used to quantify early effect of the herbicide prior any visual damage on plants can be observed by eye. To perform time-course analysis we used automated high-throughput phenotyping platform, which incorporates imaging technologies for RGB and morphometric analysis, thermal analysis, hyperspectral analysis and, critically, in-depth analysis of chlorophyll fluorescence kinetics. The latter technique, as a rapid tool for monitoring photosynthetic processes, is key to the identification of early onset of stress, and recovery from stress after amelioration.

Results of our chlorophyll fluorescence kinetic analysis demonstrate that already 3 hours after glyphosate application fluorescence decline ration (Rfd) used to asses plant vitality is reduced. Interestingly maximum photosynthetic efficiency (Fv/Fm) of the plants, which is parameter often used for monitor early onset of stress was affected only 6 hours after spraying. Normalized Difference Vegetation Index (NDVI), analysed by hyperspectral imaging, is an important indicator of chlorophyll content in plants. NDVI was reduced around 13 hours after glyphosate application, which is around 10 hours before any visual damage of the plants can be observed. Further we show that as result of glyphosate application growth dynamics of the plants is impaired within first 20 hours after spraying. We demonstrate that our in-depth analysis of chlorophyll fluorescence kinetics can be used to rapidly identify early markers of stress and can serve as robust tool for non-invasive high-resolution investigation of early changes in plant performance, here induced by glyphosate application.

Automated multi-factorial high-throughput phenotyping approaches for non-invasive capturing and interpreting of plant structural and functional phenotypes offer powerful tool for accelerating crop breeding process and for selection of desired phenotypic traits in relevant environment.

HIGH-THROUGHPUT BIOLOGICAL TESTING AND COMPLEX PLANT PHENOTYPING

JAN F. HUMPLÍK¹, TOMÁŠ FÜRST², ALEXANDRA HUSÍČKOVÁ³, DUŠAN LAZÁR³, MIROSLAV HÝBL⁴, LUKÁŠ SPÍCHAL¹

¹ Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-78371, Olomouc, Czech Republic

² Department of Mathematical Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, CZ-77146, Olomouc, Czech Republic

³ Department of Biophysics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-78371, Olomouc, Czech Republic

⁴ Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Crop Research Institute, Olomouc, Czech Republic, Šlechtitelů 11, CZ-78371, Olomouc, Czech Republic

E-mail: jan.humplik@upol.cz, lukas.spichal@upol.cz

Since 2013, the Palacký University has been equipped with two PlantScreen phenotyping systems by Photon Systems Instruments (Brno, Czech Republic). The instruments work as measuring systems for high throughput phenotyping and are located in climate chambers with LED illumination (max. 1000 µE) and controlled environment (10–40 °C, 30–99% r.h.). The first fully automated system with the capacity of 1200 standardized *Arabidopsis* pots or 480 culture multiwell plates in fixed positions employs a robotic arm for XYZ positioning. The arm is equipped with a chlorophyll fluorescence imaging system for measuring photosynthetic parameters, visual imaging system for analyzing leaf area and growth rate, and with a VIS-NIR hyperspectral imaging system for the evaluation of optical indices and parameters. The system is now being validated to be used either for high throughput phenotyping of *Arabidopsis* plants, or high throughput screenings of compound libraries in various plate-based bioassays. The second system, equipped with roller conveyer, has the capacity for high throughput phenotyping of up to 640 *Arabidopsis* plants, cereals and other crops grown in standardized pots. The measuring cabinet contains an acclimation chamber for dark adaptation of plants coupled with an automated weighting and watering area. The cabinet is equipped with chlorophyll fluorescence imaging and visual imaging systems (top and 2 side views), thermimaging to detect stomata openness and SWIR hyperspectral imaging to reveal water content. The operating software enables automatic data evaluation. The measuring protocols for cold stress sensitivity in pea plants and for general growth of *Arabidopsis thaliana* have been established and validated up to date.

POROSTOU VÁM VAŠE ROSTLINY I POD LEDEM?

MARTIN JANDA^{1,2}, OLDŘICH NAVRÁTIL¹, DANIEL HEISEL¹, BARBORA JINDŘICHOVÁ¹, LENKA BURKETOVÁ¹, NOEMI ČEROVSKÁ¹, TOMÁŠ MORAVEC¹

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

² ÚBM VŠCHT, Technická 3, Praha 6, ČR

E-mail: moravec@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 822

Nedílnou součástí moderního výzkumu na poli rostlinné biologie jsou zařízení umožňující celoroční pěstování pokusných rostlin za regulovaných podmínek. Nejčastěji používaným zdrojem osvětlení v těchto zařízeních jsou fluorescenční zářivky. Jsou snadno dostupné v různých velikostech, barevných teplotách a cenových hladinách, nevyzařují tolik tepla jako žárovky nebo sodíkové výbojky. Ovšem pokrok nezastavíme ani na poli umělého osvětlení, a tak se v poslední době stále častěji setkáváme se zdroji světla založenými na malých plochých elektronických čípech tzv. LED diodách. Oproti zářivkám nabízejí ještě nižší vyzařované odpadní teplo a možnost zakoncentrovat vyzařovanou energii a to jak prostorově tak i výběrem v podstatě jakýchkoliv vlnových délek. V této práci jsme použili LED čipy, které byly zabudovány do jinak standardní zářivky s patičí G13. Použité LED čipy nebyly monochromatické, ale poskytovaly spojitě světelné spektrum se zvýšeným podílem modrých a červených vlnových délek vhodných pro růst rostlin. Porovnali jsme růst několika běžných modelových rostlin jakož i důležitých zemědělských plodin pěstovaných pod těmito LED trubicemi s běžnými zářivkami. Kromě parametrů samotného růstu jsme během experimentu porovnali i odolnost rostlin k napadení patogeny. Věříme, že data naměřená v průběhu tohoto pilotního experimentu budou užitečná i pro celou komunitu rostlinných biologů jako odrazový můstek pro vstup do světa studeného světla.

Podporováno granty GAČR501/11/1654; 501/12/1942; 501/12/1761, MSM č. 21/2014; a OPVK 16/3.1.00/24014.

Děkujeme za zapůjčení: LED osvětlení (Restore One), měřič chlorofylu SPAD (Radomíra Vaňková, ÚEB); USB datalogger (Jan Martinec, ÚEB) a Li-Cor Quantum Photometer (Helena Synková, ÚEB).

VYUŽITÍ NGS SEKVENOVÁNÍ PRO URČENÍ STRUKTURY A PŮVODU CHROMOZOMU B KUKUŘICE

MARTINA BEDNÁŘOVÁ, NICOLAS BLAVET, JAN BARTOŠ, JAROSLAV DOLEŽEL

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, ÚEB AVČR, Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc-Holice
E-mail: bednarova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 713

B chromozomy jsou nadpočetné chromozomy, jejichž přítomnost byla pozorována u zástupců všech skupin eukaryot. Vyznačují se tím, že jsou postradatelné a až na vzácné výjimky na nich nebyly nalezeny aktivní geny. Nerekombinují s žádným ze základní sady autozomů a nevykazují mendelovskou dědičnost. B chromozomy kukuřice jsou malé a vysoce heterochromatické. V populaci se akumulují procesem nondisjunkce během druhé pylové mitózy. Vajíčko je následně oplodněno přednostně spermatickou buňkou nesoucí B chromozomy. Zatím není mnoho známo o jejich původu ani molekulárním uspořádání. Studium B chromozomů žita naznačuje, že rostlinné B chromozomy obsahují sekvence odvozené z autozomů, ale také velké množství specifických repetitivních sekvencí a inzercí původem z dalších buněčných organel nesoucích vlastní genetickou informaci ve formě DNA. V naší práci jsme se zaměřili na strukturu a původ B chromozomů kukuřice. B chromozomy byly tříděny pomocí průtokové cytometrie, jejich DNA byla amplifikována a sekvenována platformou Illumina. Krátká čtení byla následně skládána pomocí programu MaSuRCA za účelem získání delších sekvencí z B chromozomů pro další analýzy. Pomocí analýzy kódujících sekvencí a jejich porovnání s autozomálními geny byly identifikovány oblasti genomu kukuřice podílející se na evoluci B chromozomu kukuřice. Na základě získaných sekvencí byly navrženy specifické primery a podíl jednotlivých autozomů na vzniku B chromozomů bude ověřen pomocí PCR.

Tento projekt je podporován grantem LO1204 v rámci Národního programu udržitelnosti I. (MŠMT) a interní grantovou agenturou Univerzity Palackého (grant IGA PrF/2012/00).

ANALÝZA ACETYLAČNÍHO STAVU ROSTLINNÝCH HISTONŮ

SYLVA BRABENCOVÁ¹, GABRIELA LOCHMANOVÁ¹, ZBYNĚK ZDRÁHAL¹, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}, MILOSLAVA FOJTOVÁ¹

¹ CEITEC (Central European Institute of Technology) a Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 5, 625 00 Brno

² Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Kralovopolská 135, 612 65 Brno

E-mail: sylva.brabencova@seznam.cz

Acetylce rostlinných histonů (i histonů obecně) je jednou z prvních známých posttranslačních histonových modifikací ovlivňujících expresi genů. Acetylce jsou spojovány se změnami kondenzace chromatinu směrem k dekonzenzované euchromatinové struktuře a se zvýšenou přístupností transkripčních faktorů k DNA. Nejčastěji acetylovanou aminokyselinou je lyzin. Změny hladiny acetylce a s nimi spojené změny exprese genů jsou součástí epigenetického systému umožňujícího rostlině adaptaci na změnu životních podmínek (změna teploty, světla, stres).

Acetylaci histonů katalyzují enzymy histon acetyltransferázy – HAT. Působením histon deacetyláz pak dochází k odstranění acetylové skupiny. Histon acetyltransferázy jsou rozděleny do dvou kategorií, podle distribuce v buňce. HAT typu B je cytoplasmatický enzym acetylující histony před začleněním do nově syntetizovaného chromatinu. Tento enzym se vyskytuje i v jádře a předpokládá se tedy, že má i přídatné jaderné funkce. HAT typu A je zodpovědná za acetylaci histonů v jádře a řídí tak sestavení chromatinu a transkripci genů. Histon deacetylázy dělíme do 4 tříd přičemž čtvrtá třída zahrnuje 4 proteiny, které jsou pravděpodobně specifické pro rostliny.

Naším cílem je studium acetylačních stavů rostlinných histonů za užití různých podmínek pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro studium acetylací je prvním krokem izolace a následná purifikace histonů. Oba tyto kroky jsou zavedené pro živočišné histony, v případě rostlinných histonů je nutné provést optimalizaci, a proto je tento krok nyní naším primárním zaměřením. Optimalizace postupu izolace a purifikace histonů z listů modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) vede k odstranění nežádoucích kontaminantů, které by interferovaly při vlastní analýze a zahrnuje odmytí Tritonu X-100, který je součástí izolačního pufru, váže se na histony a brání tak jejich další purifikaci i analýze a odstranění jaderných a cytoplasmatických proteinů, které jsou v extraktu oproti histonům v nadbytku. Pro izolaci i purifikaci bylo použito více různých metod (např. BIO-PROTOKOL s krokem pro odmytí Tritonu X-100, SP Sepharosa, srážení, aj.). Následně byly vzorky separovány pomocí HPLC nebo 1D gelové elektroforézy a jednotlivé frakce (u SDS-PAGE po digesti trypsinem v gelu) byly analyzovány pomocí LC-MS/MS.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (P501/11/0596), v rámci projektu „CEITEC – Central European Institute of Technology“ CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu pro regionální rozvoj, a projektu CZ.1.07/2.3.00/20.0043 z Evropského sociálního fondu.

GENOMIC CONSTITUTION OF BLUE GRAINED WHEAT GENOTYPES

VERONIKA BUREŠOVÁ¹, DAVID KOPECKÝ^{1*}, JAN BARTOŠ¹, PETR MARTÍNEK², NOBUYOSHI WATANABE³, TOMÁŠ VYHNÁNEK⁴, JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Šlechtitelů 31, CZ-78371, Olomouc-Holice, Czech Republic

² Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787, CZ-76701 Kroměříž, Czech Republic

³ College of Agriculture, Ibaraki University, 3-21-1 Chuo, Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0393, Japan

⁴ Mendel University in Brno, Zemědělská 1, CZ-61300 Brno, Czech Republic

E-mail: kopecky@ueb.cas.cz

Anthocyanins determine red, purple and blue colouring in many species of fruits, vegetables, honey, olive oil, flowers and others. Nowadays, the interest in such pigment is increasing and it is not only for its natural colouring abilities but also for its beneficial properties for human health. Clinical studies revealed significant antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-carcinogenic effect of anthocyanins. Moreover, anthocyanins are proposed as a functional food component that may help to prevent heart diseases, stroke, obesity, diabetes and other lifestyle diseases.

Anthocyanins have been identified also in some cereals. High content of anthocyanins has been detected in wheat with blue aleurone layer. It is known that blue colour of aleurone is determined by the presence of alien chromatin of wild relatives in common wheat. Three such donors of introgression: *Thinopyrum ponticum*, *Th. bessarabicum* and *Triticum monococcum* were identified up to date.

We used GISH/FISH to detect introgression of *Th. ponticum* and determine wheat chromosome(s) carrying the introgression. Our analysis revealed large variation in genomic constitution of blue grained wheat genotypes. There are at least six different types of introgression. Among genotypes, we detected either the addition of the entire pair of chromosomes (cvs. Blue Baart and Blue Norco), or disomic substitution of chromosome arm (cv. UC66049) and chromosome segment(s) (cv. Xiao Yan). *Thinopyrum* substitutions were located on the wheat chromosomes of homoeologous group 4. In some genotypes (i.e. cvs. Skorpion and Tschemaks Blaukörniger Sommerweizen), we were unable to detect introgressed chromatin of *Th. ponticum* indicating different source of blue aleurone trait (presumably *T. monococcum*). Our next goal is flow sorting individual chromosomes with introgression using FISHIS (FISH in suspension) and identification the origin of *Th. ponticum* introgressions in various genotypes.

This work has been supported by the European Regional Development Fund (Operational Programme Research and Development for Innovations No. CZ.1.05/2.1.00/01.0007).

ŘÍZENÉ UMLČOVÁNÍ GENU V BUNĚČNÉ LINII TABÁKU BY-2

VOJTĚCH ČERMÁK¹, DIMITRIJ TYČ¹, ŠÁRKA MOTYLOVÁ¹, ADÉLA PŘIBYLOVÁ¹, LUKÁŠ FISCHER¹

¹ Katedra experimentální biologie rostlin PŘF UK v Praze, Viničná 5, Praha 2, 128 44, ČR

E-mail: vojta.ce@gmail.com

Mechanismus RNA interference (RNAi) náhodně objevený před několika desítkami let u rostlin a jeho následné popsání Firem a kol. 1998 znamenal velkou revoluci v molekulární biologii. Klíčovou složkou tohoto procesu jsou malé RNA (sRNA), které umožňují proteinu Argonaut (AGO) rozeznat cílové místo na základě sekvenční komplementarity. Vlastní regulace pak může probíhat buďto na úrovni posttranskripční (PTGS – degradace mRNA či blokování translace) a nebo na úrovni transkripční (TGS – epigenetické modifikace v regulačních oblastech daného genu). Jako prekursor pro tvorbu sRNA u rostlin slouží dvouvláknová RNA (dsRNA). Skutečnost, že RNAi je možné navodit takto relativně jednoduchým způsobem z ní dělá atraktivní a využívaný nástroj pro navození změn genové exprese jak v základním, tak i aplikovaném výzkumu. Důležitou roli hraje zejména v případech, kdy u daného modelového organismu nejsou dostupné T-DNA inserční mutanti, a nebo v případech, kdy je například potřeba inaktivovat funkci vybraného genu pouze v konkrétním vývojovém stádiu rostliny.

V naší laboratoři se zabýváme několika různými problematikami týkajícími se RNAi, jejichž cílem je přispět k lepšímu pochopení dynamiky a průběhu tohoto procesu. Získané poznatky pak mohou být i zhodnoceny při navrhování experimentů, které RNAi využívají. Vytvořili jsme systém umožňující tento proces snadno sledovat na buněčné línii tabáku BY-2 s využitím GFP a promotoru, jehož exprese je aktivována estradiolem. Po indukci vzniká dsRNA (komplementární k umlčovanému GFP), která slouží jako prekursor sRNA. Byly zvoleny tři různé způsoby produkce dsRNA, jež tak mohou být navzájem porovnávány: exprese vlásenky (dsRNA vzniká v rámci jedné molekuly), exprese antisense RNA (dsRNA vzniká párováním s jinou molekulou RNA) a exprese RNA bez použití terminátoru (dsRNA vzniká rozpoznáním aberrantní RNA pomocí RNA-dependentních RNA polymeráz). Použití GFP umožňuje snadné sledování průběhu umlčování s využitím fotodokumentačního systému pro hodnocení velkého množství klonů a nebo s využitím průtokové cytometrie detailnější analýzu některých již vyselektovaných klonů. Indukovatelný promotor pak dovoluje sledovat celý proces od samého počátku umlčování.

Srovnání jednotlivých variant populací klonů po indukci umlčení vedlo ke zjištění, že vlásenka je pro indukci RNAi nejúčinnější, což bylo možné očekávat na základě již publikovaných prací. Nejúčinnější přitom byla ve všech sledovaných aspektech – počet reagujících klonů, rychlost nástupu umlčování i schopnost dosáhnout nejvyšší míry umlčení (fluorescence GFP může klesnout až k úrovni pozadí). Jako méně efektivní se jevila exprese antisense RNA. Umlčování u varianty s expresí RNA bez použití terminátoru nemělo rovnoměrný průběh.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), s.806–811

Vzniklo za podpory GA UK 904813 a GA UK 253538.

OPTIMALIZACE *DE-NOVO* SESTAVOVÁNÍ TRANSKRIPTOMŮ ZÍSKANÝCH SEKVENOVÁNÍM DALŠÍ GENERACE (NGS)

JANA DRABEŠOVÁ¹, JAMES D. STONE¹, MANUELA KRÜGER¹, HELENA ŠTORCHOVÁ¹

¹ Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Rozvojová 313, 165 00 Praha 6, Česká republika
E-mail: drabesova@ueb.cas.cz

V současné době se stává sekvenování další generace stále dostupnějším a lze tedy celkem snadno získat velké množství dat. Základem dobrých výsledků, ale není jen získání těchto dat, ale především jejich dobré zpracování. *De-novo* sestavování transkriptomů je vhodným řešením pro transkriptomové analýzy organismů, pro které není zatím dostupný referenční genom. Výstup z *de-novo* assembly však může ovlivňovat mnoho faktorů, od kvality dat po nastavení jednotlivých parametrů v programech. Dosud nebyl popsán jednotný a optimální postup, jak při takové analýze postupovat. Proto jsme přistoupili k porovnání jednotlivých programů pro sestavování transkriptomů a optimalizaci postupu pro naše konkrétní data, pocházející z Illumina sekvenování 12 transkriptomů *Chenopodium rubrum*. Vybrali jsme celkem čtyři volně dostupné a v současné době používané programy pro sestavování transkriptomů (Trinity, SPAdes, SOAPdenovo-Trans, ABySS). Testovali jsme programy jak v single *k*-mer, tak multi *k*-mer nastavení. Porovnávali jsme také schopnost programů sestavit kvalitní transkriptom s použitím všech dostupných dat (300 mil. párů readů), stejně tak za použití pouze části dat. Sledovali jsme, jak se mění parametry kvality sestaveného transkriptomu (počet a průměrná délka contigů, N50) s rostoucím počtem readů. Cílem bylo získat kvalitně sestavený transkriptom, který bude možné použít pro další analýzy, především pak pro hodnocení exprese velkého množství genů za různých podmínek (např. různé fotoperiody).

Tato práce byla podpořena projektem GAČR P506/12/1359 a projektem evropského sociálního fondu (EFS) a státního fondu České republiky Operational Programme Education for Competitiveness (OPEC) „Integration of the experimental and population biology using new methods of interdisciplinary issues – the way to excellence with young scientists“ Reg.: CZ.1.07/2.3.00/30.0048.

COMPUTATIONAL IDENTIFICATION OF *HUMULUS LUPULUS* (HOP) MIRNA AND THEIR TARGET PREDICATIONS

GANESH SELVARAJ DURAISAMY¹, AJAY KUMAR MISHRA¹, JERNEJ JAKSE², AND JAROSLAV MATOUŠEK^{1*}

¹ Biology Centre AS CR, v. v. i., Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31, České Budějovice, CZ-37005, Czech Republic

² University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia

* Corresponding author

E-mail: jmat@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 525, fax: +420 385 310 356

Hop (*Humulus lupulus*) is a species of flowering plant in the Cannabaceae family, well-known for their content of biologically active phenylpropanoid metabolites. Hop glands produce resin referred to as lupulin is commercial interest for flavouring of beer and medicinal properties of carcinogenesis and potent phytoestrogens. Identification of miRNAs in hop plant play important roles in numerous biological events, greater research in this area is being stimulated. MicroRNAs (miRNAs) are small, endogenous RNAs, approximately 21 nucleotides in length that play an important regulatory role in many physiological process both in plants and animals by targeting mRNAs for cleavage or translational repression. The roles of plant miRNA's in molecular biology are leading to the development of more efficient and reliable tools for their characterization. Currently 10,898 plant miRNAs are available in plant miRNA database (PMRD). Available plant miRNAs were used to identify miRNA in hop. We proposed a modified version of existing computational tools to identify the miRNAs from Expressed sequence tags (EST) of hop. Based on this approach we identified 25 miRNAs and predicted their potential target. Among 25 miRNAs some microRNAs were also identified having putative role in regulation of transcriptional factors (bZIP, zinc finger, C3HC4, Rap30/Rap74 TFs and Nuclear transcription factor Y) and Kinase involved in signal transduction (BAK1-interacting receptor-like kinase 1). bZIP class of TFs was identified to be involved in regulation of lupulin biosynthesis in hop (Matoušek *et al.*, 2010) and C3HC4 class in know to regulate plant flowering. Conventional expression analyses were used to verify those miRNAs.

Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak J., Stehlík, J., Füßy, Z., Krofta K., Heyerick, A., Roldán-Ruiz I., Maloukh L., De Keukeleire D., (2010). Cloning and Molecular Analysis of HlbZip1 and HlbZip2 Transcription Factors Putatively Involved in the Regulation of the Lupulin Metabolome in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(2): 902–912

The project was supported by the Czech Science Foundation (GAČR 13-03037S) by the cooperative project FP7-REGPOT-2012-2013-1 MODBIOLIN No. 316304 and by institutional support RVO: 60077344.

A DRAFT GENOME OF THE RECENTLY DISCOVERED PEAT BOG CYANOBACTERIUM

PETR DVOŘÁK¹, DALE A. CASAMATTA², PETR HAŠLER¹, ALOISIE POULÍČKOVÁ¹, VLADAN ONDŘEJ¹ & REMO SANGES³

¹ Department of Botany, Faculty of Sciences, Palacký University Olomouc, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

² University of North Florida, Department of Biology, 32224 Jacksonville, Florida, U.S.A.

³ Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli, Italy

E-mail: p.dvorak@upol.cz

Synechococcus is one of the most important primary producers on global scale exhibiting very simple morphology and small size. Its abundance is increasing with global warming and it inhabits almost all environments including marine, thermal, and polar. On the other hand, *Synechococcus*, together with other cyanobacteria, is generally rare in acidified environments. Furthermore, *Synechococcus* is enigmatic polyphyletic group with complicated evolutionary history. We used 454 pyrosequencing to retrieve a draft genome of the *Synechococcus*-like cyanobacterium isolated from a peat bog, where it inhabits various habitats of a biotic origin including hyaline cells of *Sphagnum* plants. Based on 16S rDNA phylogeny, it forms separate cluster from all other *Synechococcus* lineages close to the filamentous cyanobacterium *Leptolyngbya*. It has recently allowed us to erect new genus *Neosynechococcus*. The genome of size ca. 4.3 Mb belongs to more complex *Synechococcus*-like genomes. Repeats and tRNA composition correspond to other published cyanobacterial genomes. 47 % of genes annotated by homology were hypothetical. In conclusion, besides its evolutionary importance, which is underlined by its position among other cyanobacteria, the *Neosynechococcus* genome may reveal specific metabolic pathways of peat bog cyanobacteria.

This work was supported by Post-UP II CZ.1.07/2.3.00/30.0041.

MIKROSKOPICKÁ DETEKCE POLYFENOLICKÝCH LÁTEK VE ZRALÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍCH SMRKU PO OZÁŘENÍ UV-B

KATEŘINA ELIÁŠOVÁ, ZUZANA VONDRÁKOVÁ, MILENA CVIKROVÁ

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

Suchozemské rostliny se jako přisedlé organismy musí vypořádat s celou řadou abiotických stresů včetně krátkověnné složky jinak pro rostliny životně důležitého slunečního svitu – ultrafialového záření (UV-B). Množství UV-B záření, které dopadá na Zemi, je velmi proměnlivé. Nízká úroveň UV-B radiace působí jako přirozený regulátor genové exprese, buněčných a metabolických aktivit, ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Životní prostředí na Zemi je ovšem výrazně ohroženo ztenčováním ozónové vrstvy ve stratosféře, které vede ke zvýšení UV-B radiace. Ve vysokých dávkách ultrafialové záření poškozuje DNA, proteiny i membrány, narušuje fotosyntézu a růst rostlin. Klíčovým faktorem UV-B stresu je stres oxidativní, vyvolaný produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Rostliny odpovídají na UV-B záření syntézou širokého spektra sekundárních metabolitů, včetně látek s antioxidačními vlastnostmi a fenylypropanů s UV-B ochranným charakterem.

Soustředili jsme se na stanovení změn v lokalizaci kondenzovaných taninů, derivátů kyseliny skořicové a flavonoidů ve zralých somatických embryích smrku ztepilého (*Picea abies* L. (Karst.)), linie AFO 541, která byla 10 dní desikována. Embrya byla ozářena UV-B v intenzitách 0,1, 0,6 a 6 W/m². Vzorky byly analyzovány 3. a 7. den po ozáření. Kondenzované taniny byly detekovány histochemicky na podélných čerstvých řezech embryí pomocí HCl-vanilínového testu a Hoepfner-Vorsatzova testu. Oba tyto testy prokázaly přítomnost kondenzovaných taninů v povrchových vrstvách především kořenové čepičky embryí ve všech variantách. Množství kondenzovaných taninů se po ozáření mírně zvýšilo. K nejvýraznější změně došlo u embryí vystavených UV-B o intenzitě 6 W/m². U této varianty jsme pozorovali zvýšené množství kondenzovaných taninů nejen v oblasti kořenové čepičky, ale i hypokotylu a děloh.

Na absorpci UV-B záření se podílejí především deriváty kyseliny skořicové (např. kyselina ferulová), které jsou vázány v buněčných stěnách. Flavonoidy, lokalizované převážně ve vakuolách, mají významné antioxidační vlastnosti. Tyto fenolické látky jsou po excitaci UV-zářením zdrojem výrazné modro-zelené autofluorescence. K jejich studiu jsme proto využili konfokální mikroskop Zeiss LSM 5 Duo. Provedli jsme spektrální analýzu po excitaci laserem 405 nm (BP 470–500 nm) – pozorování derivátů kyseliny skořicové a 488 nm (BP 530–600 nm) – pozorování flavonoidů. Přirozená autofluorescence byla zvýšena aplikací 0,1% 2-aminoethyl difenylborinátu (Naturstoffreagenz A ve fosfátovém pufru, pH 6,7; zásobní roztok 2,5% v ethanolu) na čerstvé podélné řezy embryí. Embrya vystavená UV-B záření o různé intenzitě vykazovala zvýšení fluorescence v modré (deriváty kyseliny skořicové v buněčných stěnách epidermis) i zelené oblasti (flavonoidy ve vakuolách epidermis a svrchní vrstvy kortexu). Nejvýraznější zvýšení autofluorescence flavonoidů jsme pozorovali v oblasti kořenové čepičky; po ozáření o nejvyšší intenzitě také na povrchu děloh a hypokotylu.

Podporováno grantem MŠMT LD13051.

KOMPARATIVNÍ ANALÝZA TELOMER A TELOMERÁZY U HYBRIDŮ PLANÝCH × KULTIVOVANÝCH ODRŮD BRAMBORU

PETR FAJKUS^{1,2}, EVA SÝKOROVÁ^{1,2}, JIŘÍ PTÁČEK³, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, CZ-61265 Brno

² Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC, Masarykova univerzita, Kamenice 5, CZ-62500 Brno

³ Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o., Dobrovského 2366, CZ-58001 Havlíčkův Brod

E-mail: fajkuspe@seznam.cz

Většina rostlin, ačkoliv se jedná často o různé paleopolyploidy, si udržuje jednu variantu genu pro katalytickou podjednotku enzymu telomerázy (TERT). Zdá se, že během evoluce v genomech rostlin funguje nějaký neznámý mechanismus limitující počet genů pro TERT. Nedávné výsledky sice odhalily, že některé druhy z čeledi *Solanaceae* mají více variant *TERT* genů včetně pseudogenů – což mohou být i původní knockoutované varianty od jednoho z genomových donorů při hybridizaci. Je možné, že zástupci čeledi *Solanaceae* jsou tolerantnější k přítomnosti více variant *TERT* genů, avšak trend je zde podobný jako u většiny ostatních rostlin s telomerázou – tedy zachovávat jednu variantu *TERT* genu. Výzkum telomer a telomerázy na nově vzniklých mezidruhových hybridech *Solanum tuberosum* má za cíl odhalit, co se děje po hybridizaci genomů s rodičovskými telomerázami u hybridních rostlin, tak jak tomu mohlo být v minulosti u řady jiných druhů během jejich evoluce, a jaký má vliv přítomnost obou rodičovských systémů udržujících telomery na syntézu telomer. Pro experimentální výzkum byly použity metody pro: měření délek telomer – TRF (Terminal Restriction Fragment analysis), analýzu hybridnosti genomu získaných hybridů – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a GISH (Genomic *In Situ* Hybridisation), analýzu aktivity telomerázy a její exprese – TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol) a qPCR. Zde jsou prezentovány nejnovější poznatky z oblasti komparativní analýzy telomer a telomerázy u hybridů planých × kultivovaných odrůd brambor získané uvedenými metodami.

Projekt je řešen s podporou GAČR (13-06943S) a Evropského sociálního fondu (CZ.1.07/2.3.00/20.0043).

IMAGING OF LIVING AND MOVING SAMPLES BY CONFOCAL MICROSCOPY

MATYAS FENDRYCH, ROBERT HAUSCHILD, JIRI FRIML

Institute of Science and Technology (IST) Austria, 3400 Klosterneuburg, Austria

E-mail: fajkuspe@seznam.cz

For many biologists, confocal microscopy is the principal source of data. While imaging of fixed samples is pretty straightforward, imaging of living samples for longer periods of time poses several inherent challenges – including phototoxicity, mechanical stress, light availability and movement of the sample. Here I want to sum a few approaches and tricks we use to overcome these issues when imaging *Arabidopsis* and moss samples. We use the vertical confocal setup with illumination mimicking the growthroom conditions; and we employ several approaches to correct the movement of samples both after imaging, and also an automatic object tracking system operating during the imaging process. I will show several examples of data acquired using our setup.

ROSTLINNÁ FOSFOPROTEOMIKA

JAN FÍLA^{1,2}, ANDREA MATROS³, SONJA RADAU⁴, RENÉ PEIMAN ZAHEDI⁴, VĚRA ČAPKOVÁ¹, HANS-PETER MOCK³, DAVID HONYS¹

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

² Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2, Česká republika

³ Skupina aplikované biochemie, Oddělení fyziologie a buněčné biologie, IPK Gatersleben, Gatersleben, Německo

⁴ Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften-ISA-e.V., Dortmund, Německo

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

Fosforylace proteinů představuje velmi dynamickou posttranslační modifikaci. Navázání fosfátové skupiny na protein výrazně mění jeho vlastnosti. Dojde k posunu isoelektrického bodu do kyselější oblasti, díky čemuž zpravidla dochází ke změně konformace dané domény i mezidoménových interakcí. V jiných proteinech může fosfátová skupina navázaná do aktivního místa blokovat aktivitu daného enzymu.

Fosforylace může mít regulační nebo signalizační funkci v mnoha buněčných procesech, reguluje například buněčné dělení, transkripci, translaci, dynamiku cytoskeletu a umožňuje přenos signálu z plazmatické membrány do nitra buněk.

Navzdory své významné roli bývají fosfoproteiny v buňce málo koncentrované a navíc mohou v buňce být spolu se svou původní, nefosforylovanou formou. Kromě toho jsou fosfopeptidy ve směsi s nativními peptidy hůře identifikovatelné pomocí hmotnostní spektrometrie, protože se v pozitivním skenovacím módu hůře ionizují. Z těchto důvodů bývá nutné zbavit se ve vzorku nefosforylovaných proteinů (nebo peptidů), a získat tak k frakci obohacenou o fosforylované proteiny (nebo peptidy).

