

4. METODICKÉ DNY

HOTEL HORIZONT, ŠUMAVA
1.–4. ŘÍJNA 2006

VĚDECKÁ RADA SYMPOZIA

Aleš Kovařík (BFÚ AVČR)
Jiří Macas (ÚMBR AVČR)
Jan Martinec (ÚEB AVČR)
Jan Petrášek (ÚEB AVČR, PřFUK)
Olga Valentová (VŠCHT Praha)
Eva Zažimalová (ÚEB AVČR)

ORGANIZAČNÍ TÝM

Tomáš Feltl
Miloslava Fojtová
Aleš Kovařík
Jiří Macas
Jan Martinec
Přemysl Pejchar
Jan Petrášek
Roman Pleskot
Olga Štajnrtová
Štěpánka Veselková



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



Milé kolegyně, vážení kolegové,
účastníci a účastnice 4. metodických dnů,
členky a členové České společnosti experimentální biologie rostlin i Fyziologické sekce
Slovenské botanické společnosti,
náhodní čtenáři,

je to poprvé, kdy forma tohoto Bulletinu je naplněna abstrakty a příspěvky vědecké konference. Vážím si tohoto nápadu, s nímž přišli organizátoři uvedené konference, jmenovitě pak kolega Martinec. Doufám, že obálka Bulletinu bude důstojným rámcem pro seznámení všech zájemců s náplní konference.

Na druhé straně jsem si jist, že pro samotný Bulletin znamená tento obsah významný posun k tomu, aby se i tato publikace stala zajímavou a užitečnou nejen pro její autory, ale především pro širokou vědeckou obec experimentálních biologů rostlin na Slovensku a v Česku.

Dovolují si využít příležitosti, kdy nejen dosavadní čtenáři tohoto Bulletinu, ale nepochybě všichni účastníci konference se nejen vědomě podívají na obálku, ale i s různou pozorností prolistují obsah tohoto čísla. Chtěl bych připomenout některé **záměry redakční rady**. Záměry, které jsme zatím uměli uskutečňovat spíše s menším než dostatečným zdarem. Ale zároveň záměry, o jejichž životoschopnosti jsme ještě pořád přesvědčeni a které chceme ještě pořád přeměnit v atraktivní obsah Bulletinu.

Česká společnost experimentální biologie rostlin (a patrně i Fyziologická sekce Slovenské botanické společnosti, za niž však nemohu vystupovat) zatím není organizací, která by mezi svými členy i profesně blízkými nečleny požívala uznání nepostradatelnosti nebo aspoň nenahraditelné prospěšnosti. S tím možná trošičku souvisí i problémy Bulletinu. Ale v nejbližší budoucnosti se chceme znova pokusit o to, aby také Bulletin, byť nejen tento, přispěl k získání alespoň částečného pozitivního ohlasu u naší stavovské organizace. Prosím Vás proto o trochu Vašeho času na přečtení i následujících řádků.

Také po první pentádě 21. století vychází náš Bulletin s nesmyslným časovým skluzem a zpožděním. Tím i aktuálně napsaný příspěvek se stává archivní vzpomínkou. Věřím, že tento nezdůvodnitelný nedostatek brzy odstraníme. Potenciální přispěvovatele proto prosím, aby se tímto formálním, byť zásadním, nedostatkem nedali odradit od napsání svého příspěvku.

A o čem chce Bulletin psát? To je naznačeno již v několika minulých číslech. Připomenu alespoň několik témat:

V minulém čísle byl uveřejněn cenný příspěvek profesora J. Krajčoviče z Bratislavы, který velmi kvalifikovaně připomněl **100. výročí od formulace endosymbiotické teorie** vzniku chloroplastů a mitochondrií. Věřím, že zájem čtenářů vzbudil také poutavý příspěvek L. Adamce o **masožravých rostlinách**. Nemá smysl pokoušet se o publikace původních vědeckých prací. Ale může být cenné uveřejňovat obecněji zajímavé informace, přehledy či zamýšlení.

Jinou oblast představuje příspěvek F. Plháka, který velmi podrobně popsal celou **historii Katedry anatomie a fyziologie rostlin Masarykovy Univerzity** v Brně. Zásluhou tohoto autora dokonce v následném čísle vyjde úplný seznam všech diplomových prací obhájených na uvedené katedře. A připraven je obdobně zaměřený příspěvek J. Šebánka o **Katedře na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě** v Brně či velmi atraktivní **vzpomínání profesora L. Pastýrika** na profesora Bohumila Němce. Zdá se mi, že toto kvalifikované



historické vzpomínání opírající se o solidní faktografické zdroje i osobní vzpomínky představuje skutečně jedinečný přínos Bulletinu. Proto uvítáme i další.

S předchozím tématem souvisejí vzpomínky na významné osobnosti našich vědních oborů v Česku i na Slovensku. Zřejmě nenajdeme autory, kteří by mohli podrobnějšími životopisy postihnout všechny naše významné seniory. Proto chceme zavést alespoň **krátká připomenutí významných jubileí všech našich kolegyně a kolegů**, a to formou jedné fotografie a jen s uvedením jména, pracoviště a data narození. Tato galerie našich jubilantů by v delším časovém období trvale připomínala prakticky všechny naše významné osobnosti experimentální biologie, protože všichni máme svoje životní jubilea a všichni stárneme. Tak jen prosím vnímadlové kolegyně a kolegy, aby nám fotografie jubilantů posílali i s onou minimální informací, tedy i s minimální vloženou energií či ztrátou času.

Průběžné **informace o obhájených diplomových a dizertačních pracích** by mohly představovat další trvalou oblast Bulletinu. Zveřejněním stručného abstraktu – vesměs jen převzatého z diplomové či dizertační práce – s minimálními doplňky o pracovišti, autorce či autorovi a vedoucích či školitelích – by mohla být jinou formou uvedení mladých vědců do naší komunity. Zároveň by to byla velmi aktuální informace o právě probíhajícím výzkumu na našich pracovištích. Opět prosím diplomanty i -ky, dizertantky i -ty a jejich vedoucí či školitele: Posílejte nám tyto informace bezprostředně po obhajobách.

Je mnoho dalších oblastí, které mohou učinit z Bulletinu zajímavé čtení a zároveň i cenný zdroj informací o současnosti i minulosti našich vědních oborů na Slovensku a v Česku. Například **volná zamýšlení** věnovaná spolupráci **teorie a praxe** nebo **problémům výuky** v bakalářském, magisterském i doktorském studiu. Ale třeba také **úsměvné postřehy** podobné těm, které do předchozího čísla Bulletinu poslal A. Lux z Japonska.

Omlouvám se organizátorům i účastníkům 4. metodických dnů, pokud mají pocit, že jsem zneužil obsahovou náplň tohoto čísla k tak obsáhlému úvodu. Omlouvat se mohu jedině tím, že jediným důvodem je stále ještě moje přesvědčení, že naše stavovská organizace a tento Bulletin mají pořád ještě svoje opodstatnění. Pokud ovšem fungují tak, aby svým členům a čtenářům poskytly zajímavé, užitečné a nezastupitelné informace. A k tomuto cíli může přispět doslova jeden každý z Vás.

Děkuji Vám a těším se na budoucí spolupráci v rámci naší organizace i v tomto Bulletinu.

Účastníkům 4. metodických dnů přeji příjemné a podnětné jednání.

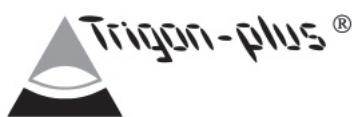
Září 2006

Lubomír Nátr





SYMPOZIUM SE KONÁ DÍKY FINANČNÍ PODPOŘE TĚCHTO FIREM:



OBSAH

Úvodní slovo ke 4. metodickým dnům	5
Program	6
Přednášky (řazeny podle programu)	8
Plakátová sdělení (řazena abecedně podle příjmení prezentujícího autora) ..	52
Rejstřík autorů	112
Seznam účastníků	113

ÚVODNÍ SLOVO KE 4. METODICKÝM DNŮM

Vážení přátelé,
dostalo se mi té cti napsat pář slov úvodem do sborníku ze 4. metodických dnů věnovaných rostlinné experimentální biologii. Rád bych jen čtenářům připomenul, že jde opravdu již o čtvrté pokračování série setkávání především mladých vědců působících v rostlinném výzkumu či na vysokých školách. Nemám k dispozici statistiku, ale mohu doporučit návštěvu sympatických webových stránek <http://www.ueb.cas.cz/methods>, kde najdete informace o minulých, současných i budoucích setkáních a dokonce i sborníky s fotodokumentací. Položím si řečnickou otázku, kdo za touto záslužnou a altruistickou aktivitou stojí a pokusím se na ni hned odpovědět. Jsou to úctyhodní členové vědecké rady a organizačního výboru, lidé převážně z prostředí Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze. Dle mých dlouholetých znalostí tohoto pracoviště a jeho skvělých výzkumníků se domnívám, že za myšlenkou svolávání Metodických dnů musela stát jeho dobrá duše – Ivana Macháčková.

Myšlenka pořádat setkání mladých výzkumníků je skvělá a snad je též optimální společný jmenovatel, metodika experimentální práce s rostlinami. Organizátoři se však neomezují jen na nové metody či technologie, ale pravidelnou součástí těchto konferencí jsou i všeobecné přednášky z rozmanitých oblastí biologických věd. Hlavním cílem Metodických dnů jsou však setkání jako taková, osobní kontakty mezi kolegy, která vedou nejen k výměně cenných vědeckých informací ale též k vytváření dobrého společenského zázemí v rostlinných vědách. Jako pedagog vidím v neposlední řadě význam této akce pro začínající výzkumníky a především doktorandy: jde často o jejich první příležitost přednест a obhájit vlastní vědeckou práci na širším plénu.

Jmérem pravidelných účastníků Metodických dnů děkuji organizátorům za skvělou práci a přeji nám všem, aby tradice těchto oblíbených setkání i nadále vzkvétala.

V Brně dne 28. srpna 2006

prof. Boris Vyskot
Laboratoř vývojové genetiky rostlin
Biofyzikální ústav AV ČR

P Program

NEDĚLE 1. 10. 2006

16.00–19.30	Registrace
18.30–19.30	Večeře
19.30–19.45	Zahájení sympozia
	Sekce Z jiných světů
19.45–21.15	M. Vácha: Vznik života na Zemi – evoluce nebo stvoření? A. Markoš: Příběh vzniku života
22.00	Noční kino
0.00	Kino o půlnoci

PONDĚLÍ 2. 10. 2006

7.30– 8.15	Registrace
	Sekce Bioinformatika a modelování (předseda P. Smýkal)
8.15– 9.00	M. Lexa: Bioinformatika si hľadá miesto na pomedzí biológie, lingvistiky a informatiky 8
9.00– 9.40	M. Potocký: Bioinformatické nástroje pro biology a jiné neinformatiky 8
9.40– 9.55	M. Talianová: Teoretické základy molekulárnej fylogenetiky 9
9.55–10.10	E. Michu: Molekulárne-fylogenetická analýza v praxi 12
10.10–10.40	Přestávka, prezentace firem, registrace
10.40–11.20	C. Vogl: Hybrid origin of the tetraploid <i>Achillea alpina</i> and <i>A. wilsoniana</i> detected by newly developed Bayesian methods 15
11.20–11.35	A. Kovařík: „Epigenom“ a metody jeho analýzy 15
11.35–12.00	J. Macas: Identifikace LTR-retroelementu v genomických sekvencích 16
12.00–13.30	Oběd
	Sekce Z jiných světů
13.30–14.15	M. Flegel: Vývoj a výroba peptidů v běhu času 16
	Sekce Bioinformatika a modelování (předseda J. Macas)
14.15–14.40	V. Žárský: Úvod do diskuze o přístupech systémové biologie 17
14.40–14.55	K. Hoyerová: Matematické modelování toku auxinu buňkou 17
14.55–15.25	Přestávka, prezentace firem
	Sekce O „nomech“ v praxi – genom (předseda A. Kovařík)
15.25–16.10	J. Doležel: Sekvenování velkých genomů rostlin 18
16.10–16.25	Z. Kubát: Chromosome walking jako metoda sekvenování genomů 19
16.25–16.55	P. Smýkal: Repetitivní DNA sekvence – nástroj evoluce, ale i praktické analýzy genomu 22
	Sekce O „nomech“ v praxi – transkriptom (předsedkyně M. Fojtová)
16.55–17.15	J. Hejátko: Automatická mikroskopie a poziciální klonování v přístupech přímé genetiky 23
18.00–19.00	Večeře
19.30–21.00	Firemní prezentace <i>Bio-Rad, spol. s r. o., F. Bizouarn, M.Sc. (Global Field Application Specialist, Gene Expression Division): RNAi Workflow: Delivery to Detection</i> <i>Applera ČR, spol. s r. o., A. Merta: Kvantifikace genové exprese – TaqMan Gene Expression Assays pro všechny geny <i>Arabidopsis thaliana</i></i> <i>Roche, spol. s r. o., D. Žůrek: Knihovna univerzálních sond (UPL) pro kvantitativní real-time PCR</i>
22.00	Noční kino
0.00	Kino o půlnoci

P Program

ÚTERÝ 3. 10. 2006

Sekce O „nomech“ v praxi – transkriptom (předsedkyně M. Fojtová)

8.15 – 8.55	J. Libus: Jak na expresi genu – přehled metod	24
8.55 – 9.15	H. Štorchová: Northern hybridizace u rostlin – v čem je dosud nenahraditelná	24
9.15 – 9.40	D. Reňák: DNA čipy – technologie a možnosti použití.	25
9.40–10.10	D. Honys: Zpracování a normalizace transkriptomických dat	26
10.10–10.40	Přestávka, prezentace firem	
10.40–11.10	N. Dupláková: Webové nástroje pre prácu s transkriptomickými dátami	27
11.10–11.25	J. Vrbský: Expressní profily genů <i>A. thaliana</i> s použitím radioaktivně značené próby	28
11.25–11.40	J. Fulneček: Izolace a detekce krátkých molekul RNA.	32
11.40–11.55	J. Lochman: Výhody a úskalí produkce proteinů v expresním systému kvasinky <i>Pichia pastoris</i>	35
12.00–13.30	Oběd	
14.00–18.30	Exkurze – Kašperk nebo Březník	
18.30–19.30	Večeře	
19.30–20.15	Plakátová sekce – lichá čísla	
20.15–21.00	Plakátová sekce – sudá čísla	
21.00–21.45	Firemní prezentace	
	Immunotech, a. s., J. Moos: QUANTA SC – využití Coulterova principu v průtokovém cytometru	
	Nikon, spol. s r. o., O. Sedlák: Revoluční zobrazování živých buněk systémem Perfect Focus System	
22.00	Noční kino	
0.00	Kino o půlnoci	

STŘEDA 4. 10. 2006

Sekce O „nomech“ v praxi – vývoj a evoluce (předseda J. Hejátko)

8.15 – 9.00	B. Vyskot: Evo-devo: mechanismy ontogeneze a evoluce.	36
9.00 – 9.15	J. Žlžová: Evo-devo aneb co nám řekne klonování kandidátních genů	37
9.15 – 9.30	J. Fajkus: Evoluční změny v syntéze rostlinných telomer.	40
9.30 – 9.45	M. Dvořáčková: Studium rostlinných proteinů <i>in vivo</i>	40
9.45–10.15	Přestávka, prezentace firem	

Sekce O „nomech“ v praxi – struktura a funkce (předseda J. Petrášek)

10.15–11.05	I. Moore: Inducible expression and quantitative imaging of cellular trafficking	41
11.05–11.45	J. Lindenau: Current developments in confocal live cell microscopy.	41
12.00–13.30	Oběd	
13.30–14.10	F. Vácha: Metody studia jednotlivých molekul v biologii.	42

Sekce Z jiných světů

14.10–15.00	J. Weger, K. Havlíčková: Výzkum a využití rychle rostoucích dřevin pro produkci biomasy	43
15.00–15.30	Přestávka, prezentace firem	

Sekce O „nomech“ v praxi – proteom a metabolom (předseda J. Martinec)

15.30–16.10	V. Havlíček: Hmotnostní spektrometrie jako nástroj proteomiky	44
16.10–16.40	M. Strnad: Miniaturizace a metabolický přístup v analýze fytohormonů	45
16.40–16.55	O. Novák: Hmotová spektrometrie ve výzkumu cytokininů	46
16.55–17.10	K. Doležal: Metody vývoje a studia nových cytokininových derivátů	47
17.10–17.30	M. Fojta: Monitorování hladiny fytochelatinů v rostlinných buňkách pomocí elektrochemických metod	48
17.30–17.50	Přestávka, prezentace firem	

Sekce O „nomech“ v praxi – experimentální modely a aplikace (předseda B. Vyskot)

17.50–18.10	V. Benetka: Šlechtění druhu <i>Populus nigra</i> L. a problémy s využitím molekulárních markérů.	49
18.10–18.25	M. Tichý: Sinice jako modelový systém pro studium (nejen) fotosyntézy.	50
18.25–18.45	J. Kolář: Nemilá překvapení při kultivaci rostlin v laboratoři – problémy a jejich řešení.	51
19.45	Společenská večeře	

Vyhlašení výsledků soutěže, zakončení sympozia

Hudba k tanci

BIOINFORMATIKA SI HĽADÁ MIESTO NA POMEZÍ BIOLÓGIE, LINGVISTIKY A INFORMATIKY

MATĚJ LEXA

Masarykova univerzita Brno, Fakulta informatiky, Botanická 68a, 602 00 Brno

V posledných desaťročiach paralelne s rozvojom výpočtovej techniky a pokrokmi v oblasti molekulárnej biológie dochádza k rozvoju bioinformatiky. Táto vedná disciplína nielen hľadá spôsoby na zber, triedenie a zobrazovanie hromadných biologických dát, ako sú napríklad sekvencie genómov a štruktúry proteínov, ale skúma aj spôsoby ich biologickej interpretácie.

V prednáške uvediem príklady, ktoré demonštrujú, že informácie obsiahnuté v biologických sekvenciách sú pri určitej generalizácii podobné informáciám predávaných pomocou ľudských jazykov. Vytvorím pracovnú analógiu štruktúry biologických sekvencí a jazykov a ukážem cudzie i vlastné príklady, kde metódy počítačovej lingvistiky alebo použitia lingvistickeho nazerania na biologický materiál prináša zaujímavé výsledky pri analýze biologických sekvencí. Zamerám sa na problémy posudzovania podobnosti sekvencí, hlavne u vzdialených sekvencí, možnosti funkčnej anotácie neznámych sekvencí a predpovedanie štruktúry proteínov.

