

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, Ústav experimentální botaniky
AVČR, Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc – Holice

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).

„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, 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 restrikční 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

Grant GAČR P501/12/2554

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 Masarykovy univerzity, Kamenice 5, 625 00 Brno

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

Acetylace rostlinných histonů (i histonů obecně) je jednou z prvních známých posttranslačních histonových modifikací ovlivňujících expresi genů. Acetylace 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 acetylace 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 digesci 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, 767 01 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, 613 00 Brno, Czech Republic

Email: 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 Tschermaks 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).

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, 783 71 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).

ŘÍZENÉ UMLČOVÁNÍ GENŮ 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 prekurzor 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 dostupní 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 linii 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.

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

NELA DAŇKOVÁ¹, RADKA SLOVAK², VILEM REINOHLE¹

¹CEITEC - Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

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

Email: 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).

Aplikace moderních biochemických a molekulárně-biologických metod na studium interaktomu telomerasy z *Arabidopsis thaliana*

Dokládá Ladislav^{1,2}, Benková Eva^{2,3}, Stanton Bruce Gelvin⁴, Sýkorová Eva^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., Královopolská 135, 61265 Brno

² Přírodovědecká fakulta a CEITEC Masarykovy univerzity, Kamenice 5/A2, 62500 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

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).

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.

Optimalizace de-novo sestavování transkriptomů získaných sekvenováním další generace (NGS)

Jana Drabešová J.¹, James D. Stone¹, Manuela Krüger¹, Helena Štorchová¹

¹Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 313, 16500 Praha 6, Česká republika

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 fotoperiodě).

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.

A DRAFT GENOME OF THE RECENTLY DISCOVERED PEAT BOG CYANOBACTERIUM

Petr Dvořák¹, Dale A. Casamatta², Petr Hašler¹, Aloisie Pouličková¹, Vladan Ondřej¹ & Remo Sanges³

¹Department of Botany, Faculty of Sciences, Palacký University Olomouc, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic, Email: p.dvorak@upol.cz

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

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

Synechococcus is one 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 AVČR, 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 krátkovlnné 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 fenyylpropanů 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. Vzorčky 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

Podporováno grantem MŠMT LD13051

6. METODICKÉ DNY – Komparativní analýza telomer a telomerázy u hybridů planých x kultivovaných odrůd bramboru

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

¹ Biofyzikální ústav AVČR, 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-580 01 Havlíčkův Brod

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 x 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)

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.

ROSTLINNÁ FOSFOPROTEOMIKA

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

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

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

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

⁴Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften-ISAAS-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).

IMAGING PLANT CELL UTRASTRUCTURE BY FIELD EMISSION SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

JINDŘIŠKA FIŠEROVÁ¹, MARTIN W. GOLDBERG²

¹ ÚMG AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1084, 140 00 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.

LARGE SCALE ORGANIZATION OF CHROMATIN IN PEA CENTROMERES.

IVA FUKOVÁ, PAVEL NEUMANN, JIŘÍ MACAS

Biologické centrum AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR

E-mail: ifukova@umbr.cas.cz, tel.: 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).

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

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

¹Biology Centre ASCR v.v.i, Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31, České Budějovice 370 05, Czech Republic.

²University 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

Abstract

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.

Keywords: *Humulus lupulus*, lupulin gland, miRNA, computational tools

Reference

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 (GACR 13-03037S) by the cooperative project FP7-REGPOT-2012-2013-1 MODBIOLIN No. 316304 and by institutional support RVO: 60077344.

The application of immunomodulation approach in the cytokinin signaling research

Zuzana Gelová¹, Matej Zabradý², Petra ten Hoopen³, Václav Motyka⁴, Udo Conrad³, Lubomír Janda² and Jan Hejátko¹

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

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

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

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

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 (*atZR_scFvs*). *Nicotiana tabaccum* stable transgenic lines ectopically expressing *atZR_scFvs* targeted to endoplasmatic reticulum (ER) (35S:KDEL-*atZR_scFv*) exhibited CK over-sensitizing response on meristematic levels. The 35S:KDEL-*atZR_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-*atZR_scFv* construct to upregulate CK signaling. Our results from *atZR_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 (*αAHP3_scFvs*), the member of CK signaling pathway were cloned from mice hybridomas producing anti-AHP3 monoclonal antibody. We have shown the ability of *αAHP3_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 *αAHP3_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 AVČR, Rozvojová 265, Praha6
KEBR PŘF UK, Viničná 5, Praha 2
email: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 (toxicitá 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

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 Řeha², Sandra Puehringer³, Olga Otrusínová¹, Séverin Jansen¹, Michal Kutý², Manfred S. Weiss³, Vladimír Sklenář¹, Jaromír Marek¹, Veronika Papoušková¹, Lukáš Židek¹, Ivana Kutá-Smatanová², Lubomír Janda¹ and Jan Hejátko¹

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

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

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

* Contributed equally

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.