K obohacení vzorku se obvykle přistupuje buď na úrovni celých fosfoproteinů, anebo na úrovni proteinů naštěpených specifickou proteázou (typicky trypsinem) na peptidy. Obecně využívají obohacovací techniky jednoho ze tří principů. První možností je využití protilátek, jejichž epitopem jsou jednotlivé fosforylované aminokyseliny. Tento přístup našel největšího uplatnění při obohacování fosfotyrosinových míst. Fosforylovaný serin nebo threonin se pomocí protilátek neobohacují příliš efektivně, protože protilátky nerozeznávají pouze samotnou fosforylovanou aminokyselinu, ale také sousední aminokyseliny. Druhý princip využívá záporného náboje fosfátových skupin; pomocí kladně nabitých kovových iontů (ať už v podobě iontů navázaných na nosič nebo kovových iontů vázaných v oxidech) pak mohou být vychytány na pevnou fázi a uvolněny do příslušného pufru. Poslední okruh metod spadá do využití specifické chemické modifikace fosforylovaných aminokyselin a jejich obohacování za využití právě takto modifikovaných skupin.

Tento příspěvek bude zaměřen na výhody a limitace různých obohacovacích protokolů užívaných ve fosfoproteomice. Jako příklad budou využity naše experimenty na zralém pylu tabáku a pylu aktivovaném *in vitro* 5 min nebo 30 min.

Výzkum byl finančně podpořen granty GAČR (P501/11/1462, P305/12/2611).

LARGE SCALE ORGANIZATION OF CHROMATIN IN PEA CENTROMERES

IVA FUKOVÁ, PAVEL NEUMANN, JIŘÍ MACAS

Biologické centrum AV ČR, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, ČR

E-mail: ifukova@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 511

Chromosomes of garden pea (*Pisum sativum*) possess one of the most complicated centromeres described so far, consisting of multiple CenH3 domains separated by megabases of pericentric chromatin (Neumann et al. 2012). Pea centromeres contain rich and diverse population of satellite repetitive sequences some of which are associated with functional centromere domains and others that lie outside CenH3 clusters (Neumann et al. 2002). Pea thus offers a great system for studying gross architecture of centromeric chromatin. Current models of large scale chromatin organization in metaphase chromosome in most cases neglect centromere although it forms a prominent part of the chromosome with an essential function for faithful chromosome segregation. The models presented in literature concerned with centromeres (reviewed in Verdaasdonk and Bloom 2011) are often partial or so simplified that it is problematic to fit them to the actual observation.

Here we examined high order chromatin packaging of pea centromeres at metaphase by comparing FISH hybridization patterns of a set of centromere-specific probes on metaphase chromosomes with that on less condensed pachytene bivalents. We present results from comparison of our data with the prediction of available models of centromere architecture. Further we studied the behaviour of CenH3 domains and pericentromeric repeats during interphase and correlated changes in their respective orientation with the onset of mitosis. We believe our data will bring a new insight in the knowledge of the general structure of centromeres and will stimulate others to contribute to the endeavour.

Neumann P, Navrátilová A., Schroeder-Reiter E., Koblížková A., Steinbauerová V., Chocholová E., Novák P., Wanner G., Macas J.: 2012 – PLoS Genet 8(6): e1002777.

Neumann P, Požárková D., Vrána J., Doležel J., Macas J.: 2002 – Chromosome Res 10: 63–71.

Verdaasdonk J.S., Bloom K.: 2011 – Nat Rev Mol Cell Biol. 12: 320–32.

This research was supported by grants from the Czech Science Foundation of the Czech Republic (P501/11/1843 and P501/12/G090) and the Academy of Sciences of the Czech Republic (AVOZ50510513).



My Roche Box

Vážení zákazníci,

nabízíme Vám možnost si zdarma navrhnout osobní Roche Box – krabičku pro uskladnění Vašich reagensů v mrazáku.

**Vyberte si vlastní obrázek, fotografii, nápis
a Váš Roche Box poznáte na první pohled!**

Je to velmi snadné:

1. Navštivte stránky **www.myrochebox.cz**
2. Vložte vlastní obrázek nebo si vyberte obrázek z naší databáze.
3. Vložte vlastní text.
4. My Vám Váš Box zdarma doručíme a zároveň od nás získáte voucher na 50% slevu na vybrané reagensy.

Pokud budete potřebovat další informace, napište nám na adresu:

czech.appliedscience@roche.com

VÝVOJ METODY IRAP PRO HODNOCENÍ GENETICKÉ DIVERZITY MÁKU SETÉHO (*PAPAVER SOMNIFERUM* L.)

Jiří HORÁČEK, MICHAELA PAVELKOVÁ

AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s. r. o., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk
E-mail: horacek@agritec.cz, tel.: +420 583 382 127

Mák setý je po řepce naší nejdůležitější olejninou. Česká republika je největším producentem a určujícím nositelem evropských i světových cen semen máku. Pro efektivní výběr vhodných genotypů jako výchozích genetických zdrojů při šlechtění máku je účelné zavést postupy molekulární genetiky. V případě genomicky málo prostudovaných organismů s minimem dostupných sekvenčí, jako je právě i mák setý, je dosud možno využít jen univerzálních, sekvenčně nespecifických technologií, jako je RAPD, ISSR či AFLP. V případě RAPD a ISSR se již jedná o technologicky zastaralé metody, trpící řadou nedostatků (především nízkou reprodukovatelností, nízkou mírou polymorfismu a špatným přenosem mezi laboratořemi). V případě AFLP se jedná o technicky dosti náročnou metodu s vysokými nároky na optimalizaci a vybavení laboratoře. Proto byla vyvinuta metodika založená na modernější, ale stále ještě univerzální technologii využívající repetitivních sekvencí. Při použití metody iPBS (inter-primer binding site) je pomocí PCR amplifikován úsek mezi primery a PBS (primer binding site) doménami. Z ní odvozená je technologie IRAP (Inter Retroelement Amplified Polymorphism), fungující v případě vysoce abundantních elementů, kdy je oblast mezi jednotlivými elementy možno PCR amplifikovat a detekovat ve formě DNA fragmentů (Kalendar *et al.* 2010). Právě metoda IRAP byla využita pro potřeby analýzy genetické struktury kolekce máku. Pro vývoj a optimalizaci metody bylo vybráno 16 geograficky a pasportně vzdálených odrůd máku. Pomocí sady univerzálních primerů nasedajících na konzervativní oblasti retrotranspozonů byl na tomto souboru sledován polymorfismus amplifikovaných fragmentů DNA. Celkem bylo testováno 82 univerzálních primerů. Fragmenty s nejvyšším stupněm polymorfismu byly klonovány a osekvenovány. Bylo získáno celkem 66 sekvencí, ve kterých byly vyhledávány oblasti LTR (Long Terminal Repeats). Na základě sekvencí bylo navrženo celkem 45 IRAP primerů, specifických pro LTR oblasti máku. Tyto primery byly testovány jednotlivě i v kombinacích. Vybrané IRAP primery s nejvyšším stupněm polymorfismu byly dále využity při hodnocení celé genetické diverzity kolekce máku.

Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. (2010): iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation, *Theor Appl Genetics*, 121:1419–30

Podporováno grantem TA CR č. TA01010375.

Poděkování: Mgr. Vrbovskému ze spolřešitelského pracoviště OsevaPro za dodání vzorků rostlin máku setého, Dr. Petru Smýkalovi z Univerzity Palackého a Dr. Ruslanu Kalendarovi z University of Helsinki za pomoc při návrhu primerů IRAP.

CHARACTERIZATION OF CYTOKININ METABOLISM KINETICS IN *ARABIDOPSIS* THROUGH EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL TECHNIQUES

HOSEK P.^{1,2}, HOYEROVA K.¹, KIRAN N. S.³, DOBREV P. I.¹

¹ Institute of Experimental Botany, the Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 263, CZ-16502 Prague 6, Czech Republic

² Department of Biomedical Informatics, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, nám. Sítná 3105, CZ-27201 Kladno 2, Czech Republic

³ Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, CZ-61300 Brno, Czech Republic

E-mail: hoyerova@ueb.cas.cz

Cytokinin metabolism is rather complex network of reactions determining the concentration of particular cytokinin forms in plant tissues, thus modulating their biological effects. Kinetics of several enzymes involved in cytokinin metabolism have previously been investigated in vitro but transition of these results into physiological conditions in plants is not straightforward. Experimental studies in vivo are, therefore, still beneficial for getting an image of cytokinin metabolic machinery. Moreover, through the use of computational modelling the experimental results can be processed and kinetics of principal metabolic pathways can be estimated.

In our study 14-day-old *Arabidopsis* seedlings were incubated in presence of trans-zeatin, cis-zeatin, dihydrozeatin and isopentenyladenin for 15, 30, 60 and 120 minutes and resulting cytokinin levels in roots and shoots were measured by HPLC. After interactive visualisation and analysis of the results the metabolic system was divided into four subsystems according to particular incubations and independent multicompartament mathematical models of these subsystems were then constructed. Multiple Monte Carlo optimization of the models was carried out providing estimates of kinetic parameters of the major reactions. Subsequent sensitivity analysis and statistical analysis provided further insight into parameter importance and reliability of the estimates.

KOMUNIKACE LISTU S PROSTŘEDÍM – METODY STUDIA

MARIE HRONKOVÁ^{1,2}, DANA WIESNEROVÁ¹, MARIE ŠIMKOVÁ¹, MARTINA VRÁBLOVÁ², PETR SKŮPA³, PETRE I. DOBREV³, EVA ZAŽÍMALOVÁ³ A JIŘÍ ŠANTRŮČEK^{1,2}

¹ BC AV ČR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR

² KEBR, PrF JČU, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR

³ ÚEB AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje, ČR

E-mail: hronkova@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 532

List je základním fotosyntetizujícím orgánem rostliny. V průběhu svého vývoje reaguje na podněty z vnějšího prostředí a jeho podoba je výsledkem interakce geneticky dané informace s vlivem vnějšího prostředí. Nejdůležitějšími vnějšími podmínkami, ovlivňujícími hustotu průduchů na listu jsou světlo, dostupnost vody a CO₂ (Casson, Hetherington, 2010). Studium hustoty a uspořádání průduchů, jež zprostředkují výměnu vodní páry a CO₂ s okolním prostředím, umožňuje i hlubší pochopení obecnějších mechanismů dělení, prodlužování, diferenciací a komunikace buněk. Meristemoid, z nějž průduchy v epidermis převážně vzniká, je nediferencovaná „kmenová“ buňka, uprostřed buněk již diferencovaných (hotové průduchy a dlaždicové epidermální buňky).

Světlo podporuje vývoj průduchů v epidermis listu u *Arabidopsis thaliana* patrně také díky stomagenu (Sugano *et al.*, 2010, Kondo *et al.*, 2010), malému proteinu – epidermálnímu faktoru, který se syntetizuje v mezofylu a pozitivně působí na vývoj průduchů v epidermis. Chceme ukázat, že se tak děje v interakci s dalšími proteiny většinou syntetizovanými v epidermis (TMM, ERECTA – součást komplexu receptoru na membráně a SDD1 – subtilasa ne zcela objasněné funkce).

Roli ve změně hustoty průduchů (zjištěné pomocí Image J softwaru pro analýzu obrazu ze snímků získaných optickým mikroskopem z otisků listů do bezbarvého laku na nehty či dentální hmoty a laku) hraje patrně vnitřní koncentrace CO₂ v listu (Šantrůček *et al.*, 2014). Tu lze určit za použití analýzy diskriminace stabilního izotopu ¹³C v sušině listů na základě modelu odvozeného Farquharem *et al.* (1982). Svou roli patrně hraje i hladina „klasických“ rostlinných hormonů (ABA a IAA), stanovené v listech pomocí LC-MS.

Relativní míra exprese proteinů účastnících se vývoje průduchů, ovlivněná vnějším prostředím či změnou genetické informace u mutantů (*tmm*, *sdd1*) poskytnutých prof. Sackem z USA a linií (St-RNAi, St-Ox- umlčení a zvýšená exprese *STOMAGENU*), z provenience laboratoře prof. Hara-Nishimura z Japonska, byla stanovena pomocí Real-time RT-PCR s využitím Taq-Man sond firmy Life Technologies – Applied Biosystems.

In situ byla pozorována exprese *STOMAGENU* pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie v mezofylu a epidermis listů *A. thaliana* linie ST-Venus, s fluorescenčním markerem („Venus“ – žlutá modifikace GFP), kterou nám rovněž poskytla prof. Hara-Nishimura z Univerzity v Kyoto (Sugano *et al.*, 2010). Buňky byly zviditelněny pomocí fluorescenčního barviva FM 4-64, které se váže na plasmatickou membránu.

Casson SA, Hetherington AM. 2010. Environmental regulation of stomatal development. *Cur Opin Plant Biol* 13, 90–95

Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the inter-cellular carbon-dioxide concentration in leaves. *Aust J Plant Physiol* 9, 121–137.

Kondo T, Kajita R, Miyazaki A, Hokoyama M, Nakamura-Miura T, Mizuno S, Masuda Y, Irie K, Tanaka Y, Takada S, Kakimoto T, Sakagami Y. 2010. Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant Cell Physiol* 51, 1–8

Šantrůček J, Vráblová M, Šimková M, Hronková M, Dřtinová M, Kveton J, Vrábl D, Kubasek J, Macková J, Wiesnerová D, Neuwirthová J, Schreiber L. 2014. Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO₂ concentration. *Annals of Botany* 114, 191–202.

Sugano S, Shimada T, Imai Y, Okawa K, Tamai A, Mori M, Hara-Nishimura I. 2010. Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis*. *Nature* 463, 241–244

Podporováno grantem GAČR P501/12/1261.

STUDIUM EVELOCE rDNA POLYPLOIDNÍCH ROSTLIN *SPARTINA MARITIMA* A *SPARTINA ALTERNIFLORA* POMOCÍ 454 SEKVENOVÁNÍ

DALIBOR HÚSKA¹, JULIE FERREIRA DE CARVALHO², ANDREW LEITCH³, ILIA LEITCH⁴, MALIKA AINOUCHE², ALEŠ KOVAŘÍK¹

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

² UMR 6553 ECobio Université de Rennes 1, Bât 14A Campus de Beaulieu, Francie

³ Queen Mary University of London, School of Biological and Chemical Sciences, Mile End Road, London E1 4NS, UK

⁴ Jodrell Laboratories, Royal Botanic Garden, Kew, UK

E-mail: huska@ibp.cz, tel.: +420 541 517 230

Ribozomální DNA (rDNA) patří mezi důležité genetické markery, jež využívají mnohé fylogenetické studie. U většiny rostlin se nacházejí v mnoha kopiích. Každá kopie nese geny pro 18S, 5,8S a 26S rRNA, které jsou odděleny nekódujícími oblastmi (intra- a intergenové mezerníky: ITS a IGS). Kódující oblasti genu jsou evolučně konzervovány, zatímco intra a intergenové mezerníky divergují podstatně rychleji. Navzdory tomu, že hybridní a allopolyploidní organismy dědí alely od svých rodičů, v mnohých případech dochází ke ztrátám homeologních rDNA či změnám poměru jednotlivých genů v rámci, doposud ne zcela objasněného procesu, homogenizace rDNA jednotek. Kvůli existenci vysoce multikopiových paralogních genů není snadné určit stupeň homogenizace pomocí klasických přístupů sekvenování. V této práci ukazujeme intragenomickou variabilitu rDNA jednotek u dvou hexaploidních druhů *S. alterniflora* a *S. maritima*, které divergovali před ~3 mil. let, pomocí tzv. „deep“ sekvenování PCR amplikonů.

Pomocí emulzní PCR byl amplifikován úsek, pokrývající část 18S genu a celou ITS1 sekvenci. Následně byla provedena sekvenace pomocí platformy 454 GS-FLX. Bylo získáno >10000 sekvencí reprezentujících téměř 4 násobek všech rDNA v daném genomu. Následně byla provedena SNP a kvantitativní analýza získaných sekvencí.

Konsensní sekvence ITS1 jednotlivých druhů vykazovaly 32 (12 %) konzervovaných polymorfních míst. Nejfrekventovanějšími polymorfizmy byly tranzice (C↔T/G↔A). Vysoké zastoupení SNPs bylo překvapivě nalezeno i v kódující oblasti 18S genu. Většina těchto SNPs se nachází v potencionálně methylovatelných sekvenčních motivech. Co se týče počtu variant rDNA, *S. alterniflora* obsahuje jeden převažující ribotyp, jak pro ITS1 tak i 18S gen, zatímco *S. maritima* má dvě dominantní varianty ITS1 i 18S genu. Další analýza ukázala, že dominantní ITS1 ribotyp *S. alterniflora* se nachází v 0,2 % u *S. maritima*, která nenese žádný ribotyp od *S. alterniflora*. Vysoké procento mutací v kódujících oblastech 18S genu u obou druhů, může být zapříčiněno deaminací cytosinu na thymin. Proces homogenizace rDNA jednotek (možná i celého genomu) je vysoce akcelerovaný u *S. alterniflora*, kdežto u *S. maritima* probíhá relativně pomalu.

STUDIUM ORGANIZACE JADERNÉHO GENOMU U KOSTŘAV (*FESTUCA* SP.) POMOCÍ FISH

ANNA CHMELÁŘOVÁ, EVA HŘIBOVÁ, DAVID KOPECKÝ, JAROSLAV DOLEŽEL

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin),
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc-Holice, ČR
E-mail: chmelarova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 728

Velká část jaderné DNA většiny rostlinných druhů je složena z různých typů repetitivních DNA elementů. Na základě distribuce repetitivních v genomu odlišujeme dvě skupiny: tandemové a rozptýlené repetice, jejichž studium nám může pomoci v porozumění evoluci a organizaci rostlinných genomů. Rozptýlené repetice se v různé míře vyskytují po celém genomu a při fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) dávají typický disperzní signál, zatímco tandemové repetice (TR) jsou lokalizovány v tzv. klastrech, které mohou poskytnout signál specifický jen na určitých částech chromozomů. Tandemově organizované repetice se obvykle vyskytují v centromerických nebo subtelomerických oblastech. Některé TR jsou proto využívány jako cytogenetické markery např. pAs1, pSc119.2 nebo GAA používané k identifikaci jednotlivých chromozomů u obilnin; jiné TR mohou být genomově specifické. U rodu kostřava (*Festuca* sp.) byly dosud cytogeneticky zamapovány pouze 5S a 45S rDNA genové lokusy, které kódují strukturní RNA ribozomů; organizace dalších repetitivních DNA sekvencí nebyla dosud zkoumána.

V předchozí studii (Kopecký *et al.*, 2013) jsme získali Illumina sekvenční data z chromozomu 4F kostřavy luční (*F. pratensis*) vyřídného pomocí průtokové cytometrie. V sekvenčních datech bylo identifikováno 15 pravděpodobných TR a různé skupiny retroelementů a DNA transpozónů. V této práci jsme se zaměřili na využití repetitivních DNA sekvencí identifikovaných v Illumina datech chromozomu 4F ke studiu struktury a organizace jaderného genomu kostřavy luční.

Tandemový charakter *in silico* identifikovaných TR byl potvrzen pomocí Southernovy hybridizace s genomovou DNA izolovanou z různých druhů kostřav. Na základě výsledků hybridizace bylo vybráno 5 TR, které poskytly dobře viditelný „ladder-like“ patern a použito pro mapování na metafázni chromozomy kostřavy luční cv. „Fure“ pomocí vícebarevné FISH. Různé kombinace těchto 5 TR společně se sondami pro 5S a 45S rDNA umožnily zřetelné odlišení všech 7 chromozomů kostřavy luční cv. „Fure“. Tyto sondy fungovaly také u dalších odrůd kostřavy luční, ačkoli mezi nejmenšími chromozomy 5, 6 a 1 byla pozorována mírná variabilita signálu.

Mobilní DNA elementy byly amplifikovány pomocí PCR se specifickými primery a vzniklé produkty byly následně sekvenovány pomocí Sangerovy technologie. Na základě Sangerova sekvenování byly vybrány klon s nejvyšší homologií k *in silico* kontigům jednotlivých druhů mobilních elementů a následně použity jako sondy pro mapování jaderného genomu pomocí FISH. Většina sond poskytla typický disperzní signál po celé délce chromozomů se sníženou intenzitou v oblasti centromer a telomer. Výjimkou byl klon CL4/141 nesoucí DNA sekvenci homologní ke Cacta DNA transpozónu, který byl lokalizován v subtelomerických oblastech všech chromozomů. Obdobně, specifickou lokalizaci do oblasti centromer poskytl klon CL38/72, který obsahuje části LTR oblastí a nebylo možné ho blíže charakterizovat.

Výsledky této práce umožňují karyotypování a identifikaci chromozomů kostřavy luční pomocí 5 tandemových repetitivních nalezených v Illumina sekvenčních datech z chromozomu 4F. Ověřili jsme, že mobilní DNA elementy identifikované v datech specifických pro chromozom 4F jsou přítomny i na ostatních chromozomech. Převážná část mobilních DNA elementů je v jaderném genomu druhu kostřava luční lokalizována rozptýleně, některé z nich však poskytly specifickou lokalizaci v subtelomerické a centromerické oblasti.

Kopecký D., Martis M., Číhalíková J., Hřibová E., Vrána J., Bartoš J., Kopecká J., Cattonaro F., Stočes Š., Novák P., Neumann P., Macas J., Šimková H., Studer B., Asp T., Baird J. H., Navrátil P., Karafiátová M., Kubaláková M., Šafář J., Mayer K., Doležel J.: 2013 – Plant Physiol, 163: 3

Tato práce byla podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. LO1204 a grantem Grantové agentury České republiky č. P501/11/0504.

HIGH-THROUGHPUT GENE RESOURCES AND PHENOTYPING—THE KEY FACTORS IN FINE MAPPING OF NEW *Eps* GENE

ZUZANA IVANIČOVÁ¹, ZBYNĚK MILEC¹, MARTINA TRÁVNÍČKOVÁ², MICHAEL ABROUK¹, MIROSLAV VALÁRIK¹, ILJA T. PRÁŠIL², KATEŘINA PÁNKOVÁ², JOHN W. SNAPE³, JAN ŠAFÁŘ¹

¹ Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Šlechtitelů 31, Olomouc, Czech Republic

² Crop Research Institute, Drnovská 507/73, Prague, Czech Republic

³ John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom

E-mail: ivanico@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 283 717

Acceleration and delay of heading time was identified in Sandra (CP3B) substitution line under long or short day conditions, respectively. The 3B chromosome in Sandra was substituted from Czech wheat landrace Česká přesívka. The heading time difference of one day under long days or two days under short days may be caused by earliness *per se* (*Eps*) gene. The gene was localized within 30cM region of long arm of 3B chromosome and designated *QFt.cri-3B.1*. The locus was delineated by *barc164* and *cfa2170* microsatellites markers.

An F₄ NILs (Nearly Isogenic Lines) mapping population was developed by crossing Sandra (CP3B) substitution line with Sandra variety in order to localize gene precisely.

274 DAAT, SSR and STS markers were used for saturation of the *QFt.cri-3B.1* region. To acquire more markers we flow sorted and sequenced 3B chromosome from Česká přesívka. Obtained sequences were assembled and *QFt.cri-3B.1* region was refined.

27,388 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) specific for the *QFt.cri-3B.1* region were identified using SNPLauncher pipeline (developed by Helene Rimbart – INRA Clermont-Ferrand – GDEC). The identified SNPs have been used for sequence-based and KASP markers development. From all tested markers nearly 80% were successfully converted and applied on mapping population.

For fine mapping of the *QFt.cri-3B.1* locus, precise phenotype needs to be assessed. For this purpose a NILs mapping population is being developed.

Both F₅ NILs mapping population as well as obtained SNP genotyping sources will be used for precise fine mapping of the gene which will be eventually followed by positional cloning. Candidate gene/genes analysis and its detailed characterization will provide novel information which could lead to deeper understanding of fine tuning flowering time in wheat. Furthermore, determined effect could be useful in creating new varieties and finding new growth areas in different climate conditions.

This work has been supported by the Czech Science Foundation (P501/10/1778) and MSM CR and EU (Operational Programme Research and Development for Innovations No. ED0007/01/01).

INTERAKCE *ARABIDOPSIS THALIANA* A *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

MARTIN JANDA^{1,2}; LENKA BURKETOVÁ² A OLGA VALENTOVÁ¹

¹ Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice

² Laboratoř patofyziologie rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 – Lysolaje

E-mail: martin.janda@vscht.cz

Bez efektivní obrany by rostliny v neustálém souboji s patogeny neměly šanci na přežití. Významnou roli ve studiu obrany rostlin zaujímá patosystém *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) – *Pseudomonas syringae*. *A. thaliana* je typickou představitelkou modelového organismu a byla první rostlinou z osekvenovaným genomem. *Pseudomonas syringae* je patogen známý pro svou hostitelskou specifitu, přičemž různé kmeny jsou schopné infikovat různé hostitelské rostliny.

P. syringae byla v osmdesátých letech dvacátého století popsána jako první patogen infikující *A. thaliana* v laboratorních podmínkách. Screeningovým studiem interakce *A. thaliana* – *P. syringae* byly objeveny a ustaveny dva virulentní kmeny hojně používané dodnes, *P. syringae* pv *tomato* a *P. syringae* pv *maculicola* ES4326. Pozorování patosystému *A. thaliana* – *P. syringae* vede k velmi produktivnímu výzkumu, který přispívá k objasnění fascinujících základních mechanismů rozpoznání patogena rostlinou, popsání signálních drah kontrolujících obrannou odpověď rostlin, či faktorů virulence a avirulence.

V současnosti se ukazuje, že při zkoumání interakce mezi rostlinou a patogenem mohou být výsledky ovlivněny mnoha zdánlivě nepodstatnými faktory, které je třeba vzít v úvahu. Bylo zjištěno, že se odezva rostlin liší v závislosti na čase ošetření rostliny (je rozdíl, zda je rostlina infikována ráno, či odpoledne), podstatné je i stáří rostlin, koncentrace inokula a metoda ošetření patogenem. K objasnění, čemu všemu je třeba věnovat pozornost při plánování experimentů, výrazně přispělo i studium patosystému *A. thaliana* a *P. syringae*.

Tato práce byla podpořena GAČR č. 501/11/1654, GAČR č. 501/12/1942, MŠMT č. 21/2014.

THE RELATIONSHIP BETWEEN AURORA KINASES AND TPX2 PROTEIN IN PLANTS AS REVEALED USING MULTIDISCIPLINARY APPROACHES

HANA JEŘÁBKOVÁ¹, EVA TOMAŠTÍKOVÁ¹, DMITRI DEMIDOV², BEÁTA PETROVSKÁ¹, ANDREAS HOUBEN², JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Institute of Experimental Botany, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 31, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

² Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany
E-mail: jerabkova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 721

Correct progression of mitosis and transmission of genetic information to daughter cells depends on proper function of mitotic regulators. Aurora kinases, a family of conserved serine/threonine kinases, play important role in regulation of mitosis and cytokinesis in yeast, plants and animals. The targeting protein for Xklp2 (TPX2) was found to activate animal Aurora A and, at the same time, to protect the kinase from dephosphorylation. The significance of Aurora A and TPX2 in spindle assembly and microtubule nucleation in animal cells has been documented.

To examine the Aurora kinases-TPX2 interaction in *Arabidopsis* cell cultures, we used several state of art methodological approaches. Using immunofluorescence, we observed colocalization of AtTPX2 and AtAurora1 at microtubules in cell cycle-dependent manner. The AtAurora1-AtTPX2 association was confirmed by co-immunoprecipitation experiment. Data obtained from immunolocalisation and immuniprecipitation studies suggest that AtTPX2 may guide Aurora kinase to microtubules and, analogically with other systems, TPX2 may spatially and temporally modulate the function of AtAurora1.

In order to evaluate *in vitro* regulation of Aurora kinase family members by AtTPX2, we used *in vitro* kinase assays with -RFP/-GFP trap. The results showed AtTPX2 as a substrate and activator of Aurora1, but not of Aurora3. Different mechanisms of activation of AtAurora1 and AtAurora3 may point to a specific regulation of both kinases, which may play important role in cell cycle regulation and signalling cascade transduction.

This research was supported by grants from the Czech Science Foundation (14-28443S, P501/12/G090), the National Program of Sustainability I (LO1204), the European Social Fund (Operational Program Education for Competitiveness CZ.1.07/2.3.00/20.0165), and Internal Grant Agency of Palacky University, Olomouc (Prf/2013/00 and IGA_PrF_2014001).

SEKVENČNÍ VARIANTY GENU PRO TELOMERÁZOVOU REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZU (*TERT*) V MODELOVÉ ROSTLINĚ *NICOTIANA TABACUM*

JANA JUREČKOVÁ¹, EVA SÝKOROVÁ², JIŘÍ FAJKUS^{1,2}, MILOSLAVA FOJTOVÁ¹

¹ Přírodovědecká fakulta a CEITEC (Central European Institute of Technology), Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00, Brno

² Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Královopolská 135, 612 65, Brno
E-mail: 376223@mail.muni.cz

Studium evoluce telomer zahrnuje analýzu organizace telomerových a subtelomerových oblastí a charakterizaci enzymu telomerázy v různých modelových organismech.

Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex katalyzující syntézu telomerových repetit na koncích eukaryotických chromosomů. Skládá se z telomerové RNA (TR) a z proteinové podjednotky TERT s reverzní transkripční aktivitou, která provádí prodlužování telomer podle TR. Gen kódující katalytickou podjednotku je vývojově regulovaným genem a jeho transkripce odráží aktivitu telomerázy v rostlinných pletivech.

Nicotiana tabacum, allotetraploidní modelová rostlina, je v současné době jedinou rostlinou, u které bylo identifikováno více sekvenčních variant genu *TERT* (Sýkorová et al., 2012). Předky *N. tabacum* jsou diploidní *Nicotiana sylvestris* a *Nicotiana tomentosiformis*. Dvě sekvenční varianty *NtTERT*: *NtTERT-C/s* and *NtTERT-D*, byly zděděny od *N. sylvestris* a jedna varianta *NtTERT*: *NtTERT-C/t* od *N. tomentosiformis*. V naší studii byl pomocí qPCR analyzován podíl kopií jednotlivých variant *NtTERT* v genomu *N. tabacum* a qRT-PCR stanovena úroveň transkripce variant *TERT* v tkáních s rozdílnou telomerázovou aktivitou, jako jsou semenáčky, listy, pupeny a kořínky.

Sýkorová E, Fulnecková J, Mokros P, Fajkus J, Fojtova M, Peska V. Three *TERT* genes in *Nicotiana tabacum*. Chromosome Res. (2012), 20, 381–394

Financování: Masarykova univerzita v Brně (MUNI/C/0979/2013), Grantová agentura ČR (13-06943S) a projekt „CEITEC – Central European Institute of Technology“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropských zdrojů pro regionální rozvoj.

OPTIMALIZACE METODY PRO IDENTIFIKACI PROTEINŮ ASOCIOVANÝCH S ROSTLINNÝMI TELOMERAMI

KATEŘINA JŮZOVÁ, PETRA PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, JIŘÍ FAJKUS, MILOSLAVA FOJTOVÁ

CEITEC (Central European Institute of Technology) a Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kamenice 5,
625 00 Brno

E-mail: 380301@mail.muni.cz

Telomery jsou nukleoproteinové struktury lokalizované na koncích lineárních eukaryotických chromozomů, kde zastávají dvě základní role. První z nich je ochrana konců chromozomů před opravnými mechanismy vytvořením komplexu s proteiny, tzv. čepičky. Druhou funkci sehrává telomera při řešení tzv. problému replikace konců, kdy DNA polymeráza není schopná plně replikovat opožďující se vlákno DNA.

Nedílnou součástí telomer jsou proteiny asociované s telomerovou DNA, které jsou v posledních letech cílem řady výzkumů. Tyto proteiny se zásadně podílejí na správné funkci telomer a regulují přístup enzymu telomerázy k telomerám. U savců byly popsány dva komplexy proteinů asociovaných s telomerovou DNA, komplex CST a shelterin. Shelterin sestává ze šesti základních proteinů (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, Tin2, RAP1). U rostlin byl popsán protein homologní s TRF a jeho vazba na telomery a telomerázu a proteiny POT1.

K identifikaci rostlinných telomerových proteinů se snažíme využít nedávno publikovanou metodu GENECAPP (Global ExoNuclease-based Enrichment of Chromatin Associated Proteins for Proteomics, Wu *et al.*, 2011, PloS One), která je založena na sekvenčně specifické hybridizaci komplexu DNA s proteiny na magnetické kuličky. Proteiny krosslinkované s cílovou DNA jsou následně charakterizovány hmotnostní spektrometrií.

Cílem naší práce je zoptimalizovat metodu GENECAPP a identifikovat proteiny asociované s telomerovou DNA rostliny *Nicotiana tabacum*. Na posteru budou prezentovány výsledky optimalizace jednotlivých kroků této metody a předběžné výsledky.

Práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (13-06943S), v rámci projektu „CEITEC – Central European Institute of Technology“ CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu pro regionální rozvoj, a projektu CZ.1.07/2.3.00/20.0043 z Evropského sociálního fondu.

FYZICKÁ MAPA CHROMOZOMU 4A PŠENICE SETÉ

BARBORA KLOCOVÁ¹, MICHAEL ABROUK¹, ZEEV FRENKEL², AJAY KUMAR³, SHAHRYAR F. KIANIAN^{3,4}, HANA ŠIMKOVÁ¹, JAN ŠAFÁŘ¹, YUQIN HU⁵, MINGCHENG LUO⁵, JASON CARLING⁶, ANDRZEJ KILIAN⁶, ABRAHAM KOROL², SHICHEN WANG⁷, EDUARD AKHUNOV⁷, JAROSLAV DOLEŽEL¹, MIROSLAV VALÁRIK¹

¹ Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Slechtilu 31, Olomouc, CZ-78371, Czech Republic

² Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel

³ Department of Plant Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58108, USA

⁴ USDA-ARS Cereal Disease Laboratory, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA

⁵ Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA

⁶ Diversity Arrays P/L, 1 Wilf Crane Crescent, Yarralumla, Canberra, ACT 2600, Australia

⁷ Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, KS 66506-5502, USA

E-mail: klocova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 717

Přestože sekvenační technologie nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) zaznamenaly v poslední době velký pokrok, sekvenování velkých a komplexních genomů stále zůstává výzvou. Typickým příkladem je genom pšenice. Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je alohexaploidní druh s velkým a komplexním genomem s vysokým obsahem repetitivních sekvencí. Rozdělení pšeničného genomu na jednotlivé chromozomy nebo ramena chromozomů je významným nástrojem, jak obejít problémy spojené s velkou komplexitou pšeničného genomu. Jako součást mezinárodního konsorcia pro sekvenaci pšeničného genomu (International Wheat Genome Sequencing Consortium, IWGSC) jsme zkonstruovali fyzické mapy pro dlouhé a krátké rameno chromozomu 4A s využitím knihoven dlouhých inzertů (BAC knihovny) specifických pro daná ramena. Ofingerprintované BAC klony byly poskládány do fyzické mapy pomocí programu LTC (Linear Topology Contig). Na další prodlužování a propojování kontigů takto vzniklé mapy byl použit jeden z nástrojů LTC – superclustering. Knihovna pro krátké rameno chromozomu 4A (4AS) byla poskládána do 250 super-contigů a bylo vybráno 4 422 klonů představujících minimální počet klonů reprezentující celou fyzickou mapu (Minimum Tilling Path, MTP). Knihovna pro dlouhé rameno chromozomu 4A (4AL) byla složena do 924 super-contigů a 8 369 klonů bylo vybráno jako MTP. Fyzická mapa pro 4AS představuje 86% pokrytí ramene a mapa 4AL 89% pokrytí dlouhého ramene. Z klonů MTP obou ramen byly připraveny třídímenzionální směsné vzorky (3D pooly), které pak byly osekvenovány a použity pro *in silico* ukotvování kontigů na chromozom. Celkem 1 780 DArT markerů bylo použito na vytvoření GenomeZipperu z 4AS a 4AL survey sekvencí (sekvence získané celochromozomovým neuspořádaným sekvenováním). Dále bylo identifikováno 54 125 nízko-kopiových markerů pro 4AS a 62 656 markerů pro 4AL ze survey sekvencí. Všechny tyto zdroje usnadnily ukotvení 100 % 4AS kontigů a 99 % 4AL kontigů fyzických map na GenomeZipper. Pro ukotvení a orientaci kontigů v centromerické a pericentromerické oblasti chromozomů byl vyvinut panel radiačních hybridů, který byl genotypován pomocí pšeničného 90 K SNP Infinium čipu.

Podporováno granty: LO1204 Národní program udržitelnosti I, IGA PrF-2014-002, GAČR 14-07164S, Estonským ministerstvem pro zemědělství.

MODIFIED METHOD FOR LATERAL ROOTS DETECTION

KARIN KOLLÁROVÁ, DANICA KUČEROVÁ, ZUZANA VATEHOVÁ, IVAN ZELKO, DESANA LIŠKOVÁ

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

E-mail: Karin.Kollarova@savba.sk, tel.: +421 259 410 291

The importance of polysaccharides for plant cell wall architecture is acknowledged for a long time. The secondary function of these polymers, but increasingly recognized, is the production of oligosaccharides serving as signaling molecules in various processes of plant growth and development and playing a role in plant adaptive responses to biotic and abiotic stress. Our research is focused on a specific class of saccharidic signaling molecules, galactoglucomannan oligosaccharides (GGMs), derived from galactoglucomannans, structural constituents of both primary and secondary cell walls of higher plants. GGMs influence elongation growth, as well as cell division in diverse plant parts. GGMs activity is connected with auxins action. Auxins influence lateral roots formation, they stimulate initiation of primordia, but prolonged treatments inhibit elongation of lateral roots.

The objective of the present work was to find a method for the study of GGMs interaction with auxin in the process of lateral roots formation and elongation. The method has to fit several criteria. It needs to be cheap, fast and simple. We searched for a method without the use of confocal microscope, genetically modified plants, and expensive chemicals for staining. It should be in contrast to other widespread methods that use these expensive tools (e. g. Ivanchenko *et al.* 2010, Lewis *et al.* 2011). We improved the simple method according to Vuylsteker *et al.* (1998) which fulfils the above mentioned criteria.

Lišková D., Auxtová O., Kákoniová D., Kubačková M., Karácsonyi Š., Bilisics L.: 1995 – *Planta*, 196: 425

Kollárová K., Lišková D., Capek P.: 2006 – *Biol. Plant.*, 50: 232

Kollárová K., Lišková D., Lux A.: 2007 – *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 91: 9

Kollárová K., Richterová D., Slovákova L., Henselová M., Capek P., Lišková D.: 2009 – *Plant Sci.*, 177: 324

Richterová-Kučerová D., Kollárová K., Zelko I., Vatehová Z., Lišková D.: 2012 – *Plant Physiol. Biochem.*, 57: 154

Kákošová A., Digonet D., Lišková D.: 2013 – *Plant Cell Rep.*, 32: 479

Kákoniová D., Hlinková E., Lišková D., Kollárová K.: 2010 – *Cent. Eur. J. Biol.*, 5: 353

Ivanchenko M.G., Napsucialy-Mendivil S., Dubrovsky J.G.: 2010 – *Plant J.*, 64, 740

Lewis D.R., Negi S., Sukumar P., Muday G.K.: 2011 – *Development*, 138, 3485

Vuylsteker C., Dewaele E., Rambour S.: 1998 – *Ann. Bot.*, 81: 449

This study was supported by the Slovak Grant Agency for Science (No. 2/0083/14).

VALIDACE REFERENČNÍ GENŮ PRO RT-qPCR U NEMODELOVÝCH ROSTLIN

PAVLA KOLOUŠKOVÁ¹, HELENA ŠTORCHOVÁ¹

¹ Laboratoř reprodukce rostlin, Ústav experimentální botaniky AVČR, v. v. i. , Rozvojová 313,
165 02 Praha 6 – Lysolaje, ČR
E-mail: kolouskova@ueb.cas.cz

U rodu *Chenopodium* jsou dlouhodobě v oblasti zájmu geny ovlivňující kvetení a rozmnožování stejně jako u gynodioecické *Silene vulgaris*, která je dobrým modelem pro studium cytoplasmatické pylové sterility a exprese genů s ní spojených (Štorchová et al., 2012). Velice zajímavý je homolog genu *MSH1*, který může řídit rekombinaci mitochondriální DNA a následně tak ovlivňovat produkci pylu hermafroditních rostlin. Základním krokem v měření exprese je nalezení vhodných referenčních genů se stálou expresí napříč rostlinnými pletivy, pohlavními formami, v rámci jednotlivých populací a jejich blízkými i vzdálenými kříženími. K nalezení vhodných referenčních genů *Silene vulgaris* bylo vybráno 10 kandidátů z řad obvykle používaných genů. Exprese byla testována na reprezentativní sadě vzorků RNA (poupata, listy, kořeny, pyl, hermafroditní a samičí rostliny) z nichž byla syntetizována cDNA pomocí Oligo dT a náhodných primerů. Stabilita kandidátních genů byla statisticky prověřena v programech geNorm a NormFinder. Z výsledků vyplývá, že nejvhodnějšími jsou, pro soubor všech studovaných pletí a cDNA syntetizovanou Oligo dT primery, geny *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *ELF* (Elongation factor) a *ACT* (Actin). V případě cDNA syntetizované náhodnými primery je to kombinace genů *GAPDH*, *ACT*, *COG* (Complex golgi component) a *18S rRNA* (Small ribosomal subunit). Geny *ACT* a *18S rRNA* jsou vhodnými referenčními geny pro měření exprese mitochondriálních genů rovněž u rodu *Chenopodium*.

Storchova H, Müller K, Lau S, Olson MS (2012) Mosaic Origins of a Complex Chimeric Mitochondrial Gene in *Silene vulgaris*. PLoS ONE 7(2): e30401. doi:10.1371/journal.pone.0030401

Poděkování: Práce byla financována z projektu GAČR P506/12/1359.

PROČ CHYBÍ NĚKTERÉ MOBILNÍ ELEMENTY NA CHROMOZOMU Y?

ZDENĚK KUBÁT, JITKA ŽLŮVOVÁ, IVAN VOGEL, VIERA KOVÁČOVÁ, ROMAN HOBZA, BORIS VYSKOT, EDUARD KEJNOVSKÝ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno 61200, Česká republika
E-mail: kubat@ibp.cz

Mobilní elementy, transpozony, vykazují neobvyčejnou variabilitu v přítomnosti na pohlavních chromozomech rostlin. Zatímco některé transpozony jsou homogenně rozptřeny v genomu, jiné chybí na pohlavním chromozomu Y. Abychom zjistili příčinu takového rozložení transpozonů v genomu, studovali jsme tři blízké příbuzné rodiny LTR retrotranspozonů *Ogre*. Dvě rodiny jsou přítomny na všech chromozomech a jedna chybí na chromozomu Y u samečků dioecické rostliny *Silene latifolia*. Fylogenetické analýzy ukázaly, že se všechny tři rodiny *Ogrů* rozšířily v genomu teprve nedávno, až po vzniku pohlavních chromozomů, což indikuje přítomnost mechanismu, který brání inzerci jedné z rodin *Ogra* do chromozomu Y. Strukturní podobnost *Ogrů* a absence pozitivní selekce uvnitř *Ogre* elementů naznačuje, že se tyto tři rodiny neliší ani v mechanismu retrotranspozice, výběru míst pro inzerci nebo interakcích s hostitelem. Naopak studium transkriptomu ukázalo, že *Ogre* chybící na chromozomu Y produkuje asi 10× více 24 nukleotidů dlouhých malých RNA (siRNA) než ostatní *Ogry*. Molekuly siRNA dlouhé 24 nukleotidů řídí metylaci DNA a tím umlčují transkripční aktivitu transpozonů. Analýzy metylace v různých tkáních potvrdily rozdílnou míru metylace tří rodin *Ogrů* v kritických fázích tvorby zárodečných buněk a v embryogenezi, což má za následek, že se jeden z *Ogrů* šíří jen v mateřské linii, a tudíž se nemůže včlenit do chromozomu Y. Ukazuje se tak, že je mezigenerační přenos některých transpozonů regulován epigenetickými mechanismy rozdílně v samičí a samičí zárodečné linii a během časně embryogeneze.

Kubat Z, Zlufova J, Vogel I, Kovacova V, Cermak T, Cegan R, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. 2014. Possible mechanisms responsible for absence of a retrotransposon family on a plant Y chromosome. New Phytol 202: 662–78

Podporováno granty GAČR (P305/10/0930, P501/12/G090, P501/10/0102) a OPVK (CZ.1.07/2.3.00/20.0045, CZ.1.07/2.4.00/17.0042).

ISOLATION OF BARLEY AND SPRUCE THYLAKOID MEMBRANES AND THEIR DIFFERENT CHARACTERISTICS

IřENA KURASOVÁ^{1,2}, VÁCLAV KARLICKÝ^{1,2}, ZUZANA MATEROVÁ¹, VLADIMÍR ŠPUNDA^{1,2}

¹ University of Ostrava, Faculty of Science, Department of Physics, Chittussiho 10, CZ-71000 Ostrava 10, CZ

² Global Change Research Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Bělidla 986/4a, CZ-60300 Brno, CZ

E-mail: Irena.Kurasova@osu.cz, tel.: +420 597 092 160

The isolation of thylakoid membranes (tBMs) from different plant species in fully functional state is a crucial point for various *in vitro* studies as well as for subsequent separation of pigment-protein complexes embedded to tBM.

Firstly, we focused on isolation of tBMs from young spring barley and spruce plants (8 and 17 days after sawing) preferably by comparable isolation technique. Prepared tBMs of both plant species exhibited maximal photochemical efficiency of photosystem II (F_v/F_m), estimated from chlorophyll a fluorescence, equal and/or close to value characteristic for *in vivo* physiological state (~ 0.83). However, fluorescence induction curves and dynamics of light-induced non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence (NPQ) revealed marked differences for barley and spruce tBMs. Illuminated tBMs of barley in reaction medium (pH 7.5) enriched by methylviologen (artificial electron acceptor from photosystem I) and ascorbate (co-substrate of violaxanthin de-epoxidase – VDE is a key enzyme for violaxanthin conversion through antheraxanthin to zeaxanthin in xanthophyll cycle) exhibited typical time-course of NPQ (NPQ increased up to 1.4 value after 10 min. illumination at $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). HPLC analysis revealed that mentioned light treatment applied on barley tBM induced considerable violaxanthin conversion to zeaxanthin (de-epoxidation state was almost 40 %). In illuminated barley tBMs was also possible to distinguish zeaxanthin-dependent and zeaxanthin-independent NPQ, later was determined in the same reaction medium with addition of dithiothreitol (DTT) as VDE inhibitor (de-epoxidation state 0 % corresponds to undetectable amount of zeaxanthin and/or antheraxanthin). Our results on barley tBMs are in good agreement with those obtained on tBMs isolated from spinach plant (Goss *et al.* 2008). On the other hand, the tBMs prepared from spruce seedlings using the same isolation procedure and reaction media as for barley exhibited upon illumination only slight slowly developing NPQ that was zeaxanthin-independent (implying rather photoinhibitory type NPQ). Absence of zeaxanthin (and antheraxanthin) and zeaxanthin-dependent NPQ persisted also at reduced pH of reaction medium to value optimal for function of VDE (pH = 5.2).

Received results indicate probably more damaged tBMs isolated from spruce seedlings (despite of high F_v/F_m value ~ 0.7 – 0.83) associated with non-functional or eluted (during tBM isolation procedure) VDE normally occurring in lumen of tBM. Primary SDS-PAGE (according to Hager and Holocher 1994) experiment realized for testing of VDE presence indicates loss of VDE in spruce in contrast to barley tBMs isolated by same method. For that reason also the other appropriate method for the isolation of photochemically active tBMs directly focused on conifer species (Holá *et al.* 2012) will be tested.

Goss R., Opitz C., Lepetit B., Wilhelm C.: 2008 – *Planta*, 228: 999–1009

Hager A., Holocher K.: 1994 – *Planta* 192: 581–589

Holá D., Kočová M., Rothová O., Hlízová E., Fridrichová L., Lhotáková Z., Albrechtová J.: 2012 – *Photosynthetica* 50(2): 291–304

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic No. 13-28093S/P501.

ANALYSIS OF GENERAL AND SPECIFIC 5'P-RNA DEGRADOMES AND THEIR APPLICATION TO INVESTIGATE POSPIVIROID TARGETS AND NETWORK OF HOP TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN LUPULIN BIOSYNTHESIS

JAROSLAV MATOUŠEK^{1*}, ANNA TÝCOVÁ^{1,2}, KRISTYNA SIGLOVÁ^{1,2}, AJAY KUMAR MISHRA¹, GANESH SELVARAJ DURAISAMY¹, JOSEF PATZAK³, RAJEN J.J. PIERNIKARCZYK⁴, TERUO SANO⁵ AND GERHARD STEGER⁴

¹ Biology Centre AS CR, v.v.i, Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31, České Budějovice CZ-37005, Czech Republic

² University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

³ Hop Research Institute, Co. Ltd., Kadaňská 2525, CZ-43846 Žatec, Czech Republic

⁴ Institute of Physical Biology, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, D-40204 Düsseldorf, Germany

⁵ Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, 3 Bubkyo-cho, Hirosaki 036-8561, Japan

* Corresponding author

E-mail: jmat@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 525

Nucleic acids degradation and decay in cells is a natural consequence of developmental changes including switching of gene expression programmes. Because degradation of mRNA proceeds by several pathways, the degradome is rather complex (e.g. Hou *et al.* 2014). PTGS belongs to specific 5'P-RNA degradation mechanisms that participates in the regulation of development. Silencing RNAs (siRNAs) or microRNAs mediate sequence-specific slicing leading in the initial step to 5'-phosphorylated cleaved ends that can be identified, for instance, by the method of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE). Using the combination of cleavage sites (cDNA signatures) amplification, high-throughput sequencing, and comparisons by bioinformatic means (e.g. German *et al.*, 2009), it is possible to identify microRNAs, or viroid small RNAs (vsRNA) and corresponding targets. Recently, this degradome analysis was employed to characterize wounding- and topping-responsive small RNAs, physiological impact and small RNA changes caused by heavy metals, drought stress, nitrogen deficiency and other processes.

In the present work we developed concept of general and specific degradomes using biotin-streptavidin Dynabeads as a support to remove sequence contaminations and to analyze degradomes from LiCl-soluble fractions if degradation is too fast or too complex, i.e. if Oligo dT affinity chromatography cannot be used (Matoušek *et al.* submitted). There are several variations of the procedure possible and, therefore, this system is useful if RNA subtraction is necessary for instance for targets with high turnover rate or to investigate of specific targets having low expression. To increase specificity we developed two-nested system for the RTPCR and PCR steps of the procedure (Matoušek *et al.*, submitted). Using this system for general degradomes like PARE we aim to identify targets of multiple Pospiviroid (HSVd, HLVD, CVdIV and AFCVd) infections of hop and tomato (PSTVd). The specific degradome analysis procedure we used to identify degradation mediated by viroid of SANT/HTH Myb, a plant morphogenesis-regulating transcription factor, *SIWAT1* factor as a target of PSTVd from tomato, and anticancerogenic plant nuclease TBN1 during molecular farming. Recently we characterized degradation of the *HIWRKY1* transcription factor involved in the molecular regulatory network driving lupulin biosynthesis (e.g. Matoušek *et al.*, 2012). Three zones of degradation were identified in *HIWRKY1* coding region and one in 3'UTR of this gene, confirming involvement of micro RNAs in regulation of *HIWRKY1*.

German, M.A., Luo, S., Schroth, G., Meyers, B.C., and Green, P.J. 2009. Construction of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome. *Nat. Protoc.* 4:356–362

Hou, C.Y., Wu, M.T., Lu, S.H., Hsing, Y.I., and Chen, H.M. 2014. Beyond cleaved small RNA targets: unraveling the complexity of plant RNA degradome data. *BMC Genomics* 15:15

Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Füssy, Z., Procházková, J., Heyerick, A.: 2012. Combinatorial analysis of lupulin gland transcription factors from R2R3Myb, bHLH and WDR families indicates a complex regulation of *chs_H1* genes essential for prenylflavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *BMC Plant Biol.* 12, 27

Matoušek, J., Piernikarczyk, R.J.J., Týcová, A., Ganesh S. Duraisamy, G.S., Kocábek, T., Steger, G. Submitted in *Mol. Plant Microbe Interactions* 2014. PSTVd infection induces the degradation of SANT/HTH Myb mRNA, a plant morphogenesis-regulating transcription factor

The project was supported by the Alexander von Humboldt Foundation, Research Group Linkage Programme, by the Czech Science Foundation (GACR 13-03037S), MSMT Kontakt II LH14255 by the cooperative project FP7-REGPOT-2012-2013-1 MODBIOLIN No. 316304 and by institutional support RVO:60077344.

LIVE IMAGING PROTEINŮ INTERAGUJÍCÍCH S MEMBRÁNOU S VYUŽITÍM KONFOKÁLNÍ A „SPINNING DISK“ MIKROSKOPIE

JINDŘIŠKA MATOUŠKOVÁ, JAN ANDREJCH, OLGA VALENTOVÁ

VŠCHT Praha, Technická 3, Praha 6 – Dejvice, ČR
E-mail: jinmat@centrum.cz; andre.j@email.cz

Neocenitelnou pomůckou pro studium buněčných dějů jsou fluorescenční barviva nebo proteiny pro specifické značení buněčných struktur nebo jednotlivých proteinů a jejich následná vizualizace.

Ke snímání obrazu se využívá řada různých uspořádání, mezi něž patří laserová skenovací konfokální mikroskopie a spinning-disk mikroskopie. Laserová skenovací konfokální mikroskopie je založená na postupném ozařování částí preparátu po jednotlivých řádcích, a následně integraci do obrazu pomocí počítače. Tato sestava je doplněna konfokální clonou, která odstiňuje světlo vyzářené mimo zaostřenou rovinu preparátu, čímž je umožněno snímání obrazu bez rušivých vjemů pocházejících z oblastí mimo rovinu ostrosti. Spinning-disk mikroskop využívá namísto konfokální clony soustavu dvou rotujících Nipkowových disků a velmi citlivé kamery s vysokou snímkovou frekvencí, čímž je umožněno velmi rychlé snímání obrazu v tenké vrstvě preparátu, a tím se zkracuje doba ozařování vzorku laserem a omezují se problémy s postupným vyčerpáváním fluoroforů a slábnutím získávaného signálu.

Obě metody mají svá specifika a výhody, jichž se dá různým způsobem využít. Jednou z největších obecných výhod je možnost sledování fluorescenčně značených proteinů *in vivo* (tzv. live imaging) a tedy i možnost sledovat jejich interakce nebo lokalizace v reálném čase bez nutnosti fixace preparátu.

Obě metody byly použity pro studium lokalizace fosfolipasy D8 (PLD8), která se účastní řady fyziologických i stresových pochodů a je také považována za spojovací můstek mezi plazmatickou membránou a mikrotubulárním cytoskeletem.

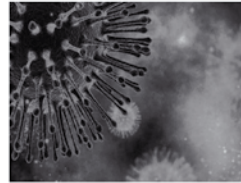


VWR INTERNATIONAL

VŠE CO POTŘEBUJETE DO LABORATOŘE...

Již 160 let pomáháme vědě uspět.
SVĚTOVÁ nabídka s LOKÁLNÍ podporou!

- ochranné pomůcky, laboratorní nábytek a přístroje
- základní spotřební materiál - sklo, plast a kov
- spotřební materiál a přístroje pro:
 - vzorkování a buněčné kultury
 - příprava vzorků
 - separaci a koncentraci
 - měření a analýzy
 - speciální aplikace - LifeScience, mikrobiologie, klinika
- laboratorní dokumentace
- chemikálie - laboratorní, LifeScience, do výroby, na zakázku



VWR PROLAB[®]
CHEMICALS

VWR PROLAB[®]
CHEMICALS

VWR COLLECTION

ACCULAB
sartorius group

BIOHIT

KAVALIER

PALL Life Sciences

AppliChem

Biotix

LABCONCO

Quanta
BioSciences, Inc.

AXYGEN
SCIENTIFIC

BRADY

NETTLER TOLEDO

sartorius

BD
BD Biosciences

BUCHI

Miele
PROFESSIONAL

SI Analytics

BINDER

CORNING

Motic[®]
More Than Microscopy

SIGMA-ALDRICH[®]

eppendorf
In touch with life

NALGENE[®]

Simport

IKA[®]

nunc[™]

Thermo
SCIENTIFIC

Leica

Owl
Optical Systems

Whatman
Part of GE Healthcare

STANOVENÍ REZISTENCE HOUBOVÝCH PATOGENŮ ROSTLIN K FUNGICIDŮM POMOCÍ TECHNIK MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

PAVEL MATUŠINSKY, LUDVÍK TVARŮŽEK, TOMÁŠ SPITZER

Agrotest fyto, s. r. o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, ČR
E-mail: matusinsky@vukrom.cz, tel.: +420 573 317 113

Zemědělci téměř na celém světě používají pesticidní látky na ochranu úrody před škůdci a chorobami. Při opakovaném používání těchto látek však může v některých případech dojít ke ztrátě nebo poklesu účinnosti pesticidu. Jednou z příčin může být rozšíření rezistentních populací patogenů. K laboratornímu stanovení rezistence slouží buď biotest, kdy za pomoci expozice odstupňovaných dávek pesticidu stanovujeme nejčastěji tzv. ED50 (efektivní dávku, při které dochází k 50% redukci růstu organismu) nebo molekulární techniky. Zde pak záleží na účelu analýzy a na povaze genetické podstaty rezistence. Pokud je příčinou rezistence bodová mutace cílového genu, pak je možno zvolit standardní metodu CAPS markeru, kterou bychom rádi demonstrovali na příkladu původce onemocnění listů ječmene, u nějž v nedávných letech vznikl v České republice problém s rezistencí ke strobilurinovým fungicidům. Zmíněným původcem je houba *Ramularia collo-cygni* (dále jen RCC), která napadá jarní i ozimý ječmen. Strobilurinové fungicidy vykazovaly v prvních letech po objevení se ramulárie skvrnitosti velmi dobrou účinnost, ovšem velmi brzy se u RCC vyvinula rezistence k fungicidům z této skupiny. U strobilurin-rezistentních izolátů RCC je přítomna bodová mutace mitochondriálního genu cytochromu b v kodonu 143 vedoucí ke změně aminokyseliny glycinu (GGT) na alanin (GCT) (Fountaine a Fraaije, 2009). Při stanovení této mutace jsme postupovali následovně. Sekvence standardní alely cytochromu b (strobilurin fungicide Qol-sensitive, G143) (FN552765.1) a mutantní alely (strobilurin fungicide Qol-resistant, A143) (FN552766.1) byly vybrány v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Na základě těchto sekvencí, byla navržena sada primerů a označena jako RCCcytoF/R (Matusinsky et al. 2010). Nejprve bylo nutno pomocí standardní PCR amplifikovat část cytochromu b a poté specifickou restrikční endonukleázou tento úsek štěpit. Výsledné fragmenty restrikční analýzy byly separovány metodou horizontální elektroforézy v 1,7% agarózovém gelu. Po PCR s primery RCCcytoF/R byl získán ampikon o velikosti 406 bp. Tento ampikon byl po inkubaci s restrikční endonukleázou *A143* u strobilurin-senzitivních izolátů RCC rozštěpen na 3 fragmenty (249, 102 a 55 bp), zatímco u strobilurin-rezistentních izolátů byl rozštěpen na 4 fragmenty (144, 105, 102 a 55 bp). Pomocí primerů RCCcytoF/R lze tedy amplifikovat část cytochromu b RCC, který po následném rozštěpení specifickou restrikční endonukleázou indikuje standardní (G143) či mutantní (A143) alelu. Tato metoda umožňuje rozlišit senzitivní a rezistentní izoláty RCC ke strobilurinovým fungicidům.

Fountaine J & Fraaije BA, 2009. Development of Qol resistant alleles in populations of *Ramularia collo-cygni*. In: Oxley S, Brown J, Foster V V & Havis N (Eds.) 2009: The Second European Ramularia Workshop. 7–8 April, 2009, Edinburgh, Scotland. Aspect Appl Biol 92, 123–126

Matusinsky P, Leisova-Svobodova L, Marik P, Tvaruzek L, Stemberkova L, Hanusova M, Minarikova V, Vysohlidova M, Spitzer T, 2010. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to Qol fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. Journal of Plant Diseases and Protection, 117, 248–252

Podporováno grantem RO0211.

SROVNÁNÍ RŮZNÝCH ZPŮSOBŮ STABILIZACE ROSTLINNÝCH VZORKŮ PŘI TERÉNNÍCH ODBĚRECH K ANALÝZE FYTOHORMONŮ

LUCIE DOLEŽÁLKOVÁ¹, LENKA ZÁVESKÁ DRÁBKOVÁ², PETRE I. DOBREV³, VÁCLAV MOTYKA³

¹ Univerzita Karlova v Praze, Ovocný trh 3–5, 116 36 Praha 1, ČR

² Botanický ústav AV ČR, v.v.i., Zámek 1, 252 43 Průhonice, ČR

³ Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR

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

Jednou ze základních činností při provádění terénních odběrů rostlinných vzorků pro analýzy rostlinných hormonů (fytohormonů) je jejich stabilizace, jejímž cílem je zastavení všech fyziologických pochodů v rostlině. Běžně používaným postupem je stabilizace velmi nízkou teplotou, ať už pomocí suchého ledu (pevná forma CO₂ o teplotě –78,5 °C) nebo kapalného dusíku (bod varu cca –196 °C). Protože obě tyto metody jsou poměrně nákladné a technicky náročné, hledají se často alternativní stabilizační postupy, které by odběr rostlinného materiálu v terénu usnadnily a zjednodušily.

Pro analýzu RNA rostlin i živočichů se běžně používá speciální vodné a netoxické stabilizační činidlo, RNAlater®, které po aplikaci rychle prostupuje pletiv/tkáněmi a zabraňuje degradaci buněčné RNA v odebraných vzorcích. Jeho použití je časově i finančně úsporné, navíc RNAlater® ani vzorky RNA v něm uchovávané nejsou náročné na skladování a mohou být běžně uloženy při laboratorní teplotě.

Cílem naší práce bylo posouzení možného využití činidla RNAlater® i pro stabilizaci vzorků z terénních odběrů určených k analýzám fytohormonů. K tomu účelu byly izolovány a purifikovány fytohormony (auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, kyselina salicylová a kyselina jasmonová) a metodou HPLC-MS stanoveny jejich hladiny [1–3] ve vzorcích odebraných z nadzemních částí pěti divoce rostoucích a systematicky poměrně vzdálených druhů rostlin (zástupci řádů *Poales*, *Sapindales*, *Ericales*, *Lamiales* a *Asterales*), k jejichž stabilizaci bylo použito buď „klasické“ metody (pomocí suchého ledu) nebo metody využívající RNAlater®. Koncentrace stanovených fytohormonů i profily jejich metabolitů po použití obou stabilizačních metod byly porovnány a výsledky vyhodnoceny. Dosavadní předběžná data ukazují, že zatímco při stabilizaci pomocí suchého ledu skutečně dochází k zastavení všech fyziologických pochodů v rostlině, RNAlater® tyto účinky má zřejmě jen v omezené míře a v rostlinných pletivech patrně vyvolává určitou formu stresu projevující se změnou hladin některých fytohormonů, u cytokininů navíc změnou poměrného zastoupení jejich jednotlivých derivátů (nárůst aktivních forem na úkor forem deaktivních a zásobních).

Získané poznatky jsou v současné době předmětem dalšího ověřování a na konferenci budou demonstrovány a diskutovány s ohledem na možné snížení náročnosti a pracnosti terénních odběrů rostlinných vzorků pro analýzy fytohormonů.

[1] Dobrev P.I., Kamínek M.: 2002 – *Journal of Chromatography A*, 950: 21

[2] Dobrev P.I., Vaňková R.: 2012 – *Methods in Molecular Biology*, 913: 251

[3] Djilianov D.L., Dobrev P.I., Moyankova D.P., Vaňková R., Georgieva D.Ts., Gajdošová S., Motyka V.: 2013 – *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 564

Práce vznikla v rámci projektu *Otevřená věda II* a s finanční podporou grantu GAČR (P506/11/0774).

GENOME INSTABILITY IN PLANT CAF1 MUTANTS STUDIED BY q-PCR AND TRF ANALYSIS

VERONIKA MUCHOVÁ^{1,2} AND MICHAL JEŽ², IVA MOZGOVÁ^{1,2}, MARTINA DVOŘÁČKOVÁ^{1,2,3}, JIŘÍ FAJKUS^{1,2,3}

¹ Mendel Centre for Plant Genomics and Proteomics, CEITEC, Masaryk University, Kamenice 5, CZ-62500 Brno, Czech Republic

² Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, CZ-61137 Brno, Czech Republic

³ Institute of Biophysics AS CR, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

E-mail: veronika.muchova@gmail.com

Studying of telomeres and rDNA in plants and mechanisms of their maintenance and regulation are the main research aims in the Laboratory of Chromatin Molecular Complexes. One of the most interesting topics is Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1) – heterotrimeric histone H3-H4 chaperone participating in nucleosome assembly after DNA replication or repair. This highly conserved complex is composed of three subunits: FASCIATA 1 (FAS1), FASCIATA 2 (FAS2) and MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1) but only *fas1* and *fas2* mutants of *A. thaliana* are viable and have an interesting phenotype on the morphological and the molecular-biological level.