BIOINFORMATICKE NÁSTROJE PRO BIOLOGY A JINÉ NEINFORMATIKY

MARTIN POTOCKÝ^{1,2}

¹ ÚEB AVČR, Rozvojová 135, 165 00 Praha 6, ČR

² VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ČR

E-mail: potocky@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 456

Bioinformatika zažívá v posledních letech téměř exponenciální nárůst v mnoha směrech: neustále roste množství sekvenačních, transcriptomických a strukturních dat, vznikají stále novější a sofistikovanější programy na jejich zpracování a samozřejmě se zvyšuje i množství vědců bioinformatické nástroje používajících. Tento rozvoj sebou přináší také mnohá úskalí. Biolog neinformatick se dnes ocítá před problémem, jak připravit/formátovat vstupní data, jaký nástroj a s jakými nastaveními použít, jak zpracovat a interpretovat výstupy a (hlavně) jak je verifikovat. Bohužel i v nejčastějších aplikacích bioinformatiky jako jsou vyhledání homologních sekvencí, multiple alignment a fylogenetická analýza se často aplikuje princip magické černé skříňky, která „nějak“ zpracuje zadaná data a poskytne „nějaký“ výstup. Ve svém příspěvku se pokusím shrnout vývoj, který prodělaly tyto oblasti v posledních letech a na příkladech ukážu možnosti a zádrhele „laické“ bioinformatiky.

SURVEY OF MOLECULAR PHYLOGENETICS

MARTINA TALIANOVÁ

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences,
Kralovopolska 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic
E-mail: talianka18@ibp.cz, tel.: +420 541 517 247, fax: +420 541 240 500

Key words: Evolutionary model; Distance-based methods; Maximum parsimony; Maximum likelihood; Bayesian inference; Accuracy of phylogeny.

Introduction

Biological sequences (DNA, RNA and amino acids) are complex source of genetic variation due to various mechanisms such as local changes in DNA sequences, rearrangements of DNA segments or DNA acquisition by horizontal gene transfer (reviewed in Arber, 2000). Thus, the comparative analyses of genes and whole genomes enable an exciting view into evolutionary processes and relationships between genetic material of different living organisms. The evolutionary process does not only determine relationships among species, but also allows prediction of structural, physiological, and biochemical properties (Chambers et al., 2000).

Phylogenetic construction is a hierarchical process

Molecular phylogenetics is a continuously evolving area, using and developing methods which enable to extract such information. Most of the techniques used in phylogenetic analyses produce phylogenetic trees (phylogenies) which represent evolutionary histories of compared species. Reconstruction of molecular phylogenetic relationships using DNA, RNA or amino acid sequences is a hierarchical process consisting of four steps: 1) alignment of homologous sequences, 2) selection of an appropriate mathematical model describing sequence evolution, 3) application of a suitable tree-building method with regard to the analysed data and 4) assessment of the quality of the resulting phylogeny and interpretation of obtained results (Steel, 2005).

Data and models of sequence evolution

Sequences for phylogenetic study are either generated in laboratory or retrieved from sequence databases and aligned. Correct alignment of sequences is a fundamental prerequisite for phylogenetic relationship reconstruction (Harrison and Langdale, 2006). Each of the sequence is a subject of random (stochastic) influence of very complex evolutionary processes. Although often very simplified, evolutionary processes can be described using mathematical models of evolution. Some models have very simple assumptions, while others are very complex with numerous parameters representing various biologically relevant facts of sequence evolution. Examples of such parameters are branch lengths of the tree (interspeciation times and rates of mutation along the branches), parameters associated with the substitution matrix (e. g., transition/ transversion bias), or parameters that describe how mutation rates vary across sites in the sequence. The knowledge of the nature of data used in analysis is an important assumption when choosing a model of evolution. The most of the tree-building methods require mathematical model of sequence evolution, to either compute 'distances' between sequences (number of differences corrected for backward, parallel or multiple substitutions) or to explicitly evaluate the probabilities of changes between characters (nucleotides or amino acids) in all positions in the sequence. The simplest model is Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) model assuming equal frequency of nucleotides and equal substitution rates. More realistic models are HKY model (Hasegawa et al., 1985), General reversible model (REV) (Rodríguez et al., 1990), Gamma-distributed-rates models (Wakeley, 1993; Yang, 1994) and Covarion models (Tuffley and Steel, 1998). Considering evolution on the protein level, commonly used models are Codon mutation model (Goldman and Yang, 1994), Dayhoff model of protein evolution (Dayhoff et al., 1978), and many others.

Tree building methods

Tree-building methods can be classified according to several criteria (Hershkovitz and Leipe, 1998). The first way is to define them as either algorithm-based or criterion-based. Algorithm-based methods produce a tree by following a series of steps (e. g., clustering algorithms), while criterion-based methods use an optimality criterion (e. g., the least number of changes in the tree or the topology with a greatest probability of giving rise of analysed data)

for comparing alternative phylogenies to one another and deciding, which one fits better. The second group of method-classification is represented by distance-based methods versus character-based methods. Distance-based methods compute pairwise distances according to some measure. Then, the actual data are omitted and the fixed distances are used in the construction of trees. Trees derived using character-based methods have been optimized according to the distribution of actual data patterns in relation to a specified character.

Distance-based methods require evolutionary distance (e. i., the number of changes that have occurred along the branches between two sequences) between all pairs of taxa. To obtain relatively unbiased estimate of the evolutionary distance, it is useful to apply a specific evolutionary model that makes assumption about the nature of the evolutionary changes. The most popular distance-based technique is *Neighbor-joining* (Saitou and Nei, 1987) method based on agglomerative clustering. Its major strength is the substantial computational speed that makes this method suitable for large dataset. The weakness of this method is the loss of sequence information when converting the data to pairwise distances. It also produces only one tree and thus it is not possible to examine competing hypotheses about the relationship between sequences.

Character-based (discrete) methods operate directly on the aligned sequences rather than on pairwise distances. *Maximum parsimony* (Edwards and Cavalli-Sforza, 1963; Fitch, 1977) does not require any model of sequence evolution, it just identifies the tree (or trees) that involves the smallest number of mutational changes (i. e., the shortest tree length or fewest evolutionary steps) necessary to explain the differences among the data under investigation. In many cases, MP methods are superior to other techniques because they are relatively free from assumptions considering nucleotide and amino acid substitution. MP works well when compared sequences are not too divergent, when the rate of nucleotide substitution is relatively constant and the number of nucleotides examined is large. Furthermore, the parsimony analysis is very useful for some types of molecular data (e. g., insertion sequences, insertions/ deletions, gene order or short interspersed nuclear elements - SINEs). The typical problem of MP trees is so called „long-branch attraction“ (Hendy and Penny, 1989) (respectively short-branch attraction). This phenomenon occurs, when rapidly (slowly) evolving sequences are artefactually inferred to be closely related.

The *maximum likelihood method* (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967; Felsenstein, 1981) method requires a stochastic model of sequence evolution over time. The principle of the likelihood is that the explanation, that makes the observed outcome the most likely (i. e., the most probable) to occur, is one to be preferred. In maximum likelihood, the topology that gives the highest maximum likelihood value is chosen as the final tree. One of the strengths of the maximum likelihood method is the ease with which hypotheses about evolutionary relationships can be formulated. It enables incorporation of complex models to consider biologically important facts of sequence evolution. On the other side, this method is computationally very intensive and thus it is not very appropriate for large datasets.

Since recently, likelihood-based *Bayesian inference* using Markov chain Monte Carlo technique (Rannala and Yang, 1996) becomes popular and very useful method which has been applied to numerous problems in evolutionary or systematic biology.

Accuracy of phylogenetic tree

With the increasing emphasis in biology on reconstruction of phylogenetic trees, questions have arisen as to how confident one should be in a given phylogenetic tree and how support for phylogenetic trees should be measured. The most commonly used methods are non-parametric bootstrap test (Felsenstein, 1985) and jack-knife test (Efron, 1982), based on random resampling of the original dataset (Efron, 1982). These techniques provide a measure of „confidence“ for each clade of an observed tree, based on the proportion of bootstrap trees showing that same branching pattern. Another way of testing reliability of phylogeny is parametric Bayesian inference (reviewed in Hulsenbeck et al., 2001) where parameters such as the tree topology, branch lengths, or substitution parameters, are assessed by posterior probabilities.

However, when assessing accuracy of resulting phylogeny, one might be cautious when interpreting the results. Except of only relying on test values, various biologically relevant facts causing artefactual relationships in the phylogeny (e. g., bad experiment design, characteristics of the data, sources of homoplasy – parallelism, convergence, horizontal gene transfer) should be accounted.

Implementation of phylogenetic methods

On the website <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html#methods> is a comprehensive overview of various phylogenetic packages and programs. These are arranged according to different criteria, some of them are free, some are commercial.

Acknowledgement

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic (204/05/P505 and 521/05/2076) and Institutional Research Plan AV0Z50040507.

References

- Arber W. (2000): Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 1-7.
- Cavalli-Sforza, L. L. and Edwards A. W. F. (1967): Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*, 19: 233-257.
- Chambers J. K., L. E. Macdonald, H. M. Sarau, R. S. Ames, K. Freeman, J. J. Foley, Y. Zhu, M. M. McLaughlin, P. Murdock, L. McMillan, J. Trill, A. Swift, N. Aiyar, P. Taylor, L. Vawter, S. Naheed, P. Szekeres, G. Hervieu, C. Scott, J. M. Watson, A. Murphy, E. Duzic, C. Klein, D. J. Bergsma, S. Wilson, P. Livi (2000): A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.*, 15: 10767-10771.
- Dayhoff M. O., Schwartz R. M., Orcutt B. C. A model of evolutionary change in proteins, in Dayhoff M. O. (Eds.), *Atlas of protein sequences and structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD, 1978, pp. 345-352.
- Edwards A. W. F., Cavalli-Sforza L. L. (1963): The reconstruction of evolution. *Heredity*, 18: 553.
- Efron B. (1982): The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics.
- Felsenstein J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fitch W. M. (1977): On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.*, 111: 223-257.
- Goldman N. and Yang Z. (1994): A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 725-736.
- Harisson C. J., Langdale J. A. (2006): A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.*, 45: 561-572.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22: 160-174.
- Hendy M. D. and Penny D. (1989): A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst. Zool.*, 38: 297-309.
- Hershkovitz M. A., Leipe D. D. Phylogenetic analysis, in: Baxevanis A. D., Ouellette B. F. F. (Eds.), *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*. Wiley Interscience, New York, 1998.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J. P. (2001): Bayesian Inference of Phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310-2314.
- Jukes T. H., Cantor C. R. Evolution of protein molecules, in: Munro H. N.(Eds.), *Mammalian protein metabolism*. Academic, New York, 1969, pp.21-132.
- Rannala B., Yang Z. (1996): Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.*, 43: 304-311.
- Rodríguez F., Oliver J. L., Marin A., Medina R. (1990): The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.*, 142: 485-501.
- Saitou N., Nei M. (1987): The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Steel M. (2005): Should phylogenetic models be trying to ,fit an elephant'? *Trends Genet.*, 21: 307-309.
- Tuffley C., Steel M. A. (1998): Modelling the covariation hypothesis of nucleotide substitution. *Math. Biosci.*, 147: 63-91.
- Wakeley J. (1994): Substitution rate variation among sites and the estimation of transition bias. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 436-442.
- Yang Z. (1994): Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.*, 39: 105-111.

A SHORT GUIDE TO PHYLOGENY RECONSTRUCTION

ELLENI MICHU

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Science of the Czech Republic, Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic
 E-mail: michu@ibp.cz, tel.: +420 541 517 111, Fax: +420 541 211 293

Phylogenetic analysis allows comprehensive understanding of the origin and evolution of species. The main aim of this article is to summarise the currently used methods and to discuss some difficulties in the phylogeny reconstruction.

The result of phylogeny reconstruction is a phylogenetic tree which can be either rooted or unrooted. In the unrooted tree, groupings are inferred, but no direction to evolutionary change is implied. It only displays the relationships between the taxons (Figure 1). To root the tree, it is necessary to add a (unrelated) group of species that is not included in the group of species under the study (reviewed in Harisson and Langdale 2006). This group (or single species) is called outgroup. It can be selected on the basis of prior knowledge of the group of interest, or may become apparent during the alignment. Generally, the most informative outgroup is the actual sister group. The resulting rooted tree implies directionality in time and shows the relationships with regard to the outgroup (Figure 2) (reviewed in Doyle and Gaut 2000).

The first step in the phylogeny reconstruction is to choose species used in the phylogenetic analysis. The selection of species is very important because "wrong" (incongruent) selection (e. g. only few taxa or the "wrong" taxa) can negatively influence the phylogeny reconstruction.

Generally, it is possible to construct the phylogenetic trees according to different features and characters (e.g., morphological and anatomical characters, RAPD patterns, FISH patterns, DNA, RNA or amino acid sequences). In the case of molecular phylogeny, there has been much debate about which sequences are better - nucleotide or amino acid sequences (Simmons et al. 2002). As there are only four possible nucleotides in DNA sequences and as the DNA substitution rates are high, the probability that two lineages will independently evolve the same nucleotide at the same site increases. The main argument for using amino acid data to infer phylogeny is that there are more possible character states for amino acids as opposed to nucleotides (20 versus 4). For the same reason, the alignment of amino acid sequence data is also generally easier. However, the increased number of characters in nucleotide sequences can lead to better resolution of the tree.

The primary source of the data used for molecular phylogenetic analyses are sequenced PCR or RT-PCR products, which are either directly used in analyses or translated to amino acid sequences. The obtained PCR (RT-PCR) products can be directly sequenced or it is possible to clone them into a suitable plasmid first and then to sequence the inserted PCR product. In contrast to the sequencing of cloned PCR product insert (sequenced plasmids coming from the same colony contains only one variant of the allele), the direct sequencing enables to find some polymorphisms in the sequence. Subsequent segregation analysis of the polymorphisms enables to identify whether different alleles or different copies of the gene were found.

When phylogenetic trees are constructed using DNA sequences, there is a possibility to choose either repetitive sequences (rDNA spacers, mitochondrial DNA, chloroplast DNA) or nuclear genes for further analyses. The main disadvantage of repetitive sequences is that not all of the repetitive sequences are identical (e.g., Desfeux and Lejeune (1996) sequenced rDNA spacer and obtained two types of sequences of *S. dioica* with completely different branching patterns). Therefore, it is better to sequence more monomers. Furthermore, repetitive sequences do not always offer sufficient distinction between the closely related species (e. g., rDNA loci in the genus *Silene* – Desfeux et al. 1996). On the other hand, phylogenetic analysis of introns of nuclear genes relatively often provides better resolution than repetitive sequences. The main disadvantage of using nuclear genes is that, in the case of less conserved sequences, it can be difficult to find orthologs from all studied species by PCR with the same pair of primers.

In general, DNA sequences can have more copies in a respective genome (i. e., they are paralogous). This fact causes problems in the construction of phylogenetic trees. For example, it is possible to consider a gene with two copies in all analysed species. If both copies of this gene are detected, the found phylogenetic tree will agree with the true relationships between the species (Figure 3). However, when different copies are found in different species, the resulting phylogenetic tree will not provide the correct relationships between the species (Figure 4) (reviewed in Baldauf, 2003). To distinguish between a single copy and a multicopy gene, Southern hybridisation or PCR analysis can be performed.

In some cases, sequencing of a single gene does not provide the best resolution in the phylogenetic tree. For this reason, it is better to sequence more gene sequences (reviewed in Sanderson and Driskell, 2003). The construction

Přednášky

of a phylogenetic tree on the basis of higher number of sequences coming from multiple genes provides generally much more information than a tree constructed according to the sequences coming from one gene.

The next step in the phylogeny reconstruction is to check the sequences from the studied species and to align them. The resulting sequences can be visualized, for example using the program BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The alignment of the sequences can be performed automatically or manually. Automatic alignments may fail to correctly identify conserved regions, whereas manual alignments allow this but they are more laborious. Using a computer-based alignment as a guide to manual alignment offers a good compromise. For the automatic alignment of sequences, for example the program Clustal W1.81 (Thompson et al. 1994) can be used. To check and to manually correct the alignments, for example, the program SeaView can be used (Galtier et al. 1996). Both programs are available on the World Wide Web (<http://www.cfl.ac.uk/bios/research/biosoft/Downloads/clustalw.html>) ([ClustalW1.81](http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html)), <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html> (SeaView)).

Once the data are aligned, there are many different types of phylogenetic analyses, which can be performed (Holder and Lewis 2003). The methods for calculating phylogenetic trees can be generally divided into two categories. These are distance-matrix based methods, also known as clustering or algorithmic methods (e.g., neighbor-joining, Fitch-Margoliash, UPGMA) and discrete data based methods, also known as tree searching methods (maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian methods).

Neighbor-joining (Saitou and Nei 1987) is a fast method suited for large datasets. It permits different branch lengths indicating the evolutionary time or amount of evolutionary changes along the branch. However, this method has also several disadvantages - it gives only one possible tree, it is strongly dependent on the used model of evolution (model is a mathematical description of the sequence evolution), and it can be complicated to incorporate other biologically important processes like insertions or deletions. Moreover, the algorithm is based on the reduction of sequence information when transforming the data to the distance matrix, which can be also disadvantageous.

Maximum parsimony (MP) method is based on shared and derived characters. It does not reduce sequence information to a single number. It works with original data (alignment) and tries to provide the information about the ancestral sequences. The principle of this method is to find a tree with the smallest number of evolutionary changes (based on the theory that the evolution prefers the smallest number of mutations). In comparison with the distance based methods, it is a relatively slow method. MP does not use all the sequence information because only informative sites are used and it does not provide information on the branch lengths. An advantage of the maximum parsimony method is that it does not imply a specific model of evolution, it provides more equally parsimonious topologies. A specific problem of maximum parsimony is a long-branch attraction. It is a phenomenon in phylogenetic analyses caused by the fact that rapidly evolving lineages are considered to be closely related, regardless of their true evolutionary relationships (Bergsten, 2005). This problem can be minimized by methods which take into account differential rates of substitution among lineages or by breaking up long branches by adding taxa that are related to those with the long branches (Bergsten, 2005).