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, 78701, Šumperk

E-mail: horacek@agritec.cz, tel.: 583382127

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 sekvencí, 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 spoluřešitelského 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, 165 02 Prague 6, Czech Republic

² Department of Biomedical Informatics, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno 2, Czech Republic

³ Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

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 multicompartiment 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.

PRECISE GENOME EDITING IN PLANTS

VOJTECH HUDZIECZEK

Institute of Biophysics, Kralovopolska 135, 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.

HIGH-THROUGHPUT BIOLOGICAL TESTING AND COMPLEX PLANT PHENOTYPING.

JAN F. HUMPLÍK¹, TOMÁŠ FÜRST², ALEXANDRA HUSIČKOVÁ³, 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, 78371, Olomouc, Czech Republic.

² Department of Mathematical Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 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, 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, 78371, Olomouc, Czech Republic.

Email: 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), thermoimaging 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.

Advanced Fluorescence Microscopy Techniques Investigating Membrane Organization and Dynamics

Jana Humpolíčková

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic

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.

STUDIUM VELOCE RDNA POLYPLOIDNÍCH ROSTLIN SPARTINA MARITIMA A SPARTINA ALTERNIFLORA POMOCÍ 454 SEKVENOVÁNÍ

DALIBOR HUSKA¹, JULIE FERREIRA DE CARVALHO², ANDREW LEITCH³, ILIA LEITCH⁴, MALIKA AINOUCHE², ALES KOVARIK¹

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

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

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

⁴Jodrell 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 ampliconů.

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 reprezentující 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 akceleroval u *S. alterniflora*, kdežto u *S. maritima* probíhá relativně pomalu.

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

ANNA CHMELAROVÁ, 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 repetice 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 sekvence z chromozomu 4F kostřavy luční (*F. pratensis*) vyříděného pomocí průtokové cytometrie. V sekvenačních datech bylo identifikováno 15 pravděpodobných TR a různé skupiny retroelementů a DNA transpozonů. 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 transpozonu, 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 repetice nalezených v Illumina sekvenačních 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., Čiháliková 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: ivanicova@ueb.cas.cz, tel.: 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 30 cM 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 DArT, 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 MSMT 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

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

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

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 obranou 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

¹INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BOTANY, CENTRE OF THE REGION HANÁ FOR BIOTECHNOLOGICAL AND AGRICULTURAL RESEARCH, Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc, Czech Republic

²LEIBNIZ INSTITUTE OF PLANT GENETICS AND CROP PLANT RESEARCH, Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany

E-mail: jerabkova@ueb.cas.cz, tel.: 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).

6. METODICKÉ DNY – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V MEMBRÁNOVÉ PROTEOMICE

PETRA JUNKOVÁ, LUCIE MARŠÁLOVÁ, RADOVAN HYNEK, OLGA VALENTOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 16628 Praha-6, ČR
E-mail: junkovap@vscht.cz, tel.: 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.

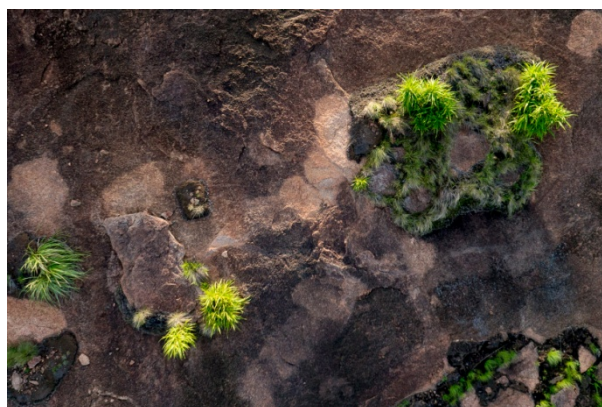
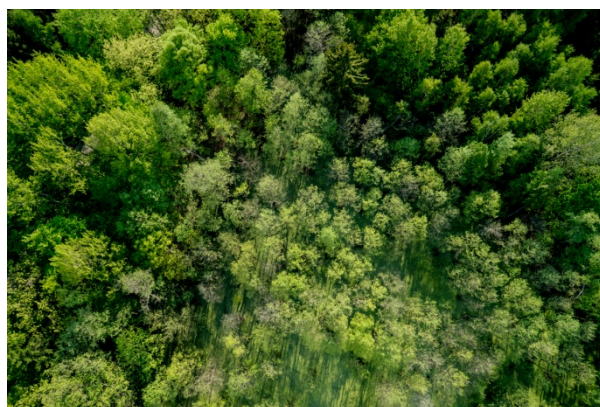
METODY ZOBRAZENÍ ROSTLIN V MIKRO A MAKROMĚŘÍTKU

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.: 723 119 339

Velké množství přírodovědeckých pozorování, ať již experimentálního, terénního nebo čistě náhodného původu, je spjato 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.