Previously we demonstrated progressive loss of 45S rDNA and telomeres during nine consecutive generations of these mutants (Mozgová *et al.*, 2010) and lately we investigated effects of reversion of the functional CAF-1 on the genome of the *fas* revertants. For this purpose we have created back-crossed and complemented plants from early (G2) and also later (G4) generations mutants. We have performed the Terminal Restriction Fragment (TRF) analysis to determine telomere lengths of those plants. To analyse rDNA copy number and variant expression profile, we used q-PCR with *ubiquitin* as a reference gene and also rDNA/rRNA variant assay. Here we demonstrate almost full recovery of both types of repeats in case of the reversion performed in the earlier generation. Whereas telomeres recovered up to approx. 90% of their wild type level also in later generation revertants, the rDNA analysis showed us distinct results with a complete, partial or no copy number recovery suggesting differences between the processes involved in maintenance (and expansion) of these two kinds of sequences. Complementation by insertion of T-DNA with *FAS* cDNA construct resulted in complete phenotype reversion in transformed plant lines expressing *FAS* cDNA but no recovery of telomere or rDNA repeats was observed. On the contrary, additional loss of rDNA continued.

Mozgová I, Mokros P, Fajkus J (2010) Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22(8):2768–2780

This project is supported by GACR (P501/11/0289), European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0043) and by the project “CEITEC — Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

TELOMERE MAINTENANCE IN *PHYSCOMITRELLA PATENS*

LUCIE NAJDEKROVÁ¹, MILOSLAVA FOJTOVÁ¹, DAGMAR ZACHOVÁ¹, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Central European Institute of Technology (CEITEC) a Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kamenice 5, CZ-62500 Brno

² Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Kralovopolská 135, CZ-61265 Brno
E-mail: lucie.najdekrova@gmail.com

Physcomitrella patens is a moss species and as a member of the bryophytes, it stands in an important phylogenetic position for illuminating the evolution of land plants.

The availability of a complete genome sequence, together with the ability to perform gene targeting efficiently in *P. patens* has recently promoted the moss to a powerful genetically tractable model plant system.

The ends of eukaryotic chromosomes are protected from mis-recognition as DNA damage sites through telomere complexes. It was found however, that many repair factors playing important roles in detection, signalling and repair of genomic DSBs also associate in functional complexes with telomeres and contribute to their maintenance. *Physcomitrella* is one of a few known multicellular organisms, with highly efficient system of DNA repair by homologous recombination. In particular, comparative analysis of *Arabidopsis* with low levels of homologous recombination, and *Physcomitrella* with an efficient homologous recombination will be informative to explore crosstalk of these pathways and their involvement in DNA damage processing and telomere maintenance.

First we focused on dynamics of telomerase activity and telomere lengths during protonema development. The moss protonema is growing by apical cell division and the number of dividing apical cells generally decreases with protonema elongation while protonema branching partially compensates this decline by formation of additional apical cells. Analyses of the telomerase activity by TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol) and qRT-TRAP assays revealed the higher activity in the extracts from 1-day protonema (containing 30–50 % apical cells) than extracts from 7 or 14 day protonema (with 10 % and 5 % of apical cells, respectively). These findings were also supported by RT-PCR analyses of transcript levels of the telomerase *TERT* gene.

Telomere lengths were assayed by TRF (Terminal Restriction Fragment) method and a PETRA (Primer Extension Telomere Repeat Amplification) approach at single chromosome arms using the known telomere-associated sequences from the *P. patens* genome sequence. We confirm the developmental telomere dynamics is similar to that of land plants, because the telomere lengths remained stable independently of the time of protonema cultivation. In contrast to land plants, however, this characteristic feature of plant telomere maintenance has been verified for the first time in samples with distinct and known proportions of dividing cells.

The next aim of our work was to follow telomere and telomerase dynamics in mutant strains of *Physcomitrella* deficient in essential repair factors (*prrad50*, *ppmre11*, *ppnbs1*, *ppku70*). The results obtained will be discussed in relation to the previous results published in *A. thaliana*.

The project is supported by the Czech Science Foundation (13-06595S).

SHADED ROOTS: A NOVEL ROLE OF CYTOKININ IN PHOTOMORPHOGENESIS?

JAN NOVÁK, MARTIN ČERNÝ, JAROSLAV PAVLŮ, JANA ZEMÁNKOVÁ, JAN SKALÁK, BŘETISLAV BRZOBOHATÝ

Laboratory of Plant Molecular Biology, Institute of Biophysics AS CR, v.v.i. and CEITEC – Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, CZ-61300 Brno, Czech Republic
E-mail: jan.novak@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 374

In land plants, roots have evolved, develop and function in darkness. However, analysis of seedling development in *in vitro* conditions employs cultivation in transparent Petri dishes resulting in unnatural exposure of roots to light. To evaluate influence of root illumination on seedling development and to get the first insight into underlying molecular processes, we have compared *Arabidopsis* seedling development in seedlings having roots fully exposed to those with strongly shaded roots. Morphometric analysis revealed that seedlings with shaded roots have shorter primary roots and elongated hypocotyls. Cellular analysis revealed that increased hypocotyl growth resulted solely from enhanced cell elongation. Next, we employed LC-MS approach to compare whole seedling proteome profiles in seedlings with shaded and illuminated roots. We succeeded in quantification of relative peptide abundances in 1209 proteins represented by more than 4200 peptides. The comparison after manual validation of MS spectra in Skyline software revealed 47 differentially regulated proteins quantified at 159 unique peptides. The largest group of these proteins is located in chloroplasts (28), followed by cytosol (14) and mitochondrion (4). Functional analysis revealed that these proteins are involved, for example, in autotrophic CO₂-fixation and carbohydrate metabolism, nitrogen metabolism, amino acid metabolism and light absorption. Two differentially regulated proteins were then selected to test the biological significance. Actin 2 was found up-regulated in seedlings with shaded roots. Actin 2 is reportedly involved in root hair elongation and its increased abundance corresponded with elongated root hairs in shaded roots. Among proteins down-regulated in seedlings with shaded roots, APT1 was selected for further analysis. APT1 catalyzes a reverse reaction to that of LOG and thereby inactivates cytokinins. Decrease in APT1 suggests an increase in active cytokinin pool in seedlings with shaded roots. A role of cytokinin in morphological alterations caused by root shading was proven in cytokinin receptor mutants.

Supported by grants and funds P305/12/2144, CZ.1.05/1.1.00/02.0068, CZ.1.07/2.3.00/30.0017.



Thermo
SCIENTIFIC

Lynx

THERMO
nová řada výkonných velkokapacitních vysokorychlostních centrifug;
výkon až 100 000 x g, kapacita až 6 x 1000 ml;
špičková technologie, **Auto-ID** identifikace rotoru, **Auto-Lock** rychlá a bezpečná výměna rotorů stiskem tlačítka, **Fiberlite** Carbon Fiber rotory, extrémně odolné, korozivzdorné a s nízkou hmotností



E1-ClipTip

THERMO
unikátní programovatelné pipety; až 20 programů;
systém **ClipTip** - spolehlivé uchycení špičky na pipetu, vynikající přesnost a reprodukovatelnost dávkování; **Equalizer** - nastavitelná rozteč se shodnou vzdáleností mezi dávkovacími kanály



GBOX

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



Multifuge X1/X3

THERMO
univerzální multifunkční centrifugy pro všechny aplikace; výkonné rotory 4 x 400 ml a 4 x 750 ml, až 16 x mikrodětička, až 28 x 50 ml, max. výkon 25 tisíc x g, **Autolock** unikátní systém upínání rotoru bez klíče usnadňující obsluhu



KOMPLETNÍ NABÍDKA LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ A SLUŽEB

BIOHAZARDY, LAMINÁRNÍ BOXY, IZOLÁTORY
BEZODTAHOVÉ DIGESTOŘE
CENTRIFUGY a ULTRACENTRIFUGY
GEL-IMAGING a ANALÝZA
KONCENTRÁTORY VZORKŮ, LYOFILIZÁTORY
MIKRODETIČKOVÁ 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

PROTEINOVÉ EFEKTORY V INTERAKCI ŘEPKY OLEJKY S *LEPTOSPHAERIA MACULANS*

MIROSLAVA NOVÁKOVÁ^{1,2}, LUCIE TRDÁ¹, MONIKA BAREŠOVÁ², OLGA VALENTOVÁ², LENKA BURKETOVÁ^{1,2}

¹ ÚEB AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha – Lysolaje, ČR

² VŠCHT Praha, Technická 6, 160 00 Praha 6 – Dejvice, ČR

E-mail: mirnov@ueb.cas.cz

Askomyceta *Leptosphaeria maculans* se jako rostlinný patogen specializuje na čeleď brukvovitých, přičemž hospodářsky významné škody působí zejména na řepce olejce. Způsobuje tzv. fomové černání stonků řepky, které se projevuje zprvu nekrózami na listech a později na kořenovém krčku a stonku, což vede ke zvýšené lámavosti stonku a usychání rostlin. *L. maculans* se chová jako hemibiotrof. Nejdříve roste asymptomaticky a čerpá živiny z živého rostlinného pletiva (biotrofní fáze) a později usmrcuje rostlinné buňky a tvoří nekrózy (nekrotrofní fáze). Avšak již během biotrofní fáze probíhá intenzivní souboj mezi rostlinou a patogenem, jehož se účastní stovky molekul. O závažnosti infekce přitom často rozhoduje přítomnost nebo absence jediné molekuly. To je případ efektoru AvrLm4-7 produkovaným *L. maculans*. Nejobecněji lze efekторы definovat jako proteiny nebo malé molekuly, které zasahují do struktury nebo funkce hostitelské buňky (Hogenhout *et al.*, 2009). Efektor AvrLm4-7 významně přispívá k agresivitě *L. maculans*, avšak jeho funkce, mechanismus nebo cíl jeho působení nejsou dosud známy.

Dvojici izolátů *L. maculans*, které se liší pouze přítomností efektoru AvrLm4-7, jsme transformovali reportérovým genem pro β -glukuronidasu (β -GUS), abychom mohli sledovat průběh infekce a kvantifikovat jej. Využili jsme fluorescenční metody stanovení aktivity β -GUS pomocí β -D-glukuronidu 4-methylumbilliferonu (MUG). Specifita a senzitivita stanovení umožňují sledovat rozrůstání vláken houby již v rané fázi infekce, dlouho před objevením prvních příznaků. Hlavní výhodou je rychlost provedení metody, což umožňuje rozhodnout se, zda je již vhodný okamžik pro sledování interakce na molekulární úrovni. Navíc tato metoda velmi dobře koreluje s kvantifikací patogenu pomocí RT-qPCR.

Při screeningu β -GUS transformantů jsme navíc našli jeden izolát *L. maculans* s výrazně sníženou patogenitou. Pro identifikaci místa integrace T-DNA do genomu transformovaného izolátu byla úspěšně použita TAIL-PCR (z angl. thermal asymmetric interlaced PCR) podle Liu *et al.* (1995) založená na využití degenerovaných primerů. Výsledky sekvenace naznačují, že T-DNA narušila skupinu genů nejspíše souvisejících s biosyntézou cysteinu. Fyziologické důsledky integrace T-DNA jsou v současnosti předmětem našeho zkoumání.

Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S.: 2009 – MPMI, 22: 115

Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF: 1995 – Plant J, 8: 457

Podporováno grantem GAČR 13-26798S.

COMPARATIVE PROTEOMICS AS A TOOL TO STUDY DIFFERENCES IN RESPONSE OF TWO ZUCCHINI CULTIVARS TOWARD THE ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS INFECTION

NOVÁKOVÁ S.^{1*}, FLORES-RAMÍREZ G.¹, ŠKULTÉTY L.^{1,2}, DANCHENKO M.¹, SVOBODA J.³, GLASA M.¹

¹ Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak Republic

² Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic, Videnska 1083, CZ-14220 Prague, Czech Republic

³ Research Institute of Crop Production, Drnovská 507, CZ-16106 Praha 6 – Ružyně, Czech Republic

*E-mail: viruslno@savba.sk, tel.: +420 259 302 447

Cucurbita pepo (family *Cucurbitaceae*), is an important food plant widely cultivated around the world. In the cucurbit-growing areas, *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) is one of the notable emerging viral pathogens. Infection leads to formation discoloured and misshapen fruits which are unmarketable. Knowledge advance on the genetic components of the pathosystem is important to design new protection strategies.

Various species from the family *Cucurbitaceae* are showing different level of resistance to virus infection. We have studied a response of two zucchini cultivars: *C. pepo* cv. Zelena (susceptible) and *C. pepo* cv. Jaguar (partially resistant) to ZYMV. Western blot analysis of virus development showed late-onset of infection in partially resistant cultivar comparing to susceptible. This finding was in line with observed phenotypical symptoms on leaves.

It is feasible to achieve thorough understanding of the plant behavior after pathogen attack, using multiple strategies. The proteomics is one of the most useful tools, allowing to have a global view of complex biological changes, caused by the pathogen-host interaction. In this study, we have highlighted the changes in protein profiles among two *C. pepo* cultivars with different susceptibility to ZYMV infection. Total proteins from *C. pepo* leaves have been isolated by phenol extraction/ammonium acetate precipitation protocol, profiled using two dimensional electrophoresis (2-DE) and identified by tandem mass spectrometry. The results indicated that *C. pepo* leaf proteome changes induced by ZYMV infection are generally associated with photosynthesis and redox homeostasis. Our work is the direct comparative study which provide list of proteins differentially expressed in both cultivars as response to virus infection, functionally analysed using advanced bioinformatic tools.

This work was supported by the grant VEGA 2/0156/12 from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education and Slovak Academy of Sciences. J.S. receives a support from the Ministry of Agriculture, Czech Republic (project MZe 0002700604).

VLIV HYGROMYCINU A KANAMYCINU NA REGENERACI NEZRALÝCH ZYGOTICKÝCH EMBRYÍ JEČMENE A PŠENICE

LUDMILA OHNOUTKOVÁ¹, ZUZANA KUČEROVÁ¹, JANA VAŠKOVÁ¹, MENTEWAB AYALEV²

¹ Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, CHR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ČR

² Spelman College, 350 Spelman Lane SW, Atlanta, USA

E-mail: ludmila.ohnoutkova@upol.cz

Ječmen a pšenice patří mezi obtížně transformovatelné druhy rostlin. Kultivace v *in vitro* podmínkách, indukce kalusu a regenerace kalusu je také odrůdově velmi specifická. Jedním z předpokladů úspěšné transformace je účinná selekce buněk po transformaci. Nejčastěji používanými selekčními geny s rezistencí k antibiotikům jsou *hpt* a *ntplI*.

Bakteriální gen *hpt* neboli *aphIV* kóduje hygromycin B fosfotransferázu poskytující rezistenci detoxifikací hygromycinu B ATP-dependentní fosforylací 7"-hydroxylové skupiny. Hygromycin B je aminoglykosidický antibiotikový inhibitor proteinové syntézy, pro rostliny je velmi toxický. Hygromycin je nejčastěji využíván při transformaci ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Jones a Shewry, 2009)

Gen *ntplI* kódující enzym neomycin fosfotransferáza II poskytující rezistenci transgenních rostlin k antibiotiku kanamycinu je selekčním markerem bakteriálního původu. Kanamycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované z bakterie *Streptomyces kanamyceticus*. Neomycin fosfotransferáza II katalyzuje ATP-dependentní fosforylací 3'-hydroxylové skupiny určitých aminoglykosidů jako je kanamycin, neomycin, genetecin (Miki a McHugh, 2004). Selekční gen *ntplI* byl využit při transformaci pšenice pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Binka a kol. 2012).

Za účelem dosažení vysoké úrovně selekce transformovaných buněk byly testovány rozdílné koncentrace antibiotik hygromycinu a kanamycinu. V *in vitro* podmínkách byla hodnocena regenerace rostlin z izolovaných nezralých zygotických embryí odrůdy jarního ječmene Golden Promise a odrůdy jarní pšenice Bob White. Sledována byla i možnost selekce transgenních rostlin T1 generace na médiu s antibiotiky.

Binka A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk, A.: J. (2012) – Appl. Genetics, 53:1–8

Jones H. J. a Shewry P. R.: (2009) – Humana Press, New York, ISBN 978-1588299611

Miki B., McHugh, S.: (2004) – Journal of Biotechnology, 107: 193–232

Podporováno grantem MŠMT LH13069.



OligoArchitect™ Online v3.0

Sigma® Life Science is Pleased to Offer the Most Comprehensive Online qPCR Assay Design Tool.

Bioconfident.

In addition to Dual-Labeled Probes and SYBR® Green I Primers, OligoArchitect Online may now be used to design Molecular Beacons, Scorpions™ Probes, and LightCycler® Probes. Together with our custom qPCR probes portfolio, Sigma ensures the success of every qPCR assay — every time.

Design your qPCR assay now
sigma.com/probedesignonline



©2012 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA and SIGMA-ALDRICH are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. OligoArchitect and Where bio begins are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC. SYBR® is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. LightCycler® is a registered trademark of the Roche Group. Scorpions™ probes are licensed from DxS Ltd. Molecular Beacons are sold under license from PHRI, City of New York, Inc.

Slovakia Tel: +421 02 555 71 562 SVKorders@sial.com
Czech Republic Tel: +420 246 003 200 CZEorders@sial.com

SIGMA-ALDRICH

SIGMA Where bio begins™
Life Science

POROVNÁNÍ DOSTUPNÝCH PCR MIXŮ PRO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME ANALÝZU EXPRESE GENŮ

JOSEF PATZAK, ALENA HENYCHOVÁ

Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, ČR
E-mail: patzak@chizatec.cz, tel.: +420 415 732 109

Pro analýzu exprese genů v pletivech rostlin na úrovni mRNA lze použít několik metod. Jsou to metody jednak založené na molekulární hybridizaci nebo na polymerázové řetězové reakci (PCR). Kvantitativní Real-time (qRT) PCR je dnes nejpoužívanější metodou.

Metoda qRT-PCR je založena na principu klasické PCR, kdy na rozdíl od ní dovede simultánně amplifikovat a kvantifikovat sledovaný úsek DNA. Jeho detekce probíhá v reálném čase bez nutnosti elektroforetické analýzy. K detekci jsou používána nespecifická fluorescenční barviva (např. SYBR green), specifické fluorescenční hydrolyzační (Taqman) nebo hybridizační (FRET, Dual-labelled) sondy a specifické fluorescenční primery (Amplifluor). Výsledky analýzy pak lze kvantifikovat v absolutním obsahu kopií templátu genu nebo v relativním množství oproti kontrole nebo expresi referenčních genů.

V našich experimentech jsme sledovali celkem 12 dostupných RT-PCR mixů pro nespecifickou fluorescenční (SYBR green a alternativy) detekci amplifikovaných produktů. Specifické primery pro referenční geny glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) a DEAD-box RNA helikázy 1 (DRH1) byly použity v qRT-PCR reakcích na ředící řadě cDNA z žateckého chmele (Maloukh *et al.* 2009; Matoušek *et al.*, 2012). Amplifikační reakce byly prováděny v Real-time PCR cykleru CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) podle firemních protokolů v dvou nebo tří krokovém cyklu bez nebo s počáteční teplotní aktivací polymerázy.

V analýzách byly sledovány efektivita amplifikace, specifita amplifikovaných produktů, průběh reakce a míra fluorescence. V celkovém porovnání pak byla do hodnocení zahrnuta i cena reakce, aby byly vybrány RT-PCR mixy s nejvýhodnějším poměrem kvalita/cena. V celkovém hodnocení se jako nejvhodnější ukázaly RT-PCR mixy iTaq universal SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories), FastStart universal SYBR green master (Roche Diagnostics), Xceed qPCR SYBR green master mix (Biotech), SYBR Select master mix a Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems).

Maloukh, L., Matoušek, J., Van Bockstaele, E., Roldán-Ruiz, I.: 2009 – J Plant Biochem Biotech., 18: 53–58

Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Füssy, Z., Procházková, J., Heyerick, A.: 2012 – BMC Plant Biol, 12: 27

Podporováno grantem GAČR 13-03037S.

POROVNÁNÍ METOD IZOLACE DNA ZE SUCHÝCH A ZPRACOVANÝCH HLÁVEK CHMELE

JOSEF PATZAK, ALENA HENYCHOVÁ

Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, ČR
E-mail: patzak@chizatec.cz, tel.: +420 415 732 109

Využití molekulárně genetických metod studia DNA je v posledních letech nejvýhodnější nástroj hodnocení jednotlivých genotypů. Moderní molekulární metody nám umožňují co nejlépe sledovat změny způsobené kombinacemi rodičů, chybami v přenosu, mutacemi a selekčním tlakem a zhodnotit tak příbuznost jednotlivých genotypů nebo variabilitu (diverzitu) v rámci populace. Velmi výhodné je využít molekulárně genetické metody pro genotypizaci a identifikaci jednotlivých druhů a odrůd rostlin. V nedávné době jsme vyvinuli účinný markerovací systém pro kontrolu autenticity českých odrůd chmele (Patzak a Matoušek, 2013), který jsme zavedli do systému identifikace genotypů chmele a kontroly odrůdové čistoty sadby.

Pro molekulárně genetickou analýzu je nezbytné vyizolovat z rostlin dostatečné množství DNA v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Pro kontrolu odrůdové čistoty na našem pracovišti izolujeme DNA z mladých listů cetyl trimethylammonium bromid (CTAB) izolační metodou nebo DNeasy Plant mini kitem (Qiagen, Hilden, FRG). Komerčním produktem chmelových rostlin jsou sušené chmelové hlávky a chmelové produkty (pellety, extrakty), kde je DNA sice uchována, avšak v různém stavu poškození. Přesto ověření autenticity odrůd chmele při prodeji má vysoký ekonomický dopad.

V našich experimentech jsme proto otestovali celkem 11 různých metod izolace DNA na vzorcích ze suchých hlávek chmele a lisovaných pellet. Z těchto metod byly tři modifikace CTAB izolační metody, dvě modifikace dodecylsírnan sodný (SDS) izolační metody, pět kolonkových izolačních kitů a jeden kit, využívající magnetické partikule. Izolační metody byly hodnoceny podle výtěžku DNA, průběhu a kvality specifické PCR. Největšího výtěžku bylo dosaženo naší standardní CTAB izolační metodou. Žádná DNA nebyla získána jednou modifikací CTAB izolační metody a oběma modifikacemi SDS izolační metody. Pomocí magnetických partikul byl dosažen dostatečný výtěžek DNA, ale na vzorcích neprobíhala PCR. Výtěžek z kolonkových izolačních kitů byl srovnatelný a vzorky byly vhodné pro PCR analýzu. Nejvýhodnější byly Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Dy nex), Omega EZNA SP Plant DNA mini kit (VWR International) a Machery-Nagel NucleoSpin Plant II kit (Biotech).

Patzak J., Matoušek J.: 2013 – Certifikovaná metodika, 40 s., ISBN 978-80-86836-94-2

Patzak J., Matoušek J.: 2013 – Užité vzor, č. 25678

Podporováno centrem kompetence TAČR TE02000177.

MODIFICATION OF LINSEED OIL COMPOSITION USING CONSTRUCT TO INDUCE GENE SILENCING

MICHAELA PAVELKOVÁ¹, PAVEL HANÁČEK², MIROSLAV GRIGA¹

¹ AGRITEC Ltd., Plant Biotechnology Department, Zemědělská 16, CZ-78701, Šumperk, Czech Republic

² Mendel University, Department of Plant Biology, Zemědělská 1, CZ-61300, Brno, Czech Republic

E-mail: pavelkova@agritec.cz

This work is focused on creating vector construct inducing downregulation of the *fad2* gene in flax (*Linum usitatissimum* L.) via RNA mediated post-transcriptional gene silencing. The downregulation of the *fad2* gene should lead to increased oleic acid content in linseed. Oleic acid is a monounsaturated fatty acid with a high melting point, and its consumption can decrease the risk of coronary heart diseases.

Fragments of *fad2* gene were inserted in sense/antisense orientation between the 35S promoter and OCS terminator in the plasmid pHannibal. Sense/antisense orientation is transcribed to hairpin RNA (hpRNA) which leads to post-transcriptional gene silencing. Resulting expression cassette was cloned into t-DNA region of the pGreen II vector system. Plasmid pGreen II contains a reporter gene for GUS histochemical test (*uidA*) and selection gene for resistance to the herbicide phosphinotricin (*bar*). This construct together with pSoup (binary vector) were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. The ability of the construct to transform plants was tested by transformation of tobacco leaf discs. *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco and flax was performed with *A. tumefaciens* EHA105 strain. The aim of this work is to prepare transgenic flax plants with increased oleic acid content.

Acknowledgement: This work was financially supported by Ministry of Education CR research project LH12226.

LABEL-FREE IMAGING OF POLLEN GRAIN HYDRATION: MODULATION RELIEF-CONTRAST MICROSCOPY

RADEK PELC^{1,2,3,4}, ZDENĚK HOSTOUNSKÝ² & CHAN-SOO KIM³

¹ Institute of Physiology, Academy of Sciences, Vídeňská 1083, CZ-14220 Prague 4 (Krč), Czech Republic

² The Stentor Institute, Hostivice-Palouky 614, CZ-25301 Praha-Západ, Czech Republic

³ Warm-Temperate & Subtropical Forest Res. Ctr. KFRI, Seogwipo City, Jeju Island 697-050, South Korea

⁴ Jeju Technopark JBRI/HiDI, Seogwipo City, Jeju Island 697-943, South Korea

E-mail: radek.pelc@seh.oxon.org

A detailed investigation of microscopic plant anatomy and its physiological implications [1,2] often requires the use of specialized staining procedures and/or complex imaging equipment. In some cases, however, staining is impractical or even impossible, and contrasting by purely optical means represents a convenient alternative. The present paper highlights standard/modulation relief-contrast microscopy as a simple optical-contrasting (label-free imaging) modality (Fig. 1) suitable for visualization of unstained cells and tissues. Its “standard” form (“off-axis illumination”) has been presented elsewhere [3,4].

Optically thick objects such as leaf replicas in transparent acrylate resin are typically best rendered in standard or modulation relief contrast, often superior in image quality to Hoffman modulation contrast requiring special objectives. Objects of medium optical thickness ($\sim 1 \mu\text{m}$ on a logarithmic scale) such as spores of the field horsetail (*Equisetum arvense*), or osmotically swollen (burst-open) pollen grains of yew or juniper are most conveniently imaged by differential interference contrast (DIC Nomarski) or (apodized) phase contrast. However, at least with low-power objectives, modulation relief-contrast (“schlieren”) microscopy yields images comparable to those obtained with much more complex DIC (Fig. 2). Optically thin objects such as refractive-index matched stellar trichomes of olive tree (*Olea europaea*) or *Elaeagnus* sp. leaves ideally require the use of low-transmittance phase-contrast.

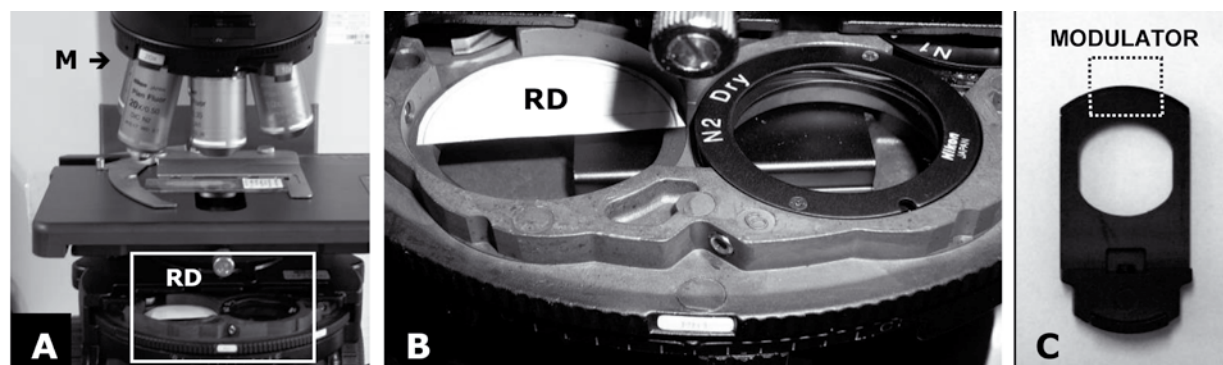


Fig. 1

Adaptation of an upright microscope to standard (RD only) and modulation (RD+M) relief-contrast imaging. Relief diaphragm (RD) is actually made of black (not white) cardboard. Modulator (M) placed in the objective back focal plane consists of an edge diaphragm (dotted square in C), much like RD.

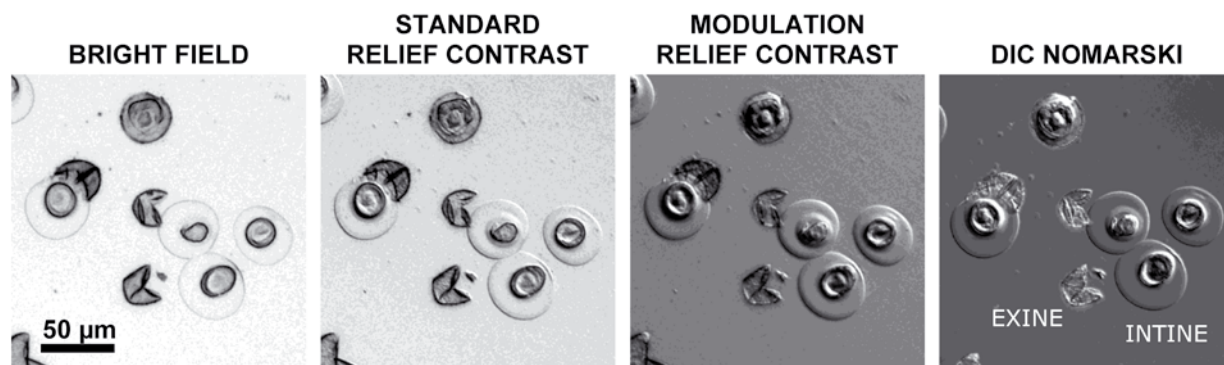


Fig. 2

Unstained osmotically swollen pollen grains of European yew (*Taxus baccata*) in water. The process of exine rupture and intine release is documented here (inverted microscope configuration was employed). Objectives $\times 40/0.75$ (DIC Nomarski) and $\times 10/0.30$ (all other images). Raw-image ID: 2009-08-29_*

- [1] Vogelmann T.C. et al. (1996) Trends Plant Sci. 1 (2): 65–70. DOI: 10.1016/S1360-1385(96)80031-8
[2] Vogelmann T.C. et al. (1996) Physiol. Plant. 98 (1): 43–56. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00674.x
[3] Hostounský Z. & Pelc R. (2007) Adv. Physiol. Educ. 31 (2): 232–235. DOI: 10.1152/advan.00028.2006
[4] Pelc R., Hostounský Z. & Otaki T. (2008) J. Biomed. Opt. 13 (5): 054067. DOI: 10.1117/1.2966716

Supported by LC06063, RVO:67985823 and NRF/KOSEF International Fellowship.

OPTIMALIZACE DETEKCE VIRŮ TUMV A TYMV METODOU RT-PCR S JEJICH POTVRZENÍM SEKVENACÍ

ELIŠKA PEŇÁZOVÁ, ALEŠ EICHMEIER

Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Valtická 337, 691 44 Lednice, ČR
E-mail: eliska.penazova@mendelu.cz, tel.: +420 519 367 247

Virus mozaiky tuřínu (TuMV) spolu s virem žluté mozaiky tuřínu (TYMV) patří mezi ekonomicky významné patogeny infikující pletiva zelenin čeledi *Brassicaceae*. Cílem práce byla optimalizace jejich detekce metodou RT-PCR a porovnání míry napadení testovaných odrůd.

V rámci studie jednotlivých virů byla nejprve provedena inokulace odrůd pekinského zelí izoláty TuMV a TYMV. Virulence použitého inokulačního materiálu byla současně ověřena na indikátorových rostlinách merlíku (*Chenopodium quinoa* Willd.) a tabáku (*Nicotiana tabacum* L., 'White Burley'). Celková RNA byla izolována za použití komerčního kitu, pro RT-PCR byly použity specifické primery TU 8705-8726 a TY 109N0-109M9. Při optimalizaci detekce pak byly porovnány dvě využívané polymerázy – Taq DNA Polymerase (NEB) a GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega). Získané PCR produkty byly purifikovány a sekvenovány.

Podporováno grantem IGA č. 4/2014/591. Použité izoláty pocházejí ze sbírek VÚRV, v.v.i. a referátu virologie ÚKZÚZ.