The principle of the maximum likelihood (ML) method is to find parameters, which explain in the best way the observed data. The resulting tree explains the relationships between the sequences with the highest likelihood. ML method requires a model of evolution. This is an advantage because it makes us aware of the assumptions being made. However, ML is even slower than maximum parsimony, and some computers are not able to analyse data in a reasonable time.

Phylogenetic analysis can be performed using the program PhyloWin (Galtier et al. 1996; <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/phylowin.html>) where all mentioned techniques are implemented. The direct output of a phylogenetic analysis is an user unfriendly formatted file (e. g., ((raccoon:19.19959,bear:6.80041):0.84600,((sea_lion:11.99700, seal:12))). To visualize and to edit the tree, many different programs can be used, for example NJ plot (Perrière and Gouy, 1996; accessible on <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>).

It is important to know how much the individual branches are supported within the tree. Finally the accuracy of the resulting phylogeny can be measured by different methods. The most commonly used method is bootstrapping. This technique determines the phylogenetic accuracy and enables to establish a marginal winner among many nearly equal alternatives. Each of the subsamples has the same size as the original, which is accomplished by allowing repeated sampling of sites. Constructing trees from each of the subsample and calculating the frequency with which the branching pattern in each of this random subsample is reproduced. (reviewed in Baldauf, 2003). The bootstrap represents the value showing the percentage of cases in which the sequences were classified together. This is done by random resampling of the sequence dataset. For example, if a species is found in every subsample tree, then its bootstrap support is 100%, if it is found in only two-thirds of the subsample tree, its bootstrap support is 67%. Generally, the bootstrap values of 70% and higher indicate reliable groupings. When the bootstrap values all over the tree are low, it can indicate problems with a long-branch attraction. Then it is possible to remove these sequences from a dataset and observe whether the bootstrap values are increased.

Přednášky

To present phylogenetic trees there are several widely accepted rules. Branch lengths are almost always drawn to scale. Bootstrap values should be displayed as percentages and only values of 50% and higher are presented, because of easier understanding and comparison with other trees (reviewed in Baldauf 2003).

Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant Nos. 204/05/H505 and 204/05/P505) and the Institutional Research Plan (Grant No. AVOZ50040507).

References

- Baldauf S.L. (2003): Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends Genet.*, 19: 345-351.
- Bergsten J. (2005): A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21: 163-193.
- Desfeux C., Lejeune B. (1996): Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae): Evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences. *Sciences de la vie/Life science*, 319: 351-358.
- Desfeux C., Maurice S., Henry J.P., Lejeune B., Gouyon P.H. (1996): Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 263: 409-414.
- Doyle J.J., Gaut B.S. (2000): Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol. Biol.*, 42: 1-23.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. (1996): SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, 12: 543-548.
- Harrison C.J., Langdale J.A. (2006): A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.*, 45: 561-572.
- Perrière G., Gouy M. (1996): WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 78: 364-369.
- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-25.
- Sanderson M.J., Driskell A.C. (2003): The challenge of constructing large phylogenetic trees. *Trends Plant Sci.*, 8: 374-379.
- Simmons M.P., Ochoterena H., Freudenstein J. (2002): Conflict between amino acid and nucleotide characters. *Cladistics*, 18: 200-206.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.

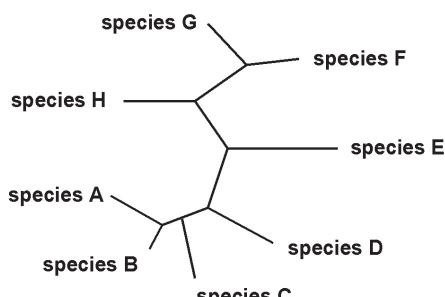


Figure 1: An example of unrooted tree.

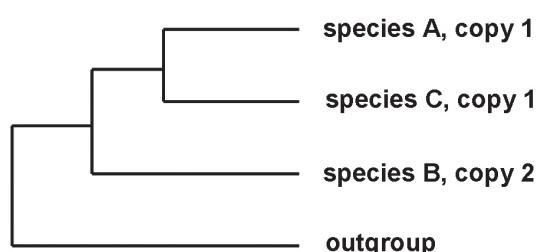


Figure 3: Phylogenetic tree constructed on the basis of different copies of a gene. This tree does not provide the correct relationships between the species.

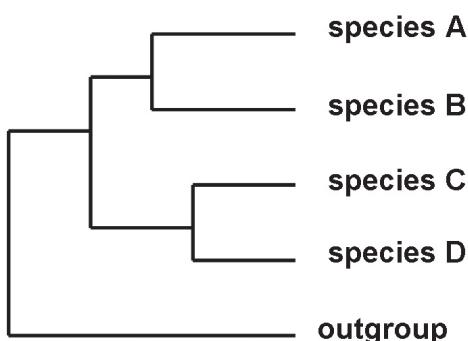


Figure 2: An example of rooted tree.

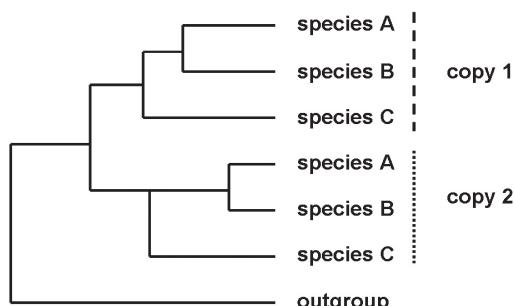


Figure 4: Phylogenetic tree constructed according to all found paralogs of a gene. This tree indicates the correct relationships between the species.

HYBRID ORIGIN OF THE TETRAPLOID *ACHILLEA ALPINA* AND *A. WILSONIANA* DETECTED BY NEWLY DEVELOPED BAYESIAN METHODS

CLAUS VOGL

Institute of Animal Breeding and Genetics University of Veterinary Medicine Vienna Veterinaerplatz 1,
A-1210 Vienna

The plant genus *Achillea* (Asteraceae – Anthemideae) offers a classical model for speciation by hybridization and polyploidy. We test the suspected allotetraploid origin of two species, *A. alpina* – 4× and *A. wilsoniana* – 4×, in E Asia. A total of 421 AFLP bands from 169 individuals and 19 populations of five 2×- and two 4×-species were obtained. Data were analyzed with newly developed Bayesian methods that account for polyploidy. The assumption that the parental chromosome sets recombine freely within the allotetraploids was not successful in resolving the 2×/4×-relationships. The alternative approach, assuming lack of recombination among the parental chromosome sets, suggests strongly that *A. alpina* and *A. wilsoniana* are allotetraploids between *A. acuminata* – 2× (sect. *Ptarmica*) and *A. asiatica* – 2× (sect. *Achillea*). The 4×-species share many AFLP bands with the two presumed parental species, respectively. Eight plastid haplotypes (A-H) were detected by PCR-RFLP analyses. *A. alpina* and *A. wilsoniana* share haplotype F only with *A. asiatica*, indicating the latter in the maternal lineage. Morphology and ecology of the two 2×-species are distinct, whereas the two 4×-species form a nearly continuous link between them. We therefore regard *A. alpina* and *A. wilsoniana* as the product of a hybridization between genetically distinct 2×-ancestors, one *A. acuminata*-like and paternal, the other *A. asiatica*-like and maternal.

„**EPIGENOM**“ A METODY JEHO ANALÝZY

ALEŠ KOVÁŘÍK, JANA BEDŘICHOVÁ, MIOSLAVA FOJTOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
E-mail: kovarik@ibp.cz, tel: 541 517 178

Nukleotidová sekvence DNA je určující pro tvorbu bílkovin, strukturních a regulačních molekul RNA. Čtyřpísmenkový sled nukleotidových bází je sice univerzální, avšak zdaleka ne jedinou informací, kterou Watson-Crickova dvoušroubovice nese. U vyšších eukaryotických organismů se setkáváme s dalšími kódy, které jsou nadstavbou primární struktury DNA. Ne-mendelistickou dědičnost (epigenetickou) nám u živočichů a rostlin například zabezpečuje pátá báze, 5-metylcytosin. Bylo prokázáno, že metylace DNA je klíčovým regulačním nástrojem v regulaci genové exprese, aktivity transposabilních elementů a udržování integrity genomu. Rozhodující měrou se podílí na vývojových programech jak u živočichů tak i rostlin. V prezentaci se budu věnovat analýzou epigenomu, metodám detekce metylace DNA a aplikací softwarových nástrojů pro zpracování dat po bisulfitovém sekvenování.

Užitečné odkazy

Methtools – nástroj pro analýzu zpracovávání dat genomového sekvenování –
<http://genome.imb-jena.de/methtools>

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

Methbase – databáze metylačních sekvencí – <http://genome.imb-jena.de/methbase>

IDENTIFIKACE LTR-RETROELEMENTŮ V GENOMICKÝCH SEKVENCÍCH

JIŘÍ MACAS

Biologické centrum AVČR, Ústav molekulární biologie rostlin, České Budějovice
E-mail: macas@umbr.cas.cz, <http://w3lamc.umbr.cas.cz/lamc>

Long terminal repeat (LTR-) retroelementy jsou mobilní elementy (transpozóny), využívající pro svou transpozici reverzní transkripci z RNA intermediátu, čímž dochází ke vzniku nové kopie daného elementu. Výsledkem tohoto procesu je akumulace transpozičně aktivních retrotranspozónů v hostitelském genomu, což je evidentní zvláště u vyšších rostlin, kde jsou retroelementy jednou z hlavních složek repetitivní DNA a tvoří podstatnou část jejich jaderného genomu. Izolaci retroelementů lze provádět řadou experimentálních přístupů, avšak díky akumulaci genomických dat z řady rostlinných druhů nabývá stále více na významu jejich počítacová detekce v dostupných sekvencích DNA. Tento přístup však narází na značnou variabilitu sekvencí LTR-retrotranspozónů, a proto je jejich identifikace založena především na jejich specifické struktuře, a to zejména na přítomnosti přímých repetitive ohrazení jících element, a na duplikaci krátké sekvence v místě inzerce elementu do genomu. Tento princip je implementován např. v programu LTR_STRUC (McCarthy and McDonald, 2003), který je často využíván pro detekci LTR-retrotranspozónů při anotaci genomických sekvencí. Na příkladu hledání elementů patřících do určité podskupiny LTR-retrotranspozónů (Ty3/gypsy-like elementy typu Ogre) pak budou demonstrovány další programové nástroje využitelné pro cílenou identifikaci specifického typu elementů na základě uspořádání jejich otevřených čtecích rámců a konzervovaných proteinových domén.

Citace a webové odkazy

- McCarthy, E.M., McDonald, J.F., 2003. LTR_STRUC: a novel search and identification program for LTR retrotransposons. Bioinformatics 19, 362-367.
 LTR_STRUC: http://www.genetics.uga.edu/retrolab/data/LTR_Struc.html
 RPS-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/download.shtml>
 Position-specific scoring matrices for RPS-BLAST: <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/mmdb/cdd>
 EMBOSS: <http://emboss.sourceforge.net>
 BioPerl: <http://www.bioperl.org>

VÝVOJ A VÝROBA PEPTIDŮ VČERA A DNES

MARTIN FLEGEL

PolyPeptide Laboratories spol. s r. o., Radiová 1, 102 27 Praha 10
E-mail: martin.flegel@polypeptide.cz

Výzkum a vývoj peptidů začal na Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV v padesátých letech. Hlavním tématem výzkumu byla struktura a účinek neurohypofyzárních hormonů. Během let byla připravena řada analogů técto látek z nichž některé se po trnitě cestě pre-kliniky a klinického testování dostaly do kategorie peptidových léčiv dnes již vyráběných jako generika. V přednášce bude popsána cesta od výzkumu k výrobě peptidů-léčivých látek a jejich některých lékových forem. Dále budou popsány možnosti přípravy peptidů a některé moderní nástroje sloužící k přípravě a výběru účinných látek. Pozornost bude věnována zejména alternativám synthesis na polymerním nosiči ve velkém objemu při peptidové výrobě. Významné výsledky výzkumu peptidů na ÚOCHB zejména pak vývoj a výroba Carbetocinu a Desmopressinu budou zároveň použity jako příklady v obecnějším kontextu problémů výroby técto látek v PolyPeptide Laboratories.

Závěrem bude podán přehled o vyráběných a připravovaných peptidových léčivech a budou zmíněny jejich indikační možnosti a ekonomický potenciál.

ÚVOD DO DISKUZE O PŘÍSTUPECH SYSTÉMOVÉ BIOLOGIE

VIKTOR ŽÁRSKÝ

Laboratoř buněčné biologie, ÚEB AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
E-mail: zarsky@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 457

Buněčná a vývojová biologie modelových organismů konečně dosáhla na počátku 21. století takové úrovně nahromadění dat, která umožnuje – či přímo nutí - pokoušet se smysluplně o dynamické modelování celkového fungování buněk, tkání i organismů. Touto počáteční fází přechodu k modelování prošla již dříve ve 20. století ekologie. Velká kvanta informací pocházejících ze všech možných „omic“ (gen-, transcript-, prote-, metabol-, phen-, ...) vlastně sama o sobě vedou k rozvoji matematických metod hromadného zpracovávání/pořádání biologických dat a hlavně – k hledání souvislostí mezi nimi. Nejde jen o snahu chování živých systémů kvantitativně popsat – cílem biologie systémů („systems biology“) je vytváření a prohlubování realistických analytických/predikčních modelů, které odhalují dosud skryté parametry systému. Jsou to modely, které vedou k novým biologickým objevům. Tento typ biologicko-kybernetického modelování už v polovině minulého století vyhlížel a připravoval svým dílem Ludwig von Bertalanffy.

Reference

- Bertalanffy, L. (1949b) Zu einer allgemeinen Systemlehre, *Biologia Generalis*, 195:114-129
- Bertalanffy, L. (1949c) The concepts of systems in physics and biology, *Bulletin of the British Society for the History of Science*, 1:44-45
- Bertalanffy, L. (1950a) The theory of open systems in physics and biology, *Science*, 111:23-29
- Bertalanffy, L. (1950b) An outline of General Systems Theory, *British Journal for the Philosophy of Science*, 1:139-164
- Bertalanffy, L. (1951) (with C. G. Hempel, R. E. Bass, and H. Jonas) General System Theory: A new approach to unity of science, *Human Biology*, 23:302-361

MODELING MECHANISMS OF CELLULAR AUXIN TRANSPORT

KLÁRA HOYEROVÁ¹, MARCEL JIŘINA², EVA ZAŽÍMALOVÁ¹

¹ Institute of Experimental Botany, AS CR, Prague, Czech Republic

² Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Czech Republic

E-mail: hoyerova@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 436

Auxins, in co-action with cytokinins, play a crucial role in the regulation of plant growth and development. Transport processes of auxins within a plant are, together with auxin metabolism, involved in the regulation of auxin levels in plant organs, tissues, individual plant cells and plant cell compartments. Trans-membrane carrier proteins transporting auxin into cells and out from cells facilitate the auxin flow from cell to cell. Those, which are distributed asymmetrically at the surface of each cell, give auxin flow a polarized direction.

Recent mathematical models of auxin flow in plant tissue built on canalization hypothesis by Sachs (1981) and Mitchison (1980, 1981) show that auxin transport ability of a tissue increases with auxin flux, resulting in self-enhancement of this flux along auxin paths. However, they still do not sufficiently characterize auxin transport on a single cell level.

Using experimental data describing the kinetics of both auxin influx and efflux carriers based on accumulation of radioactively labeled compound in tobacco BY-2 cells, we try to incorporate more accurate estimates for passive and carrier-mediated auxin membrane permeabilities. We extend the model with respect to more precise characterization of the role of both auxin influx and efflux carriers in auxin transport machinery and try to find conditions under which the model would fit in all the auxin movements observed in plants.

Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project LC06034.

SEKVENOVÁNÍ VELKÝCH GENOMŮ ROSTLIN

JAROSLAV DOLEŽEL A HANA ŠIMKOVÁ

Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc
a Katedra buněčné biologie a genetiky, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Dnes již téměř nikdo nepochybuje o tom, že sekvenování celých genomů rostlin, jakkoliv pracné a nákladné, poskytuje nenahraditelné poznatky o jejich struktuře, evoluci a funkci. V řadě oblastí pak zcela mění dosavadní představy a mimo jiné vytváří teoretické základy pro šlechtění pomocí moderních metod. Mimo jiné i proto byly revidovány původní plány na přečtení pouze několika genomů modelových druhů rostlin. Již v roce 2006 mají být přečteny genomy 12 druhů rostlin, a to zejména díky programu *Joint Genome Initiative* (JGI, Department of Energy, USA). Takový pokrok by nebyl možný bez automatizovaných postupů, kterých využívá strategie *whole genome shotgun sequencing*. Ta produkuje sekvence malých fragmentů DNA, které však nejsou použitelné pro rekonstrukci celého genomu. Důvodem je přítomnost různých typů repetitivních sekvencí DNA, duplikací a u některých druhů rovněž polyploidní stav či původ. Jediná možnost, jak krátké sekvence sestavit a celý genom zrekonstruovat, spočívá v jejich ukotování na fyzickou mapu. Ta sestává ze souboru velkých fragmentů DNA (~100kb), které jsou uspořádány tak, aby odpovídaly původnímu pořadí v genomu. Sestavování se provádí na základě tzv. *fingerprintingu*, metody založené na restrickční analýze fragmentů DNA. Výše popsána strategie se jeví jako reálná u genomů o velikosti do několika Gbp/1C, což je také jeden z důvodů, proč JGI zatím neplánuje sekvenování velkých genomů. Sestavení fyzických map genomů o velikosti nad 5 Gbp/1C, zejména pokud jsou polyploidní (obsahují dva nebo více podobných genomů), přesahuje současné možnosti klasických postupů genomiky.