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., Kralovopolská 135, 612 65, Brno

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

Telomeráza je ribonukleoproteinový komplexem katalyzující syntézu telomerových repetit na koncích eukaryotických chromosomů. Skládá se z telomerové RNA (TR) a z proteinové podjednotky TERT s reverzně 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.

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

Finncování: 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

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 funkcí sehrává telomera při řešení tzv. problému replikace konců, kdy DNA polymeráza není schopná plně replikovat opoždující 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

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

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

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

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

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

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

⁷Department 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). Zatím co 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 tři dimenzionální 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 2 59410291

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., Slováková E., 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

¹Laboratoř reprodukce rostlin, Ústav experimentální botaniky AVČR, Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 Lysolaje, ČR

Email: 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 pletiv 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

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, JIRI BARTEK^{2,3} AND JOZEF ŠAMAJ¹

¹Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Cell Biology, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 783 71 Olomouc, Czech Republic

²Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, 779 00 Olomouc, Czech Republic

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

[*georgios.komis@upol.cz](mailto:georgios.komis@upol.cz)

Tel.: 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).

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 neobyčejnou variabilitu v přítomnosti na pohlavních chromozomech rostlin. Zatímco některé transpozony jsou homogenně rozprostřeny 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 inserci jedné z rodin Ogra do chromozomu Y. Strukturní podobnost Ogrů a absence pozitivní selekce uvnitř Ogr elementů naznačuje, že se tyto tři rodiny neliší ani v mechanismu retrotranspozice, výběru míst pro inserci nebo interakcích s hostitelem. Naopak studium transkriptomu ukázalo, že Ogré chybící na chromozomu Y produkuje asi 10x více 24 nukleotidů dlouhých malých RNA (siRNA) než ostatní Ogry. 24 nukleotidů dlouhé siRNA 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 samčí a samičí zárodečné linii a během časné embryogeneze.

Kubat Z, Zluvova 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

Irena 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, 710 00 Ostrava 10, CZ

² Global Change Research Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, CZ
E-mail: Irena.Kurasova@osu.cz, tel.: 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

¹Biology Centre ASCR v.v.i, Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31, České Budějovice 370 05, Czech Republic;

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

³Hop Research Institute, Co. Ltd., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, Czech Republic;

⁴Institute of Physical Biology, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, D-40204 Düsseldorf, Germany; 3Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne, Germany;

⁵Faculty 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.L., 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

Email: jinmat@centrum.cz; andre.j@email.cz

Neocenitelnou pomůckou pro studium buněčných dějů jsou fluorescenčních 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 následné 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 ozáření 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 D δ (PLD δ), která se účastní řady fyziologických i stresových pochodů a je také považována za spojovací můstek mezi plazmatickou membránou a mikrotubulárním cytoskeletem.

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 QoI-sensitive, G143) (FN552765.1) a mutantní alely (strobilurin fungicide QoI-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 *AluI* 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 QoI 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-Svobodová 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 QoI fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. Journal of Plant Diseases and Protection, 117, 248–252.

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

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

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

²Botanický ústav AV ČR, Zámek 1, 252 43 Průhonice, ČR

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

E-mail: vmotyka@ueb.cas.cz, tel.: 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 pletivy/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, gibereliny, 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}

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

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

³Institute of Biophysics ASCR, 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 sexpressing *FAS* cDNA but no recovery of telomere of rDNA repeats was observed. On the contrary, additional loss of rDNA continued.

Mozgova 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, 625 00, Brno

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

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 (*pprad50*, *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).

Identifikace centromerických DNA sekvencí pomocí metody ChIP-seq a klastrovací analýzy

PAVEL NEUMANN

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

E-mail: neumann@umbr.cas.cz, tel.: 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 DNA ³.

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.

VYUŽITÍ METACENTRA PRO ANALÝZU BIOLOGICKÝCH DAT

PETR NOVÁK¹

¹ BC AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ČR

E-mail: petr@[umbr.cas.cz](mailto: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.

SHADED ROOTS: A NOVEL ROLE OF CYTOKININ IN PHOTOMORPHOGENESIS?

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

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-613 00 Brno, Czech Republic
E-mail: jan.novak@mendelu.cz, tel.: 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.

HIGH-RESOLUTION CELL-SPECIFIC ANALYSIS OF PHYTOHORMONES

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

¹ LRR, CRH, ÚEB AVČR & PřF UP, Šlechtitelů 11, 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.: 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., Hénýková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., Ljung, K.: 2012 - *Plant J*, 72:523-536

Pěňčík A., Simonovic B., Petersson S.V., Hénýková 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.