STUDIUM METYLACE TELOMEROVÝCH CYTOSINŮ ROSTLIN

PAVLA POLANSKÁ¹, EVA MAJEROVÁ¹, MILOSLAVA FOJTOVÁ¹, JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Central European Institute of Technology (CEITEC) a Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kamenice 5, 625 00 Brno

² Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Kralovopolská 135, 612 65 Brno
E-mail: polanskapavla@gmail.com

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích lineárních eukaryotických chromozomů, skládající se z krátkých repetitivních sekvencí, které jsou nezbytné pro stabilitu genomu. Telomery byly považovány za typicky heterochromatinové oblasti s heterochromatinovými epigenetickými značkami. Avšak nedávná studie ukázala přítomnost heterochromatinových i euchromatinových histonových modifikací na telomerách *Arabidopsis thaliana* (Vrbsky et al., 2010). Jiná studie telomery *A. thaliana* charakterizuje dokonce jako euchromatinové struktury (Vaquero-Sedas et al., 2011).

Analýza metylace asymetricky lokalizovaných cytosinů v telomerovém motivu CCCTAAA je metodicky problematickou záležitostí, jelikož nelze využít konvenčních přístupů: i) telomery neobsahují cílové místo pro žádnou metylačně citlivou restriční endonukleázu, ii) repetitivní sekvence nelze analyzovat PCR po modifikaci bisulfitem. V práci (Vrbsky et al., 2010) byl navržen přístup analýzy metylace telomerových cytosinů za pomoci bisulfitové konverze DNA, kdy dochází ke konverzi cytosinu na uracil, zatímco metylcytosin zůstává nezměněn. Konvertovaná DNA je přenesena na nylonovou membránu a hybridizována s radioaktivně značenými telomerovými oligonukleotidy, které jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s telomerovými repetitivy obsahujícími metylované/nemetylované cytosiny. V naší práci (Majerová et al., 2011) byl návrh primeru detekujícího frakci metylovaných telomerových repetitiv zpřesněn na základě informace o rozložení metylovaných cytosinů v telomerech *A. thaliana* (Cokus et al., 2008).

Studovali jsme metylaci cytosinů v telomerech rostlin *Arabidopsis thaliana* klíčících a buněk kultury *Nicotiana tabacum* BY-2 pěstovaných v přítomnosti hypometylačních látek zebularinu a DHPA (dihydroxypropyladenin). V semenáčcích *A. thaliana* klíčících v přítomnosti hypometylačních látek a v buňkách BY-2 byla výrazně snížena metylace cytosinů v telomerových a centromerových repetitivních oblastech. V dospělých rostlinách *A. thaliana*, které již nerostly v přítomnosti zebularinu či DHPA, byla metylace téměř srovnatelná s kontrolními rostlinami. Telomery v hypometylovaných rostlinách *A. thaliana* byly výrazně zkrácené (Ogrocká et al., 2014), zatímco délka telomer hypometylované tabákové kultury BY-2 se nezměnila (Majerová et al., 2011), což ukazuje na možnou rozdílnou epigenetickou regulaci délky telomer v různých rostlinných modelech.

Finanční podpora: Grantová agentura ČR (P501/11/0596), "CEITEC" CZ.1.05/1.1.00/02.0068, projekt CZ.1.07/2.3.00/20.0043 z Evropského sociálního fondu.

ZPŮSOB PŘEHLEDNÉHO ZOBRAZENÍ VELKÉHO MNOŽSTVÍ DAT

PETR HOŠEK^{1,2}, SYLVA PREROSTOVÁ^{1,3}, RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹

¹ ÚEB AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje, ČR

² FBMI ČVUT, nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno 2, ČR

³ PŘF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR

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

Zobrazení hodnot jedné nebo více spojitých proměnných v závislosti na více kategorických proměnných (například koncentrace různých hormonů ve vzorcích vystavených různým podmínkám pokusu) pomocí sloupcového grafu bývá často nepřehledné. Obvykle je nutné použít větší počet grafů nebo seskupování sloupců k vizualizaci hodnot pro všechny kategorie, což porovnatelnost dat mezi sebou značně ztěžuje a ve výsledku zaujímá velkou plochu. V případě 3D sloupcových grafů může zase dojít k zakrytí nízkých sloupců těmi vyššími. Z těchto důvodů jsme vytvořili program CircleGraph, který vizualizuje data do kruhů uspořádaných v přehledné matici.

Program CircleGraph v1.14 vznikl v systému MATLAB. U koncového uživatele není nutná instalace plné verze MATLABu, spouštění programu probíhá v prostředí MATLAB Compiler Runtime (MCR). Vstupní data a parametry zobrazení jsou načteny z .xlsx souboru (MS Excel). Hodnota hlavní číselné proměnné je znázorněna pomocí průměru či obsahu kruhů (uživatel vybírá mezi těmito dvěma módy) uspořádaných v přehledné matici podle dvou kategorických proměnných. Obsah kruhu roste s kvadrátem průměru, což dovoluje na omezeném prostoru zobrazit a porovnat i veličiny s širokým rozsahem naměřených hodnot. Další spojitě hodnoty (nejčastěji směrodatné odchylky, mezikvartilová rozpětí apod.) se dají znázornit přerušovanými kružnicemi v poměrné vzdálenosti od obvodu kruhu. Dovnitř každého kruhu může být uveden jakýkoli text, tedy číselná hodnota hlavní či další spojitě proměnné nebo popisek další kategorické proměnné. Poslední kategorickou proměnnou je možné ještě vyjádřit pomocí barvy kruhu, která se zadává v datovém souboru v Hex formátu. Obvod každého kruhu lze nezávisle zvýraznit pomocí tučné linky, čímž se dá zobrazit navíc jedna binární proměnná (například statistická významnost hodnoty hlavní proměnné). Pomocí parametrů definovaných ve zdrojovém souboru může být upraven také finální vzhled matice. Výslednou matici lze exportovat do rastrových i vektorových grafických formátů.

Program CircleGraph umožňuje rychle a flexibilně porovnat velká množství dat a přehledně je prezentovat na menší ploše, než by tomu bylo u standardních grafů.

Projekt byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (GAUK 3067/2014).

EXTRAKCE POLYFENOLŮ Z POKRUTIN RÉVY VINNÉ

DAGMAR PROCHÁZKOVÁ^{1,2}, RADOMÍRA STRÁLKOVÁ¹, TEREZA MIŠTOVÁ¹, ONDŘEJ SKALA¹, MARIE KOZÁKOVÁ³,
ALENA HEJTMÁNKOVÁ³, JAROMÍR LACHMAN³

¹ VÚRV, Drnovská 507/163, 161 06 Praha 6–Ruzyně, ČR

² ÚEB AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 161 06 Praha, ČR

³ ČZU, Kamýcká 129, 169 21 Praha, ČR

E-mail: prochazkovad@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 812

Polyfenolické látky jsou ve vyšších rostlinách přítomny jako sekundární metabolity. Mají nezastupitelnou úlohu v ochraně proti chorobám, infekcím, parazitům a hrají též významnou roli při ochraně rostlin proti nadměrnému slunečnímu záření. Jejich koncentrace v rostlinách závisí na mnoha faktorech, z nichž nejdůležitější jsou faktory genetické (druh a odrůda rostliny), stupeň zralosti, faktory klimatické a konečně působení nejrůznějších abiotických a biotických stresů.

Polyfenolické látky představují mnoho typů sloučenin, které můžeme rozdělit do pěti základních skupin: kyseliny fenolkarboxylové, flavonoly, flavan-3-oly, proantokyanidy a antokyanidy. V poslední době je těmto látkám věnována značná pozornost ze strany nutričních specialistů, neboť jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných civilizačních nemocí, jako je rakovina a kardiovaskulární choroby (Zendulka, 2008).

Doposud zavedené postupy extrakce polyfenolických látek ve světě se zabývají zpracováním pouze celých semen. Předchozí studie ukázaly, že významným zdrojem polyfenolických látek jsou též pokrutiny révy vinné *Vitis vinifera* L. (Lachman et al. 2013). Ověřili jsme, že pokrutiny zůstávají velice hodnotným zdrojem polyfenolických látek původem ze semen révy vinné i po vylisování oleje. Jejich zpracování by tak dále navýšilo možnosti extrakce biologicky aktivních látek z odpadů pocházejících z výroby vína. Zjistili jsme, že důležitým rozdílem v extrakci polyfenolů z pokrutin oproti intaktním semenům je přítomnost oleje v hrubém extraktu. Bude tak vyžadována optimalizace celého procesu.

Pokrutiny pocházející ze semen révy vinné jsou velmi tvrdým a křehkým materiálem. Pro účely extrakce byly zvoleny dva způsoby jejich zpracování, a to 1) mechanické drcení a 2) rozmočení vodou. Jako solvent během extrakce byla vzhledem k nízké ekonomické náročnosti a případné potravinářské bezpečnosti zvolena voda. Dále byly testovány možnosti pryskyřice Amberlite XAD-7HP a etanolu ve využití pro přečištění a zakonzentrování získaného produktu. Uvedeným postupem bylo získáno cca 10 % polyfenolických látek obsažených v pokrutinách.

AMBERLITE XAD7HP (Rohm and Haas Company) je neiontový alifatický akrylový polymer. Sorpční schopnosti tohoto materiálu jsou odvozeny z jeho síťovité struktury (obsahuje souvislou polymerní porézní fázi), a z velkého povrchu alifatické povahy. Tato struktura dává tomuto adsorbentu výbornou fyzikální a termální stabilitu. Díky své alifatické povaze může AMBERLITE XAD7HP adsorbovat nepolární sloučeniny z vodných roztoků a polární sloučeniny z nepolárních rozpouštědel. Jeho adsorpční výnos u polyfenolů je 70,4 %; čas adsorpce je 20 min (Soto et al., 2012).

Mechanicky rozdrcené (pomleté) a nepomleté vzorky pokrutin byly vařeny ve vodě po dobu 60 min a bylo upraveno pH. Polyfenoly byly adsorbovány v koloně s Amberlitem XAD-7HP a nakonec byly desorbovány 96% etanolem. Obsah celkových polyfenolů (CP) v eluátu byl měřen spektrofotometricky pomocí modifikované metodiky dle Lachmana a kol. (1999) Folin-Ciocalteuovým činidlem na spektrofotometru SPECORD*210 Plus (Analytic Jena AG, Německo), v plastové kyvetě o tloušťce 1 cm, při vlnové délce 700 nm. Hodnoty CP byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové na jeden kilogram vzorku pokrutin.

Průměrné výsledky byly získány ze 3 opakování. Sledování probíhalo u vybraných odrůd révy vinné, a to Müller Thurgau, Zweigeltrebe, Rulandské modré a Rulandské bílé, vypěstované v České vinařské oblasti (Grebovka Praha, Mělník) v roce 2013. Výsledky ukázaly rozdílný obsah CP mezi pomletými a nepomletými vzorky.

Lachman J., Hejtmánková A., Hejtmánková K., Horníčková Š., Pivec V., Skala O., Dědina M., Přibyl J.: 2013 – Ind. Crop. Prod., 49: 445–453

Lachman J., Pivec V., Orsák M., Hosnedl V., Prokinová E., Lapčík O.: 1999 – Agrární www portál <http://www.agris.cz/clanek/111118>

Zendulka O.: 2008 – Polyfenoly ve výživě jako možná prevence nádorových onemocnění. Disertační práce, Masarykova univerzita v Brně: 137

Soto, M.L. et al.: 2012 – Molecules, 17: 3008–3024

Rohm and Haas Company: Amberlite® XAD7HP Industrial Grade Polymeric Adsorbent

[online http://www.rohmhaas.com/ionexchange/Pharmaceuticals/Bioprocessing_doc/english/xad7hp.PDF]

Podporováno grantem 111B107 NAZV „Výzkum získávání a využití biologicky aktivních látek (BAL) ze semen vinných hroznů pro zlepšení metabolismu hospodářských zvířat jako podklad pro návrh nejlepší dostupné techniky (BAT)“.

N⁶-ADENOSYL METHYLATION REGULATES VASCULAR DEVELOPMENT AND HORMONAL RESPONSE IN *ARABIDOPSIS*

KAMIL RŮŽIČKA^{1,2}, SEDEER EL-SHOWK, ANA CAMPILHO, VASSILIKI ZACHARAKI, DOMINIQUE EECKHOUT, MUHAMMAD KASHIF, JAN HEJÁTKO, GEERT DE JAEGER, MIKKO FRILANDER, GORDON SIMPSON, RUPERT FRAY, YKÄ HELARIUTTA²

¹ CEITEC Masaryk University, Kamenice 5, CZ-62500 Brno, CR

² Inst. of Biotechnology, POB 65, 00014 University of Helsinki, Finland

E-mail: kamil.ruzicka@ceitec.muni.cz, tel.: +420 549 495 740

N⁶-adenosine methylation (m⁶A) is the most common mRNA modification in eukaryotes. However, the physiological role of m⁶A and the underlying molecular machinery remain practically unknown, and, despite recent significant progress, it is very little known about its role in pattern formation, in plants, as well as in other eukaryotes.

Protein AHP6, a member of signaling cascade of a plant hormone cytokinin, plays a critical role during protoxylem development and is the earliest known marker of protoxylem identity, which relies also on other phytohormone auxin. We isolated mutant *emb2016-6*, which shows a reduced *AHP6prom:GFP* activity, accompanied with aberrant protoxylem formation. In addition, *emb2016-6* shows auxin related defects and resistance to synthetic auxin 2,4-D and ethylene. In order to support this hypothesis, we made a transcriptional profiling of *emb2016-6* mutant, searching for auxin synthesis related genes with altered expression levels there.

emb2016-6 codes for a weak allele of an embryonically lethal gene involved in mRNA processing. In order to elucidate the molecular function of EMB2016 complex, we performed two rounds of independent protein interaction hunts. We co-purified m⁶A methylase and a protein homologous to EMB2016 interactors from *Drosophila*. We demonstrate that knockdown lines of interactors of EMB2016 show similar defects to *emb2016-6*, including altered sensitivities to auxin 2,4-D and vascular defects. Finally, we found that depletion of EMB2016 in *Arabidopsis* and its homolog in HeLa cells leads to strong depletion of m⁶A in mRNA and EMB2016 appears to be a novel functional member of a conserved m⁶A complex.

Supported by Czech Science Foundation (P501/12/0934) and by the European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0189 and CEITEC).

CHARAKTERIZACE PROTEINŮ ASOCIOVANÝCH S TELOMERÁZOU

ŠÁRKA SCHOŘOVÁ¹, PETRA PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFVÁ¹, JANA MAJERSKÁ^{1,3}, LADISLAV DOKLÁDAL^{1,2} A JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC a Oddělení funkční genomiky a proteomiky, NCBR, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

² Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Česká republika

³ Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Station 19, 1015 Lausanne, Switzerland

E-mail: 376269@mail.muni.cz

Významným enzymem účastnícím se prodlžování nedoreplikovaných lineárních chromozomů eukaryotických konců neboli telomer je telomeráza, která je tvořena z katalytické podjednotky TERT a RNA podjednotky TR (u rostlin byly popsány dvě varianty TR).

TERT podjednotka je rozdělena na několik částí. Naše studium je zaměřené na N-terminální část domény zodpovědné za vazbu jednořetězcové DNA při translokačním kroku a obsahující NLS signál lokalizující telomerázu do jádra. TERT podjednotka může asociovat s mnoha proteiny, které ovlivňují její lokalizaci, funkci či regulují její aktivitu. V naší laboratoři jsme popsali první přímou interakci rostlinné telomerázy s proteiny schopnými vazby i na telomerickou DNA – Telomere repeat binding (TRB) proteiny (Schrumpfová et al. 2014). TRB proteiny navíc přímo interagují s proteinem Pot1b, který je homologem lidského proteinu Pot1 vázajícího se na jednovláknový přesah telomer.

Avšak telomeráza neplní v organismu jen funkci spojenou s prodlžováním telomer (telomerickou funkci), ale účastní se i dalších procesů, které nejsou propojeny s telomerami. Mezi netelomerické funkce telomerázy patří například její účast při tumorigenezi, kde ovlivňuje genovou expresi, opravuje poškozenou DNA nebo se uplatňuje při regulaci buněčného cyklu.

Pomocí metody Tandemové afinitní purifikace (TAP = Tandem Affinity Purification) byly získány kandidátní proteiny, které by mohly potenciálně interagovat s TERT podjednotkou. Několik kandidátních proteinů a jejich interakce s TERT podjednotkou byly ověřovány třemi metodami pro zjištění protein-proteinových interakcí: Dvojhybridním kvasinkovým systémem (Y2H = Yeast two Hybrid systém), Bimolekulární fluorescenční komplementací (BiFC = Bimolecular Fluorescence Complementation) a imunoprecipitací.

Schrumpfová PP, Vychodilová I, Dvořáčková M., Majerská J., Dokládál L., Schořová Š., Fajkus J. (2014) Telomere repeat binding proteins are functional components of *Arabidopsis* telomeres and interact with telomerase, *Plant J.*, 77(5), 770–81

Práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (13-06943S), a projektu CZ.1.07/2.3.00/20.0043 z Evropského sociálního fondu.

ANALYSIS OF KINASE ACTIVATION OF HOP TRANSCRIPTION FACTOR *H/WRKY1* AS A PART OF NETWORK REGULATING LUPULIN BIOSYNTHESIS

KRISTÝNA SIGLOVÁ¹, TOMÁŠ KOCÁBEK¹, AJAY KUMAR MISHRA¹, GANESH SELVARAJ DURAISAMY¹, ANNA TÝCOVÁ¹, JAROSLAV MATOUŠEK¹

¹ Biology Centre AS CR, v. v. i., Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic
E-mail: kristyna@umbr.cas.cz

Plant WRKY is relatively large group of transcription factors (TFs), which play an important role in response to biotic or abiotic stress in relation to growth and development of plants (Eulgem and Somssich, 2007). The WRKY proteins recognize W-box (TTGACC/T) sequence in the promoter region of DNA and thus regulate the expression of specific genes (e.g. van Verk *et al.*, 2008). Many WRKYs contain in their own promoter W-boxes which caused autoregulation by WRKY (Eulgem and Somssich, 2007). We recently find a significant influence of lupulin-specific *H/WRKY1* factor for gene expression of some key enzymes especially o-methyl transferase, which is necessary for the synthesis of xanthohumol, and therefore *H/WRKY1* regulate biosynthesis of prenylflavonoids in hop lupulin gland. We are testing the promoters activity of the genes for key enzymes when exposed *H/WRKY1* and in addition, our aim is also to characterize the regulatory network acting on *H/WRKY1* factor itself. In transient expression system, the interaction between *H/WRKY1* and *H/WDRI* TFs showed a co-activation and further *H/WRKY1* is stimulated by silencing inhibitors, particularly p19 and HCPro. The activity of *H/WRKY1* protein, as others WRKY factors, is probably dependent on a phosphorylation. It was published the phosphorylation of *Arabidopsis* WRKY factors with the MAPK kinases (Popescu *et al.*, 2007). Therefore the level of kinase expression influence the expresion of *H/WRKY1* and to analyse the extent of which phosphorylation affects the activity of *H/WRKY1* factor we used transient expression system using two kinases (SIPKV and AtPRK2) from tomato and *Arabidopsis*. We designed a construct where the *H/WRKY1* is fused with GFP at the C-terminal end of *H/WRKY1* to further study of the mechanism of *H/WRKY1* network. The expression level in *N. benthamiana* was evaluated in protein and RNA levels. We used the protein extracts from *N. benthamiana* containing *H/WRKY1* fused to GFP as tag and based on mobility shift of phosphorylated and non-phosphorylated proteins in polyacrylamid gels, we designed the method for studying phosphorylation of tagged *H/WRKY1* protein and the influence of silencing inhibitors on *H/WRKY1* factor.

Eulgem T., Somssich I.E.: 2007 – Curr Opin Plant Biol 10: 366–371.

Popescu S. C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., and Dinesh-Kumar S.P.: 2009 – Gen Dev 23: 80–92

van Verk M. C., Pappaioannou D., Neeleman L., Bol J. F., Linthorst H. J. M.: 2008 – Plant Physiol 146: 1983–1995

The project was supported by the Czech Science Foundation (GACR 13-03037S), by the cooperative project FP7-REGPOT-2012-2013-1 MODBIOLIN No. 316304 and by institutional support RVO:60077344.

DYNAMIKA PROTEOMU ROSTLIN *ARABIDOPSIS THALIANA* PŘI ODPOVĚDI NA TEPLOTNÍ STRES A ZMĚNU ENDOGENNÍCH HLADIN CYTOKININŮ

JAN SKALÁK¹, MARTIN ČERNÝ¹, PETR JEDELSKÝ², EVA GE³, JANA DOBRÁ³, RADOMÍRA VAŇKOVÁ³, BŘETISLAV BRZOBOHATÝ¹

¹ Laboratoř molekulární biologie rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. a Mendlova univerzita v Brně, CEITEC MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Viničná 7, 128 43 Praha, ČR

³ Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha, ČR

E-mail: skalak.jan7@gmail.cz, tel.: +420 545 133 374

Rostliny odolávají v průběhu svého života mnoha stresujícím faktorům, které mohou hrát zcela zásadní roli v jejich růstu a vývoji. Mezi nejvýznamnější abiotické faktory patří mimo jiné teplota, u které jsou následkem klimatických změn čím dál častější a závažnější výkyvy. Současný matematický model předpokládá, že průměrná teplota v hospodářsky využitelných oblastech stoupne do 50 let až o 5 °C. Odhalení odpovědí rostlin na změny teplotních podmínek je tedy nezbytné pro budoucí přípravu odolnějších kultivarů¹.

V průběhu dne dochází k přechodu působení teplotního stresu z prýtové na kořenovou část rostlin². Proto byl sestaven experiment simulující tyto denní výkyvy teplot (rozmezí 21–40 °C) působící odděleně na prýtovou (i) a kořenovou (ii) část, i na celou rostlinu (iii). Jelikož se v poslední době vyskytují informace o důležitosti rostlinných hormonů cytokininů v teplotní signalizaci rostlin³, byly souběžně s kontrolními ekotypy (Col-0) do experimentu zahrnuty transgenetické linie *Arabidopsis thaliana* s indukovatelnou expresí genu *ipt* (*CaMV35S>GR>ipt*) kódujícího enzym v biosyntéze cytokininů. Rostliny byly po aplikaci odlišných teplotních podmínek podrobeny analýze fluorescenční kinetiky chlorofylu (FluorCam) a sesbírány pro následnou proteomickou (2D PAGE, MALDI MS) a hormonální (LC-MS) analýzu.

Výsledky dokládají, že endogenní navýšení hladin cytokininů zásadně ovlivňuje reakci rostlin na aplikaci teplotního stresu a ve většině případů vede zvýšená hladina cytokininů společně s teplotním stresem k opačnému účinku než aplikace samotného teplotního šoku, a to jak na hormonální, tak i proteomickou úroveň. Na základě proteomické analýzy bylo odhaleno 110 a 36 signifikantně regulovaných proteinů v prýtové a kořenové části. Celkově měla aplikace teplotního stresu za následek negativní regulaci u 61 % rozdílně regulovaných proteinů, kdy nejčastěji docházelo k negativní regulaci proteinů po aplikaci teplotního stresu na kořenovou část. Na základě shlukové analýzy (Cluster 3.0) bylo zjištěno, že zvýšená hladina cytokininů způsobuje opačnou odpověď na teplotní stres, což bylo pozorováno i na samotném fenotypu rostlin na základě odlišného vadnutí a teploty listů. Hormonální analýza zahrnovala stanovení hladiny 4 důležitých rostlinných hormonů a jejich prekurzorů (cytokininy, kyselina abscisová, auxiny a gibereliny). Aktivní formy cytokininů klesaly v těch částech rostlin, které byly vystaveny aplikaci teplotního stresu. Kombinace zvýšené hladiny cytokininů a teplotního stresu vedla rovněž k odlišné regulaci hladin kyseliny abscisové (ABA) v porovnání se samotnou aplikací teplotního stresu. ABA byla dříve pozorována jako jeden z hlavních hormonů v odpovědi na abiotický stres. Je tedy zřejmé, že výsledná odezva na teplotní stres, jako je regulace pohybu průduchů, či aktivita fotosyntézy, je závislá na interakci mezi rostlinnými hormony cytokininy a kyselinou abscisovou.

¹ Gornall J., Betts R., Burke E., Clark R., Camp J., Willet K. a Wiltshire A.: 2010 – Phil. Trans. Royal Soc. B: 365, 2973–2989

² Shymanski S. J., Or D. a Zwieniecki: 2013 – PLoS ONE 8 (1), e54231. doi: 10.1371/journal.pone.0054231

³ Černý M., Jedelský P.L., Novák J., Schlosser A. a Brzobohatý, B.: 2014 – Plant, Cell and Envi.: 37, 1641–1655

Tato práce vznikla za podpory grantů GA206/09/2062 a P305/12/2144 (GAČR) a CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

COMBINATIONAL ANATOMICAL, CHEMICAL AND GENOMIC APPROACHES TO DISSECT TWO KEY DOMESTICATION TRAITS IN LEGUMES: SEED DORMANCY AND POD DEHISCENCE

PETR SMÝKAL¹, ALEŠ SOUKUP², PAVEL HANÁČEK³, MILOSLAV KITNER¹, HELENA SALDANHA⁴ AND PETR BEDNÁŘ⁴

¹ Department of Botany, Palacký University in Olomouc

² Department of Experimental Plant Biology, Charles University, Prague

³ Department of Plant Biology and CEITEC MENDEL, Mendel University in Brno

⁴ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Palacký University in Olomouc

E-mail: petr.smýkal@upol.cz

The origin of the agriculture was one of key points in human history, and a central part of this was the evolution of new plant forms, domesticated crops. Common set of traits have been recorded for unrelated crops, named domestication syndrome (Hammer 1984, Zohary and Hopf 2000). These include loss of germination inhibition and increase of seed size, linked to successful early growth of planted seeds. The loss of natural seed dispersal and seed dormancy are considered to be the most important domestication traits (Hancock 2012). Despite of crucial position of legumes, as protein crops, in human diet, comparably little is known on their domestication. The loss of fruit shattering has been under selection in most seed crops, to facilitate seed harvesting, while in wild plants, shattering is a fundamental trait to assure seed dispersal. Timing of seed germination is one of the key steps in plant life. It determines when plants begin growth in natural or agricultural ecosystems. In the wild, many seeds exhibit dormancy. In contrast, crops germinate as soon as they are imbibed usually at planting time. Moreover, legume seed imbibition has a crucial role in cooking ability (Smýkal et al. 2014). Breeding experiments have shown that the genetic control of seed shattering and seed dormancy are both often governed by a single locus. Orthologous genes and functions were found to be conserved for seed shattering mechanisms between mono and dicotyledonous plants but none yet in legumes.

The main objective of the study is to identify genetic, structural a chemical basis of two key traits of legumes domestication, the seed dormancy mediated by seed coat water impermeability and pod dehiscence, by comparative analysis of wild and domesticated pea genotypes. This is done by combination of linkage and association mapping as well as candidate genes approaches, modern analytical chemistry methods and anatomical analysis, ultimately leading to identification of respective genes. We have chosen pea as suitable model (Weeden 2007, Smýkal et al. 2012) and tested pea seed imbibition and germination, resulting in range from 100 to 40 % dormancy in wild, while primitive landraces display 50 to 0 %. Several pairs of wild versus domesticated forms were selected, together with primitive forms (landraces) representing transitory steps (Smýkal et al. 2011). These pairs as well as mapping populations of crosses are morphometrically, histologically and physiologically characterized and assessed both for seed dormancy and pod dehiscence phenotypes. Since positive correlation in content of phenolics, the development of a water-impermeable seed coat and seed dormancy (germination) in wild versus domesticated pea seeds have been shown (reviewed in Smýkal et al. 2014) we follow this by using the up-to-date analytical method for direct surface analysis using matrix assisted laser desorption/ionization high resolution tandem mass spectrometry; MALDI Synapt G2-S HDMS (Waters, USA). Combination of MALDI spectrometric analysis with principal component allowed segregation of dormant from non-dormant samples. Several differential signals (m/z values) belonging to compounds with very variable structures were found. Among the signals several polyphenolic compounds were tentatively identified. Elucidation of the structure of markers in detail and evaluation of their relations is in progress. Composition of seed coat cell wall is correlated with their histochemical properties using selected tests for flavonoids, phenolic compounds, and polysaccharides (Soukup, 2014). Permeability of seed surface for water and other solution is estimated from the tracing of weak periodic acid solution and its labelling of cell wall polysaccharides via PAS reaction (Soukup, 2014) which allows for identification of sites of water entry during imbibition. Isolated genomic DNA from RIL lines is subjected to both whole genome analysis DArT seq and candidate genes approaches. The synteny to model legume *Medicago truncatula* and closely related chickpea genomes are also exploited to narrow previously mapped regions of *Dpo1* (pea pod dehiscence) and *Gty* (seed testa) loci along with association mapping using set of 96 wild and domesticated pea accessions. The results of candidate genes mapping, seed testa MALDI analysis and anatomical characterization will be shown and discussed.

Hammer K. (1984) Kulturpflanzen 32: 11–34.

Hancock J.F. (2012) Plant Evolution and the Origin of Crop Species. CAB International

Smýkal P. et al. (2011) Plant Genet Res 9: 4–18.

Smýkal P. et al. (2012) MDPI Agronomy 2: 74–115.

Smýkal et al. (2014) Frontiers in Plant Sciences 5, 351. doi: 10.3389/fpls.2014.00351

Soukup (2014) Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols, Springer. doi: 10.1007/978-1-62703-643-6_2

Weeden N.F. (2007) Ann Botany 100: 1017–1025.

Zohary, D. and Hopf, M. (2000) Domestication of Plants in the Old World, 3rd edn. Oxford University Press

This research is funded by Grant Agency of Czech Republic, 14-11782S project and Operational Program Education for Competitiveness (project CZ.1.07/2.3.00/30.0041) – European Social Fund of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

IN VITRO BIOTESTY – APLIKACE

IVA SMÝKALOVÁ¹, ELIŠKA ONDRÁČKOVÁ²

¹ Oddělení Biotechnologií, Agritec Plant Research s. r. o., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk, ČR

² Oddělení Ochrany rostlin, Agritec Plant Research s. r. o., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk, ČR

E-mail: smykalo@agritec.cz, tel.: +420 583 382 120

In vitro biotesty jsou používány běžně pro screening biologické aktivity, interakcí různých organismů. V našem případě jsou používány *in vitro* biotesty pro vyhledání organismů s inhibičními vlastnostmi. Základem jsou čisté kultury organismů, sbírkových kmenů, jejich izoláty a extrakty hledaných organismů. Izoláty fytopatogenních hub jsou výhodnými testovacími organismy pro získání rychlé odpovědi na přítomnost antagonistických, inhibičních eventuelně toxicky působících látek přítomných v hrubých extraktech. Extrakce je založena na jednoduchém principu, vycházejícím z drcení živé nebo lyofilizované biomasy a prostřednictvím polárních nebo nepolárních organických činidel se uvolňují do roztoku rozpouštědel nejrůznější biologicky aktivní látky. Aplikace těchto extraktů přímo k izolátům hub, představuje snadno vyhodnotitelný test s rychlou odpovědí. Další aplikace *in vitro* biotestů spočívá ve vyhodnocení účinku vyhledané biologicky aktivního hrubého extraktu. Determinace vlivu na klíčení, růst a morfolologii rostlin, které jsou dnes nezbytnou součástí testů fytotoxicity. Vyhodnocení těchto biotestů je již v současnosti možné provádět spolehlivou automatizovanou metodou, obrazovou analýzou z fotodokumentace experimentu.

Podporováno grantem MŠMT – COSTAction1206 č.grantu LD14101, Mobility č.grantu 7AMB14SK192.

IDENTIFIKACE ALEL ROSTLINNÝCH ENZYMŮ V PLASMIDOVÝCH KNIHOVNÁCH ZALOŽENÁ NA ALEL-SPECIFICKÉ REAL TIME PCR

PŘEMYSL SOUCEK¹, ZUZANA MEDVEĐOVÁ¹, DUŠAN TUREK¹, JIŘÍ VOLF², PAVEL KLIMEŠ¹, PAVEL MAZURA¹

¹ Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

² Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno

E-mail: soucek@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 454

Současné možnosti vytvářet cílené mutace ve zkoumaných proteinech včetně vybraných rostlinných enzymů umožňují detailně studovat jejich funkci a podíl na biochemických a vývojových pochodech v živých organismech. Místně specifická mutagenese na předem vytypovaných místech těchto proteinů je užitečným nástrojem pro vytváření nejen místně specifických aminokyselinových záměn, ale i pro vytváření rozsáhlých knihoven s předem navrženou variabilitou. Velikost takto vytvořených knihoven vyžaduje identifikaci jednotlivých variant s minimem nákladů a možností její automatizace. Pro tyto účely jsme vyvinuli metodu založenou na alel-specifické real time PCR, která umožňuje jednoznačně identifikovat jednotlivé genové varianty mezi desítkami možných.