V naší laboratoři jsme navrhli a vypracovali strategii, která umožňuje řešení tohoto problému. Nový postup spočívá v rozdělení genomů na malé a definované části, představované jednotlivými chromozómy, resp. jejich rameny, což otevírá možnost sestavit fyzické mapy a sekvenovat i obrovské genomy. Například genom hexaploidní pšenice, který má velikost ~17Gbp/1C, je možné tímto způsobem rozdělit na části o velikosti 221-544 Mbp (1,3 – 3,2% genomu), což odpovídá genomu rýže, který již byl téměř celý sekvenován. Náš postup zahrnuje třídění chromozómů nebo jejich ramen pomocí průtokové cytometrie. K tomu používáme telosomické nebo adiční linie, u kterých je možné konkrétní chromozómy identifikovat a třídit. V současné době jsme mimo jiné schopni třídit všechny chromozomy žita (1C~7,9 Gbp) a jednotlivá ramena všech chromozómů ječmene (1C~5,1 Gbp), tetraploidní pšenice (1C~12 Gbp) a hexaploidní pšenice. Prokázali jsme, že tříděné chromozomy jsou vhodné pro fyzické mapování pomocí metod PCR, PRINS a FISH a pro cílenou izolaci molekulárních markerů. Významným výsledkem je možnost připravit knihovny velkých inzertů klonovaných ve vektoru BAC. Reálnost naší strategie jsme ověřili ve spolupráci s Dr. C. Feuillet (INRA, Clermont-Ferand, Francie), která sestavila fyzickou mapu největšího chromozómu pšenice (3B). Tyto společné výsledky potvrdily, že naše strategie umožní sestavit fyzické mapy i pro obrovské a polyploidní genomy rostlin. Dostupnost těchto map pak otevírá možnosti pro izolaci markerů pro MAS, poziciální klonování a komparativní analýzu evoluce genomů. Rozdělení genomu na mnoho menších částí pak umožňuje mezinárodní spolupráci. Mimo jiné i proto se náš tým stal zakládajícím členem Mezinárodního konsorcia pro sekvenování genomu pšenice a Evropské iniciativy pro genomiku Triticeae.

Tato práce je podporována Grantovou agenturou ČR (521/04/0607, 204/04/1207 a 521/05/0257) a Ministerstvem školství mládeže a tělovýchovy ČR (LC06004).

CHROMOSOME WALKING WITH BAC CLONES AS A METHOD OF GENOME MAPPING

ZDENĚK KUBÁT

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics AV CR, Kralovopolska 135, 612 65 Brno,
Czech Republic
E-mail: kubat@ibp.cz, tel: +420 541 517 203

Introduction

Genome sequencing is an important part of current genomics. Genome sequence knowledge facilitates all subsequent analyses of genome structure, organization and function. Current sequencing projects are often based on random sequencing of genomic libraries followed by contig assembly by means of bioinformatics tools as well as on chromosome walking. Libraries of large fragments, mostly BAC (bacterial artificial chromosome) libraries, are mostly used in genome projects (for review see KEJNOVSKY, 2000). Searching for overlapping BAC clones described here is the main point of contig assembly based on principle firstly described by BENDER et al.(1983).

Principle

The chromosome walking starts with BAC clone called "seed BAC clone". Based on its end sequence, called "BAC end sequence" (BES), probe is amplified and used for the screening of the whole BAC library. The specificity of BAC clones selected by hybridization is verified by PCR with specific primers to exclude false positive hybridizing clones. Then, insert sizes of positive clones are estimated and BAC clones with largest inserts are preferentially selected to accelerate walking. Their BAC ends are then sequenced and this information is used for confirmation of overlaps with seed BAC by PCR. When seed BAC sequence is already known, more primers designed inside the overlapping area may be used for multiple confirmation followed by sequence alignment. If the seed BAC sequence is not known, sequencing of PCR products is necessary for verification of 100% identity of homologous regions in overlapping BAC clones. When overlap is confirmed, is located near the BAC end and the BAC insert is large enough, this new BAC is sequenced and used for other walking as a seed BAC.

Materials and Methods

BAC library screening

BAC library (SCHIZUYA et al., 1992) usually have several times coverage of the genome. The widely used vector is pBelo BAC 11; its insert size capacity is up to 400 kb. The starting point for the finding of overlapping BAC clones in genomic library are BAC end sequences (BES) or ideally complete sequence of the seed BAC clone. Probes used for BAC library screening originate from BESs, on which the primers are designed. The goal of library screening is to find clones with an overlap as short as possible, to the limit of 40-50 kb but not shorter than 1kb. Probes have to be amplified on seed BAC DNA template under highly specific PCR conditions to prevent contamination by closely related but not identical PCR products. PCR products must be purified (Quiagen PCR purification kit), because template DNA or BAC vector DNA contamination may cause unspecific cross-hybridization. Hybridization method need not be so sensitive (non-radioactive labeling can be used, e.g. AlkPhos direct labeling kit, Amersham Biosciences) because probe consists of highly concentrated short PCR products.

PCR confirmation

Glycerol stocks from all positive clones are prepared to store BAC clones apart of BAC library plates. Frozen glycerol stocks are stored at -20°C and can be used as PCR templates during next 2 to 3 months. PCR confirmation of all positive clones with primers used previously for probe amplification has to be performed to exclude false positive clones. Only the clones producing PCR products of the same size as the PCR product of seed BAC are considered as really positive.

BAC insert size estimation

There is a high probability that more than one overlapping clone will be found in the library. In order to prevent work on too short clones, the insert sizes are estimated in selected BAC clones. Sequencing of long BACs will accelerate walking. Low amounts of BAC DNAs are sufficient to estimate insert size by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Přednášky

BAC DNA isolated by plasmid miniprep is then digested with restriction enzymes surrounding the cloning site of BAC vector. Digested BAC DNA is loaded onto PFGE gel with DNA size marker. BAC clones of minimal size 80–100 kb are chosen for further work.

Back confirmation of positive clones

The overlaps in selected BAC clones must be verified by more than one PCR confirmation. Strategy is illustrated on **Fig 1.** If the BES is the only one known seed BAC sequence, BESs of candidate positive BACs should be used for back confirmation of overlap. A list of BESs of all BAC clones in the library may be very helpful. Obtaining of such quantity of sequencing data characterizing each clone is very expensive and time consuming, but can significantly accelerate research progress. If BES is not available, sequencing of BAC ends must be performed. BAC DNA may be isolated by common method, but in case of direct BAC DNA sequencing with BAC vector specific primers, DNA template must be very pure. Quiagen or Promega plasmid isolation midi kits are good choice because they provide high yield (~10ug) of ultrapure DNA from 50–70 ml of bacteria cultured in LB medium. One sequencing reaction requires 1.5–2.0 µg of BAC DNA. BAC ends are sequenced with T7 and M13 (or SP6) primers, respectively. BES originating in sequencing with T7 primer is called “BAC_NAME_t” and BES sequenced with M13 or SP6 primer is called “BAC_NAME_y” what is useful when determining of BAC clone orientation.

The other method of BES sequencing is BAC end cloning (Chen and Gmitter, 1999) when BAC end subclone is used for sequencing instead of large BAC DNA. During this approach, BAC DNA is digested with one restriction enzyme cleaving inside the BAC vector simultaneously with another restriction enzyme digesting inside BAC insert. This method is time consuming and has high probability that subcloned BAC end sequence is short. Subsequently, primers for obtained BESs are designed and used for back PCR confirmation. Only candidate BACs whose BESs derived primers amplify products of correct size on seed BAC DNA can be considered as overlapping with seed BAC. Amplified PCR products should be then sequenced and aligned to BESs of primers origin (BLAST – align two sequences). Ideally, 100% identity can prove the overlap. In some cases, such double overlap confirmation does not guarantee accuracy of results and more regions used for confirmation should be analyzed. Namely repetitive elements and duplicated regions presence in BESs of both seed BAC and candidate BACs can cause mistakes in contig assembling. If the seed BAC is already sequenced, it can serve as a source of next primers useful for overlap confirmation and also overlap length estimation. When the complete sequence of seed BAC is not available, more candidate BACs overlapping with seed BAC can be used for contig assembly (Fig. 1A).

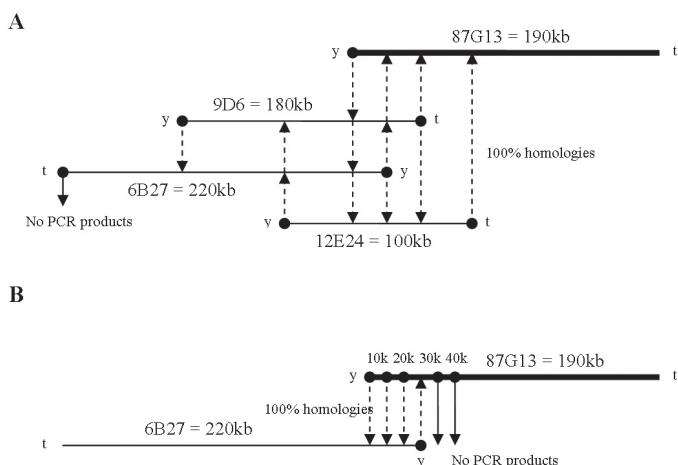


Fig 1.: The scheme of contig assembling. BAC names used on the picture are an example. **(A)** Strategy used when the seed BAC (87G13) is not sequenced. Searching for clones and overlaps confirmation is based on BAC end sequences (BESs). Primers are designed for all candidate BAC clones BESs confirmed by PCR (marked by dashed arrows) to have homology with the seed BAC BES, in this case 87G13y. These primers are used for back PCR confirmation on each of potentially overlapping BAC clones, their PCR products are sequenced to verify 100% identity of homologous region. BAC clones orientation (y to t end) is determined. **(B)** Strategy used when the seed BAC is sequenced. Several primer pairs in defined positions can be designed for multiple PCR confirmation of overlap between seed BAC 87G13 and the largest candidate BAC 6B27. PCR products should be sequenced to verify 100% identity. The length of overlap is unambiguously defined by position of homology between BAC 6B27 BES and 87G13 sequence. Analogous strategies are used for searching on the second end of seed BAC and also on the opposite ends of confirmed overlapping BACs.

Factors affecting method efficiency

Several factors affect efficiency of this method. The most important factor is the BAC library quality and size (insert size, coverage of genome). When the library is too small and does not cover complete genome, hybridization screening could result in no positive clones. Even in a large library, some genomic regions could be missing. It can be caused by the absence of used restriction enzymes target sites surrounding studied sequence. Repetitive sequences and duplications can cause big problems as well. They can lead to incorrect contig assembly, namely when repetitive regions are highly conserved or young and not much diversified. The use of a large probe could help in these situations. Supporting methods such as restriction fragment analysis, long range PCR (BARNES, 1994; CHENG, 1994) or fiber FISH (HEISKANEN, 1995; WEIER, 1995) can be also used.

Acknowledgments

I thank Eduard Kejnovský for a help in preparation of the manuscript.

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant nos. 204/05/2097 and 204/05/H505).

Literature

- BARNES W., 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. Proc Natl Acad Sci USA 91, 2216–2220
- BENDER W., SPIERER P., and HOGNESS D.S., 1983. Chromosomal Walking and Jumping to Isolate DNA from the ACE and rosy Loci and the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster*. J Mol Biol 168 17-33.
- CHEN Ch. and GMITTER F. G. JR., 1999. Direct Cloning and Sequencing of Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Insert Ends Based on Double Digestion. Plant Mol Biol Reporter 17: 231–238
- CHENG S., FOCKLER C., BARNES W.M., HIGUCHI R., 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. Proc Natl Acad Sci USA 91, 5695–5699
- HEISKANEN M., HELLSTEN E., KALLIONIEMI O.P., MAKELA T.P., ALITALO K., PELTONEN L., PALOTIE A., 1995. Visual mapping by fiber-FISH. Genomics 30:31-36
- KEJNOVSKÝ E., 2000. Construction of plant BAC libraries. Biol. Listy 65:181
- SHIZUYA H., BIRREN B., KIM U. J., MANCINO V., SLEPAK T., TACHIIKI Y., SIMON M., 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 89(18):8794-7
- WEIER H. U. G., WANG M., MULLIKIN J. C., ZHU Y., CHENG J. F., GREULICH K. M., BENSIMON A., GRAY J. W., 1995. Quantitative DNA fiber mapping. Hum Mol Genet 4:1903-1910

REPETITIVE DNA SEQUENCES AS TOOLS FOR CROP GENOME ANALYSIS AND GENETIC DIVERSITY STUDIES

WITH EMPHASIS ON RETROTRANSPOSON-BASED MARKERS

PETR SMÝKAL

Department of Biotechnology, AGRITEC Plant Research Ltd., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk, Czech Republic
E-mail: smýkal@agritec.cz, tel.: +420 583 382 127 (lab 139), fax: +420 583 382 999

Germplasm banks, living seed collections serve as repositories of genetic variation and the source of genes for further improving agricultural crops. The establishment and maintenance must be coupled with the ability to actively utilize all collected diversity. The vast majority of gene bank accessions did not make a contribution to modern varieties, particularly with respect to complex traits such as yield and nutritional quality. As a result, crop improvement is still practiced on rather narrow genetic base. Many beneficial alleles were surely left behind during domestication process.

The invent of DNA markers has rapidly led to implementation of various so called DNA fingerprinting methods in classification of germplasm. A common theme of these methods is to screen and provide sufficient polymorphism and high information content. With the use of DNA profiles, the genetic uniqueness of each accession, relative to others, can be determined and quantified. The general rule is that, accession with the most distinct DNA pattern are likely to posses the greatest number of novel alleles. Markers, entities which are heritable as simple Mendelian traits and are easy to score, are increasingly important in genetical studies, in the construction of linkage maps, and in the diagnosis of individuals. Particularly in case of crop species, with large often polyploid genomes, direct genome sequencing is difficult and progress slow. As the result the use of gene specific data is limited.

Early in advent of molecular biology, highly abundant fraction of DNA, composed of either satellite, minisatellite or tandem repeats of simple sequences called microsatellites, was identified. Due to less stringent mutation control, the repeat length polymorphism develops readily, in contrast to coding regions, making them suitable for marker use. Abundant repeat motives forming microsatellites were isolated with flanking genomic DNA regions leading to design of highly locus specific and robust SSR (Simple Sequence Repeats) markers. The additional advantage of SSR technology is possibility to map chromosomal location and to be co-dominant markers.

Retrotransposons together with transposons represent a highly abundant, ubiquitous class of repetitive elements in all studied eukaryotic genomes. They can constitute vast majority of genome, especially in case of plants making up to 60–90%. Retrotransposons activity in creating genomic diversity by stable integrating large DNA segments into dispersed chromosomal loci, make them ideal for marker use. Integration sites shared between germplasm accession are likely to occur at common ancestor, and therefore these markers are currently the most informative for phylogenies and pedigree studies.

Several developed marker methods rely on the principle that a joint between retrotransposon and genomic DNA is formed during integration process. The methods are named according to particular motif providing second priming site (Schulman et al. 2004). The SSAP (Sequence-Specific Amplified polymorphism) method is derived from AFLP. In IRAP (Inter-Retrotransposone Amplified Polymorphism) segments between two nearby elements are amplified (Kalendar et al. 1999, Smýkal 2006). Retrotransposone-Based Insertional Polymorphism (RBIP) is an ultimate retrotransposone based method which provides locus specific co-dominant marker system, suitable for high-through put analysis and automatization (Flavell et al. 2003, Jing et al. 2005).

All these methods will be presented and discussed on the example of pea genome analysis and genetic diversity studies.

References

- Flavell A.J., Bolshakov V.N., Booth A., Jing R., Russell J., Ellis T.H.N., Isaac P.: A microarray-based high throughput molecular marker genotyping method: the tagged microarray marker (TAM) approach. *Nucleic Acids Res* 31: e115, 2003
- Jing R.C., Knox M.R., Lee J.M., Vershinin A.V., Ambrose M., Ellis T.H.N., Flavell A.J.: Insertional polymorphism and antiquity of PDR1 retrotransposon insertions in *Pisum* species. *Genetics* 171: 741-752, 2005
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A.: IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* 98:704-711, 1999
- Schulman A.H., Flavell A.J., Ellis T.H.N.: The application of LTR retrotransposons as molecular markers. In: *Methods in Molecular Biology* 260:145-175, 2004
- Smýkal P.: Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *J.Appl. Genet.* 47 (3) 2006 *in press*

This work is financially supported by Ministry on Education of Czech Republic within the frame of MSM 2678424601.

AUTOMATICKÁ MIKROSKOPIE A POZIČNÍ KLONOVÁNÍ V PŘÍSTUPECH PŘÍMÉ GENETIKY

TEREZA KOLOUCHOVÁ¹, RADKA PODHORSKÁ¹, JIŘÍ FRIML^{1,2} A JAN HEJÁTKO¹

¹ Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česká republika

² Department of Developmental Genetics, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany
E-mail: hejatko@sci.muni.cz, tel. 549 494 165

Přístupy přímé (klasické) genetiky byly v minulosti uplatňovány jako základní nástroj identifikace geneticky podmíněných fenotypových projevů všech organismů. Znalost celých genomů modelových organizmů umožnila využití nových přístupů, zejména reverzní genetiky, jako velmi efektivního nástroje při identifikaci funkce jednotlivých genů a vedla k revolučním změnám v chápání pojmu genu. Základním handicapem přístupů přímé genetiky oproti genetice reverzní byla rychlosť identifikace genů podmiňujících sledovaný fenotyp. Díky velkému pokroku v metodách identifikace genů pomocí metod pozičního klonování se podařilo do velké míry tento handicap odstranit. Naopak zásadní výhodou klasické genetiky oproti genetice reverzní je možnost selektovat přímo na sledovaný znak. V současné době se zdá být paleta mutantů identifikovaných v základních pozorovatelných znacích téměř úplná. Přes značné experimentální úsilí je však stále funkce většiny z 25 498 odhadovaných genů *Arabidopsis* neznámá. Jednou z možností jak identifikovat funkci zbývajících genů je vývoj nových vyhledávacích přístupů, umožňujících identifikaci znaků, jež nejsou dosud používanými technikami identifikovatelné až již z důvodů limitací detekčních nebo časových. V naší laboratoři se zabýváme analýzou role rostlinných hormonů cytokininů ve vývoji rostlin a jejich interakcemi s dalšími hormony, zejména auxiný. V současné době jsou dostupné mnohé markerové linie, umožňující sledovat např. endogenní hladiny různých hormonů, expresní profily genů, zúčastňujících se regulace vnímání a přenosu hormonálních signálů nebo jejich působení na molekulární úrovni. Využití EMS mutageneze a identifikace mutantů se změnami expresních profilů jednotlivých markerových linií tak otevírá velké možnosti identifikace molekulárních mechanizmů podílejících se na regulaci zmíněných procesů. Limitujícím faktorem při identifikaci mutantů v mutantních knihovnách markerových linií však zůstává nízká průchodnost analýzy pomocí optické mikroskopie. Abychom překonalí tuto bariéru, adaptovali jsme k analýze expresních profilů jednotlivých mutantních linií systém pro automatickou mikroskopii .slide, původně vyvinutý firmou Olympus pro automatickou analýzu histologických preparátů. Přizpůsobením pro naše účely, zejména pro automatickou analýzu nerovných a silných preparátů jak v procházejícím, tak v odraženém světle, bylo dosaženo dostatečného rozlišení, umožňujícího analýzu expresních profilů mutantních linií s vysokou průchodností (přibližně 50–100 nezávislých linií za den). Geny zasažené u identifikovaných mutantních linií budou izolovány pomocí pozičního klonování. V současné době jsme vypracovali mapu základních, zejména SSLP markerů, pokrývajících celý genom *Arabidopsis* a optimalizovali podmínky pro jejich identifikaci v mapovací populaci připravené křížením mutantních Col-0 linií se standardními liniemi Ler-0. Jemné mapování bude probíhat pomocí markerů publikovaných sdružením TAIR a v databázi Monsanto (Cereon Genomics).