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 AVČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha - Lysolaje, ČR

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

E-mail: mironov@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 nekrotizací 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, 142 20 Prague, Czech Republic

3-Research Institute of Crop Production, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ružyně, Czech Republic

*E-mail: viruslno@savba.sk, Tel.: +421 2 59302 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 *ntpII*.

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

Gen *ntpII* 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 fosforylaci 3'-hydroxylové skupiny určitých aminoglykosidů jako je kanamycin, neomycin, geneticin (Miki a McHugh, 2004). Seleční gen *ntpII* 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.

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.: 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.

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 glyceralddehyd-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 tři 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.: 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 byli tři modifikace CTAB izolační metody, dvě modifikace dodecylsírany 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 (Dynex), 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 - Uživatelský vzor, č. 25678.

Podporováno centrem kompetence TAČR TE02000177

MODIFICATION OF LINSEED OIL COMPOSITION USING CONSTRUCT TO INDUCE GENE SILENCING

Pavelková Michaela¹, Hanáček, Pavel², Griga Miroslav¹

¹ AGRITEC Ltd., Plant Biotechnology Department, Zemědělská 16, CZ-787 01, Šumperk, Czech Republic

² Mendel University, Department of Plant Biology, Zemědělská 1, CZ-613 00, 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.

Key words: flax, transformation, *A. tumefaciens*, post-transcriptional gene silencing, oleic acid

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, 14220 Prague 4 (Krč), Czech Republic

² The Stentor Institute, Hostivice-Palouky 614, 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

* (presenting author) 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 (~1 µm 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.

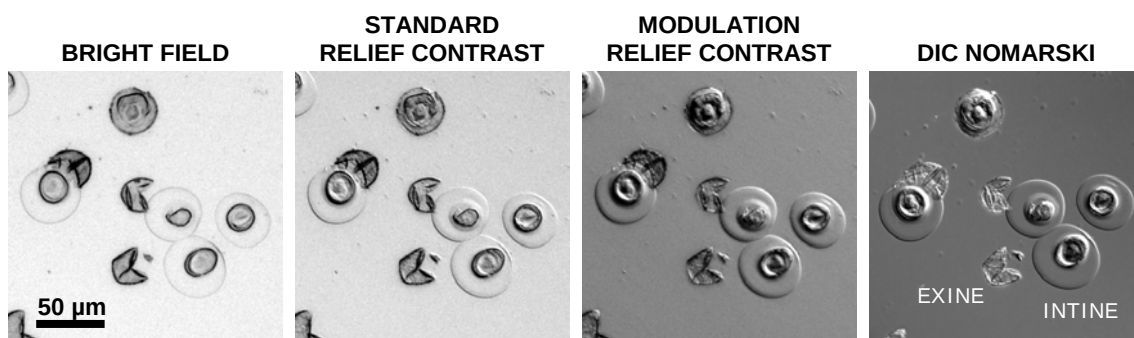


Fig. 2 Unstained osmotically swollen pollen grains of European yew (*Taxus baccata*) in water. The process of exine rupture and intine release is documented here (inverted microscope configuration was employed). Objectives x40/0.75 (DIC Nomarski) and x10/0.30 (all other images). Raw-image ID: 2009-08-29_*

[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/KOEF 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, 961 44 Lednice, ČR

E-mail: eliska.penazova@mendelu.cz, tel.: 519 367 247

Virus mozaiky tuřinu (TuMV) spolu s virem žluté mozaiky tuřinu (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 pekingského 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.

IN-VIVO FLUORESCENCE MACROSCOPY IN PLANTS.

MARKÉTA PERNISOVÁ

LMFR, CEITEC Masarykova Univerzita, Kamenice 5 – A2, 625 00 Brno, ČR

E-mail: pernisov@sci.muni.cz, tel.: 549496470

Many microscopic techniques exist in plant biology and microscopic slides are necessary to use usually. Together with Nikon company we developed horizontally oriented confocal macroscope 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 macroscope 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.

OPTICAL SECTIONING OF PLANT SAMPLES WITH FLUORESCENCE MICROSCOPY

JAN PETRÁŠEK^{1,2}

¹Charles University, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR

²Institute of Experimental Botany, AS CR, Rozvojová 263, 152 02 Praha 6, ČR

E-mail: petrasek@ueb.cas.cz, tel.: 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.

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, Slechtitelu 31, 783 71 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, Slechtitelu 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic
E-mail: petrovska@ueb.cas.cz, tel.: 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).

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, Česká republika*

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. Hrubo zrnné (*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.

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

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 telomerách *A. thaliana* (Cokus et al., 2008).