Metoda byla testována na knihovně variant kukuřičné β -glukozidázy p60, která byla vytvořena metodou SLONOMAX a obsahovala 20 nesynonymních mutací v kodonech 195, 202 a 463. Kromě toho byly do cílové sekvence zavedeny synonymní mutace v kodonech 194, 196, 201, 203 a 464. Metoda byla navržena tak, aby byla diskriminační k nesynonymním mutacím v pozicích 195, 202 a 463 a necitlivá ke všem ostatním mutacím. Alel-specifická PCR využívá alel-specifických primerů v kombinaci s Tm analýzou pro diskriminaci jednotlivých alel a DNA vazebných barev k detekci PCR produktu. Dosud popsané aplikace se zaměřovaly především na identifikaci malého počtu alel, typicky 2 v případě SNP. Při námi testovaných optimalizacích je možné v jediné reakci rozlišit až 7 různých alel v případě, že cílová sekvence není obklopena dalšími nesynonymními mutacemi. Jsou-li další mutace přítomny v oblasti, kde hybridizuje alel-specifický primer, jako je tomu například v pozici 464, dochází sice ke zvýšení variability efektivity amplifikace v závislosti na přítomných nesynonymních mutacích, ale diskriminační schopnost metody zůstává zachována. Bylo možné rozlišit až 7 alel v kodonu 463 v jediné reakci, resp. všech 20 ve 3 reakcích a to přesto, že celkový počet možných alel v genové oblasti je 60. Přítomnost mutací v 3' oblasti směrem od alel-specifického primeru neovlivňuje párování templát – primer, ale ovlivňuje Tm výsledného produktu v závislosti na inkorporovaných nukleotidech, což znesnadňuje identifikaci jednotlivých mutací. Námi zavedená modifikace metody spočívající v přeskupení primerových kombinací v jednotlivých reakcích umožňuje vyřešit i tento problém. Jsme schopni rozlišit všech 20 kodonů 195 v 6 reakcích i přesto, že celkový počet alel dosahuje počtu 80. Podobně v 8 reakcích je možné rozlišit všech 20 kodonů 202 z celkového počtu 180 alel.

Vzhledem k vyšší náročnosti na optimalizaci je vyvinutá metoda vhodná pro identifikaci genových variant ve velkých souborech vzorků jako jsou právě plasmidové knihovny. Jako jedna z mála PCR metod umožňuje identifikovat velké množství mutací v relativně malém počtu reakcí při zachování přesnosti a nenáročnosti na kvalitu izolované DNA.

Práce byla podporována granty P305/11/P768 a P305/12/P405 GA ČR.

POZIČNÍ KLONOVÁNÍ GENU PRO REZISTENCI K MŠICI ZHOUBNÉ (*DIURAPHIS NOXIA*): KONSTRUKCE VYSOKOHUSTOTNÍ GENETICKÉ MAPY

HELENA STAŇKOVÁ¹, MIROSLAV VALÁRIK¹, NORA LAPITAN², PAUL BERKMAN³, DAVID EDWARDS³, MING-CHENG LUO⁴, ZUZANA TULPOVÁ¹, MARIE KUBALÁKOVÁ¹, NILS STEIN⁵, JAROSLAV DOLEŽEL¹, HANA ŠIMKOVÁ¹

¹ Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Ústav experimentální botaniky, Šlechtitelů 31, 783 71, Olomouc-Holice, Czech Republic

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

³ Australian Centre for Plant Functional Genomics, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

⁴ Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA

⁵ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Department Genebank, AG Genome Diversity, D-06466 Gatersleben, Germany

E-mail: stankovah@ueb.cas.cz

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z ekonomicky nejvýznamnějších kulturních plodin, poskytující zdroj potravy pro 35 % obyvatel světa. Jedná se o allohexaploidní druh ($2n = 6x = 42$) s celkovou velikostí genomu téměř 17×10^9 bp. Genom je tvořen třemi homeologními subgenomy (A, B a D) a jeho podstatnou část (přes 80 %) tvoří repetitivní sekvence. Všechny výše zmíněné vlastnosti pšeničného genomu znesnadňují jeho analýzu, genetické i fyzické mapování, sekvenování či pozičního klonování. Třídění jednotlivých chromozómů a jejich ramen pomocí průtokové cytometrie umožňuje rozložit tento obrovský genom na malé a snadno analyzovatelné části.

Na krátkém rameni chromozómu 7D (7DS) pšenice se nachází řada agronomicky významných genů, včetně genu *Dn2401* pro rezistenci k mšici zhoubné (*Diuraphis noxia*). Mšice zhoubná je jedním z nejvýznamnějších škůdců pšenice a ječmene. Chemické i biologické postupy hubení nejsou v případě mšice zhoubné dostatečně účinné. Z tohoto důvodu se jeví jako nejvýhodnější způsob ochrany pěstování odrůd nesoucích geny pro rezistenci vůči tomuto škůdci.

Konstrukce vysokohustotní genetické mapy pokrývající oblast zkoumaného genu je nezbytná pro jeho následné poziční klonování, tedy izolaci genu na základě jeho pozice na genetické či fyzické mapě. Za účelem konstrukce této mapy byla vyvinuta metoda pro cílené odvozování markerů z úzké oblasti genomu, a to v podmínkách polyploidního genomu. Tato metoda využívá syntenie mezi pšenicí a jejími příbuznými druhy (ječmen, *Brachypodium*, rýže, čirok, *Aegilops tauschii*) v kombinaci se sekvencemi jednotlivých chromozómů skupiny 7, získanými celochromozómovým neuspořádaným (shotgun) sekvenováním. Za pomoci genových markerů vymezujících oblast genu na rameni 7DS je možno identifikovat orthologní oblasti v genomech příbuzných druhů. Geny z těchto oblastí poté slouží k nalezení odpovídajících sekvenčních kontigů pocházejících z chromozómů 7A, 7B a 7D pšenice. Na základě polymorfismů mezi jednotlivými homeologními chromozómy je možno designovat jednolokusové, genomově specifické markery. Popsaným postupem bylo odvozeno 11 nových vysoce specifických markerů, které posloužily k zahuštění mapy v okolí genu *Dn2401*. Skrining BAC knihovny z ramene 7DS umožnil identifikaci kontigu v 7DS-specifické fyzické mapě, který kompletně překlenuje oblast genu. BAC klony z této oblasti byly osekvenovány a v současné době probíhá jejich anotace. Sekvence BAC klonů mohou rovněž posloužit k odvození dalších markerů v blízkosti genu *Dn2401*. Prezentovaná metodika vývoje markerů je obecně aplikovatelná pro jakýkoliv chromozóm pšenice.

Tato práce je podporována grantem GA ČR P501/12/2554, MŠMT ČR a EU (Operační program Výzkum a Vývoj pro Inovace ED0007/01/01) a Interní Grantovou Agenturou PŘF 2014-001.

TRANSCRIPTOMICS AND GENOMICS OF MALE STERILITY IN *SILENE VULGARIS*: TECHNICAL CHALLENGES AND BIOLOGICAL INSIGHTS

JAMES STONE¹, DAN SLOAN², HELENA STORCHOVA³

¹ Institute of Botany, AS CR

² Department of Biology, Colorado State University

³ Institute of Experimental Botany, AS CR

E-mail: james.stone@ibot.cas.cz, dbsloan@rams.colostate.edu, storchova@ueb.cas.cz

We use replicated transcriptomes from female and hermaphrodite *Silene vulgaris* with the RSEM and the edgeR pipelines to characterize differentially expressed transcripts associated with the male-sterile phenotype. We present results from multiple transcriptome assembly strategies, including varied depths of coverage using the single-kmer Trinity assembler as well as multi-kmer assemblies using SPAdes, highlighting the strengths and limitations of each. Furthermore, we compare mitochondrial genomes from divergent populations to reveal structural variation in potential cytoplasmic male sterility factors. We discuss the challenges of *de novo* assembling repetitive and actively recombining mt genomes using paired-end 454 reads and offer potential solutions. Finally, we present an analysis of mitochondrial transcriptomes made with the aid of reference mitochondrial genomes. We examine the impacts of RNA editing and the method of RNA and cDNA preparation on the resulting transcriptomic maps.

This project output has been developed during implementation of the project: "Integration of the experimental and population biology using new methods of interdisciplinary issues - the way to excellence with young scientists", Reg.No.: CZ.1.07/2.3.00/30.0048, which is funded by the European Social Fund (ESF) and the state budget of Czech Republic through the Operational Programme Education for Competitiveness (OPEC).

EXPRESSION AND PURIFICATION OF HATPASE AND RECEIVER DOMAINS OF THE ETHYLENE RECEPTOR ETR1 FROM *A. THALIANA* AND INTRODUCTION OF INTEIN TECHNOLOGY

AGNIESZKA SZMITKOWSKA¹, ZUZANA JASENAKOVÁ¹, BLANKA PEKÁŘOVÁ¹, LUKÁŠ ŽÍDEK¹, HIDEO IWAI² AND JAN HEJÁTKO¹

¹ Masaryk University Central European Institute of Technology (CEITEC), Kamenice 753/5, CZ-62500 Brno, CR

² Institute of Biotechnology, Viikinkaari 1 (P.O. Box 65) 00014, University of Helsinki, Finland

E-mail: agnieszka_szmitkowska@wp.pl

Ethylene Receptor ETR1 is a membrane-bound receptor from *A. thaliana* involved in ethylene signaling process. ETR1 possesses all of the sequence motifs of canonical histidine kinase domains and also reveal histidine kinase activity (1,2).

Histidine kinase activity is supposed to play the minor role in output of ethylene signaling. It may allow for cross-talk with multistep phosphorelay (MSP) via AHP proteins, potentially influencing cytokinin signaling. The 3D structures of HATPase and receiver domains have been described. The main objective of our work is to express and purify these domains for structural NMR studies. Both domains were expressed in soluble form, so then they are suitable candidates for introduction of the segmental isotope labeling technique based on intein technology allowing to study multi-domain proteins.

1. Gamble et al. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7825–7829

2. Moussatche & Klee. (2004), *J.Biol.Chem.*, Vol. 279, No. 47, 48734–48741

Supported by the European Regional Development Fund (Central European Institute of Technology, CZ.1.05/1.1.00/02.0068) and the Czech Science Foundation (GA13-25280S).

THE ROLE OF ALTERNATIVE SPLICING IN AUXIN AND CYTOKININ PATHWAYS

MÓNKA HRTYAN, EVA ŠLIKOVÁ, JAN HEJÁTKO, KAMIL RŮŽIČKA

FGPP – Central European Institute of Technology – Masaryk University, Kamenice 753/5, CZ-62500 Brno, CR
E-mail: eva.slikova@gmail.com, tel.: +421 915 738 963

Alternative splicing is a regulated process accompanying gene expression. It leads to multiple protein variants from the simple primary transcript. High throughput transcriptome sequencing revealed that > 60 % of *Arabidopsis* genes are alternatively spliced (Marquez *et al.*, 2012). This raises the question if all the identified isoforms have biologically functional relevance. Our aim is to answer this question for three members of auxin and cytokinin signalling pathways: *PIN4* (*PIN-FORMED 4*), *PIN7* and *AHP6* (*ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6*).

PIN4 and *PIN7* are auxin efflux carriers. Their tightly regulated localization in specific domains of the plasma membrane is crucial for auxin-related developmental processes. Their two annotated isoforms differ in 12 nucleotides at the end of the first exon (arabidopsis.org).

AHP6 is expressed in developing protoxylem and its adjacent pericycle cells. It acts as inhibitor of cytokinin signaling and promotes formation of protoxylem. It has two splicing variants which differ in the position of 3' site of the first exon (Mähönen *et al.* 2006).

Marquez, Y. *et al.* (2012) *Genome Res.*, 22: 1184–1195

Mähönen, A. P. *et al.* (2006) *Science*, 311: 94–98

Supported by the Czech Science Foundation (P501/12/0934) and by the European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0189).

USING *IN VITRO* KINASE ASSAY FOR DETERMINING ENZYME SPECIFICITY

EVA TOMAŠTÍKOVÁ¹, BEÁTA PETROVSKÁ¹, JAROSLAV DOLEŽEL¹, ANDREAS HOUBEN², DMITRI DEMIDOV²

¹ Centre of Plant Structural and Functional Genomics, Institute of Experimental Botany AS CR, v.v.i., Olomouc, CZ

² Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, DE

E-mail: tomastikova@ueb.cas.cz

One of the properties of enzymes is the specificity they exhibit relative to reactions they catalyze. Aurora kinases family are responsible for cell-cycle dependent phosphorylation of H3 at S10 and S28 in both plant and non-plant species. Histones are targets of various post-translational modifications that help to recruit proteins and modulate the chromatin structure. The substrate specificity of Aurora kinases varies toward differently modified histone residues. In animals, cross-talk occurs between phosphorylation and methylation of adjacent residues, resulting in a so-called methyl/phos switch. In plants, data on the cross-regulation between H3 phosphorylation and post-translational modification of neighboring amino acids are limited.

To analyze whether a cross-talk between different histone modifications exists similar to non-plant species, we determined the phosphorylation activity of the *Arabidopsis* Aurora family members (*AtAurora 1* and *3*) on H3 peptides with different modifications related to positions S10 and S28. Our kinase assay confirmed that both serine positions are phosphorylated by both recombinant kinases *in vitro*, although phosphorylation of H3S28 is much weaker than of H3S10. Phosphorylation of H3S28 by both kinases is increased by dimethylation and acetylation of adjacent K27. Pre-phosphorylation of T22 and T32 decrease *AtAurora1* activity, but increase *AtAurora3* activity, respectively. Furthermore, using a peptide microarray, we identified *AtAurora1* consensus phosphorylation sequence, which could help us to identify additional targets for *Arabidopsis* Aurora kinases.

Taken together, *in vitro* kinase assay allowed us to determine differences in specificity of different members of Aurora kinase family in plants. Our data suggest that a cross-talk between different H3 modifications occurs also in plants, although in similar rather than the same manner as in non-plant species. Despite the fact that some modifications influence Aurora kinase 1 and 3 activity in a similar way, there are differences between few modifications, indicating different substrate specificity of both kinases.

Supported by ED0007/01/01 for ET, BP and IGA UP Prf/2013/003 for ET, DFG Germany (SFB 648) for DD, AH.

FIRST PRELIMINARY SCREENING OF THE GENETIC DIVERSITY IN COCONA (*SOLANUM SESSILIFLORUM* DUNAL) USING ISSR MARKER

MARTINA TRAVNICKOVÁ^{1,3}, LUZ ELITA BALCAZAR TERRONES², IVA VIEHMANNNOVA³, PETRA HLASNA CEPKOVA³

¹ Crop Research Institute, Czech Republic

² Peruvian Amazon Research Institute (IIAP), Tingo Maria, Peru

³ Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic

E-mail: travnickova@vurv.cz

Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) a member of the family Solanaceae, is a native shrub previously cultivated by Indians throughout the Amazon basin. Nowadays, it is cultivated especially in Ecuador, Venezuela, Brazil and Peru for its edible fruits. Wild and semi-wild forms of cocona show significant morphological variability. The aim of the study was to optimize application of ISSR markers in limited number of cocona samples showing various morphological characteristics, and to carry out preliminary study on genetic variability among these botanical forms. One randomly chosen individual from 14 of morphologically different forms was always selected. This primary study proved that ISSR markers are reliable method for detection of genetic variability in *S. sessiliflorum*. Within our further research, the optimized method will be used for detection of genetic diversity among and within numerous Amazonian populations of this plant.

This study was financially supported by an Internal Grant Agency of the Czech University of Life Science Prague CIGA (Project No. 20115004) and an Internal Grant Agency of Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences Prague IGA (Project No. 20135119).

GENOVÉ MANIPULACE U VLÁKNITÉ HOUBY *LEPTOSPHAERIA MACULANS*

LUCIE TRDÁ, MIROSLAVA NOVÁKOVÁ, MONIKA BAREŠOVÁ, HANA KRUTINOVÁ, VLADIMÍR ŠAŠEK, LENKA BURKETOVÁ

Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i., Laboratoř patofyziologie rostlin, Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 – Lysolaje
E-mail: trdal@ueb.cas.cz

Heterotalická askomyceta *Leptosphaeria maculans* je původcem choroby mnoha brukvovitých rostlin. Pro řepku olejku (*Brassica napus*) je jedním z nejzávažnějších fungálních patogenů, kde zapříčiňuje tzv. fomové černání stonků. K napadení rostlin dochází hojně na podzim, kdy se ze zbytků rostlinné masy v půdě uvolňují askospory. *L. maculans* kolonizuje mezibuněčné prostory v mezofylu listů. V infikovaných pletivech dochází k tvorbě nekroz a pyknid, které jsou zdrojem sekundárního inokula. Patogen dále kolonizuje cévní svazky, prorůstá do stonku a kořenového krčku, kde ke konci vegetačního období vyvolá nekrozu báze stonku a tím způsobuje poléhání rostlin a jejich předčasnou zralost.

Pro studium interakce rostlina-patogen je nezbytná vizualizace a kvantifikace míry kolonizace rostlinného pletiva. Jednou z velmi účinných a robustních metod je využití transformantů s vloženým reportérovým genem, jako je např. gen pro zelený fluorescenční protein (GFP) nebo pro β -glukurodinazu (GUS), umožňujících detekci pomocí fluorescence nebo detekci produktu enzymatické reakce. Takto připravení transformanti jsou i vhodným nástrojem pro sledování klíčení a kinetiky růstu mycelia v axenické kultuře *in vitro*.

Vláknité houby, včetně *L. maculans*, lze účinně transformovat pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která se rutinně využívá pro transformace rostlin. Konidiospory jsou kultivovány 48 h ve tmě společně s transformovaným *A. tumefaciens*, kdy je příslušný expresní klon doručen do hostitelských buňek v T-DNA (transferová DNA). Transformanti jsou dále selektováni na mediu s příslušnými antibiotiky a *A. tumefaciens* je odstraněno pomocí cefotaximu.

Metody pro genetické modifikace jsou také klíčové pro funkční genomiku a studium genů. Post-transkripční umlčení genu je jednou z metod reverzní genetiky. Testovali jsme vláskový vektor pHYG-GS typu Gateway (Fox a kol., 2008), který byl navržen pro genové umlčení u *L. maculans*. Testovali jsme dva různé konstrukty pro utlumení reportorového genu GFP a ve dvou různých izolátech *L. maculans*. Míra genového umlčení byla vyhodnocena měřením GFP fluorescence a stanovením relativního množství GFP mRNA pomocí qPCR.

Genom *L. maculans* byl nedávno sekvenován, což usnadňuje identifikaci kandidátních genů (Rouxel a kol., 2011). Rozvinutí metod genetické modifikace *L. maculans* je nezbytné pro funkční genomiku v tomto organismu.

Fox EM, Gardiner DM, Keller NP, Howlett BJ. (2008) A Zn(II)₂Cys₆ DNA binding protein regulates the sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet Biol.* 45(5): 671–682

Rouxel T et al. (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat Commun* 2:202. doi: 10.1038/ncomms1189

IZOLACE DNA Z TECHNOLOGICKY ZPRACOVANÝCH POTRAVIN S VYUŽITÍM MAGNETICKÝCH NOSIČŮ

ZDENĚK TROJÁNEK¹, ALEŠ KOVAŘÍK², ALENA ŠPANOVÁ¹, DANIEL HORÁK³, BOHUSLAV RITTICH¹

¹ VUT FCH, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, ČR

² BFÚ AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

³ ÚMCH AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 2, ČR

E-mail: xctrojanezk@fch.vubr.cz, tel.: +420 731 462 708

Výchozím krokem mnoha molekulárně biologických aplikací je extrakce nukleových kyselin v dostatečné kvantitě a kvalitě. V současné době se vyvíjí nové postupy založené na magnetických mikro a nanočásticích. Cílem práce bylo použití magnetických nosičů pro izolaci DNA z technologicky zpracovaných potravin rostlinného původu.

Proces izolace rostlinné DNA je komplikovaný vzhledem k přítomnosti polyfenolů, polysacharidů a jiných metabolitů, které jsou často koextrahovány s DNA. Uvedené látky působí jako inhibitory enzymatických procesů, včetně PCR, což je nežádoucí při zjišťování autentičnosti potravin nebo detekci GMO v potravinách. Potravin jsou při výrobě často vystaveny působení různých faktorů. Mechanické namáhání, vysoké teploty, kolísání pH, enzymatické změny a fermentační procesy mohou ovlivňovat primární strukturu DNA (např. hydrolýzou, oxidací a deaminací) a tím ztěžovat její následnou analýzu. Proto je stěžejní zvolit vhodnou metodu izolace DNA.

Metody: byla optimalizována metoda izolace DNA z tepelně upravené brokolice (*Brassica oleracea*) založená na použití neporézních magnetických částic poly(glycidyl methakrylát) (PGMA) a byla porovnána její účinnost se standardními metodami (CTAB a komerční chromatografické kolonky). Dále byl zkoumán vliv sterilizačních podmínek, kterým jsou potraviny (kukuřice, zelí, červená řepa) vystaveny při průmyslovém zpracování, na stabilitu DNA a její amplifikovatelnost v polymerázové řetězové reakci (PCR). Množství a čistota DNA byly hodnoceny spektrofotometricky, integrita DNA gelovou elektroforézou. Pomocí primerů specifických pro oblast genu 26S rRNA bylo dosaženo vysoké citlivosti PCR odpovídající řádově pg genomové DNA.

Výsledky: u brokolice množství amplifikovatelné DNA s vlivem sterilizačních podmínek (pH 4, teplota 75 °C) snižuje během krátké doby až o několik řádů, což klade extrémní nároky na citlivost izolačních postupů. Optimalizovaná metoda založená na adsorpci DNA na povrch polymerního magnetického nosiče (PGMA) poskytovala dostatečné množství templátu pro provedení PCR z různě upravených potravin rostlinného původu (brokolice, kukuřice, zelí, červená řepa). V porovnání s klasickými metodami (CTAB) byla DNA izolována o polovinu v kratším čase. Odpadají časově i finančně náročné kroky, jako je fenolová a enzymatická deproteinace. Metody CTAB a magnetické částice, v porovnání s komerčními kity, měly rovněž univerzálnější použití. Umožňovaly izolaci DNA z většího počtu potravinových produktů.

Závěr: byla vyvinuta metoda izolace DNA kombinující prvky klasické metody CTAB a magnetických nosičů. Množství a čistota izolované DNA je srovnatelná s metodou CTAB a komerčními kity. Mezi výhody metody patří rychlost a cena, která je desetkrát nižší oproti použití komerčních kitů. Přepokládáme využití vyvinutého postupu při analýze širokého spektra technologicky zpracovaných potravin obsahujících vysoce degradovanou DNA v nízkých koncentracích (sterilizovaná zelenina, kompoty apod.).

FYZICKÁ MAPA A SEKVENOVÁNÍ KRÁTKÉHO RAMENE CHROMOZÓMU 7D PŠENICE

ZUZANA TULPOVÁ¹, MING-CHENG LUO², PAUL VISENDI³, SATOMI HAYASHI⁴, HELENA STAŇKOVÁ¹, JAN BARTOŠ¹,
JACQUELINE BATLEY⁴, ALEX HASTIE⁶, AJAY KUMAR⁵, ANDRZEJ KILIAN⁷, NICOLAS BLAVET¹, JAROSLAV DOLEŽEL¹,
DAVID EDWARDS³, HANA ŠIMKOVÁ¹

¹ Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Šlechtitelů 31, CZ-78371 Olomouc-Holice, Czech Republic

² Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA

³ Australian Centre for Plant Functional Genomics, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

⁴ School of Agriculture and Food Sciences, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

⁵ Department of Plant Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND, 58108, USA

⁶ BioNano Genomics, 9640 Towne Centre Drive, San Diego, CA 92121, USA

⁷ University of Canberra, Bruce, ACT 2617, Australia

E-mail: tulpova@ueb.cas.cz

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je zdrojem potravy pro 35 % světové populace, a je tak považována za jednu z nejdůležitějších plodin na světě. Vytvoření fyzické mapy celého genomu pšenice je nezbytným krokem pro získání jeho kompletní referenční sekvenace. Sekvenování pšenice je ztíženo značnou velikostí jejího genomu (17 Gb), jeho polyploidním charakterem (subgenomy A, B a D) a vysokým obsahem repetitivních sekvencí (> 80 %). Tyto překážky je možné překonat, nebo aspoň zmírnit pomocí průtokové cytometrie, díky níž lze třídit jednotlivé chromozómy nebo jejich ramena a tím snížit komplexitu genomu pšenice a výrazně zjednodušit jeho analýzu. Sekvenování pšenice metodou klon po klonu na základě fyzických map zkonstruovaných pro jednotlivé chromozómy (ramena) se stalo klíčovou strategií Mezinárodního konsorcia pro sekvenování genomu pšenice (IWGSC). Rozdělení genomu na jednotlivé chromozómy umožňuje zapojit do tohoto ambiciózního projektu řadu laboratoří z celého světa.

Cílem naší práce bylo vytvořit fyzickou mapu krátkého ramene chromozómu 7D pšenice (7DS), ukotvit ji na chromozóm a osekvenovat minimální sestavu klonů z knihovny dlouhých inzertů, která reprezentuje celé rameno (tzv. MTP = *Minimum Tilling Path*). Klony z BAC knihovny specifické pro 7DS byly fingerprintovány pomocí SnaPshot HICF technologie a následně byly sestaveny do kontigů pomocí počítačového programu FPC (Soderlund *et al.*, 2000). Takto vzniklá fyzická mapa 7DS byla integrována s fyzickou mapou *Aegilops tauschii* (donor D genomu pšenice), která se stala klíčovým nástrojem pro prodlužování kontigů fyzické mapy 7DS. Spolehlivost takto sestavené mapy byla nakonec ověřena pomocí počítačového programu LTC (Frenkel *et al.*, 2010).

Pro ukotvování fyzické mapy 7DS na chromozóm byly zvoleny různé přístupy přímého i reverzního ukotvování. Přímé ukotvování zahrnovalo PCR skřínink BAC knihovny dostupnými zamapovanými markery, *in silico* ukotvování prostřednictvím integrace s fyzickou mapou *Ae. tauschii* nebo s DaRT mapou pšenice. Reverzní ukotvování spočívalo v odvozování STS markerů ze sekvencí BAC klonů a jejich mapování na panel radiačních hybridů. Celkově tak bylo prostřednictvím 713 markerů ukotveno 404 kontigů, které reprezentují 61 % fyzické mapy. Jako nejefektivnější se ukázalo *in silico* ukotvování, s jehož pomocí se podařilo ukotvit 659 markerů do 383 kontigů, tedy více jak 90 % ukotvené části mapy.

V současné době je dokončováno sekvenování klonů reperezentujících MTP ramene 7DS pomocí platformy Illumina. Pro sestavení sekvenčních kontigů v rámci jednotlivých BAC klonů je využíván počítačový program Sassy. Na základě znalosti sekvencí BAC klonů z MTP jsme byli schopni propojit i některé dosud nespojené kontigy fyzické mapy 7DS. Nově byla pro 7DS vytvořena BioNano genomová mapa, která je využívána pro uspořádání sekvenčních kontigů, ověření sestavených sekvencí a určení velikostí mezer.

Ukotvená fyzická mapa a sestavená sekvenace ramene 7DS pšenice budou velice hodnotným nástrojem pro genetické mapování a poziční klonování genů lokalizovaných na tomto chromozómovém rameni.

Frenkel *et al.* (2010): LTC: a novel algorithm to improve the efficiency of contig assembly for physical mapping in complex genomes. *BMC Bioinformatics* 11: 584–601

Soderlund, C., Humphray, S., Dunham, A., French, L. (2000): Contig built with fingerprints, markers and FPC V4.7. *Genome Research* 10: 1772–1787

Tato práce je podporována grantem GA ČR P501/12/2554, MŠMT ČR a EU (Operační program Výzkum a Vývoj pro Inovace ED0007/01/01) a Interní Grantovou Agenturou PŘF 2012–2013.

BRASSINOSTEROIDY JAKO REGULÁTORY ZMĚN NA BUNĚČNÉ ÚROVNI PŘI ODEZVĚ ROSTLIN NA NEDOSTATEK VODY – ANALÝZA FOTOSYNTETICKÝCH A OCHRANNÝCH PROCESŮ

LENKA TŮMOVÁ¹, KATEŘINA ŘEHOŘOVÁ¹, MARIE KOČOVÁ¹, DANA HOLÁ¹, OLGA ROTHOVÁ¹, MARKÉTA PALOVSKÁ¹

¹ Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a mikrobiologie, Viničná 5, 128 43 Praha 2, ČR
E-mail: fridri@seznam.cz

Brassinosteroidy jsou organické látky steroidní povahy vyskytující se přirozeně v rostlinách. Jsou známy od roku 1978 a dnes je řadíme mezi fytohormony (dříve patřily k růstovým regulátorům). Celá skupina těchto látek se vyznačuje vysokou účinností i při nízkých koncentracích. Jejich aktivita je zřejmě založena na interakci s ostatními fytohormony, současně je závislá na koncentraci. V zemědělství (použití povoleno v zemích jako je Čína, Rusko, Bělorusko) se za účelem zvýšení výnosů plodin aplikují uměle syntetizované brassinosteroidy nebo jejich analogy. Účinek brassinosteroidů je dle mnoha pokusů vyšší při stresu než za optimálních podmínek. Vliv brassinosteroidů je stimulován mj. i během stresu suchem, kdy se rostliny musí vypořádat s nedostatkem vody. Na vystavení vodnímu deficitu rostliny reagují změnami na úrovni celého organismu i jednotlivých orgánů, které jsou důsledkem či úzce souvisí se změnami na úrovni buněk a jednotlivých buněčných organel. V důsledku sucha dochází ke změně složení intra- i extracelulárního prostředí, mění se míra exprese genů pro řadu osmoticky aktivních a ochranných látek aj., sucho také výrazně snižuje rychlost čisté fotosyntézy. U rostlin vystavených suchu se zdá, že brassinosteroidy ovlivňují (pozitivně či negativně) aktivitu antioxidantních enzymů, syntézu řady látek s osmoprotektivním účinkem, syntézu „heat shock“ proteinů či zastoupení mastných kyselin v membránových lipidech, dost pravděpodobně také omezují negativní vliv sucha na fotosyntézu.

Během skleníkových pokusů provedených v roce 2011 byl sledován vliv aplikace různých koncentrací (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M) 24-epibrassinolidu (24-EPI) během 10denního stresu suchem, v letech 2012 a 2013 vliv jedné vybrané (10^{-8} M 24-EPI) u suchem stresovaných mladých rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.) a bobu obecné (*Vicia faba* L.). Byly porovnávány reakce dvou různých inbredních linií kukuřice (2023, CE704) a dvou kultivarů bobu (Piešťanský, Merkur) na vystavení stresu suchem, který byl navozen přerušením zalévání v den ošetření rostlin postřikem na list. V sezoně 2013 byl stres prodloužen na 18 dní. U rostlin byly sledovány vybrané vývojové, morfologické, fotosyntetické a biochemické parametry. Každodenně byla prováděna měření přístrojem FluorPen FP100 (Photon System Instruments, Česká republika) pro analýzu OJIP křivky indukce fluorescence chlorofylu *a*, která poskytla řadu informací o účinnosti primárních fotosyntetických procesů. Pro spektrofotometrické stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, celkové karotenoidy) a prolinu (Pro) i aktivit obou enzymů (katalasa CAT, askorbát peroxidasa APX) byl ve vhodných časových intervalech odebrán jeden list (měřený list) u každé pokusné rostliny (u kukuřice 3. či 4. list, u bobu 3.–5. list), který byl v den postřiku ne zcela vyvinutý, ale zároveň dostatečně velký pro stanovení sledovaných parametrů. Pokusné rostliny byly rozděleny do skupin shodné inbrední linie/kultivaru, pěstování (normálně zalévané × stresované) a ošetření (ošetřené pouze vodou s přidavkem Tweenu × ošetřené vodným roztokem 24-EPI s přidavkem Tweenu). Osm měřených listů z každé skupiny bylo zpracováno bezprostředně po odběru na stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů (Wellburn, 1994), zbylé listy byly až do stanovení obsahu Pro (Bates, 1973) a aktivity CAT (Aebi, 1984; Bradford, 1976), APX (Nakano and Asada, 1981; Bradford, 1976) uchovávány při -80°C . Fotosyntetické procesy patřily mezi parametry, které byly ovlivněny vodním deficitem nejdříve. Parametry spojené s buněčnými ochrannými procesy se v průběhu stresové periody také měnily, při delším vystavení suchu byly patrnější rozdíly mezi normálně zalévanými a stresovanými rostlinami i rozdíly mezi inbredními liniemi/kultivary. Ve srovnání s literaturou byl vliv ošetření 24-EPI méně výrazný, což by mohlo souviset s mezidruhovou variabilitou, která v reakci na tyto rostlinné hormony u rostlin zřejmě existuje.

Aebi H.: 1984 – Meth Enzymol, 105: 121–126

Bates L.: 1973 – Plant Soil, 39: 205–207

Bradford M.M.: 1976 – Anal Biochem, 72: 248–254

Nakano Y., Asada K.: 1981 – Plant Cell Physiol, 22: 867–880

Wellburn A.R.: 1994 – J Plant Physiol, 144: 307–313

Práce byla finančně podpořena projekty Grantové agentury Univerzity Karlovy B/BIO/612612 a SVV-2014-260081 a projektem Grantové agentury České republiky 501/11/1650. Děkujeme všem skřítkům za pomoc během pokusů.