Podporováno granty MŠMT MSM0021622415 a LC06034.

Přednášky

JAK NA EXPRESI GENU – PŘEHLED METOD

JIŘÍ LIBUS

Laboratoř morfogeneze rostlin, ÚEB AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
E-mail: libus@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 411

Změny v expresi genů jsou nezbytnou součástí života – obzvláště v neustále se měnících podmínkách prostředí. Rozdíly v aktivitě mnoha genů jsou také přímo zodpovědné za diferenciaci buněk ve vývinu jedince a odlišují i buňky různých tkání či pletiv.

Protože všechny tyto procesy se těší zájmu vědecké veřejnosti, historie snahy změřit nebo alespoň srovnat expresi určitého genu je velmi dlouhá. Během let bylo nalezeno několik cest vedoucích k vytyčenému cíli. Každá z nich se vyznačuje určitými výhodami a nevýhodami a jejich výsledky nemusí být nutně totožné. Pouze s tímto na paměti se lze zodpovědně rozhodnout pro konkrétní metodu a také správně interpretovat vlastní či v literatuře popsáne výsledky. Většina současných prací proto spoléhá spíše na kombinaci dvou či více nezávislých metod, než aby stavěla na výsledcích, které mohou být ovlivněné zvoleným experimentálním postupem.

Tato přednáška se pokusí stručně shrnout vývoj zkoumání exprese genů na úrovni transkriptu od pravoprávku až po dnešní pokročilé technologie. Zvláštní důraz bude kladen na kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci navazující na reverzní transkripcí (qRT-PCR) a související otázky normalizace a interpretace získaných dat.

NORTHERN HYBRIDIZACE U ROSTLIN – V ČEM JE DOSUD NENAHRADITELNÁ

HELENA ŠTORCHOVÁ

Laboratoř morfogeneze rostlin, ÚEB AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
E-mail: storchova@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 433

Stanovení množství specifické RNA pomocí hybridizační metody Northern patří k tradičním molekulárně biologickým technikám. Presná kvantifikace RNA je v současnosti častěji prováděna pomocí kvantitativní RT PCR postupem, který je rychlejší, jednodušší a spolehlivější než klasický Northern. Nicméně stále existují okolnosti, kdy je Northern hybridizace nenahraditelná. Tak je tomu v případě, kdy je cílem pokusu zjištění velikosti celkového transkriptu či počet různě dlouhých transkriptů přepsaných z jediného genu.

Northern hybridizaci můžeme provádět se sondou značenou pomocí ^{32}P , anebo prostřednictvím sondy neradioaktivní. Radioaktivní sondy jsou obecně citlivější než sondy neradioaktivní, RNA sondy jsou citlivější než DNA sondy. V naší laboratoři se osvědčilo značení sondy digoxigeninem pomocí různých souprav Roche. Ověřili a optimalizovali jsme různé postupy přípravy denaturačního i nedenaturačního agarozového gelu i různá složení nanášecího pufru. Metodu Northern hybridizace úspěšně používáme pro studium transkripce mitochondriálních genů u *Silene vulgaris*.

DNA MICROARRAYS – TECHNOLOGY AND APPLICATION

DAVID REŇÁK^{1,2,3}, NIKOL DUPLÁKOVÁ^{1,3}, DAVID HONYŠ^{1,3}

¹ Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

² Dept. of Plant Physiology and Anatomy, Faculty of Biological Sciences, Branišovská 31,
370 00 České Budějovice

³ Dept. of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 43 Praha 2
E-mail: renak@ueb.cas.cz, tel: 220 390 451

Traditional molecular biology tools for studying gene expression are limited to a small group of genes at a time. Recent advances in microarray field have enabled the study of thousands of genes in a single experiment and extensive investigation of their expression profiles. While development of material science, surface chemistry and miniaturization has progressed, DNA microarrays have received a great deal of attention and become broadly commercialized.

The principle of DNA microarrays is to detect a large number of transcripts or cDNA in a sample and their identification based on complementation with probes that are immobilized with known coordinates and belonging to a gene. There are several technologies to manufacture DNA microarrays. The main difference is in the way and place of preparing DNA probes, which can be (a) *in vitro* out of the chip or (b) *in situ* on the chip. In the first case (a) DNA probe is made by PCR with well defined primers and the part of amplified gene or by *de novo* oligonucleotide synthesis with length of 100–300 nt. The following instrumentation is printing of ready probes onto the surface of the chip. This technology is in principle same as that of ink-jet printing. In the second (b) approach, DNA probes are directly synthesized on the chip using photolithography, piezoelectric deposition or electrochemistry and the length of these probes is 25–100 nt. Another difference lies in materials used for DNA microarray manufacturing such as glass slide, silicon chip or nylon membrane.

DNA microarrays are broadly used in biological and biomedical research. They are used for global analyses of gene expression in particular tissues and cells during developmental or environmental changes, in analyses of marker genes during oncogenesis, in study of mutation and SNP polymorphism for forensic use or identification of certain diseases, in study of alternative splicing and others. DNA microarray is a powerful technology to investigate complex regulation of gene expression and becomes a corner-stone in post-genome era of contemporary biology.

References

Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingras TR, Lockhart DJ (1999) Nature Gen Supp 21: 20–24

Zhu T (2003) Curr Op Plant Sci 6: 418–425

Redman JC, Haas BJ, Tanimoko G, Town CD (2004) Plant J 38:545–561

Supported by GACR grant 525/06/0864 and GAAVCR grant KJB6038409.

MICROARRAY DATA TREATMENT AND NORMALIZATION

DAVID HONYS

Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
 Dept. of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 43 Praha 2
 E-mail: honys@ueb.cas.cz, tel: 225 106 450

Introduction of microarrays enabled the study of gene expression at a genome-wide level. It is a crucially optical technique and many intermediate steps are needed in order to associate gene expression with the emission of light at the particular spot. In each of these steps, both random and systematic errors accumulate. Random errors tend to increase the variation of the results, but do not really affect their overall mean accuracy. Systematic bias, however, can cause disaster because they can alter the structure of the results to the extent that the raw (or, in worse case, mistreated) data can say very little about the actual amount of transcribed mRNA. For all stated reasons, normalization step is required prior to microarray data analyses.

Normalization stands for the process of removing systematic bias as a result of the experimental artifacts from the data. Its application is inevitable for both dual-channel (variable design, ie. HGMP project; www.hgmp.mrc.ac.uk) and single-channel arrays (ie. Affymetrix GeneChip; www.affymetrix.com).

Normalisation consists of several individual activities and it is virtually impossible to perform them at once. When normalizations are done one after the one, it is almost inevitable that their order affects the outcome. It is therefore crucial that some rhythm or reason is applied in selecting the order of the individual normalization steps. It is generally accepted as reasonable to normalize all local features first and then gradually progress to normalizations that involve several or all arrays. However, if one is not prudent with normalization at each step, it is easily conceivable that higher-order normalizations introduce bias if lower-order normalizations have not been dealt with carefully. In principle, single-channel arrays do not produce so many normalization obstacles as double-channel arrays. For single-channel arrays, the following order of normalization steps is strongly recommended: 1) Spatial correction, 2) Background correction, 3) One-condition rescaling/modeling (within replicates, few arrays) and 4) Across-conditions rescaling/modeling (across various experiments, often multiple arrays).

Moreover, the most common single-channel microarray, the Affymetrix GeneChip, has some idiosyncrasies with respect to data storage and initial analyses. Every Affymetrix GeneChip microarray employs internal replicates for all genes. They are called probes and, depending on the array type, there is 11–20 of them for each gene. Probes are designed as 25-mer oligonucleotides and they are considered as brief quotes of a particular gene. The idea was that as long as the quote is specific enough, RNA from that and only that gene can recognize it as itself. With progressively improved annotation of individual genomes, this assumption is often no longer true and that is why number of genes actually covered by particular microarray gradually decreases. However, this problem of non-specific hybridization has been partly dealt with. Affymetrix designed for each perfectly matching probe (PM) a so-called mismatch (MM) cousin. It was believed that a gene-specific expression value would be obtained by subtracting the MM values from the corresponding PM values. Well, not always.

Several methods are being used for Affymetrix microarray data normalization. MAS 5.0 software (Affymetrix) subtracts MM values from PM values to obtain the individual probe expression values. Tukey's biweight algorithm is used to summarize all probe values for a particular gene into single gene expression value. Application of a scaling factor then adjusts the brightness of individual arrays to the average. Another software, RMA (freeware, part of the R package, www.r-project.org), suggests an alternative background correction algorithm in place of MAS 5.0 mismatch subtraction. dChip software (freeware, www.dchip.org) normalizes the data by pooling for each gene the information across probes and across replicates using a multiplicative model. The employed algorithm detects and removes probe or array outliers.

Supported by GACR grant 525/06/0864 and GAAVCR grant KJB6038409.

WEB-BASED TOOLS FOR ANALYSIS OF TRANSCRIPTOMIC DATA

NIKOLETA DUPLÁKOVÁ

Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
Dept. of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 43 Praha 2
E-mail: duplakova@ueb.cas.cz, tel: 225 106 452

Biological research in present post-genomic era is characterised by the effort to functionally characterise whole genomes of model organisms (ie. Quite ambitious NSF Project 2010). It requires to reveal biological function of thousands of genes. Transcriptomics represent one mighty tool to achieve such goal. It enables to understand function of genes by parallel analyse of their expression patterns. The characterisation of transcriptomes of individual plant cells and complex tissues in different morphological and developmental stages under various physiological and stress condition have become, together with number of other „omes“, one of the main and important field of interest in molecular biology today.

DNA microarray technology created the opportunity in our effort to detect the parallel expression of numerous genes. Correct interpretation of microarray expression data give significant insight into global gene expression patterns and thus supports enables to reveal the functional specialization of gene or their groups.

The broad spread of microarray technology has led to the availability of vast amount of data. However, it points out potential difficulties in orientation in these datasets and their proper interpretation even in the case of datasets stored on public repositories and services. Recently, in parallel with increasing number of microarray expression data, several web-based databases and toolboxes appeared. This improved the processing and interpretation of expression data (ACT [<http://www.arabidopsis.leeds.ac.uk/act/coexanalyser.php>]), arabidopsisGFP [<http://agfp.ueb.cas.cz/>]), Genevestigator [<https://www.genevestigator.ethz.ch/>]). Relatively extensive group of web-based tools is represented applications designated for testing of similarities in expression patterns and gene clustering (ACT, Genevestigator). These analyse may help to frame testable hypotheses based on potential participation of co-regulated genes in the same metabolic or regulatory pathways.

SEMIQUANTITATIVE RT-PCR ANALYSIS OF TERMINAL GENES IN ARABIDOPSIS

JAN VRBSKÝ

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135, 612 65 Brno, Czech Republic
E-mail: vrbsky@ibp.cz, tel.: +420 541 517 194, fax: +420 541 240 500

Introduction

The reversible silencing of genes near telomeres, termed the telomere position effect (TPE), has been extensively studied in *Saccharomyces cerevisiae* (Tham et al. 2002), human (Baur, J. et al. 2001), and some other organisms but it still remains unknown in plants probably due to different organisation of subtelomeric heterochromatin in plant model species. Because TPE is an epigenetic event, genes underlying this mechanism of heredity are expressed in variable degree.

A reliable and simple method for assessing expression of subtelomeric genes is an important tool for investigating structural and functional organization of chromatin domain at chromosome termini. *Arabidopsis thaliana* is a unique biological model with specific organisation of subtelomeric chromatin structure. Unlike to other plant species where large blocks of heterochromatin are located at the chromosomal ends, *Arabidopsis* subtelomeres contain genes that are immediately adjacent to telomeres. This unique *Arabidopsis* feature allows us to characterise interactions between chromatin arrangement and telomeric organisation by analyzing expression of terminal genes.

There is an increasing number of known transcription factors that bind to *Arabidopsis* telomeric sequence motif (TTTAGGG) *in vitro*, and hence have a capability to localize to chromosome termini (Yang et al. 2003). This indicates that the transcriptional factors may be involved in controlling expression of subtelomeric genes and that telomeres could serve as essential promoter regions for telomere-proximal genes. Therefore, alteration of the telomeric structure may lead to changes in the expression of these genes. Available *Arabidopsis* mutants with defects in telomere length maintenance (i.e., mutant lines with shorter/longer telomeres), such as *ku70/ku80* (Riha et al. 2002) or *tert* (Fitzgerald et al. 1999) deficient lines allow to investigate the effect of telomere structure on expression of subtelomeric genes.

Five pairs of chromosomes of *A. thaliana* contain 10 unique chromosomal ends. A detail study of the length of the telomeres on individual chromosomes (Copenhaver et al. 1996) showed large blocks of rDNA repeats on the left arms of the chromosome 2 (2L) and 4 (4L). Subtelomeric parts of 8 remaining arms do not contain any heterochromatin blocks but they harbour specific terminally located genes (TLGs, Figure 1). The distance of these genes from the most proximal telomeric repeats is relatively short, especially on 2R and 3R arms being only 653 bp and 1.3 kbp, respectively.

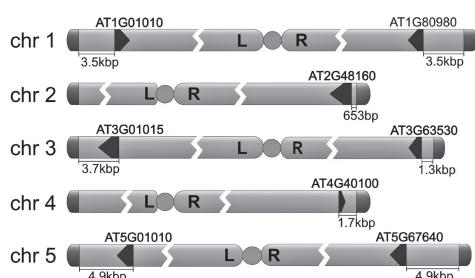


Figure 1. The scheme of *Arabidopsis* chromosomes with the most terminally positioned genes (TLGs). Black arrowheads show genes (AGI codes) in proper orientation. The distances from the telomeres are indicated. Centromeres are represented by small circles and telomeres by dark-grey caps.

In silico analysis of expression of TLGs was done using GENEVESTIGATOR microarray database (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at>). Expression of 4 of total 8 genes was confirmed (AT1G01010, AT2G48160, AT3G01015, AT5G01010) indicating their real function in the plant transcriptome. Expression of 4 other genes (AT1G80980, AT3G63530, AT4G40100, AT5G67640) was not detected.

Here we describe a method based on the radioactive quantification of RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) products. Total RNA was isolated from stems, inflorescences, leaves, seedlings, siliques and roots. After RNA purification from DNA contaminations, RNA was reversely transcribed into cDNA. Gene specific primers were used to amplify segment of TLGs. After the separation on agarose gel, PCR products were transferred onto nylon membrane using Southern blot technique and hybridized to radioactively labelled gene-specific probes. Signal quantifications and expression profiles of TLGs were calculated.

Přednášky

Expression level comparison of the same gene in different plant lines (i.e., wild-type line against *ku70* and *ku80* lines with knock-out gene leading to prolongation of telomeres and *tert* line with extremely short telomeres) requires an exact cDNA calibration (Figure 2).

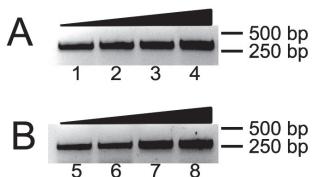


Figure 2. Calibration of cDNA concentrations in stem tissue of *tert* mutant line.

PCR products of *Actin 2.7* gene were blotted and hybridized with gene-specific probe. Amounts of wild-type (A) and *tert* mutant cDNA to be compared were loaded into PCR reactions and diluted (0.1, 0.3, 0.7, and 1 μ l of 20 μ l cDNA transcribed from 500 ng of total RNA).

Actin (ACT2.7) PCR (primers, PCR conditions) reactions served as a control for cDNA quantity and integrity. The cDNA isolated from equivalent tissues of the plant lines compared were balanced in different dilutions and under optimised PCR conditions where linear dependence between the number of PCR cycles and the amount of product is presumed. Amounts of cDNA were calculated using radioactive labelled *Actin* probe hybridized to PCR products of the *Actin* gene.

Using this method we confirmed the presence of transcripts of all eight candidate TLGs including four genes with unknown expression profiles in GENEVESTIGATOR tool. Direct comparison between wild-type plants and mutants defective in telomeric length (*tert*, *ku70*, *ku80*) showed differences in their expression in the same tissue. As expected, the genes tested showed dissimilar expression profiles. These results indicate either telomere position effect similar to previous studies in different organisms or direct interaction between telomeres and TLGs. In comparison to a routine ethidium bromide quantification, semiquantitative RT-PCR analysis of genes using radioactive labelled probe is more sensitive and allows sophisticated quantification of measured signals.

Although the accuracy of the presented method is lower than Real-Time PCR techniques, the results are highly reproducible, especially when comparing the expression of the same gene in various plant lines. The method is particularly useful for the estimation of gene expression of wide pool of genes and for selection of positive candidate genes for detailed Real-Time PCR analyses. Based on the TLG experiments we found this technique reliable when intensity of signals differed by 30% and more.

Materials and methods

Consequent steps of gene expression comparison can be simplified in a comprehensive scheme (Figure 3).