Studovali jsme metylaci cytosinů v telomerách 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 PŘEROSTOVÁ^{1,3}, RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹

¹ ÚEB AV ČR, 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.: 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. Dvnitř 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 AVČR, Rozvojová 263, 161 06 Praha, ČR

³ ČZU, Kamýcká 129, 169 21 Praha, ČR

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

Abstrakt

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 (Grebavka 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)“

CURRENT METHODOLOGY IN PLANT EPIGENETIC ANALYSIS

José Luis Rodríguez¹, Boris Vyskot¹

¹Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic.

Epigenetic research is at the forefront of plant biology and molecular genetics. Studies on higher plants underscore the significant role played by epigenetics in both plant development and stress response. The epigenetic mechanisms include DNA methylation, post-translational modifications of histone proteins and non-coding silencing RNA, which serve to regulate the transcription of certain genes, transposons and repetitive sequences. Their influence on a specific physiological situation involves the use of precise analysis techniques and a correct interpretation of the individual data.

Classical approaches to analyse DNA methylation and histone post-translational modifications (PTMs) include global quantification based on high-performance separation techniques like HPLC or HPCE and on antibody, ELISA-like and Western blot detection. These techniques were commonly used as markers in different developmental or physiological situations. Immunostaining represents an alternative quantifying the signal by imaging software and including the possibility to show tissue and chromosomal specific patterns. Nevertheless, relatively recent advances in analytical methodology have allowed a significant expansion of what is known about genome-wide mapping of DNA methylation and histone modifications as the main but not the only epigenetic marks. With the advent of high-throughput sequencing methods, it is now routine to measure the genome-wide distribution of epigenetic marks, and these genome-wide patterns are providing insights into evolutionary processes. The four most frequently used sequencing-based technologies for DNA methylation analysis are the bisulfite-based methods: MethylC-seq and reduced representation bisulfite sequencing (RRBS), and the enrichment-based techniques: methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq) and methylated DNA binding domain sequencing (MBD-seq). The combination of these techniques with methylation-sensitive restriction enzyme sequencing (MRE-seq), allows the detection of regions with allele-specific epigenetic states. Histone PTM profiling is achieved by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) using antibodies for every modification and for high-throughput analysis of small RNAs (sRNAs) next generation sequencing has been shown as an effective approach as well.

Mass spectrometry has quickly been accepted as a versatile tool to achieve insights into chromatin biology and histone post-translational modifications (PTMs). High sensitivity and high mass accuracy and the ability to sequence post-translationally modified peptides and perform large-scale analyses make this technique very well suited for histone protein characterization. There are three major MS based strategies for histone characterization and the main difference lies on the fragmentation of the protein. The most commonly used approach is the small peptide analysis by mass spectrometry, known as the 'bottom-up' approach. The second approach is known as the 'top-down' strategy, mapping co-existing PTMs located far apart within the histone sequence. A third strategy for histone analysis is the 'middle-down' approach which has the ability to analyse the majority of the PTMs of the histone. This approach is a suitable compromise between the bottom-up and top-down methods, reducing technical challenges of intact histone analysis while preserving a semi-global overview of coexisting modifications.

These advances in mass spectrometry allowed the identification of novel proteins interacting with the DNA and new histone PTMs. The analysis of these interactions requires, besides immunoprecipitation techniques, affinity purification and hybridization. Together with proteomics approaches novel chromatin studies can be applied. There are currently two major ways to approach this; the first is to use a transcription factor, histone, or DNA binding protein to isolate a specific chromatin region, and analyse the proteome associated with that particular chromatin region (ChIP-like methods). In this approach we can find: modified chromatin immunoprecipitation (mChIP), chromatin-interacting protein mass spectrometry (ChIP-MS) and chromatin proteomics (ChroP). The second uses a specific genomic DNA sequence to extract a target chromatin segment for analysis of the entire associated proteome, and is considered a locus-specific method. Here, all identified proteins bind to the specific DNA locus targeted for analysis, finding: proteomics of isolated chromatin segments (PICH) and chromatin affinity purification with mass spectrometry (ChAP-MS)

In our presentation we will review the different techniques to analyse modification patterns in plant epigenetics, and novel techniques based on the combination of classical approaches and new methods using micro- and nanoscale devices and explore their use in the study of DNA and chromatin modifications in plants.

6. Metodické dny – Charakterizace proteinů asociovaných s telomerázou

Šárka Schořová

Masarykova univerzita v Brně a Výzkumná skupina Molekulární komplexy chromatinu

Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC, e-mail: 376269@mail.muni.cz

Významným enzymem účastnícím se prodlužování nedoreplikovaných lineárních chromozomů eukaryotických konců-telomer je telomeráza, která je tvořená 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 (Schrumpfova et. al. 2014). TRB proteiny navíc přímo interagují s proteinem Pot1b, který je homologem lidského proteinu Pot1 vázajícího se na jednovláknová přesah telomer.