MAPOVÁNÍ AGRONOMICKY VÝZNAMNÝCH ZNAKŮ U PŠENICE *TRITICUM MONOCOCCUM* L.

HANA VANŽUROVÁ¹, TIBOR SEDLÁČEK², BARBORA KLOCOVÁ¹, LUCIA GALLOVÁ¹, MIROSLAV VALÁRIK¹, JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹ Laboratoř strukturní a funkční genomiky rostlin ÚEB AV ČR, v. v. i., Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc, ČR

² Výzkumné centrum SELTON, s. r. o., Stupice 24, 250 84 Sibřina, ČR

E-mail: vanzurova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 726

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) tvoří 90 % světové produkce pšenice. Z hlediska výživy se jedná o druhou nejdůležitější plodinu světa, která poskytuje 40 % základních potravin a 20 % všech kalorií konzumovaných lidskou populací. Vzhledem k rychle rostoucí lidské populaci, měnícím se klimatickým podmínkám a omezeným osevním plochám je navýšení a udržení výnosu a kvality hlavní výzvou ve šlechtění pšenice. Překážkou při šlechtění pšenice je zejména její velký a komplexní genom ($2n = 6x = 42$, AABBDD, $1C = 17$ Gb) se třemi homeologními subgenomy s velkým podílem repetitivních sekvencí (~ 80 % genomu) a intenzivním šlechtěním omezené genové zdroje. Jednou z možností snížení komplexity pšeničného genomu je využití blízké příbuzných druhů s nižším stupněm ploidie, které slouží jako modely pro jednotlivé subgenomy a zjednodušují identifikaci agronomicky významných genů. Pro studium subgenomu A je vhodným modelem diploidní pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum* L.), u které byla díky dostupnosti kultivovaných i planých forem zachována vysoká míra genetické diversity využitelné pro obohacení genomu hexaploidní pšenice.

Cílem našeho výzkumu bylo zamapovat 13 agronomicky významných kvantitativních znaků (obsah proteinů v zrnech, hmotnost zrn, tvar zrn, počet klásků na klas, počet obilek na klásek, délka klasu, rozpadavost klasu, hustota klasu, počet odnoží, rozkladitost trsu, výška rostliny, chlupatost listů a doba metání) u *Triticum monococcum* L. Fenotyp rostlin byl hodnocen na F9 až F12 generaci RIL (Recombinant Inbred Line) mapovací populace vzniklé z křížení kulturní formy jednozrnky *Triticum monococcum* ssp. *monococcum* DV92 s planou formou jednozrnky *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116. Pro identifikaci QTLs (Quantitative Trait Locus) byla použita vazebná mapa *T. monococcum* L. s celkovou délkou 830 cM a 481 zamapovanými markery. Na sedmi chromozómech jednozrnky bylo lokalizováno 58 lokusů.

PŘÍJEM A TRANSPORT FOSFÁTU – HORMONÁLNÍ INTERAKCE

GABRIELA KUREŠOVÁ¹, MARIE TRČKOVÁ¹, PETRE DOBREV², SYLVA PŘEROSTOVÁ², ALENA GAUDINOVÁ², RADOMÍRA VAŇKOVÁ²

¹ Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ČR

² Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR

E-mail: vankova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 427

Fosfor patří spolu s dusíkem k prvkům, které výrazně ovlivňují růst a vývoj rostlin. Objasnění molekulárních mechanismů regulujících vnímání hladiny fosfátu, jeho transport, včetně remobilizace v rámci rostliny, je nezbytným předpokladem pro zvýšení využitelnosti fosfátů z půdy. Odezva rostlin na nedostatek fosfátu zahrnuje změnu morfologie kořenového systému, sekreci látek uvolňujících fosfor z nerozpustných komplexů a zvýšení exprese genů pro transportní proteiny. Řada těchto procesů je regulována hormony, zejména strigolaktony a auxiny, které ovlivňují morfologii kořenů a expresi transportérů. Odezvy na nedostatek fosfátu se účastní také etylén, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. Stupeň deficiencie fosfátu byl korelován s hormonálními změnami v nadzemní části a kořenech *Arabidopsis thaliana*. Vliv modulace hladin hormonů na příjem fosfátů byl sledován prostřednictvím stanovení rychlosti příjmu fosfátů z media. Koncentrace fosfátů byla stanovována spektrofotometricky. Zvýšení kapacity analýz bylo dosaženo použitím mikrotitračních destiček. Objasnění vzájemných vztahů mezi jednotlivými hormony pomocí charakterizace dopadu exogenně aplikovaných hormonů na hladiny endogenních hormonů a aktivitu jejich signálních drah při nízké hladině fosfátu umožní lépe objasnit mechanismus odezvy rostlin na nedostatek fosforu a stanovit strategii lepšího využití živin v půdě.

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR, projekt COST LD 14 120.

SEPARATION OF NEUTRAL AND ACIDIC MONOSACCHARIDES BY HPAEC-PAD

ZUZANA VATEHOVÁ, ZUZANA KOŠTÁLOVÁ, KARIN KOLLÁROVÁ, ANNA MALOVÍKOVÁ, DESANA LIŠKOVÁ

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

E-mail: zuzana.vatehova@savba.sk

Carbohydrates belong to the most widely occurring and abundant type of organic compounds in the nature and are prime substances in many biological processes. The effective separation and detection of carbohydrates is an important subject of investigation. The hydroxyl groups of carbohydrates are partially ionized under highly alkaline conditions to form oxanions, and thus carbohydrates can be separated by anion-exchange mechanism. The high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) at high-pH with electrochemical detection (ED) is effective and highly sensitive and selective detection method for carbohydrates without the need for prior derivatization.

In the presented HPAEC-PAD method, we optimized the separation of neutral and acidic monosaccharides derived from various plant polysaccharides on a CarboPac PA-1 anion-exchange column (4 mm i.d. × 250 mm) in a short time (45 min). Polysaccharides were hydrolyzed to monosaccharides with 2 M trifluoroacetic acid and separated using 100 mM NaOH and 500 mM sodium acetate in 100 mM NaOH solvents with a modified gradient. Monosaccharides composition determined by this method was in good agreement with the expected, and the obtained results were reproducible. This very simple method with high sensitivity, good resolution and integrity information is a most suitable method for monosaccharide compositional analysis.

Košťálová Z. et al 2014. Bioactive hemicelluloses alkali-extracted from *Fallopia sachalinensis* leaves. Carbohydr. Res. sent

Vatehová Z. et al. 2014. Structural remodeling of root cell walls as response to toxic metal stress in monocots. Env. Exp. Bot. sent

This study was supported by the Slovak Grant Agency for Science (No. 2/0083/14 and 2/0085/13).

METHOD FOR FINDING NOVEL SEQUENCE MOTIFS IN TRANSPOSABLE ELEMENTS

IVAN VOGEL¹, EDUARD KEJNOVSKÝ¹

¹ Department of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, AS CR, Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

E-mail: ivogel@fit.vutbr.cz, tel.: +420 725 990 776

Transposable elements (TEs) are ubiquitous in plant genomes. Some transposable element families contain additional open reading frame (eORF) in addition to the standard genes (*gag*, *pol*). TEs can also contain different protein binding sites (human Alu elements contain p53 binding sites), regions homologous to microRNA and some host genes (DNA methylases) that play a role in various regulatory networks.

Next-generation sequencing allows an analysis of a large amount of DNA and RNA data. DNA-seq, RNA-seq and sRNA-seq can provide information about the genomic sequences, whole transcriptome and small noncoding RNAs, respectively.

We present an annotation pipeline that systematically searches for eORFs, miRNA genes, protein binding sites and other potentially functional motifs involved in the regulatory networks of different genes and TEs themselves. Although there are studies confirming the regulatory role of specific TEs regions, no systematic bioinformatics approach was used by now. The accuracy of the pipeline is improved using next-generation sequencing technologies (RNA-seq, DNA-seq, sRNA-seq). We used described approach to perform a systematic survey of eORFs and microRNAs located within LTR retrotransposons in plants.

McCue AD, Nuthikattu S and Slotkin RK (2013) Genome-wide Identification of Genes Regulated in trans by Transposable Element Small Interfering RNAs. RNA Biology v10: 1379–1395

Nosaka M, Itoh J-I, Nagato Y, Ono A, Ishiwata A, et al. (2012) Role of Transposon-Derived Small RNAs in the Interplay between Genomes and Parasitic DNA in Rice. PLoS Genet 8(9)

Steinbauerova V, Neumann P, Novak P, Macas J (2011) A widespread occurrence of extra open reading frames in plant Ty3/gypsy retrotransposons. Genetica 139: 1543–1555

Wang T, Zeng J, Lowe CB, Sellers RG, Salama SR, Yang M, Burgess SM, Brachmann RK, Haussler D (2007) Species-specific endogenous retroviruses shape the transcriptional network of the human tumor suppressor protein p53. PNAS 2007 104 (47) 18613–18618

This work was supported by grant 0360. Access to computing and storage facilities owned by parties and projects contributing to the National Grid Infrastructure MetaCentrum, provided under the programme "Projects of Large Infrastructure for Research, Development, and Innovations" (LM2010005), is greatly appreciated.

VLIV TEPLoty A VLHKOSTI NA PRŮBĚH DESIKACE SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU

ZUZANA VONDRÁKOVÁ, KATEŘINA ELIÁŠOVÁ, ALENA TRÁVNÍČKOVÁ, PAVLÍNA BEČVÁŘOVÁ, MILENA CVIKROVÁ

ÚEB AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje, ČR

E-mail: vondrakova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 422

Abiotické stresy indukují nejenom změny na úrovni fyziologických a biochemických procesů, ale i změny morfologie rostlin. Zvýšená produkce a akumulace reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) je první odpovědí rostlin na environmentální stres. Vysoké hladiny ROS působí jako primární elicitor, který spouští obrannou reakci rostliny. Zvýšená hladina ROS však může být současně původcem oxidativního poškození enzymových komplexů a struktury DNA, a proto je detoxifikace ROS pro rostlinu velmi důležitá. Mezi vysoce efektivní antioxidanty se řadí polyaminy (především putrescin (Put), spermidin (Spd) a spermin (Spm)). Jejich biologická aktivita je podmíněna interakcí s negativně nabitými molekulami nukleových kyselin, fosfolipidů, proteinů apod., které jsou těmito vazbami chráněny před oxidativním poškozením. Klíčové postavení ve stresové odpovědi rostlin zaujímá též kyselina abscisová (ABA), která ovlivňuje metabolické změny související s aktivací biosyntetických cest.

Cílem práce bylo ověření možnosti charakterizovat míru abiotického stresu (vyvolaného vlivem zvýšené teploty a snížené vlhkosti) pomocí změn hladin endogenních polyaminů a obsahu kyseliny abscisové. Jako marker oxidativního stresu byly stanoveny hodnoty malondialdehydu (MDA).

K testování stresového působení využíváme somatická embrya smrku. Na konci procesu somatické embryogeneze je nutné vystavit zralá embrya působení desikace, tj. embrya se před klíčením kultivují bez živného média; dochází u nich k částečnému snížení obsahu vody a dokončují se biochemické procesy nezbytné pro úspěšné klíčení. Průběh desikace významně ovlivňují vnější podmínky, především vlhkost a teplota.

V experimentech jsme se zaměřili na porovnání vlivu různé vlhkosti (90, 95 a 100%) a teploty (18, 25 a 30 °C) v průběhu desikace na metabolismus polyaminů. Stanovené rozdíly v klíčení somatických embryí po ukončení desikace dokumentují míru stresu, kterým byla embrya vystavena.

V průběhu desikace embryí v kontrolních podmínkách se celková hladina polyaminů (ve srovnání s jejich obsahem na konci maturace) snižuje. V embryích desikovaných při snížené vlhkosti a zvýšené teplotě je pokles především obsahu Spd mnohem výraznější. Stresová reakce embryí vystavených zvýšené teplotě a snížené vlhkosti se v obsazích ABA projevila pouze nevýznamně. Výrazné snížení hodnot MDA v embryích desikovaných v prostředí se zvýšeným osmotickým stresem a zvýšenou teplotou je pravděpodobně důsledkem poklesu metabolické aktivity stresovaných embryí. Inhibiční působení stresových podmínek v průběhu desikace se výrazně projevilo v klíčení somatických embryí a v morfologii klíčících rostlin.

Práce je podporována grantem MŠMT LD13050.

TREHALÓZA JAKO ZDROJ ENERGIE A UHLÍKU V ORCHIDEOIDNÍ MYKORHIZE

STANISLAV VOSOLSOBĚ¹, KLÁRA ČIHÁKOVÁ¹, HELENA LIPAVSKÁ¹, JAN PONERT^{1,2}

¹ Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK, Viničná 5, 128 48 Praha 2, ČR

² Botanická zahrada Hl.m. Prahy, Nádvorní 134, 171 00 Praha 7 – Troja, ČR

E-mail: vosolsob@natur.cuni.cz, tel.: +420 728 460 417

Mykorhiza je rozšířená u více než 90 % vyšších rostlin. O přenosu živin a signalizačních látek je však stále relativně málo informací. I když existují práce zabývající se široce rozšířenými typy mykorhizních asociací autotrofních rostlin, prakticky chybí práce o mykorhizách rostlin mykoheterotrofních. Pro takové rostliny je mykorhizní asociace jediným možným zdrojem energie a studium tohoto vztahu tak otevírá zcela nové otázky. Porozumění mykorhizním asociacím mykoheterotrofních rostlin je však důležité i pro úvahy o evoluci vztahu mezi houbou a rostlinou.

Pro mykoheterotrofní rostliny je zásadní příjem energie od houbové složky symbiózy ve formě sacharidů. Informace o tom, které sacharidy jsou přenášeny a jakou mají úlohu, však prakticky chybí. V této práci jsme se zaměřili na otázku, které sacharidy mohou být přenášeny z houby do rostliny a jakou mohou mít úlohu ve studované symbióze. Jako modelový druh byla zvolena orchidej prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*). Orchideje jsou v časných fázích vývoje zcela mykoheterotrofní, což umožňuje porovnání úplné a částečné mykoheterotrofie u jediného druhu. Zároveň jsou orchideje zdaleka největší skupinou mykoheterotrofních rostlin na světě, což dává dobrý předpoklad pro zobecnění získaných poznatků.

Naše experimenty ukázaly, že sacharóza, fruktóza, glukóza, rafinóza, sorbitol a trehalóza mohou sloužit jako dobrý zdroj energie a uhlíku pro růst protokormů. Maltóza a manitol byly využívány pouze malou měrou a galaktóza nebyla metabolizována vůbec. Jedno z nejzajímavějších zjištění je schopnost orchidejí využívat trehalózu. U naprosté většiny rostlin se jedná o signální molekulu přítomnou ve stopových množstvích. Naproti tomu v houbách je trehalóza běžný sacharid přítomný ve vysokých koncentracích. Jak se mohou mykoheterotrofní rostliny, které přijímají houbové sacharidy, vyrovnat s trehalózou, není známo.

Předkládané výsledky ukazují, že za využití trehalózy je u orchidejí odpovědný enzym trehaláza. Stejný enzym je zapojen i v regulaci signalizačně aktivních derivátů trehalózy u ostatních rostlin. U studovaných orchidejí však došlo k duplikaci tohoto enzymu, což může souviset s jeho neobvyklou rolí při využití exogenní trehalózy.

S podporou Grantové agentury Univerzity Karlovy (1598214) a SVV 260076 / 2014.

ŠTÚDIUM INTERAKCIÍ PROTEÍNU P1 VÍRUSU ŠARKY SLIVKY S PROTEÓMOM HOSTITEĽSKEJ RASTLINY S VYUŽITÍM DVOJHYBRIDNÉHO SYSTÉMU

ZUZANA VOZÁROVÁ¹, ZDENO ŠUBR¹

¹ Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, SR
E-mail: zuzana.vozarova@savba.sk, tel.: +421 59302447

Šarka sliviek predstavuje jedno z najviac devastujúcich, celostvetovo rozšírených ochorení kôstkovín s dôležitým socio-ekonomickým dopadom. Etiologickým agensom tohto ochorenia je vírus šarky slivky (PPV) patriaci do najväčšej čeľade rastlinných vírusov (*Potyviridae*). Jeho RNA genóm kóduje obmedzené množstvo vírusových proteínov a pre úspešnú replikáciu a pohyb vírusu sú esenciálne interakcie medzi vírusovými a rastlinnými faktormi počas infekcie. Hostiteľské faktory, ktoré sú nevyhnutné pre vírusovú infekciu, ale nie pre samotnú rastlinu, sa preto môžu stať východiskom pre vývoj nových antivírusových stratégií.

V tejto práci sme sa zamerali predovšetkým na vyhľadávanie a analýzu interakcií medzi PPV proteínom P1 a hostiteľskými proteínmi. Za týmto účelom bola pripravená cDNA knižnica z rastlín *Nicotiana benthamiana* infikovaných PPV, ktorá bola následne použitá na detekciu interagujúcich partnerov pomocou bakteriálneho dvojhybridného systému (BACTH). Princípom metódy je obnova regulačnej dráhy závislej na cAMP [1]. V prípade interakcie medzi testovanými proteínmi dochádza k rekonštitúcii aktivity adenylátcyklázy a expresii reportérového génu (*lac*), čo umožňuje detekciu pozitívnych klonov špecifického kmeňa *E. coli* na minimálnom médiu. Získané klony sme analyzovali colony PCR s využitím primerov nasadajúcich na hraničné oblasti klonovaných fragmentov cDNA knižnice a následnou sekvenáciou.

Sekvence boli podrobené BLAST analýze, ktorej výsledky môžu byť rozdelené do niekoľkých kategórií. Prvú skupinu tvoria vysoko abundantné rastlinné proteíny (RubisCO, kalmodulín) nasledované proteínmi so známou alebo potenciálnou funkciou pri odpovedi na stres, ako je translačne kontrolovaný tumorový proteín, ktorý je zároveň dôležitým regulátorom rastu u rastlín [2]. Tretiu skupinu tvoria proteíny so známou funkciou (predovšetkým v chloroplastoch) a nakoniec proteíny s neznámou funkciou alebo bez zistenej BLAST homológie. Konkrétne výsledky budú prezentované. Následne ich bude potrebné overiť nezávislými pull-down experimentami, na ktorých optimalizácii pracujeme.

[1] Karimova GA, Ullmann A, Ladant L. A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 328: 59–73, 2000

[2] Berkowitz O, Jost R, Pollmann S, Maslea J. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 20: 3430–3447, 2008

Táto práca bola podporená projektom APVV-0042-10.

JEDNOFÁZOVÝ VERSUS MULTIFÁZOVÝ SATURAČNÍ PULZ FLUORESCENCE PŘI STANOVENÍ MEZOFYLOVÉ VODIVOSTI PRO TRANSPORT CO₂ V LISTU

DANIEL VRÁBL¹, MARTINA VRÁBLOVÁ²

¹ Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava

² Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

E-mail: daniel.vrabl@osu.cz

Mezofylová vodivost, jako jedna z dominantních difúzních limitací, je parametr, který lze stanovit několika rozdílnými metodami. Jenou z těchto metod je současné měření gazometrických parametrů a fluorescence chlorofylu a. Konkrétně rychlosti asimilace CO₂ (A_n), koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině (C_i) a rychlost transportu elektronů přes PSII (ETR). Většina současných gazometrických systémů takové simultánní měření umožňuje, avšak podrobnější analýza dat ukazuje zásadní rozpory mezi teoretickou a měřenou stechiometrií asimilovaného CO₂ a množstvím elektronů. Při současném stanovení AN a ETR za normální koncentrace O₂ zjistíme, že k asimilaci jedné molekuly CO₂ je potřeba 4–5 elektronů. Tak nízké hodnoty jsou však více pravděpodobné za nefotorespiračních podmínek nebo u C₄ rostlin. Za fotorespiračních podmínek bychom předpokládali hodnoty 7–10 elektronů na asimilaci jedné molekuly CO₂. Tento rozpor je pravděpodobně způsoben nedostatečnou intenzitou saturačního pulzu u gazometrického systému. Tímto nedochází k úplnému uzavření reakčních center a podhodnocení parametru ETR.

Je zřejmé, že chybné stanovení parametru ETR vede k nepřesnému stanovení mezofylové vodivosti případně dalších parametrů, jejichž výpočet je založen na současném měření gazometrických a fluorescenčních parametrů.

Tzv. multifázový saturační pulz (Loriaux *et al.*, 2013) je alternativou ke klasickému saturačnímu pulzu, který umožňuje extrapolovat maximální hodnotu fluorescence i při použití nedostatečné intenzity saturačního pulzu, což je typické pro většinu gazometrických systémů s integrovaným modulem pro měření modulované fluorescence. Pomocí gazometrického systému Li-6400 s listovou komorou s integrovaným fluorescenčním modulem 6400-40, byly sledovány rozdíly v hodnotách vypočítané mezofylové vodivosti při použití klasického jednofázového a multifázového saturačního pulzu. Byla testována variabilita stanovení mezofylové vodivosti a byla provedená citlivostní analýza parametrů ETR na její výpočet.

Loriaux SD, Avenson TJ, Welles JM, McDermitt DK, Eckles RD, Riensche B, Genty B: 2013 – PCE, doi: 10.1111/pce.12115

IDENTIFICATION OF REGULATORY ELEMENTS OF *ATTERT* GENE

DAGMAR ZACHOVÁ¹, MILOSLAVA FOJTOVÁ^{1,2}, TOMÁŠ CRHÁK¹, IVANA ŽVÁČKOVÁ³ AND EVA SÝKOROVÁ^{1,2}

¹ Mendel Centre for Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology, Masaryk University, and Faculty of Science, Masaryk University Brno, Czech Republic

² Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic

³ Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

E-mail: dzachova@gmail.com

Telomeres are nucleoprotein structures at the ends of eukaryotic chromosomes. They are synthesized and maintained by the telomerase enzyme, a ribonucleoprotein complex which is important for genome stability and totipotency of plant cells. Telomerase is developmentally regulated, active enzyme was detected in meristematic tissues while in leaves and other organs formed by terminally differentiated cells, telomerase activity is abolished. Telomerase consists of two essential components – the telomerase RNA (TR) that provides a template for telomeric DNA synthesis, and the catalytic telomerase reverse transcriptase (TERT) protein. Both telomerase subunits have been characterized in many model organisms. Telomerase activity in plant tissues is dependent on the expression of the TERT, despite of intensive studies the principles of TERT expression regulation are not well understood.

Our recent study using the collection of *Arabidopsis thaliana* mutant plants with T-DNA insertions in the *AtTERT* gene and in the upstream region revealed putative minimal promoter and putative regulatory elements providing perspective background for subsequent studies (Fojtová *et al.*, 2011). Next, we focused on subcellular localization and function of the full-length and truncated variants of *AtTERT* *in planta*. Our results suggest a more complex telomerase regulation in plant cells than would be expected based on results of similar experiments in mammalian model systems (Zachová *et al.*, 2013).

Currently we focus on (i) searching for a minimal *AtTERT* gene region necessary for telomerase function and telomerase reconstitution *in planta*, (ii) identification of elements involved in regulation of telomerase expression, and (iii) investigation of the pattern of telomerase expression using a set of promoter::GUS or GFP constructs. For the reconstitution/complementation experiments, we prepared constructs covering various parts of putative *AtTERT* promoter region upstream of the start codon and a full length *AtTERT* sequence. Reconstitution of telomerase activity is monitored in mature leaves of wild type *A. thaliana* plants and in tissues of *AtTERT* mutant plants.

We hope our results will bring new pieces of knowledge about the basic principles of the plant telomerase regulation and will represent the basis for further functional studies.

Zachová D., Fojtová M., Dvořáčková M., Mozgová I., Lermontova I., Peška V., Schubert I., Fajkus J. and Sýkorová E. (2013), Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/ppl.12021

Fojtová M., Peška V., Dobšáková Z., Mozgová I., Fajkus J. and Sýkorová E. (2011), Molecular analysis of T-DNA insertion mutants identified putative regulatory elements in the *AtTERT* gene. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/err235

The research is supported by Czech Science Foundation (13-06943S), and by the project “CEITEC – Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund.

R

Rejstřík autorů

- Abrouk 85, 88
 Ainouche 83
 Akhunov 88
 Andrejch 93
 Antoniadi 67
 Antoš 41
 Ayalev 101
 Balcazar Terrones 117
 Barešová 99, 117
 Bárta 45
 Bartek 60
 Bartoš 73, 74, 119
 Batley 33, 119
 Bečvářová 123
 Bednář 112
 Bednářová 73
 Benedikty 70
 Benítez 43
 Benková 57
 Berkman 114
 Beseda 38
 Blavet 73, 119
 Blažová 49
 Borkovcová 52
 Brabencová 73
 Brzobohatý 98, 111
 Burešová 74
 Burketová 72, 85, 99, 117
 Campilho 109
 Čápal 37, 38
 Carling 88
 Casamatta 77
 Conrad 53
 Crhák 127
 Cvikrová 77, 123
 Čapková 79
 Čermák 75
 Černý 98, 111
 Čerovská 72
 Čiháková 124
 Danchenko 100
 Daňková 68
 de Carvalho 83
 Degtjarik 52
 De Jaeger 109
 Demidov 86, 116
 Dobrá 111
 Dobrev 81, 82, 95, 121
 Dokládál 57, 109
 Doležal 67
 Doležalková 95
 Doležel 33, 37, 38, 56, 73, 74, 84, 86, 88, 114, 116, 119, 121
 Domínguez 43
 Dopitová 52
 Doskočilová 60
 Drabešová 76
 Duraisamy 76, 92, 110
 Dvořáčková 96
 Dvořák 77
 Eberius 69
 Edwards 33, 114, 119
 Eeckhout 109
 Eichmeier 105
 Eliáš 44
 Eliášová 77, 123
 El-Showk 109
 Fajkus 109
 Fajkus J. 73, 78, 86, 87, 96, 97, 106
 Fajkus P. 78
 Feltl 65
 Fendrych 78
 Fila 79
 Fischer 75
 Fišerová 63
 Flores-Ramírez 100
 Fojtová 73, 86, 87, 97, 106, 127
 Fray 109
 Frenkel 88
 Frilander 109
 Friml 78
 Fuková 80
 Fürst 71
 Gallová 121
 Gaudinová 121
 Ge 111
 Gelová 53
 Gelvin 57
 Glasa 100
 Goldberg 63
 Griga 103
 Hála 54
 Hanáček 103, 112
 Hastie 33, 119
 Hašler 77
 Hauschild 78
 Hayashi 33, 119
 Heisel 72
 Hejátka 52, 53, 62, 109, 115, 116
 Hejtmánková 108
 Helariutta 109
 Henychová 102, 103
 Henryková 67
 Hlásná Čepková 117
 Hobza 90
 Holá 120
 Honys 79
 Horáček 81
 Horák 52, 118
 Hosek 81
 Hostounský 104
 Hošek 107
 Houben 86, 116
 Hoyerová 81
 Hronková 82
 Hrtyan 116
 Hřibová 84
 Hu 88
 Hudzieczek 34
 Humplík 71
 Humpolíčková 59
 Husičková 71
 Húška 83
 Hýbl 71
 Hynek 55
 Chamrád 56
 Chmelařová 84
 Illés 60
 Ivaničová 85
 Iwai 115
 Jakse 76
 Janda L. 52, 53
 Janda M. 72, 85
 Jansen 52, 69
 Jasanaková 115
 Jedelský 111
 Jeřábková 56, 86
 Jež 96
 Jindřichová 72
 Junková 55
 Juračka 40
 Jurečková 86
 Jůzová 87
 Karlický 91
 Kashif 109
 Kejnovský 90, 122
 Kianian 88
 Kilian 88, 119
 Kim 104
 Kiran 81
 Kitner 112
 Klimeš 113
 Klocová 88, 121
 Klumpler 52
 Kocábek 110
 Kočová 120
 Kollárová 89, 122
 Koloušková 90
 Komis 60
 Kopecký 74, 84
 Korol 88
 Košnar 41
 Košťálová 122
 Kováčová 90
 Kovařík 83, 118
 Kozáková 108
 Krüger 76
 Krutinová 117
 Kubaláková 37, 114
 Kubát 90
 Kučerová 89, 101
 Kumar 88, 119
 Kurasová 91
 Kurešová 121
 Kutá-Smatanová 52
 Kutý 52
 Lachman 108
 Lapitan 114
 Lazár 71
 Leitch A. 83
 Leitch I. 83
 Lenobel 56
 Lipavská 124
 Lišková 89, 122
 Ljung 67
 Lochmanová 73
 Luo 88, 114, 119
 Macas 80
 Majerová 106
 Majerská 109
 Malovíková 122
 Marek 52
 Maršálová 55
 Martínek 74
 Materová 91
 Matoušek 76, 92, 110
 Matoušková 93
 Matros 79
 Matušinsky 94
 Mazura 113
 Medveděová 113
 Mezulaníková 70
 Milec 85
 Mishra 76, 92, 110
 Mistrik 60
 Mištová 108
 Mock 79
 Moravec 72
 Motyka 53, 95
 Motylová 75
 Mozgová 96
 Muchová 96
 Najdekrová 97
 Navrátil 72
 Nejedlá 52
 Neumann 46, 80
 Novák J. 98
 Novák O. 67
 Nováková J. 48
 Nováková M. 99, 117
 Nováková S. 100
 Novák P. 42
 Ohnoutková 101
 Ondráčková 113
 Ondřej 77
 Otrusínová 52
 Ovečka 60
 Palovská 120
 Pánková 85
 Panzarová-Šimková 70
 Papoušková 52
 Patzak 92, 102, 103
 Pavelková 81, 103
 Pavlů 98
 Pekárová 52, 115
 Pelc 104
 Peňázová 105
 Pěničák 67
 Pernisová 62
 Petrášek 58, 66
 Petrovská 56, 86, 116
 Piernikarczyk 92
 Plačková 67
 Pleskot 50, 51
 Polanská 106
 Ponert 124
 Potocký 50
 Pouličková 77
 Prášil 85
 Procházková 108
 Procházková Schruppfová 87, 109
 Přerostová 107, 121
 Příbylová 75
 Ptáček 78
 Puehringer 52
 Radau 79
 Rebok 41
 Reinohl 68
 Rittich 118
 Rothová 120
 Růžicka 109, 116
 Růžičková 48
 Řeha 52
 Řehořová 120
 Říha 36
 Saldanha 112
 Sanges 77
 Sano 92
 Sedláček 121
 Schořová 109
 Schwarzerová 61, 66
 Siglová 92, 110
 Simonovik 67
 Simpson 109
 Sirová 45

Skala 108
 Skalák 98, 111
 Sklenář 52
 Skůpa 82
 Sloan 115
 Slovak 68
 Smýkal 112
 Smýkalová 113
 Snape 85
 Souček 113
 Soukup 112
 Spíchal 71
 Spitzer 94
 Staňková 33, 114, 119
 Steger 92
 Stein 114
 Stella 64
 Stone 45, 76, 115
 Strnad 67
 Štálek 108
 Suchomelová 70
 Svoboda 100
 Sýkorová 57, 78, 86, 127
 Szmítowska 115

Šafář 85, 88
 Šamaj 60
 Šamajová 60
 Šantrůček 82
 Šásek 117
 Šebela 56
 Šimková 33, 38, 82, 88, 114, 119
 Škultéty 100
 Šliková 116
 Španová 118
 Špunda 91
 Štorchová 45, 76, 90, 115
 Šubr 125
 ten Hoopen 53
 Tomašíková 86, 116
 Trávníčková A. 123
 Trávníčková M. 85, 117
 Trčková 121
 Trdá 99, 117
 Trojánek 118
 Trtílek 70
 Tulpová 114, 119
 Tůmová 120

Tůrek 113
 Turnbull 67
 Tvarůžek 94
 Týcová 92, 110
 Tyč 75
 Uřínovská 56
 Valárik 85, 88, 114, 121
 Valentová 55, 85, 93, 99
 Vandenhirtz D. 69
 Vaňková 107, 111, 121
 Vanžurová 121
 Vašková 101
 Vatehová 89, 122
 Viehmannová 117
 Visendi 33, 119
 Vogel 90, 122
 Vogelová 32
 Volf 113
 Vondráková 77, 123
 Vosolobě 66, 124
 Vozárová 125
 Vrábl 126
 Vráblová 82, 126
 Vrána 33, 37, 38, 56

Vyhnánek 74
 Výskot 90
 Wang 88
 Watanabe 74
 Weiss 52
 Wiesnerová 82
 Zabady 53
 Zahedi 79
 Zacharakí 109
 Zachová 97, 127
 Zástěra 39, 47
 Záveská Drábková 95
 Zažimalová 82
 Zdráhal 73
 Zelko 89
 Zemánková 98
 Žárský 50
 Žídek 52, 115
 Žlúvová 90
 Žurovec 35
 Žváčková 127