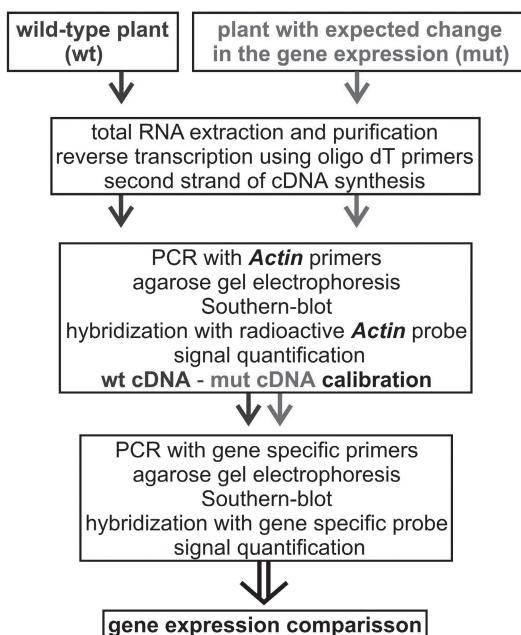


Figure 3. Schematic flowchart of the gene expression comparison method.

Individual steps of the method (RNA isolation and purification / RT-PCR / Southern-blot and RNA calibration / hybridisation of the membrane / signal quantification) are boxed in logical groups where a track of the gene to be measured is highlighted in grey.

Přednášky

RNA extraction

RNA extractions were carried out with the TRI Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. We normally used 100–500 mg of fresh tissue for homogenization. Individual samples were powdered in liquid nitrogen by pellet pestles (SIGMA). To remove genomic DNA contamination, the sample was treated with DNase I. Isolated RNA in total volume of 250 µl was mixed with 27 µl of 10× DNase I buffer (Fermentas), 5 µl of RNase inhibitor (Promega, 40U/µl), 5 µl DNase I (Promega 10U/µl) was incubated for 30 minutes at 37 °C. To terminate DNase I reaction, 22 µl of EDTA (25 mM) was added and incubated for 10 minutes at 68 °C. Additional TRI Reagent purification step followed. 300 µl of TRI Reagent, 200 µl of chloroform and 100 µl of H₂O were added. After thorough but gentle over-head inversions, samples were incubated for 5 minutes at room temperature. Mixture was centrifuged at 14000 RCF at 4 °C for 10 minutes. The supernatant was transferred into a new 1.5 ml tube and precipitated with 0.4 volumes of isopropanol for 10–15 minutes. The precipitated RNA was centrifuged at 14000 RCF for 15 minutes at 4 °C. The RNA pellet was washed with 70% ethanol, air-dried and resuspended in 50 µl of nuclease-free water. Purified RNA samples were stored at -70 °C. RNA obtained with this procedure was essentially free of genomic DNA and usually yielded 10 µg of total RNA from 3 to 4 *Arabidopsis* leaves and 30 µg of total RNA from 2 to 3 young inflorescences.

RNA concentration and integrity

Concentration of purified RNA from previous step was measured using spectrophotometer in 100 to 500 times dilution in water and measured OD at 260 nm. Additional concentration and integrity check of RNA was performed using agarose-gel electrophoresis in 1× TBE buffer. Amount of 1-2 µg of RNA was denatured in 2× denaturing buffer (0.26 g of urea in a 1.5 ml tube, 500 µl of 6× Loading Buffer III; Fermentas, 200 µl of 5× TBE and 150 µl of nuclease-free water). RNA in denaturation mixture was incubated for 3 minutes at 65 °C and then cooled on ice for 1 min, centrifuged quickly and put back on ice. RNA samples were loaded into 1.5% agarose gel and electrophoresis was run at 100 V for about 1 hour.

RNA reverse transcription

500 ng of total RNA was reverse transcribed in the presence of 0.5 µg of oligo d(T), 5 µl of 5× reaction buffer (supplied with M-MLV transcriptase, Promega), 1.25 µl of 10mM dNTPs and 1 µl of M-MLV RT (Promega) in a final reaction volume of 20 µl. Reactions were carried out at 50 °C for 60 minutes, followed by a 15 minute step at 70 °C to denature the enzyme, and then cooled to 4 °C.

Second strand synthesis and PCR amplification

We used 0,4 to 2 µl of cDNA for subsequent PCR amplification with gene specific primers (Figure 4). The following primers were used for amplification of the genes displayed: AT1G01010 (GAACATCAGCAGAGGACATATG, AAGGTGCCAAAGTAAGGAAC), AT1G80980 (CAAATTGGCTGTTGATTGG, TTCCCAGTCTCTGTCTCATC), ACT2.7 (CTGGAATGGTGAAGGCTGGT, CTTCTTCAAGTGAAAAATGG), AT3G01015 (CTTAACCAGATTCTCAGGTTCA, CATGCCTCAGTTCTTCATC), AT4G40100 (TCGTTTCTTTCAACGAGGC, CCCGAATTGGTTCTGAATC). If exons and introns are annotated, primers were constructed over introns to exclude products from genomic DNA.

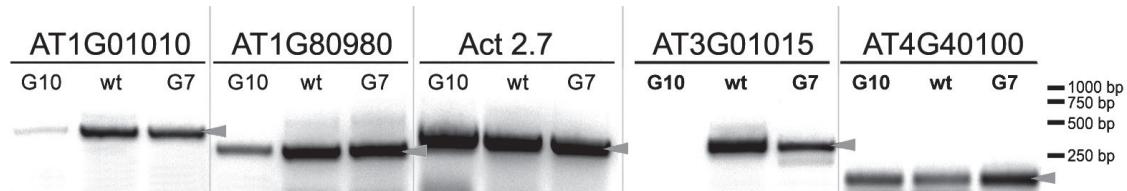


Figure 4. Expression profiles of 4 TLGs in the tert mutant line.

The tert lines were grown up to the 7th (G7) and 10th (G10) generation to increase the effect of telomere shortening. The 10th generation of tert mutants almost lacks the telomeres, whereas the 7th generation shows very short telomeres.

Labelling of dsDNA probe by Klenow

Following reaction in 1.5 ml tube was mixed: 25–50 ng of dsDNA (PCR product) in 30 µl of water, 1 µl of gene specific oligonucleotides (10 µM stock). Mixture was boiled for 5 min and then cooled down on ice for another 5 minutes. Tube was briefly spined down and following components were added: 10 µl of 5× oligonucleotide labelling buffer (OLB; 250 mM Tris pH 8.0, 25 mM MgCl₂, 5 mM mercaptoethanol, 2 mM each dCTP, dGTP and dTTP, 1 M HEPES pH 6.6, 1 mg/ml random hexamers), 2 µl of BSA (10 mg/ml), 5 µl of [α^{32} P] dATP (3000 Ci/mmol),

1 µl of Klenow fragment (5U/µl). Reaction was incubated for 1 hour at 37 °C. Labelled probe was purified with Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) and eluted twice with 100 µl of elution buffer.

Southern blot hybridization

Modified method according to Zhou et al. (1994) was used. Probe was transferred into a 1.5 ml tube with lock and boiled for 5 min and than cooled down on ice for 1 minute. Membranes were prehybridized for 2h at 55 °C. Radioactive probe was added to prehybridization solution and hybridized with membrane for 12h at 55 °C. Washing of membranes was done with 2× SSC, 0.1% SDS two times for 10 min at 55 °C, followed by stringent washing: 0.2× SSC, 0.1% SDS for 45 minutes at 55 °C. After wrapping to Saran foil, intensity of the radioactive signal was roughly measured using Geiger-Muller counter and exposed to Phospho-screen (Molecular Dynamics). Products were analyzed on PhosphorImager (Molecular Dynamics). Signal intensity was analysed and quantified using Quantity One software (BioRad).

Grant : GA AV A6004304

References

- Baur, J., Zou, Y., Shay, J.W., Wright, W.E. 2001. Telomere position in human cells. *Science* **292**: 2075-2077
- Copenhaver, G.P., Pikaard, C.S. 1996. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J.* **9**: 259-272
- Fitzgerald, M.S., Riha, K., Gao, F., Ren, S.X., McKnight, T.D., and Shippen, D.E. 1999. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14813–14818
- Riha, K., Watson, J.M., Parkey, J., Shippen, D. E. 2002. Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in *Arabidopsis* mutants deficient in Ku70. *EMBO J.* **21**: 2819–2826.
- Tham, W.H., Tham, V.A. Zakian. 2002. Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene* **21**: 512–521
- Yang, S.W., Kim, D.H., Lee, J.J., Chun, Y.J., Lee, J.H., Kim, Y.J.,
- Chung, I.K., Kim, W.T. 2003. Expression of the telomeric repeat binding factor gene NgTRF1 is closely coordinated with the cell division program in tobacco BY-2 suspension culture cells. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 21395–21407
- Zhou, M.Y., Xue, D., Gomez Sanchez, E.P., et al. 1994. Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Biotechniques* **16**: 58-59

ISOLATION AND DETECTION OF SMALL RNA MOLECULES.

JAROSLAV FULNEČEK

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

Extraction of small RNA molecules

Avoid contamination by RNases using proper RNA handling. During whole procedure (isolation and detection) use RNase-free solutions and lab equipment and wear gloves.

The following protocol is based on Dr. Andrew J. Hamilton protocol "Extraction of 25NT RNA" from The David Baulcombe group, The Sainsbury laboratory (Hamilton and Baulcombe 1999) with modifications and improvements as cited in the text.

Total RNA isolation

Homogenize fresh plant material (4 g of leafs, seedlings, etc.) in liquid nitrogen with a mortar and a pestle. Transfer homogenate into RLT buffer (2 ml/g, Qiagen) in 50 ml falcon tube. For homogenization it is also possible to use other guanidine thiocyanate buffers. Extract two times with phenol-chloroform (add one volume) and precipitate nucleic acids by adding 0.1 volume of 3M NaOAc pH 5.0 and 3 volumes of ethanol and incubating at -20 °C for 2 hours. Recover the total RNA/DNA by centrifugation at 10000×g for 10 min. Wash the pellet by 75% ethanol and let it air-dry.

For detection of abundant and known small RNA molecules RNA preparations from 100 mg of plant tissues using Trizol (Invitrogen) are sufficient.

Enrichment for small RNA

Dissolve the pellet in about 5 ml of TE (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA; for Trizol preparations only ~0.1 ml), heat this to 65 °C (faster dissolving of the pellet and disrupting any association of small RNA with DNA). Place the solution on ice and add PEG (Mw=8000) to a final concentration of 5% and NaCl to a final concentration of 0.5 M. Mix well and incubate on ice for 30 minutes. Spin down high molecular weight nucleic acids at 10000×g for 10 minutes. Transfer supernatant to a new falcon tube and precipitate small RNA molecules by adding 3 volumes of ethanol. Place the mixture at -20 °C for at least 2 hours and then spin down the RNA at 10000×g for 10 minutes. Wash the pellet by 75% ethanol and let it air-dry. Dissolve this preparation in formamide (0.1–0.5 ml), quantify RNA by measuring UV absorbance of aliquot and use 5–50 µg of small RNA directly for Northern blots. However, aberrant migration during electrophoresis can be noticed sometimes, and that is why further purification of small RNA fraction may be necessary.

Purification of small RNA fraction

Equilibrate DEAE-Sepharose CL-6b (Sigma) in buffer A (50 mM MOPS/NaOH pH 7, 15% isopropanol, 0.2 M NaCl, 0.15% Triton X100). Prepare column by plugging the end of a 5 ml disposable syringe by whatman 1 filter paper circles and adding 1 ml of the equilibrated sepharose. Let the column settle, dissolve the pellet of small RNA in buffer A and apply to the column under force of gravity. Collect the flow-through and apply to the column again. Wash the column with 10 volumes of buffer A and elute small RNA with buffer B (similar as buffer A, only concentration of NaCl is 1 M). Add 3 volumes of ethanol to the eluate, mix, place it at -20 °C for 2 hours and spin down the small RNA at 10000×g for 10 minutes. After washing the pellet by 75% ethanol and air-drying dissolve it in formamide (0.1–0.5 ml).

Electrophoresis and Northern blotting

Separate small RNA molecules in 15% polyacrylamide (19:1), 50% urea, 1×TBE (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) gels. Apparatus with 20 cm long and 1.5 mm thick gel is sufficient. It is usually possible to separate up to 50 µg of small RNA in one lane. Prepare one additional sample to which add one or two radioactively end-labeled DNA oligonucleotides (about 20 and 25 bases) or radioactively end-labeled RNA ladder (10–150 bases, Ambion Decade Markers) to serve as length standards. As a positive control load additional samples supplemented with a range of concentration (1 fmol–1 pmol) of ~20 nt DNA oligonucleotide complementary to probe. As a negative control, use small RNA samples prepared from different plant species. Add bromophenol blue and TBE buffer to samples dissolved in formamide (recommended final concentration of formamide is at least 50%), heat it at 65 °C for 5 minutes, place on ice and load the gel. Run the gel until bromophenol blue reaches the bottom of the gel. Wash the gel in 0.5×TBE (10 min.), stain RNA with ethidiumbromide in 0.5×TBE (10 min.) and then wash the gel again

in $0.5 \times$ TBE (10 min.). Photograph the gel in order to document an RNA quantity in individual lanes and cut off the part of the gel with overloaded tRNAs and 5S rRNA molecules (from start to about 80 nt). Blot the RNA to nylon membrane (Hybond N+, TM or other positively charged membrane useful for Northern blotting of small RNA molecules) at 3 mA/cm² for 1 hour in $0.5 \times$ TBE using semi-dry blot apparatus. Carefully take the membrane, do not wash it, fix the RNA either by placing the membrane on filter paper soaked in $0.5 \times$ TBE and UV crosslinking or by baking the membrane at 80 °C for 2 hours. Store the dry membrane in dark until use.

Detection with radioactively labeled probe

Detection of known and abundant small RNA molecules (several pg per lane) is possible by hybridization with complementary 5' end labeled oligonucleotide. T4 Polynucleotide Kinase (~30 units) and [γ -³²P]ATP (2–5 fold molar excess to 1–10 pmol of an oligonucleotide) is used to label an oligonucleotide to high specific activity (Sambrook and Russell 2001). Radiolabeled oligonucleotides can be purified either by precipitation with ethanol (Sambrook and Russell 2001) or by gel filtration on columns (NucAway-Spin Columns, Ambion).

Preparing the riboprobe

If you do not know the exact sequence of small RNA of interest (small RNA molecules were not cloned and sequenced) or there is limited amount of target small RNA in sample for detection by Northern blot hybridization (~10 fmol per lane) you have to prepare strand-specific single-stranded RNA probe (riboprobe) by incorporation of [α -³²P] UTP or GTP in *in vitro* transcription reaction with bacteriophage RNA polymerase (Sambrook and Russell 2001). Riboprobe is prepared from linearised recombinant plasmid that carries bacteriophage promoter immediately upstream of the DNA fragment of interest or by adding the promoter to 5' end of DNA fragment using PCR (Sambrook and Russell 2001). Check on the orientation of promoter and the sense of generating RNA strand. Use DNA template with blunt or 5'-protruding ends because 3'-protruding termini can aberrantly initiate transcription (blunt the ends of PCR product of Taq DNA polymerase). Prepare RNase-free DNA template (treatment with proteinase K and phenol-chloroform extraction is recommended).

Assemble *in vitro* transcription reaction in a laboratory according protocol (Sambrook and Russell 2001) or use commercial kit (RNAMaxx High Yield Transcription Kit, Stratagene). Use up to 10 µl of [α -³²P] rUTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol), transcription buffer, 0.5 mM each rATP, rGTP, rCTP, 0.2–0.5 µg of template DNA, 30 mM dithiothreitol, 0.3 U of yeast inorganic pyrophosphatase, 1 µl of RNase block and 200 U of RNA polymerase per 20 µl reaction volume. Incubate the complete reaction mixture at 37 °C for 2 hours. Terminate the reaction and digest the template DNA by incubation of the reaction mixture with 1 µl of RNase-free DNaseI at 37 °C for 30 minutes. Two times precipitate the riboprobe with ethanol – add 10 µl of 7.5 M NH₄Ac, mix, add 75 µl of ethanol, mix, keep on ice for 10 minutes, spin at 15000×g for 15 minutes, resuspend a pellet in 100 µl TE, add 50 µl of 7.5 M NH₄Ac, mix, add 375 µl of ethanol, mix, keep on ice for 10 minutes, spin at 15000×g for 15 minutes, wash the RNA pellet with 75% ethanol, let it air-dry for 5 minutes and resuspend it in 20 µl of TE.

Hybridization of nucleic acids fragments of comparable length can avoid high background and has higher stability of RNA-RNA homoduplexes. Therefore, prior hybridization, long riboprobes are statistically fragmented to 50 nt long molecules to obtain pool of fragments with different sequences. Add 300 µl of 200 mM Carbonate solution (80 mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃) per 20 µl of transcription reaction and incubate it at 60 °C for t minutes, which is the time necessary for riboprobe fragmentation to an average size of ~50 nucleotides ($t = (Li - Lf)/(K \times Li \times Lf)$ where t is the time in minutes, Li is the initial length of the probe in kb, Lf is the final length of the probe in kb (0.05 for 50 nt) and K is the rate constant = 0.11 kb/min). At the end of the incubation add 20 µl of 3 M NaOAc (pH 5) to stop the reaction. It is possible to add the mixture directly to hybridization solution (5–10ml of hybridization solution per small hybridization bottle).

Prepare "cold" riboprobe and analyze it on agarose gel to check on the efficient transcription of the template DNA before using [α -³²P] UTP. During preparation of radioactive riboprobe take aliquots of the reaction mixture for analysis in case of problems with detection of small RNA to monitor potential mistakes during probe preparation.

Hybridization

Prehybridize the membrane in hybridization buffer for Northern blots (including 50% deionized formamide and 7% SDS, (Sambrook and Russell 2001)) at 40 °C for at least 1 hour. It is possible to use UltraHyb-Oligo (Ambion). After adding the probe, hybridize the membrane 1–3 days at 30 °C. Wash the membrane two times with 2×SSC, 0.5% SDS at 30 °C for 10 minutes. Wrap the wet membrane in a saran wrap and expose it in a phosphorimage cassette for 1 hour or overnight (depends on radioactivity of the membrane). It is possible to decrease background (in case of riboprobe) by stripping the membrane with RNaseA at room temperature for 10 minutes (the stripping solution is 20 mM Tris-Cl pH 7.5, 5 mM EDTA, 60 mM NaCl, 2 µg/ml RNase A) (Mette et al. 2000). This step can be repeated until the background signal is low.