Avšak telomeráza neplní v organismu jen funkci spojenou s prodlužováním telomer (telomerickou funkcí), 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.

IN VIVO FLUORESCENCE PROBES FOR PLANT BIOLOGY

KATEŘINA SCHWARZEROVÁ

Department of Experimental Plant Biology, Faculty of Science, Charles University Prague, Viničná 5, 12844 Praha 2, Czech Republic

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.

ANALYSIS OF KINASE ACTIVATION OF HOP TRANSCRIPTION FACTOR *HIWRKY1* AS A PART OF NETWORK REGULATING LUPULIN BIOSYNTHESIS.

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

¹Biology Centre ASCR v.v.i, Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31, České Budějovice 370 05, Czech Republic.

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 *HIWRKY1* factor for gene expression of some key enzymes especially o-methyl transferase, which is necessary for the synthesis of xanthohumol, and therefore *HIWRKY1* regulate biosynthesis of prenylflavonoids in hop lupulin gland. We are testing the promoters activity of the genes for key enzymes when exposed *HIWRKY1* and in addition, our aim is also to characterize the regulatory network acting on *HIWRKY1* factor itself. In transient expression system, the interaction between *HIWRKY1* and *HIWDR1* TFs showed a co-activation and further *HIWRKY1* is stimulated by silencing inhibitors, particularly p19 and HCPro. The activity of *HIWRKY1* 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 expression of *HIWRKY1* and to analyse the extent of which phosphorylation affects the activity of *HIWRKY1* factor we used transient expression system using two kinases (*SIPKV* and *AtPRK2*) from tomato and *Arabidopsis*. We designed a construct where the *HIWRKY1* is fused with GFP at the C-terminal end of *HIWRKY1* to further study of the mechanism of *HIWRKY1* network. The expression level in *N. benthamiana* was evaluated in protein and RNA levels. We used the protein extracts from *N. benthamiana* containing *HIWRKY1* 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 *HIWRKY1* protein and the influence of silencing inhibitors on *HIWRKY1* 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 TĚPLOTNÍ 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.: 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 odpovědi 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 transgenní 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 proteomické úrovni. 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 kyselin

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

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

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

Tato práce vznikla za podpory grantu 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, E-mail: petr.smykal@upol.cz

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

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 and 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.

References:

- Hammer K. (1984) Kulturpflanze 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: smykalova@agritec.cz, tel.: 583382120

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 morfologii 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 Souček¹, Zuzana Medved'ová¹, Dušan Turek¹, Jiří Volf², Pavel Klimeš¹, Pavel Mazura¹

¹ Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, 61300 Brno

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

E-mail: soucek@mendelu.cz, tel.: 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 organizmech. 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

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 polymorfizmů 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*. Skríníng BAC knihovny z ramene 7DS umožnil identifikaci kontigu v 7DS-specifické fyzické mapě, který kompletně překrývá oblast genu. BAC klonů 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, ASVCR. james.stone@ibot.cas.cz

2) Department of Biology, Colorado State University. dbsloan@rams.colostate.edu

3) Institute of Experimental Botany, ASVCR. 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 Pekárová¹, Lukáš Žídek¹, Hideo Iwai² and Jan Hejátko¹

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

²2Institute of Biotechnology, Viikinkaari 1 (P.O.Box 65) 00014, University of Helsinki, Finland

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).

VYUŽITÍ BIONANO MAPOVÁNÍ PRO ANALÝZU A SEKVENOVÁNÍ ROSTLINNÝCH GENOMŮ

HANA ŠIMKOVÁ¹, ALEX HASTIE², HELENA STAŇKOVÁ¹, JAN VRÁNA¹, PAUL VISENĎI³, SATOMI HAYASHI⁴, JACQUELINE BATLEY⁴, DAVID EDWARDS³, JAROSLAV DOLEŽEL¹

¹Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 31, 78371, Olomouc, ČR

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

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

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

E-mail: simkovah@ueb.cas.cz, tel.: 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 (shrnutí 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 nanokanálků na mikročipu. Důležitá je dokonalá linearizace molekul DNA. Vysoká 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 RK, 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.

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, 16500 Prague 6, Czech Republic

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

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).

6. METODICKÉ DNY – ADVANCES IN METHODS OF ANALYSIS OF SELECTED PLANT HORMONES

DANUŠE TARKOWSKÁ¹, MIROSLAV STRNAD¹

¹ Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. and Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic
E-mail: tarkowska@ueb.cas.cz, tel.:585 634 858

Probably most organisms use chemical signals in cell–cell communication. Coordination of the growth and development of the cells, tissues and organs, as well as the environmental responses of complex multicellular organisms, require increasingly intricate signalling networks. Unlike animals, plants, lacking motility, never developed a nervous system, but they did evolve hormones as chemical messengers.