VŠE PRO PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN A ROSTLINNÝCH TK

Komory pro pěstování rostlin a rostlinných TK - Panasonic



MLR 352

- 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 **352 H** s regulací vlhkosti 55 - 90 %

Univerzální box pro pěstování rostlin a rostlinných TK - Convion



ADAPTIS A1000

- Objem 1000 l, horní osvětlení
- Na výběr 4 osvětlovací kity
- Teplotní rozsah +4 °C až +40 °C při zhasnutých světlech
- Teplotní rozsah +10 °C až +45 °C při zapnutých světlech
- Regulace vlhkosti a intenzity osvětlení

**DODÁVKY
 SERVIS
 MONTÁŽ**
www.schoeller.cz



Podrobný obsah

PŘEDNÁŠKY

Jan Calábek / Věda, film a umění k potěše včel, básníků a botaniků	32
Využití BioNano mapování pro analýzu a sekvenování rostlinných genomů	33
Precise genome editing in plants	34
Použití programovatelných nukleáz pro cílenou mutagenezi	35
Funkční genomika pro studium buněčného jádra	36
Representative amplification of DNA from single plant chromosomes	37
„Chromatin conformation capture“ jako nástroj pro studium struktury a funkce chromatinu	38
Založení a život biotechnologické firmy v Čechách	39
Metody zobrazení rostlin v mikro a makroměřítku	40
Národní e-infrastruktura CESNET – komplexní informatické nástroje pro potřeby české vědy, výzkumu a vývoje	41
Využití MetaCentra pro analýzu biologických dat	42
Gene regulatory networks in the study of plastic cell differentiation in <i>Arabidopsis</i> leaves	43
Genomické přístupy ke studiu fylogeneze a makroevoluce (nejen) řas a rostlin	44
The comparative studies of plant transcriptomes generated by RNA-seq	45
Identifikace centromerických DNA sekvencí pomocí metody ChIP-seq a klastrovací analýzy	46
GeneMarker® – unikátní softwarový nástroj pro genotypizaci – představení a aplikace	47
S3 Cell Sorter: Jednoduché automatizované sortování buněk	48
Xceed your expectation	49
Modelování struktur proteinů a jejich využití (nejen) v rostlinné biologii	50
Molekulová dynamika jako nástroj moderní biologie	51
Structural biology in use: NMR, X-ray and molecular dynamics modeling in study on multistep phosphorelay signaling in plants	52
The application of immunomodulation approach in the cytokinin signaling research	53
Produkce rekombinantních proteinů a jejich využití v experimentální biologii rostlin	54
Hmotnostní spektrometrie v membránové proteomice	55
Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting	56
Aplikace moderních biochemických a molekulárně-biologických metod na studium interaktomu telomerasy z <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
Optical sectioning of plant samples with fluorescence microscopy	58
Advanced fluorescence microscopy techniques investigating membrane organization and dynamics	59
Superresolution structured illumination live imaging of plant cortical microtubule dynamics and organization	60
<i>In vivo</i> fluorescence probes for plant biology	61
<i>In vivo</i> fluorescence macroscopy in plants	62
Imaging plant cell ultrastructure by field emission scanning electron microscopy	63
Když se kultury střetnou. Sachs, Darwin a disciplína rostlinné fyziologie	64
Bádám, bádáš, bádáme – již od základní školy!	65
Nová metoda pro stanovení afinity vazby periferního proteinu k plasmatické membráně	66
High-resolution cell-specific analysis of phytohormones	67
Identifikace kandidátních genů signálních drah strigolaktinu u modelové rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> s využitím metody GWAS	68
High-throughput phenotyping – A boost for genomics in the 21 st century	69
Chlorophyll fluorescence imaging as a powerful tool for high throughput phenotyping of early stress responses in plants	70
High-throughput biological testing and complex plant phenotyping	71
Porostou vám vaše rostliny i pod LEDem?	72

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Využití NGS sekvenování pro určení struktury a původu chromozomu B kukuřice	73
Analýza acetylačního stavu rostlinných histonů	73
Genomic constitution of blue grained wheat genotypes	74
Řízené umlčování genů v buněčné linii tabáku BY-2	75
Optimalizace <i>de-novo</i> sestavování transkriptomů získaných sekvenováním další generace (NGS)	76
Computational identification of <i>Humulus lupulus</i> (hop) mirna and their target predications	76
A draft genome of the recently discovered peat bog cyanobacterium	77
Mikroskopická detekce polyfenolických látek ve zralých somatických embryích smrku po ozáření UV-B	77
Komparativní analýza telomer a telomerázy u hybridů planých × kultivovaných odrůd bramboru	78
Imaging of living and moving samples by confocal microscopy	78
Rostlinná fosfoproteomika	79
Large scale organization of chromatin in pea centromeres	80
Vývoj metody IRAP pro hodnocení genetické diverzity máku setého (<i>Papaver somniferum</i> L.)	81
Characterization of cytokinin metabolism kinetics in <i>Arabidopsis</i> through experimental and computational techniques	81



Podrobný obsah

Komunikace listu s prostředím – metody studia	82
Studium evelope rDNA polyploidních rostlin <i>Spartina maritima</i> a <i>Spartina alterniflora</i> pomocí 454 sekvenování	83
Studium organizace jaderného genomu u kostřav (<i>Festuca</i> sp.) pomocí FISH.	84
High-throughput gene resources and phenotyping – the key factors in fine mapping of new <i>Eps</i> gene	85
Interakce <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Pseudomonas syringae</i>	85
The relationship between Aurora kinases and TPX2 protein in plants as revealed using multidisciplinary approaches	86
Sekvenční varianty genu pro telomerázovou reverzní transkriptázu (<i>TERT</i>) v modelové rostlině <i>Nicotiana tabacum</i>	86
Optimalizace metody pro identifikaci proteinů asociovaných s rostlinnými telomerami	87
Fyzická mapa chromozomu 4A pšenice seté	88
Modified method for lateral roots detection	89
Validace referenční genů pro RT-qPCR u nemodelových rostlin.	90
Proč chybí některé mobilní elementy na chromozomu Y?	90
Isolation of barley and spruce thylakoid membranes and their different characteristics	91
Analysis of general and specific 5'P-RNA degradomes and their application to investigate pospiviroid targets and network of hop transcription factors involved in lupulin biosynthesis	92
Live imaging proteinů interagujících s membránou s využitím konfokální a „spinning disk“ mikroskopie	93
Stanovení rezistence houbových patogenů rostlin k fungicidům pomocí technik molekulární biologie	94
Srovnání různých způsobů stabilizace rostlinných vzorků při terénních odběrech k analýze fytohormonů	95
Genome instability in plant CAF1 mutants studied by q-PCR and TRF analysis	96
Telomere maintenance in <i>Physcomitrella patens</i>	97
Shaded roots: a novel role of cytokinin in photomorphogenesis?	98
Proteinové efekторы v interakci řepky olejky s <i>Leptosphaeria maculans</i>	99
Comparative proteomics as a tool to study differences in response of two zucchini cultivars toward the <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> infection	100
Vliv hygromycinu a kanamycinu na regeneraci nezralých zygotických embryí ječmene a pšenice	101
Porovnání dostupných PCR mixů pro kvantitativní real-time analýzu exprese genů	102
Porovnání metod izolace DNA ze suchých a zpracovaných hlávek chmele	103
Modification of linseed oil composition using construct to induce gene silencing.	103
Label-free imaging of pollen grain hydration: Modulation relief-contrast microscopy.	104
Optimalizace detekce virů TuMV a TYMV metodou RT PCR s jejich potvrzením sekvenací	105
Studium metylace telomerových cytosinů rostlin.	106
Způsob přehledného zobrazení velkého množství dat.	107
Extrakce polyfenolů z pokrutin révy vinné.	108
<i>N</i> ⁶ -adenosyl methylation regulates vascular development and hormonal response in <i>Arabidopsis</i>	109
Charakterizace proteinů asociovaných s telomerázou	109
Analysis of kinase activation of hop transcription factor <i>H1WRKY1</i> as a part of network regulating lupulin biosynthesis	110
Dynamika proteomu rostlin <i>A. thaliana</i> při odpovědi na teplotní stres a změnu endogenních hladin cytokininů	111
Combinational anatomical, chemical and genomic approaches to dissect two key domestication traits in legumes: seed dormancy and pod dehiscence	112
<i>In vitro</i> biotesty – aplikace.	113
Identifikace alel rostlinných enzymů v plasmidových knihovnách založená na alel-specifické real time PCR	113
Požiční klonování genu pro rezistenci k mšici zhoubné (<i>Diuraphis noxia</i>): konstrukce vysokohustotní genetické mapy.	114
Transcriptomics and genomics of male sterility in <i>Silene vulgaris</i> : technical challenges and biological insights.	115
Expression and purification of HATPase and receiver domains of the ethylene receptor ETR1 from <i>A. thaliana</i> and introduction of intein technology	115
The role of alternative splicing in auxin and cytokinin pathways	116
Using <i>in vitro</i> kinase assay for determining enzyme specificity	116
First preliminary screening of the genetic diversity in cocona (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal) using ISSR marker.	117
Genové manipulace u vláknité houby <i>Leptosphaeria maculans</i>	117
Izolace DNA z technologicky zpracovaných potravin s využitím magnetických nosičů	118
Fyzická mapa a sekvenování krátkého ramene chromozomu 7D pšenice	119
Brassinosteroidy jako regulátory změn na buněčné úrovni při odezvě rostlin na nedostatek vody – analýza fotosyntetických a ochranných procesů	120
Mapování agronomicky významných znaků u pšenice <i>Triticum monococcum</i> L.	121
Příjem a transport fosfátu – hormonální interakce	121
Separation of neutral and acidic monosaccharides by HPAEC-PAD	122
Method for finding novel sequence motifs in transposable elements	122
Vliv teploty a vlhkosti na průběh desikace somatických embryí smrku	123
Trehalóza jako zdroj energie a uhlíku v orchideoidní mykorhize	124
Štúdium interakcií proteinů P1 viru sličky s proteómom hostiteľskej rastliny s využitím dvojhybridného systému	125
Jednofázový versus multifázový saturační pulz fluorescence při stanovení mezofylové vodivosti pro transport CO ₂ v listu	126
Identification of regulatory elements of <i>AtTERT</i> gene	127

Albrechtová Jana, prof. RNDr., Ph.D.	Přírodovědecká fakulta UK, Praha Viničná 1965/5, 128 43 Praha 2 jana.albrechtova@natur.cuni.cz, albrecht@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 959
Andrejch Jan, Ing.	Vysoká škola chemicko-technologická Technická 5B, 166 28 Praha 6 andre.j@email.cz, tel.: +420 602 887 131
Antoš David, RNDr., Ph.D.	CESNET, z. s. p. o. Zikova 4, 160 00 Praha 6 antos@ics.muni.cz, tel.: +420 549 494 532
Basíková Hana, RNDr.	Eppendorf Czech & Slovakia s. r. o. Kolovratská 1476, 251 01 Říčany u Prahy hana.basikova@eppendorf.cz, tel.: +420 602 789 873
Bednářová Martina, Mgr.	ÚEB AV ČR, v. v. i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc lennai@seznam.cz, tel.: +420 604 203 758
Beseda Tomáš	ÚEB AV ČR, v. v. i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc beseda@ueb.cas.cz, tel.: +420 604 256 156
Blažová Monika	BioTech a. s. Tymiánová 619/14, 101 00 Praha 10 blazova@biotech.cz, tel.: +420 737 202 143
Brabencová Sylva, Mgr.	Masarykova univerzita Kamenice 5, 625 00 Brno sylva.brabencova@seznam.cz, tel.: +420 721 850 894
Brouzdová Jitka, Ing.	Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 brouzdova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 420
Břicháček Pavel	Schoeller Instruments Václavská 124, 148 00 Praha pavel.brighacek@schoeller.cz, tel.: +420 602 230 356
Burešová Veronika, Mgr.	ÚEB AV ČR, v. v. i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc buresova@ueb.cas.cz, tel.: +420 736 263 653
Burketová Lenka, doc. Ing., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 – Lysolaje burketova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 815
Cápal Petr, Mgr.	Ústav experimentální botaniky (Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin) Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc capal@ueb.cas.cz, tel.: +420 731 054 684
Čermák Vojtěch, Mgr.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 vojta.ce@gmail.com, tel.: +420 739 925 045
Dabrowski Siarhei	CEITEC – Central European Institute of Technology Masaryk University Kamenice 5, 625 00 Brno sergedobrowski@gmail.com, tel.: +420 773 526 560
Daněk Michal	ÚEB AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 danek@ueb.cas.cz, tel.: +420 607 718 468

Daňková Nela	CEITEC Mendelu Zemědělská 1, 613 00 Brno NellaDankova@email.cz, tel.: +420 732 271 584
Dobešová Eva, Mgr	Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, 612 65 Brno dobesova@ibp.cz, tel.: +420 541 517 152
Dokládál Ladislav, RNDr.	Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, 612 65 Brno ldokladal@volny.cz, tel.: +420 602 182 417
Doležal Karel, Dr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje karel.dolezal@upol.cz, tel.: +420 737 815 152
Domínguez Román Andrea Lizbeth	National University of Mexico Av Universidad 3000, Ciudad Universitaria 4510 Ciudad de México, Distrito Federal, Mexiko andreacb17@gmail.com, tel.: 5545173412
Drabešová Jana, Ing., Ph.D.	ÚEB AV ČR, v. v. i. Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 – Lysolaje drabesova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 827
Duraisamy Ganesh Selvaraj, Ph.D.	BC AV ČR, v. v. i., ÚMBR Branišovská 31, 370 05 České Budějovice gansels@orbit.umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 508
Dvořák Petr, Ph.D.	Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc p.dvorak@upol.cz, tel.: +420 585 634 080
Eliáš Marek	Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra biologie a ekologie Chittussiho 10, 710 00 Ostrava marek.elias@osu.cz, tel.: +420 776 078 780
Eliášová Kateřina, Mgr., Ph.D.	ÚEB AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje eliasova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 402
Fajkus Petr, Mgr.	Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i. Královopolská 135, 612 65 Brno fajkuspe@seznam.cz, tel.: +420 777 951 222
Feltl Tomáš	TFSOft E. Vencovského 1140, 572 01 Polička t.feltl@tfsoft.cz, tel.: +420 774 403 995
Fendrych Matyas	Institute of Science and Technology (IST) Austria, 3400 Klosterneuburg, Austria Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg, Austria mfendryc@ist.ac.at, tel.: +43 66 488 509 104
Fíla Jan, Mgr.	Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 fila@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 452
Fišerová Jindřiška, Ph.D.	Ústav molekulární genetiky, AV ČR, v. v. i. Václavská 1083, 140 00 Praha jindriska.fiserova@img.cas.cz, tel.: +420 241 063 161
Fröhlich Luděk, RNDr.	OlChemIm s. r. o. P.O. Box 22, Šlechtitelů 27, 770 10 Olomouc l.f@olchemim.cz, tel.: +420 603 494 163

Fuková Iva	Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Ústav molekulární biologie rostlin Branišovská 31, 370 05 České Budějovice ifukova@umbr.cas.cz, tel.: +420 728 839 132
Fuxová Gabriela, Mgr.	Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 fuxovag@gmail.com, tel.: +420 608 254 559
Gelová Zuzana	FGPR CEITEC-MU Kamenice 5 /A2, 625 00 Brno zuzana.gelova@email.cz, tel.: +420 608 033 596
Habrová Silvie	TRIGON PLUS spol. s r. o. Čestlice 93, 251 01 Říčany u Prahy habrova@trigon-plus.cz, tel.: +420 725 528 979
Hajná Vladimíra, Bc.	Poseč 11, 364 01 Otročin Vlajha@seznam.cz, tel.: +420 728 609 007
Hála Michal, RNDr., Ph.D.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 halam@natur.cuni.cz, tel.: +420 221 951 686
Hanáček Pavel, Ing., Ph.D.	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno hanacek@mendelu.cz, tel.: +420 724 231 355
Hejátko Jan, doc. RNDr., Ph.D.	CEITEC, Masarykova univerzita Kamenice 5, 625 00 Brno hejatk@sci.muni.cz, tel.: +420 549 494 165
Hejlová Barlatovová Michaela	GENERI BIOTECH, s. r. o. Machkova 587, 500 11 Hradec Králové michaela.barlatovova@generi-biotech.com, tel.: +420 734 318 839
Hettner Michal	KRD – obchodní společnost, s. r. o. Pekařská 12, 155 00 Praha 5 michal.h@krd.cz, tel.: +420 605 275 034
Hobza Roman, Ph.D.	Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, 612 00 Brno hobza@ibp.cz, tel.: +420 732 176 456
Horáček Jiří, Mgr., Ph.D.	AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s. r. o. Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk horacek@agritec.cz, tel.: +420 583 382 127
Hoyerová Klára	Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 hoyerova@ueb.cas.cz, tel.: +420 775 146 836
Hronková Marie, Ing., Ph.D.	Biologické centrum AV ČR, v. v. i. Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice hronkova@umbr.cas.cz, tel.: +420 420723373966
Hudzieczek Vojtěch	Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i. Královopolská 135, 612 00 Brno hudzieczek@ibp.cz, tel.: +420 541 517 203
Humplík Jan	CRH-Odd. chem. biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc jfhumplik@gmail.com, tel.: +420 585 634 945

Humpolíčková Jana	ÚFCH JH AV ČR, v.v.i. Dolejškova 3, 182 23 Praha 8 jana.humpolickova@jh-inst.cas.cz, tel.: +420 266 053 142
Húska Dalibor, Ing., Ph.D.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, 612 65 Brno huska@ibp.cz, tel.: +420 541 517 230
Chmelařová Anna	ÚEB AV ČR, v.v.i., Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc-Holice chmelarova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 728
Ivaničová Zuzana, Mgr	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Centrum regionu Haná Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc-Holice ivanicova@ueb.cas.cz, tel.: +420 721 401 423
Janda Martin	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Technická 5, 166 28 Praha martin.janda@vscht.cz, tel.: +420 603 579 167
Janečka Libor	Merci, s.r.o. Hviezdoslavova 1192/55b, 627 00 Brno janecka@merci.cz, tel.: +420 602 410 197
Jansen Marcus	LemnaTec GmbH Pascalstr. 59, 52076 Aachen, Germany marcus.jansen@lemnatec.de
Jeřábková Hana	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc jerabkova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 721
Junková Petra, Ing.	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice junkovap@vscht.cz, tel.: +420 606 246 480
Juračka Petr Jan	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Viničná 7, 128 44 Praha 2 juracka@natur.cuni.cz, tel.: +420 723 119 339
Jurečková Jana, Bc.	Březinova 112a, 586 01 Jihlava 376223@mail.muni.cz, tel.: +420 775 148 681
Jůzová Kateřina, Bc.	Němčice 68, 561 18 Němčice 380301@mail.muni.cz, tel.: +420 603 310 120
Klocová Babora, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc-Holice klocova@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 716
Kollárová Karin, RNDr., PhD.	Chemický ústav, SAV Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava karin.kollarova@savba.sk, tel.: +421 259 410 291
Koloušková Pavla, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje kolouskova@ueb.cas.cz, tel.: +420 607 282 768
Komis George, Ph.D.	Center of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research (CRH), Faculty of Science, Palacký University Olomouc Slechtitelu 11, 783 71 Olomouc georgios.komis@upol.cz, tel.: +420 585 634 734

Košnar Tomáš, Ing.	CESNET, z.s.p.o. Žitkova 4, 160 00 Praha 6 kosnar@cesnet.cz, tel.: +420 602 593 046
Krčková Zuzana	ÚEB AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje krckova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 420
Krutinová Hana, Bc.	Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i., Laboratoř patofyziologie rostlin Rozvojová 313, 165 02 Praha 6–Lysolaje hana.krutinova@centrum.cz, tel.: +420 737 912 193
Kubát Zdeněk, Ph.D.	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, 612 65 Brno kubat@ibp.cz, tel.: +420 541 517 203
Kubíčková Jana	Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. Královopolská 135, 612 65 Brno kaiserlichova@ibp.cz, tel.: +420 541 517 179
Kurasová Irena, Mgr., Ph.D.	Ostravská univerzita v Ostravě Dvořákova 7, 701 03 Ostrava irena.kurasova@osu.cz, tel.: +420 775 174 616
Macas Jiří	Biologické centrum AV ČR, v.v.i. Branišovská 31, 370 05 České Budějovice macas@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 516
Martinec Jan, RNDr., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 martinec@ueb.cas.cz, tel.: +420 776 629 209
Martinek Jan, Bc.	PřF UK v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 martinj9@natur.cuni.cz, tel.: +420 731 049 596
Materová Zuzana, Mgr.	Dvořákova 7, 701 03 Ostrava p12183@student.osu.cz, tel.: +420 724 543 392
Matoušek Jaroslav, RNDr., CSc.	Biologické centrum AV ČR, v.v.i., UMBR Branišovská 31, 370 05 České Budějovice jmat@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 937
Matoušková Jindřiška, PharmDr.	Vysoká škola chemicko-technologická Technická 5B, 166 28 Praha 6 jinmat@centrum.cz, tel.: +420 774 071 874
Matušínský Pavel, Ph.D.	Agrotest fyto, s.r.o. Havlíčková 2787, 767 01 Kroměříž matusinsky@vukrom.cz, tel.: +420 739 012 477
Matušková Petra, Ing., Ph.D.	Roche, s.r.o. Karlovo náměstí 17, 120 00 Praha 2 petra.matuskova@roche.com, tel.: +420 725 228 585
Mištová Tereza, Ing.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 – Ružyně mistova@vurv.cz, tel.: +420 702 087 809
Moravec Tomáš, Ph.D.	ÚEB AV ČR, v.v.i. Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 moravec@ueb.cas.cz, tel.: +420 603 307 178

Motyka Václav, Ing., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 vmotyka@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 437
Motylová Šárka	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 sarka.motylova@seznam.cz, tel.: +420 736 401 937
Muchová Veronika	CEITEC MU Kamenice 5, Budova A2, 625 00 Brno veronika.muchova@gmail.com, tel.: +420 602 655 573
Najdekrová Lucie, Ing.	Bělohorská 157, 636 00 Brno lucie.najdekrova@gmail.com, tel.: +420 774 025 057
Neumann Pavel, Ph.D.	Biologické centrum AV ČR, v. v. i. Branišovská 31, 370 05 České Budějovice neumann@umbr.cas.cz, tel.: +420 732 944 352
Novák Jan, Ph.D.	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno jan.novak@mendelu.cz, tel.: +420 545 133 374
Novák Ondřej, Mgr., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje novako@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 634 853
Novák Petr	Ústav molekulární biologie rostlin, Biologické centrum AV ČR, v. v. i. Branišovská 31, 373 16 České Budějovice petr@umbr.cas.cz, tel.: +420 387 775 575
Nováková Jana, Ing.	Bio-rad s. r. o. Nad Ostrovem 1119/7, 147 00 Praha jana_novakova@bio-rad.com, tel.: +420 602 752 524
Nováková Miroslava	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Laboratoř patofyziologie rostlin Rozvojová 263, 165 02 Praha mirnov@ueb.cas.cz, tel.: +420 608 103 772
Nováková Slavomíra, Ing., Ph.D.	Virologický ústav SAV Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava virusno@savba.sk, +421 259 302 447
Ortmannová Jitka	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 ortmannova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 458
Pánková Kateřina, Mgr.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 k.pankova@vurv.cz, tel.: +420 702 087 662
Panzarová Klára, Dr.	Photon Systems Instruments (PSI) Kolářkova 1057/39, 621 00 Brno panzarova@psi.cz, tel.: +420 605 560 682
Patzak Josef, Ing., Ph.D.	Chmelařský institut s. r. o. Kadaňská 2525, 438 46 Žatec patzak@chizatec.cz, tel.: +420 415 732 109
Pavelková Michaela, Ing.	Agritec Plant Research s. r. o. Zemědělská 16, 787 01 Šumperk pavelkova@agritec.cz, tel.: +420 583 382 127

Pejchar Přemysl	ÚEB AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje pejchar@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 418
Pelc Radek, RNDr., DPhil.	Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i. Videňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč radek.pelc@seh.oxon.org, tel.: +420 241 063 766
Peňázová Eliška	Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta Valtická 337, 691 44 Lednice penazova.e@gmail.com, tel.: +420 737 176 326
Pernisová Markéta, Ph.D.	CEITEC MU Kamenice 5, A2, 62500 Brno pernisov@sci.muni.cz, tel.: +420 549 496 470
Petrášek Jan, RNDr., Ph.D.	KEBR PřF UK Viničná 5, 128 44 Praha 2 petrasek@ueb.cas.cz, tel.: +420 221 951 692
Petrovská Beáta, Ing., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc petrovska@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 721
Pleskot Roman	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha pleskot@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 457
Polanská Pavla, Mgr.	Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno polanskapavla@gmail.com, tel.: +420 733 791 001
Polínek Jiří	Life Technologies Czech Republic s. r. o. V Celnici 1031/4, 110 00 Praha 1 jiri.polinek@thermofisher.com, tel.: +420 724 890 608
Potocký Martin, Ing., Ph.D.	ÚEB AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha potocky@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 457
Procházková Dagmar	VÚRV Drnovská 507/163, 161 06 Praha 6 – Ruzyně prochazkovad@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 812
Přerostová Sylva, Mgr.	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta Albertov 6, 128 43 Praha 2 prerostova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 426
Příbylová Adéla, Bc.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 pribylad@natur.cuni.cz, tel.: +420 777 939 852
Raková Kateřina, Ing.	ÚEB AV ČR, v. v. i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje rakova@ueb.cas.cz, tel.: +420 777 812 325
Rebok Tomáš, RNDr., Ph.D.	CESNET, z. s. p. o. Žitná 4, 160 00 Praha rebok@ics.muni.cz, tel.: +420 549 493 495
Rodríguez Lorenzo José Luis, Ph.D.	Institute of Biophysics AS CR, v. v. i. Královopolská 135, 612 65 Brno rodriguez@ibp.cz, tel.: +420 541 517 248

Růžička Kamil	CEITEC Masarykova univerzita Kamenice 5, 625 00 Brno kamil.ruzicka@ceitec.muni.cz, tel.: +420 773 902 647
Růžicková Šárka, RNDr., Ph.D.	Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i. Videňská 1083, 142 20 Praha sarka.ruzickova@ibt.cas.cz, tel.: +420 607 394 482
Říha Karel	CEITEC, Masarykova univerzita Kamenice 753/5, 625 00 Brno karel.riha@ceitec.muni.cz, tel.: +420 549 497 836
Sekereš Juraj, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 juro.seky@gmail.com, tel.: +420 728 253 045
Schořová Šárka, Bc.	Nové Bránice 218, 664 64 Dolní Kounice 376269@mail.muni.cz, tel.: +420 731 507 461
Schwarzerová Kateřina, RNDr., Ph.D.	Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK Viničná 5, 128 44 Praha 2 schwarze@natur.cuni.cz, tel.: +420 605 821 612
Siglová Kristýna, Ing.	Biologické centrum AV ČR, v.v.i. Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice kristyna@umbr.cas.cz, tel.: +420 724 254 477
Skalák Jan, Mgr.	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno skalak.jan7@gmail.com, tel.: +420 545 133 374
Sklenář Michal,	KRD – obchodní společnost, s.r.o. Pekařská 12, 155 00 Praha 5 michal.s@krd.cz, tel.: +420 739 654 976
Smýkal Petr, Ing., Ph.D.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc petr.smykal@upol.cz, tel.: +420 585 634 827
Smýkalová Iva, Ing., Ph.D.	AGRITEC PLANT RESEARCH, s.r.o. Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk smykalova@agritec.cz, tel.: +420 583 382 120
Souček Přemysl	Mendelova Univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno premas@sci.muni.cz, tel.: +420 545 133 454
Staňková Helena, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc stankovah@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 717
Stella Marco, Ph.D.	Katedra filosofie a dějin přírodních věd, PřF UK v Praze Viničná 7, 128 00 Praha 2 marco.stella@natur.cuni.cz, tel.: +420 603 159 948
Stone James, Ph.D.	Institute of Botany, AS CR Zámek 1, 252 43 Pruhonice james.stone@ibot.cas.cz, tel.: +420 225 106 828
Szmitkowska Agnieszka, M.Sc.	CEITEC-MU, Brno Wiatraczna 9/17, 26-680 Wierzbica, Polsko agnieszka_szmitkowska@wp.pl, tel.: +48 721 550 802

Šafář Jan, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc safar@ueb.cas.cz, tel.: +420 736 228 445
Šimková Hana, Ing., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc simkovah@ueb.cas.cz, tel.: +420 585 238 715
Šipková Kateřina	Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i. Královopolská 135, 612 65 Brno ksipkova@ibp.cz, tel.: +420 541 517 199
Šliková Eva	CEITEC – Central European Institute of Technology Kamenice 753/5, 625 00 Brno eva.slikova@gmail.com, tel.: +420 915 738 963
Šonka Josef	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta Albertov 6, 128 43 Praha 2 Joe_Sonka@seznam.cz, tel.: +420 737 151 470
Štorchová Helena, RNDr., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 00 Praha storchova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 828
Šušla Martin, RNDr., Ph.D.	Sigma-Aldrich spol. s r.o. Sokolovská 100/94, 186 00 Praha martin.susla@sial.com, tel.: +420 724 530 919
Tomašíková Eva	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje tomastikova@ueb.cas.cz, tel.: +420 725 807 216
Torres Lucie, Mgr.	M. G. P. spol. s r. o. Kvítková 1575, 760 01 Zlín lucie.torres@mgp.cz, tel.: +420 777 771 274
Trávníčková Martina, Ing.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 – Ruzyně travnickova@vurv.cz, tel.: +420 702 087 664
Trdá Lucie, Mgr.	Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i. Laboratoř patofyziologie rostlin Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 – Lysolaje lucie.trda@gmail.com, tel.: +420 721 869 511
Trojánek Zdeněk, Ing.	Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická Purkyňova 464/118, 612 00 Brno xtrojanezk@fch.vutbr.cz, tel.: +420 731 462 708
Tulpová Zuzana, Mgr.	Ústav Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc tulpova@ueb.cas.cz, tel.: +420 774 697 980
Tůmová Lenka	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, 143 28 Praha 2 fridri@seznam.cz, tel.: +420 776 636 799
Tyč Dimitrij, Mgr.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 tycd@seznam.cz, tel.: +420 739 358 879
Vágner Martin, RNDr., CSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 vagner@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 414

Valentová Olga, prof. RNDr., CSc.	Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha Technická 5, 166 28 Praha 6 olga.valentova@vscht.cz, tel.: +420 602 967 896
Vaňková Radomíra, RNDr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 vankova@ueb.cas.cz, tel.: +420 605 211 369
Vanžurová Hana, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc vanzurova@ueb.cas.cz, tel.: +420 737 605 194
Vatehova Zuzana, Mgr., PhD.	Chemický ústav, SAV Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava zuzana.vatehova@savba.sk, tel.: +421 259 410 283
Vidláková Tereza, Ing.	Bio-rad s.r.o. Nad Ostrovem 1119/7, 147 00 Praha tereza_vidlakova@bio-rad.com, tel.: +420 724 200 205
Vltavská Kateřina	ÚEB AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 vltavska@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 411
Vogel Ivan, Ing.	Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i. Královopolská 135, 612 65 Brno ivogel@fit.vutbr.cz, tel.: +420 725 990 776
Vogelová Pavlína, Mgr.	Národní muzeum Vinohradská 1, 110 00 Praha pavlinavogelova@gmail.com, tel.: +420 723 935 138
Vondráková Zuzana, RNDr., CSc.	ÚEB AV ČR, v.v.i. Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje vondrakova@ueb.cas.cz, tel.: +420 225 106 422
Vosolsobě Stanislav, Mgr.	PřF UK v Praze Albertov 6, 128 43 Praha 2 vosolsob@natur.cuni.cz, tel.: +420 728 460 417
Vozárová Zuzana, Mgr.	Virologický ústav SAV Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava zuzana.vozarova@savba.sk, tel.: +421 59 302 447
Vrábl Daniel, Mgr., Ph.D.	Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita 30. dubna 22, 701 03 Ostrava daniel.vrabl@osu.cz, tel.: +420 553 462 162, +420 597 092 162
Zachová Dagmar, RNDr.	CEITEC MU Kamenice 753/5, 625 00 BRNO dzachova@gmail.com, tel.: +420 606 727 747
Zástěra Jan, Mgr.	Carolina Biosystems, s.r.o. Klikatá 206, 252 25 Ořech jzastera@carolinabiosystems.com, tel.: +420 603 256 267
Žurovec Michal, Doc. RNDr., CSc.	BC AV ČR, v.v.i. Branišovská 31, 370 05 České Budějovice zurovec@entu.cas.cz, tel.: +420 387 775 283



bulletin

České společnosti experimentální biologie rostlin
a Fyziologické sekce Slovenské botanické společnosti

2014
6. Metodické dny
sborník abstrakt

ISSN 1213-6670