Cloning of small RNA molecules

Another way to detect small RNA molecules is extraction of all small RNA molecules from denaturing polyacrylamide gel ("Crush and soak", (Sambrook and Russell 2001)), cloning and sequencing. There are many protocols, for example http://www.tsl.ac.uk/dcb/services/Small_RNA_cloning_protocol.pdf from The David Baulcombe group, The Sainsbury laboratory (Chappell et al. 2005). The principle of the protocol is as follows. Hybrid 5'-DNA-RNA-3' adaptor is ligated to 5' ends of small RNA molecules using T4 RNA ligase. Phosphorylated hybrid 5'-RNA-DNA-3' adaptor with blocked 3'-hydroxyl terminus is ligated to 3' ends of small RNA molecules. Final ligation products are reverse transcribed and amplified. The PCR product is digested with restriction enzymes in adaptor regions and concatemerised using T4 DNA ligase. The concatemers are ligated into cloning vector, recombinant plasmids are cloned, inserts are amplified and sequenced and from the data small RNA sequences are extracted manually or automatically using software tools.

Acknowledgements

Thank Dr Jana Fulneckova (Masaryk University, Brno) for critical reading of the manuscript.

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (204/06/1432) and the Academy of Sciences (A50040507).

References

- Chappell L., Baulcombe D., Molnár A., 2005. Isolation and cloning of small RNAs from virus-infected plants. In Current Protocols in Microbiology (R. Coico, T. Kowalik, J.M. Quarles, B. Stevenson, R.K. Taylor, A.E. Simon and T. Downey eds.) pp. 16H.2.1-16H.2.17 John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
- Hamilton A.J., Baulcombe D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286:950-952.
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M., 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.*, 19:5194-5201.
- Sambrook J., Russell D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Additional literature

Small RNA isolation

- Han Y., Grierson D., 2002a. The influence of inverted repeats on the production of small antisense RNAs involved in gene silencing. *Mol. Gen. Genom.*, 267:629-635.
- Han Y., Grierson D., 2002b. Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant J.*, 29:509-519.
- Henderson I.R., Zhang X., Lu C., Johnson L., Meyers B.C., Green P.J., Jacobsen S.E., 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.*, 38:721-725.
- Huttenhofer A., Vogel J., 2006. Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucl. Acids Res.*, 34:635-646
- Onodera Y., Haag J.R., Ream T., Nunes P.C., Pontes O., Pikaard C.S., 2005. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, 120:613-622.

Small RNA cloning

- Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, 15:188-200.
- Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294:858-862.
- Llave C., Kasschau K.D., Rector M.A., Carrington J.C., 2002. Endogenous and silencing associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 14:1605-1619.
- Pfeiffer S., Lagos-Quintana M., Tuschl T., 2003. Cloning of small RNA molecules. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 4. (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl eds.) 26.4.1-26.4.18. John Wiley & Sons Inc.
- White J.L., Kaper J.M., 1989. A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *J. Virol. Methods*, 23:83-94.

Interesting links

<http://www.ambion.com>

<http://www.dharmacon.com>

VÝHODY A ÚSKALÍ PRODUKCE PROTEINŮ V EXPRESNÍM SYSTÉMU KVASINKY *PICHIA PASTORIS*

JAN LOCHMAN, TOMÁŠ KAŠPAROVSKÝ, VLADIMÍR MIKEŠ

Katedra Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR
 E-mail: jlochman@seznam.cz, tel: 549 495 602

Během posledních desetiletí byla vyvinuta celá řada technik pro manipulaci s DNA týkajících se její identifikace, specifického štěpení a klonování genů do celé rady organismů, které jsou po genetické stránce velmi odlišné od původního organisma. Hlavním úkolem takto vzniklých organismů je často snadná a finančně ne-příliš nákladná produkce proteinu.

U celé řady proteinů byla za „továrnou“ pro výrobu proteinů zvolena bakterie *E. coli* a to především díky jejímu rychlému růstu, snadnému klonování cílových genů a rychlé izolaci vzniklého proteinu. Na druhé straně je však *E. coli* prokaryotní organismus, který postrádá intracelulární organely jako je endoplazmatické retikulum nebo Golgiho aparát zodpovědné v eukaryotních organismech za modifikaci a správnou konformaci vzniklého proteinu. I přes tyto nevýhody může být mnoho eukaryotních proteinů produkováno v bakterii *E. coli*, avšak rovněž celá řada produkovávaných proteinů je nefunkčních a těžko exprimovatelných v solubilní formě. Právě tyto důvody vedly k vyvíjení eukaryotních produkčních systémů, mezi něž patří kvasinka *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris je methanoltrofní kvasinka upravená pro produkci rekombinantních proteinů, které jsou klonovány za velmi silný promotor methanol-indukované alkohol oxidázy (AOX1) vložený do expresních vektorů. Syntéza proteinu je tedy spouštěna přidáním methanolu do média, které neobsahuje zdroj uhlíku a tvoří tak jediný zdroj uhlíku pro kvasinku. Této skutečnosti se dá dále využít pro produkci proteinů 100% značených uhlíkem ¹³C, jejichž struktura se dá poté určit pomocí techniky NMR (Nukleárně Magnetická Rezonance). Syntetizované proteiny mohou být dále sekretovány do média, což umožňuje využití technik fermentace a velmi snadné purifikaci vzniklého proteinu. V neposlední řadě je výhodou i možnost produkce celé řady proteinů, které jsou toxicke pro bakteriální buňku a nemohou být tedy exprimovány v bakterii *E. coli*.

Naše zkušenosti s produkcí proteinů pomocí kvasinky *Pichia pastoris* jsou demonstrovány na syntéze mutantních forem proteinu cryptogelinu pocházejícího z houby *Phytophthora cryptogea* a je ukázána možnost snadné purifikace pomocí kombinace iontové výměnné kapalinové chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi.

EVO-DEVO: MECHANISMY ONTOGENEZE A EVOLUCE

BORIS VYSKOT

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
E-mail: vyskot@ibp.cz, tel.: 541 240 500, <http://www.ibp.cz/labs/PDG>

Cílem toho přehledného pojednání bude shrnout vztahy mezi vývojovou biologií a evolucí. Vývojem (ontogenezí či vývinem) rozumíme epigenetické procesy, které vedou od oplozeného vajíčka, přes embryogenezu, pohlavní reprodukci až k senescenci jedince. Vývoj je geneticky podmíněný a v průběhu posledních dvaceti let byly identifikovány a charakterizovány tisíce genů, které svou místní a časovou specifickostí exprese zajišťují vznik tvarů (obor vývojová genetika). Zřejmě nejznámějšími regulátory vývoje jsou homeotické geny, které reprezentují klíčové transkripční faktory spouštějící baterie realizátorových genů. Evoluce homeotických genů má zásadní vliv na morfologickou složitost organismů. Právě evoluce určité skupiny homeotických genů s homeoboxem je klíčem k pochopení struktury živočišného těla (zootyp). U rostlin se vyvinuly alespoň dvě skupiny homeotických genů, jedna specifikuje květní program (skupina MADS) a druhá architekturu stonku a listů (skupina s homeoboxem). Individuální vývoj organismu je tedy geneticky programovaný a cyklický. Pokud formulujeme, že vývoj je epigenetický, máme na mysli postupné změny, které nastávají v průběhu ontogeneze: existuje určitý plán ve formě sekvencí DNA, ale jeho realizace do značné míry závisí na interakcích s jinými částmi embrya a zejména na environmentálních vlivech. Další skupinou vývojových regulátorů dobré prostudovaných zejména u některých živočišných modelů jsou časové spínače – heterochronní geny. Zatímco geny homeotické jsou charakterizovány svými mutacemi, které způsobují ektopickou tvorbu struktur, u heterochronních mutantů lze pozorovat fenomény předčasněho stárnutí či trvalé mladosti (dauer-formy).

Evoluce je vývoj historický, představuje kontinuální linii živých forem, která je podle darwinistů podmíněna náhodnou variabilitou a přísným přírodním výběrem. Přenos dědičné informace zřejmě probíhá jen na úrovni zárodečné dráhy: u většiny živočišných druhů (hlístití počínají) jde o gamety založené v časné embryogenezi, u rostlin můžeme mluvit o pluripotentních buňkách meristemů. O linii somatické říkáme, že je diskontinuální a tudíž smrtelná. Pro existenci jedince a pro evoluci daného druhu má však význam zásadní, protože přírodní výběr probíhá na bázi fenotypu, v období pohlavní zralosti. Procesy individuálního vývoje (development) jsou tedy klíčové pro historickou linii přírodních forem (evolution). Vztah mezi evolucí a vývojovou biologií je explicitně považován za novou vědní disciplínu již asi dvacet let a označován jako evoluční vývojová biologie (evo-devo): za jejího otce je považován autor populárních učebnic vývojové biologie profesor Scott F. Gilbert ze Swarthmore College v Pennsylvanií. Některé novější studie také zdůrazňují účast ekologických procesů ve vývoji i evoluci (eco-devo), což jen potvrzuje epigenetický charakter individuálního vývoje. Lze tedy shrnout, že evoluční vývojová biologie (evo-devo) se zabývá problematikou, jak jsou vývojové procesy a jím odpovídající mechanismy modifikovány v průběhu evoluce a jak na základě těchto změn vzniká minulá i současná biodiversita.

Literatura ke studiu

- Agrawal AA: Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294: 321, 2001
- Cronk Q: Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nature Rev Genet* 2: 607, 2001
- Flegr J: Evoluční biologie. Academia, Praha, 2005
- Gilbert SF: Ecological developmental biology. *Devel Biol* 233: 1, 2001
- Hall BK: Evo-devo: evolutionary developmental mechanisms. *Int J Dev Biol* 47: 491, 2003
- Howe GT, Brunner AM: An evolving approach to understanding adaptation. *New Phytol* 167: 1, 2005
- Jablonka E, Lamb MJ: Epigenetic inheritance in evolution. *J Evol Biol* 11: 159, 1998
- Raff RA: Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nature Rev Genet* 1: 74, 2000
- Vyskot B: Přehled vývojové biologie a genetiky. ÚMG AV ČR, Praha, 1999
- Wilkins AS: The evolution of developmental pathways. Sinauer, Massachusetts, 2002

Podporováno grantem GA AV ČR 6004304.

HETEROLOGOUS APPROACH IN THE SEARCH FOR (CANDIDATE) GENES

JITKA ŽLŮVOVÁ

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic
E-mail: jitka@ibp.cz, tel.: +420 541 517 247, fax: +420 541 240 500

Keywords: evolutionary-developmental biology; degenerate primer design; PCR

Introduction

Why are there bilaterally symmetric flowers in pansy (*Viola*) instead of radially symmetric ones as in poppy (*Papaver*) and why are there lobed leaves in oak (*Quercus*) instead of entire ones as in *Tillandsia*? To answer these and many other questions of evolutionary-developmental biology, it is very difficult to use "classical" approaches like mutants screens (as many morphological novelties are caused by loss of function and because of genetic redundancy which is a relatively frequent phenomenon), positional cloning (as few data are available in the non-model species) or subtraction cloning (as too many genes will be obtained from subtractions performed between two distantly related species). The straightest method is based on cDNA or genomic library sequencing followed by analysis of sequence data and comparative expression profiling to identify genes that are candidates for a causal role in evolutionary divergence. This approach is performed for a small group of species by the Floral Genome Project (Floral Genome Project Research Group 2002). However, this method is still extremely time- and money-consuming.

Direct search for candidate genes followed by their subsequent analysis seems to be a relatively cheap and fast alternative. Using this strategy, for example the signalling pathway leading to the unifoliate growth form in *Streptocarpus* was found (Harrison et al. 2005). Because the first and very often also the most difficult step is obtaining of candidate genes, this review is focused on different methods used in the search for candidate genes.

To search directly for candidate genes, it is possible to screen cDNA (or genomic) library using probes coming from other species. However, some difficulties can appear. Because appropriate libraries are not available in many non-model organisms, it is often necessary to prepare own library. Moreover, failure in the screening can be caused by the fact that the desired gene is not highly conserved. Additionally, when cDNA libraries are screened, a considerable problem can be caused by the fact that some transcripts are present at exceedingly low levels in the tissues in which they act. For example, the gene *TEOSINTE-BRANCHED1* (a gene expected to play a crucial role in the evolution of maize from its wild progenitors – Doebley et al. 1997) has not been identified in the public maize database of 100,000 EST's (Baum et al. 2002).

Most of these difficulties can be overcome by PCR-based search for candidate genes: it is not necessary to construct libraries, the probability that conserved parts of 20–30 nucleotides appropriate for primer design will be found is much higher than the probability that a considerable part of a gene is conserved enough to be found by hybridisation, and PCR is enough sensitive to amplify transcripts of genes expressed at extremely low level.

Protocols and troubleshootings

Primer design strategies

However, primer design can be still very difficult because of codon degeneracy and the additional degeneracy needed to represent multiple codons at a position in the alignment. Basically, three primer design strategies have previously been employed (reviewed in Rose et al. 1998). One strategy is to design consensus primers across highly conserved regions. However, primer-to-template mismatches in distantly related species limit this strategy mostly to closely related species. The second strategy is to synthesize a pool of degenerate primers containing most or all of the possible nucleotide sequences implicit in a multiple alignment. A big problem is that as the degeneracy increases, the concentration of any single primer drops. As a result, the number of primer molecules in the PCR that can prime synthesis during the amplification cycles drops, and these primers are used up early in the reaction. This strategy is used in the primer design programs PriFi (Fredslund et al. 2005) and Primaclade (Gadberry et al. 2005).

The strategy called COnsensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP (Rose et al. 1998; Rose et al. 2003)) seems to overcome disadvantages of both degenerate and consensus primer design methods. Primers consist of a relatively short (11–12 nucleotides) 3' degenerate core and a long (more than 23 nucleotides) 5' non-degenerate consensus clamp. Primers are designed according to conserved amino acid sequences. The 3' degenerate core contains all of the possible nucleotide sequences whereas the 5' non-degenerate consensus

clamp contains the most probable nucleotides within each codon. Reducing the length of the 3' core to a minimum decreases the total number of individual primers in the degenerate primer pool. Hybridization of the 3' degenerate core with the target template is stabilized by the 5' non-degenerate consensus clamp, which allows higher annealing temperatures without increasing the degeneracy of the pool. A program, implemented for the World Wide Web, for automatically predicting optimal primers that embody the CODEHOP strategy is available at <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>.

However, there does not exist an ideal generally applicable primer design strategy. The situation is complicated by the fact that genes contain not only sequences conserved on the amino acid level (i. e., conserved protein domains) but also sequences conserved on the DNA level (i. e., microRNA binding sites). Limits of both CODEHOP and cDNA-based strategies can be illustrated by an example coming from our laboratory work. Two different primer design strategies were applied on problems in which the target sequences for amplification were not known but could be predicted from multiply aligned protein and cDNA sequences. The goal was to clone eleven different genes involved in floral meristem formation from *Silene latifolia*. When CODEHOP strategy was employed, four genes out of nine tested were cloned. When degenerate primers designed according to conserved cDNA sequences were used, six genes out of nine tested were cloned. Three genes were not cloned by either of these strategies.

PCR template

In principle, both genomic DNA and cDNA can be used as a PCR template to find the desired genes. A big advantage of the genomic DNA as a template is that a sample coming from any tissue contains complete genetic information. Thus, it is not necessary to isolate DNA from tissues where the desired gene is expressed. Genomic DNA as a template has also one big disadvantage – it contains complete genetic information. Because degenerate primers are used, the probability of artificial amplification of “junk DNA” is high because of the dominance of primers in the pool which do not participate in amplification of the targeted gene but are available to prime non-specific synthesis. As a result, it leads after the PCR to an extremely high amount of bands on a gel. On the other hand, although it is necessary to extract RNA from the tissue where the desired gene is expressed, the enormous advantage is that it (theoretically) does not contain any “junk DNA” and the RT-PCR with degenerate primers relatively often leads to a single band on a gel.

PCR amplification strategies

As primer positions are fixed to the conserved regions, it is often not possible to obtain primers of optimal PCR performance. To empirically determine optimal annealing and amplification conditions for the pool of primers, thermal gradient PCR amplification can be used (e. g., Rose et al. 2003). PCR amplification can be performed using not only classical but also touch-down approaches (e. g., Rose et al. 1998). In the case of highly conserved genes and extremely well-designed primers, the temperature can range from 60°C to 50°C (e. g., Žlůvová et al. 2005), but PCR gives very rarely any product under this condition. A solution is to perform touch-down PCR from 60°C to 20°C followed by 20 to 30 PCR cycles under 20°C annealing temperature. In this case, it is necessary to add DNA polymerase to the PCR mix twice – before the beginning of PCR and after the touch-down cycles. However, although we have very good experiences with this PCR strategy, it gives relatively often multiple bands or smears. We have partially solved this problem by a combination of thermal gradient PCR and 10°C temperature decrease (in total) during the touch-down PCR cycles.

Still, the reaction can give a smear or no PCR product. A possible solution is to perform nested or semi-nested PCR. Because the primers are degenerated, this method can lead to non-specific bands or smears, and optimisation of both the first and second PCR cycles often solves this problem. A disadvantage of this double optimisation is an enormous increase of PCR samples to be analysed.

When using a combination of both degenerate and specific primers (the specific primer matches for example microRNA binding site), it can be difficult to find any overlap between annealing temperatures of both primers. We have solved this problem by PCR conditions performed in two steps. The first step of 20 cycles was done with the specific primer only and the annealing temperature was high. This step enabled linear extension from the specific primer. The second step of 35 cycles was done with both the specific and degenerate primers, under a low annealing temperature. This step enabled extension from the degenerate primer and also amplification of the desired gene (Žlůvová et al., submitted).

Hypothesis testing

The obtained PCR products can be directly sequenced only when the desired gene is not a member of a gene family. Otherwise, it is better to clone the PCR product and to sequence several colonies. After the sequencing, orthology of the cloned sequence has to be verified. As the BLAST or FASTA searches are usually not sufficient to unambiguously confirm the orthology, construction of phylogenetic trees is usually used (reviewed in Michu, this issue).