Brassinosteroids (BRs) are a group of extremely low abundant (fg-pg/g) naturally occurring signalling molecules with a steroidal structure (Fig. 1) belonging to plant hormones (Caño-Delgado *et al.*, 2004).

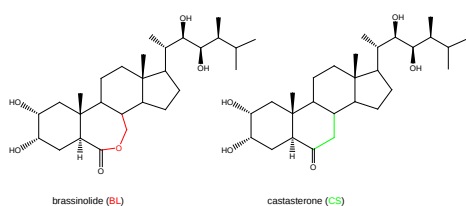


Fig 1. Structures of the most biologically active naturally occurring brassinosteroids

BRs are essential growth regulators that are widespread in the plant kingdom and have structures similar to those of animal steroid hormones. Similar to their animal counterparts, BRs influence many physiological processes throughout the plant life cycle, including germination, organ elongation, timing of senescence and flowering, male fertility and increased tolerance to stress caused by temperature, water, or salinity (Fujioka *et al.*, 1997). Initially, immunoassays and bioassays were mainly used for detecting BRs (Takatsuo and Yokota 1999). Later, immunological methods such as RIAs and ELISAs have also been used for exploring the distribution of BRs in plant tissues (Horgen *et al.*, 1984; Yokota *et al.*, 1990). Several hyphenated (GC–MS and LC–MS) techniques were also gradually introduced. Since BRs are not volatile they must be derivatised prior to GC–MS analysis. The standard derivatisation procedure is based on formation of bis-methaneboronates of BRs with vicinal diol groups (e.g. BL and CS; (Fujioka *et al.*, 1997). Several LC methods have been also published for determination of BRs (Svatoš *et al.*, 2004; Huo *et al.*, 2012).

Gibberellins (GAs) are a class of diterpenoid carboxylic acids (Fig. 2) that include biologically active compounds produced by various microbes (fungal and bacterial) and lower as well as higher plants, where they are endogenous growth regulators.

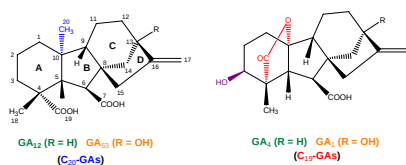


Fig 1. Structures of C₁₉ and C₂₀ gibberellins

Like other classes of plant hormones, concentrations of GAs in plant tissues are usually extremely low (generally pg/g FW). Thus, very sensitive analytical methods are required for their detection. However, levels of GAs may vary substantially even within a plant organ. Vegetative tissues (stems, roots and leaves) typically contain several pg/g FW, while reproductive organs (such as seeds and flowers) often have three orders of magnitude higher levels (i.e. ng/g FW). The first methods for GA analysis were based on GC–MS determinations of volatile methyl ester trimethylsilyl ether derivatives (Pryce *et al.* 1967). This approach is still used in some laboratories for quantifying and identifying GAs as it is highly sensitive. However, LC–MS is becoming more popular for quantitative analysis of GAs, mainly because it avoids derivatisation requirements (Varbanova *et al.*, 2007; Ayele *et al.*, 2010; Urbanová *et al.*, 2013).

Ayele B.T., Magnus V., Mihaljević S., Prebeg T., Čož-Rakovac R., Ozga J.A., Reinecke D.M., Mander L.N., Kamiya Y., Yamaguchi S., Salopek-Sondi B. (2010) *J. Plant Growth Regul.* 29:194–209. DOI: [10.1007/s00344-009-9124-5](https://doi.org/10.1007/s00344-009-9124-5)

Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K.H., Li J., Chory J. (2004) *Development* 131, 5341–5351. DOI: [10.1242/dev.01403](https://doi.org/10.1242/dev.01403)

Fujioka S., Sakurai A. (1997) *Nat. Prod. Rep.* 14, 1–10. DOI: [10.1039/NP9971400001](https://doi.org/10.1039/NP9971400001)

Horgen P.A., Nakagawa C.H., Irvin R.T. (1984) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62:715–721. DOI: [10.1139/o84-093](https://doi.org/10.1139/o84-093)

Huo F., Wang X., Han Y., Bai Y., Zhang W., Yuan H., Liu H. (2012) *Talanta* 99:420–425. DOI: [10.1016/j.talanta.2012.05.073](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.073)

Pryce R.J., MacMillan J., McCormica A. (1967) *Tetrahedron Lett.* 8:5009–5011

Svatoš A., Antonchick A., Schneider B. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18:816–821. DOI: [10.1002/rcm.1413](https://doi.org/10.1002/rcm.1413)

Takatsuo S., Yokota T. (1999) Biochemical analysis of natural brassinosteroids. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD (eds) *Brassinosteroids*. Springer, Tokyo, pp 47–68. DOI: [10.1007/978-3-642-22144-6_174](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_174)

Urbanová T., Tarkowská D., Novák O., Hedden P., Strnad M. (2013) *Talanta* 112:85–94. DOI: [10.1016/j.talanta.2013.03.068](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.068)

Varbanova M., Yamaguchi S., Yang Y., McKelvey K., Hanada A., Borochoy R., Yu F., Jikumaru Y., Ross J., Cortes D., Je Ma Ch., Noel J.P., Mander L., Shulaev V., Kamiya Y., Rodermel S., Weiss D., Pichersky E. (2007) *Plant Cell* 19:32–45. DOI: [10.1105/tpc.106.044602](https://doi.org/10.1105/tpc.106.044602)

This work was supported by EU funding Operational Program Research and Development for Innovations (ED0007/01/01) the Czech Grant Agency (grant no. 14-34792S), and the program “Návrat” for Research, Development, and Innovations (grant. no. LK21306), which is funded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic further financially supported this work through the National Program of Sustainability (grant no. LO 1204).

USING IN VITRO KINASE ASSAY FOR DETERMINING ENZYME SPECIFICITY

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

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

²Leibniz 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 Travnickova^{1,3}, Luz Elita Balcazar Terrones², Iva Viehmannova³, Petra Hlasna Cepkova³

¹Crop Research Institute, Czech Republic,

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

³Department 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, Laboratoř patofyziologie rostlin, Rozvojová 313, 165 02 Praha 6 – Lysolaje
email: 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 nekrózu 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 -glukurodinasu (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 buněk 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 vlásenkový 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 $Zn(II)_2Cys_6$ 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: xtrojanezk@fch.vubr.cz, tel.: 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 VISENĎ³, 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- 783 71, 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

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 sekvence. 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 skrínk 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 reprezentujících 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 sekvence 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 10-denního 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 obecného (*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 odebírán 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 x stresované) a ošetření (ošetřené pouze vodou s přísadkou Tweenu x ošetřené vodným roztokem 24-EPI s přísadkou 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, 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.

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

Joerg Vandenhirtz*, Matthias Eberius, Dirk Vandenhirtz, LemnaTec Germany
LemnaTec, 59 Pascalstr., Aachen 52076 Germany, joerg@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.

PŘÍJEM A TRANSPORT FOSFÁTU – HORMONÁLNÍ INTERAKCE

GABRIELA KUREŠOVÁ¹, MARIE TRČKOVÁ¹, PETRE DOBREV², SYLVA PŘEROSTOVÁ², ALENA GAUDINOVÁ²,
RADOMÍRA VAŇKOVÁ²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ČR

²Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ČR
email: vankova@ueb.cas.cz, tel.: 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.

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 diverzity 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 F_9 až F_{12} 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.

SEPARATION OF NEUTRAL AND ACIDIC MONOSACCHARIDES BY HPAEC-PAD

ZUZANA VATEHOVÁ, ZUZANA KOŠŤÁLOVÁ, 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 oxyanions, 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. x 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, Kralovopolská 135, 612 65 Brno, ČR
E-mail: ivogel@fit.vutbr.cz, tel.: 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.

References:

- 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 VHLKOSTI NA PRŮBĚH DESIKACE SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU

VONDRÁKOVÁ ZUZANA, ELIÁŠOVÁ KATEŘINA, TRÁVNÍČKOVÁ ALENA, BEČVÁŘOVÁ PAVLÍNA, CVIKROVÁ MILENA

ÚEB AVČR, 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 (18⁰, 25⁰ a 30⁰C) 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.

NOVÁ METODA PRO STANOVENÍ AFINITY VAZBY PERIFERNÍHO PROTEINU K PLASMATICKÉ MEMBRÁNĚ

STANISLAV VOSOLSOB¹, KATEŘINA SCHWARZEROVÁ¹, JAN PETRÁŠEK^{1,2}

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

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

E-mail: Vosolsob@natur.cuni.cz, tel.: 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 stanovení 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.

ŠTÚDIUM INTERAKCIÍ PROTEÍNU P1 VÍRUSU ŠARKY SLIVKY S PROTEÓMOM HOSTITEĽSKEJ RASTLINY S VYUŽITÍM DVOJHYBRIDNÉHO SYSTÉMU

ZUZANA VOZÁROVÁ¹, ZDENO ŠUBR¹

¹Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, SR

Email : zuzana.vozarova@savba.sk Tel: +42159302447

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.

Sekvencie 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 A_N 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 ATERT 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

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.

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.

References:

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