Because the initial working hypothesis was that the cloned ortholog diverged from its copies studied in model plants, and that it plays a different role in our non-model species, the phylogenetically identified ortholog should be further characterised with respect to its expression pattern. The easiest and most commonly used method is RT-PCR which provides an overall view on the expression pattern. Much more information can be obtained from *in situ* hybridisation experiments, which detect mRNA on tissue sections, so that the location of the target molecule can be seen in individual cells.

Perspectives

The search for orthologous sequences is not only the first step in the evolutionary-developmental biology, but can be also used in other disciplines. The molecular genetic markers, which can be transferred between species, can be used to study syntenic relationships in the field of comparative genomics. A broad application of the method is also in agricultural breeding programs, because such markers can be used to optimize the exploitation of genetic map resources. The method can be also used as a source of molecular markers in mapping and breeding experiments (e. g., marker-assisted breeding) which are often marker limited due to lack of DNA sequence information from the species in question.

Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 204/05/P505) and the Institutional Research Plan (Grant No. AVOZ50040507).

References

- Baum D.A., Doebley J., Irish V.F., Kramer E.M. (2002): Response: Missing links: the genetic architecture of flower and floral diversification. *Trends Plant Sci.*, 7: 31-34.
- Doebley J., Stec A., Hubbard L. (1997): The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386: 485-488.
- Floral Genome Project Research Group (2002): Missing links: the genetic architecture of flower and floral diversification. *Trends Plant Sci.*, 7: 22-31.
- Fredslund J., Schausler L., Madsen L.H., Sandal N., Stougaard J. (2005): PriFi: using a multiple alignment of related sequences to find primers for amplification of homologs. *Nucleic Acids Res.*, 33: W516-W520.
- Gadberry M.D., Malcomber S.T., Doust A.N., Kellogg E.A. (2005): Primaclade - a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics*, 21: 1263-1264.
- Harrison J., Moller M., Langdale J., Cronk Q., Hudson A. (2005): The role of KNOX genes in the evolution of morphological novelty in *Streptocarpus*. *Plant Cell*, 17: 430-443.
- Michu E. A short guide to phylogeny reconstruction. This issue.
- Rose T.M., Henikoff J.G., Henikoff S. (2003): CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res.*, 31: 3763-3766.
- Rose T.M., Ryan J.T., Schultz E.R., Raden B.W., Tsai C.C. (2003): Analysis of 4.3 Kb of the divergent locus-B of macaque retroperitoneal fibromatosis-associated herpesvirus (RFHV) reveals close similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in gene sequence and genome organization. *J. Virol.*, 77: 5084-5097.
- Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrovski S., McCallum C.M., Henikoff S. (1998): Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.*, 26: 1628-1635.
- Žlůsová J., Lengerová M., Marková M., Hobza R., Nicolas M., Vyskot B., Charlesworth D., Negruțiu I., Janoušek B. (2005): The inter-specific hybrid *Silene latifolia* x *S. viscosa* reveals early events of sex chromosome evolution. *Evol. Dev.*, 7: 327 – 336.
- Žlůsová J., Nicolas M., Berger A., Negruțiu I., Moneger F. Premature arrest of the male meristem precedes sexual dimorphism in the dioecious plant *Silene latifolia*. Submitted.

EVOLUČNÍ ZMĚNY V SYNTÉZE ROSTLINNÝCH TELOMER

JIŘÍ FAJKUS¹, EVA SÝKOROVÁ¹ A ANDREW LEITCH²

¹ Oddělení funkční genomiky a proteomiky, PřF MU, a Laboratoř molekulárních komplexů DNA, Biofyzikální ústav AV ČR

² Queen Mary University of London, UK

E-mail: fajkus@sci.muni.cz

Řád jednoděložných rostlin Asparagales je atraktivní pro studium evoluce telomer, protože sdružuje tři fylogeneticky odlišné skupiny rostlin s telomerami složenými z TTTAGGG (typ *Arabidopsis*), TTAGGG (lidský typ) a z neznámých alternativních sekvencí. V první části přednášky bude představena experimentální strategie použitá pro mapování větvících bodů v evoluci syntézy telomer a bude demonstrována na výsledcích mapování druhého evolučního rozcestí uvnitř čeledi *Alliaceae*.

Druhá část přednášky bude věnována molekulárním příčinám těchto změn v syntéze telomer. Byly klonovány a charakterizovány geny kódující katalytickou podjednotku telomerázy (TERT) u reprezentativních druhů prvních dvou skupin. Porovnání získaných sekvencí, včetně dalších sekvencí TERT, dostupných v databázích, vedlo k nalezení kandidátních aminokyselinových substitucí, které byly soustředěny u TERT sekvencí z těch druhů *Asparagales*, které syntetizují lidský typ telomerových repeatů, a které mohly přispět ke změně sekvence telomer. Mezi nimi jsou zvlášť zajímavé mutace v tzv. C-motivu, vzhledem k jeho významu pro funkci TERT.

Kromě těchto údajů byly u telomeráz *Asparagales*, produkujících lidské telomerové sekvence, zjištěny dva různé způsoby počáteční elongace substrátového primeru, které zřejmě odrážejí rozdíly v interakcích mezi RNA podjednotkou telomerázy (TR) a substrátovou DNA.

Tento výzkum byl podporován projekty GA ČR (521/05/0055, 204/04/P105), GA AV ČR (IAA600040505) a MŠMT (LC06004). Institucionální podpora: MSM0021622415, AVOZ50040507.

STUDIUM ROSTLINNÝCH PROTEINŮ IN VIVO

MARTINA DVOŘÁČKOVÁ^{1,3}, PASCALE ROSSIGNOL², OLGA KOROLEVA², JOHN DOONAN², PETER SHAW², JIŘÍ FAJKUS^{1,3}

¹ BFÚ AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

² John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, UK

³ Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno

E-mail: mdvorackova@ibp.cz, tel: +420 549 495 601

Ke studiu lokalizace a dynamiky rostlinných proteinů *in vivo* jsou využívány zejména techniky založené na přípravě GFP-fúzních proteinů a Agrobakteriem zprostředkováné transformaci rostlin. Zatímco některé proteiny mají vysokou hladinu exprese a jejich detekce pomocí GFP je relativně snadná, proteiny málo abundantní nemusí být detektovatelné vůbec.

Cílem prezentace bude představení technik transformace rostlinných explantátorových kultur *A. thaliana* a BY-2, jako efektivních skrínovacích metod umožňujících testovat funkčnost připravených konstruktů a posoudit detektovatelnost a lokalizaci proteinů v buňce. Hlavní výhodou těchto systémů je především krátký časový horizont, ve kterém je možné dané informace získat. Ačkoli práce s rostlinnými kulturami není ekvivalentní experimentům prováděným přímo na rostlinách, tyto systémy mohou práci významnou měrou urychlit. U *A. thaliana* budou popsány možnosti a výhody transientní a stabilní exprese a vlastnosti kultur používaných na trasformaci; u BY-2 bude pozornost věnována zejména přípravě stabilních transformantů.

Využití techniky transformace rostlinných kultur bude demonstrováno na výzkumu lokalizace telomer-asociovaných proteinů u *A. thaliana*.

Podporováno organizací EMBO a projekty GA ČR (521/05/0055, 204/04/P105), GA AV ČR (IAA600040505) a MŠMT (LC06004). Institucionální podpora: MSM0021622415, AVOZ50040507.

INDUCIBLE EXPRESSION AND QUANTITATIVE IMAGING OF CELLULAR TRAFFICKING

IAN MOORE

Dept. Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Rd., Oxford, OX1 3RB
E-mail: ian.moore@plants.ox.ac.uk, tel. +44 (0)1865 275 040, fax: +44 (0)1865 275 074

In this talk I'll describe some of our work on two unrelated experimental methodologies: (1) spatial and temporal control of gene expression, and (2) quantitative analysis of membrane traffic using fluorescent protein markers.

(1) Several vector systems are available for tissue-specific transactivation or chemical induction of transgene expression in plants. The choice facing researchers is which promoter system to commit to as this determines the range and characteristics of the expression resources available. The decision will not be the same for all species or applications. I will present some general discussion on the use of these technologies and discuss in detail the properties of the pOp/LhG4 for transactivation and the pOp6/LhGR system for chemical induction.

(2) Fluorescent protein markers are widely used to report plant membrane traffic and I will discuss the useful and limiting properties of these proteins in the analysis of membrane traffic. Despite the widespread use of such proteins to monitor cellular organisation and membrane traffic, effective protocols to quantify fluorescence and marker expression are lacking. One solution to this problem is the use of ratiometric assays of marker expression and accumulation. I will describe in detail how we have exploited the 20 residue self-cleaving FMDV 2A peptide to construct polyproteins that express a trafficked marker in fixed stoichiometry with a reference protein in a different cellular compartment. Various pairs of compartments can be simultaneously targeted. I will also describe an image analysis tool that allows biosynthetic membrane traffic to be assayed with markedly improved sensitivity, dynamic range, and statistical significance using protocols compatible with the common plant transfection and transgenic systems. This approach allows saturation phenomena to be avoided and stochastic or epigenetic influences to be controlled. Surprisingly, mutational analysis of the ratiometric assay constructs revealed that the 2A peptide was dispensable for efficient cleavage of polyproteins carrying a single internal signal peptide, whereas the signal peptide was essential. In contrast, a construct bearing two signal-peptide/anchors required 2A for efficient separation and stability, but 2A caused the amino-terminal moiety of such fusions to be mis-sorted to the vacuole. A model to account for the behaviour of 2A in these and other studies in plants will be proposed.

CURRENT DEVELOPMENTS IN CONFOCAL LIVE CELL MICROSCOPY

JÖRG LINDENAU

Training, Application and Support Center, Carl Zeiss MicroImaging GmbH

There is a clear trend in biomedical sciences moving away from the analysis of structures in fixed samples towards a direct observation of dynamic processes in living objects like live cells or tissues. This trend is supported especially by the progress in the development of fluorescent proteins.

Recently confocal laser scanning microscopy becomes a standard method in live cell imaging. The LSM 5 Family from Carl Zeiss offer the full range of modern confocal technology. Point scanning systems like the LSM 510 META are optimized for high resolution 3D imaging. While operating in the lambda mode, this system can be used to acquire spectral information from the specimen, in order to separate signals from fluorescent dyes with highly overlapping emission spectra.

When studying fast dynamics, the unique line scanning LSM 5 LIVE becomes an essential tool for research. Combing line wise laser excitation with CCD line array detection, this system allows image acquisition rates of up to 120 frames per second.

The newest generation of LSM 5 DUO and DuoScan systems, combines the advantages of the point and line scanning principle. Now it becomes possible to perform pixel precise photo-manipulation simultaneous with fast image acquisition.

Přednášky

METODY STUDIA JEDNOTLIVÝCH MOLEKUL V BIOLOGII

FRANTIŠEK VÁCHA^{1,2}, LADISLAV BUMBA^{1,3}, JANA NEBESÁŘOVÁ¹, VASSILIOS SARAFIS², IGOR FALÁT^{1,2}, FRANTIŠEK ADAMEC^{1,2}

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

² ÚFB JU, Zámek 136, 373 33 Nové Hrady, ČR

³ MBÚ AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ČR

E-mail: vacha@jcu.cz, tel.: 387 775 533

Studium procesů na molekulární a buněčné úrovni je možná jednou z nejzajímavějších ale i technicky nejsložitějších disciplín v biologickém výzkumu. Nepřímých metod je mnoho, ale všechny se musejí potýkat s jedním velkým nedostatkem a tím je tzv. „ensemble averaging“, volně přeloženo s „šedí průměru“. Jak se vyhnout tomuto zprůměrování a nebo naopak jak využít jeho předností je hlavním tématem tohoto příspěvku.

V první části se podíváme na jednotlivé molekuly pomocí elektronového mikroskopu a porovnáme tuto metodu a její možnosti s výsledky získanými pomocí krystalografických metod a rentgenové difracce, tj. s již známými atomárními strukturami. V další části uvidíme, že lze jednotlivé molekuly za určitých podmínek pozorovat i optickým mikroskopem nebo si na ně dokonce sáhnout.

Podporováno grantem AV0Z50510513 a MSM6007665808.

Reference

Vacha F., Bumba L., Kaftan D., Vacha M.: 2005 – The Micron 36: 483

VÝZKUM A VYUŽITÍ RYCHLE ROSTOUCÍCH DŘEVIN PRO PRODUKCI BIOMASY

JAN WEGER, KAMILA HAVLÍČKOVÁ

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajiny a okrasné zahradnictví, Květnové nám. 391, 252 43 Průhonice
E-mail: weger@vukoz.cz, tel 296 528 327; e-mail: havlíčková@vukoz.cz, tel 296 528 327

Většina zemí světa – od průmyslově vyspělých, přes rychle se rozvíjející až k nechudšímu a geograficky izolovaným – má mezi svými hlavními politickými prioritami zvyšování podílu tzv. obnovitelných zdrojů na výrobě energie. Také státní energetická koncepce ČR předpokládá, že v roce 2030 budou obnovitelné zdroje pokrývat 15,75 % primárních zdrojů energie. Tento závazek je také zakotven jako indikativní cíl v naší přístupové smlouvě k EU. Biomasa má z celkového podílu OZE zajistit 58 % resp. 70 % výroby tepelné resp. elektrické energie. Podle MŽP by hlavní podíl biomasy – až 60 % – měl pocházet z tzv. energetických plodin. V takovém případě by se energetické plodiny měly pěstovat na rozloze 850 000–1 000 000 hektarů tzn. 20–28 % zemědělské půdy.

Termínem energetické plodiny jsou označovány taxony dřevin, trvalek a bylin, které jsou využívány pro zájemnou produkci biomasy vhodné k energetickému využití (spalování, produkcí bioplynů). V ČR bylo zatím pro tento účel testováno přes 160 taxonů dřevin a bylin. V praxi se pěstuje zejména tzv. energetický štěpík (1000 ha) a asi 15 klonů dřevin (120 ha). V posledním evropském přehledu energetických plodin bylo celkem evidováno 37 plodin z čehož bylo 10 dřevin. Největší rozlohy existujících porostů dosahují blahovičníky s 500 000 ha (Portugalsko, pro vlákninu) a vrby na 18 000 ha (hlavně ve Švédsku na „energetickou štěpku“).

Základní prvky koncepce pěstování RRD formou tzv. výmladkových plantáží (short rotation coppice) byly vytvářeny v Severním Irsku, Anglii a Švédsku již v průběhu 70. a 80. let minulého století. V průběhu 90. let došlo zejména ve Švédsku k značnému pokroku v technologickém zakládání, pěstování a sklizně RRD, které vedly k výraznému snížení nákladů a tedy i ceny produkované biomasy.

Výzkum a pěstování RRD pro produkci biomasy v ČR započaly před více než 10 lety. Jaké jsou jeho hlavní výsledky, perspektivy a bariéry? Na tyto otázky se pokusí stručně odpovědět naše přednáška. Její součástí jsou výsledky hodnocení polního pokusu s klony vrb a topolů v 6. roce (32 klonů, 4 lokality, tříleté obmýtí). Hodnoceny byly jejich růstové a výnosové parametry, ztráty, a také výskyt poškození škůdci a chorobami. Z dosažených výsledků vyplývá, že: i) většina klonů si i v druhém resp. třetím obmýtí udržuje progresivní růstovou dynamiku; ii) na příznivých stanovištích dosahují nejlepší klony ve druhém obmýtí výnos 15–22 t (suš.)/ha/rok; iii) testovaný sortiment není až na výjimky vhodný pro pěstování v srážkově nedostatečných oblastech nebo vysychavých půdách.

Současné výsledky o ekonomice výmladkových plantáží RRD jsou do jisté míry omezeny vzhledem k velmi malému pěstebnímu ploše, krátkosti pěstování (nejstarší porosty jsou 11leté) a v ČR zatím nedostupné mechanizované sklizně dřevin plantáží, když již není možné využít manuální sklizně pomocí křivoňorezu. Předmětem výzkumu je stále ještě optimalizace výběru stanovišť pro jednotlivé klony (topolů a vrb) a výnos výmladkové plantáže po celou dobu její životnosti (na základě zahraničních zkušeností se očekává v rozmezí 20–25 let). Při využití dosavadních zkušeností a znalostí byla cena biomasy vypočtena metodikou minimální ceny v rozmezí 90–120 Kč/GJ za předpokladu mechanizované sklizně pomocí sklízecího stroje Class Jaguar (náklady na sklizeň cca 600 Kč/t) a průměrného výnosu biomasy v rozmezí 7–10 t (suš.)/ha/rok při současně cenové úrovni požadovaných služeb.

Výmladkové plantáže plní v krajině záhy po založení také důležité neprodukční funkce, jimiž významně a zpravidla pozitivně ovlivňují životní prostředí např. půdní úrodnost, biodiverzitu, hydrologický a klimatický režim. Podle výsledků měření klimatických a hydrologických parametrů v experimentálních porostech můžeme konstatovat, že porost dřevin s hlubokými kořeny transpiruje po velkou část vegetačního období a tím své okolí ochlazuje. Porostní změna nemá negativní důsledky na vodní režim půd, nezpůsobuje nadměrné vysychání půdy ani zvětšení odtoku. Naopak v případě přívalových dešťů brání porost s travním drnem vzniku rýhové eroze a odplavování půdy.

Podporováno grantem MŽP: ZO320/3/99 „Zdokonalování stávajících technologií využití obnovitelných zdrojů energie“, a MZe QF 4127 „Metodika analýzy potenciálu biomasy jako obnovitelného zdroje pro zájmová území“.

References

- Weger J.–Vlasák P.–Zánová I.–Havlíčková K. (2005): The results of the evaluation of selected willow and poplar clones for short rotation coppice in second harvesting period in conditions of the Czech Republic – pp. 465–468, 14th Conference Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Paris, ETA Florence.
- Lewandowski I., Weger J., van Hoidonk A., Havlickova K., van Dam J., Faaij A. (2006): The Potential Biomass for Energy Production in the Czech Republic – Biomass & Bioenergy 30: 405–421.
- Havlíčková K. –Knápek V. –Vašíček J. –Weger J. (2005): Biomasa jako obnovitelný zdroj energie, ekonomické a energetické aspekty. – Acta Průhoniciana 79: 1–67.
- Havlíčková K. –Weger J. a kol. (2006): Metodika analýzy biomasy jako obnovitelného zdroje energie. – Acta Průhoniciana 83 (In Print).

Přednášky

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE JAKO NÁSTROJ PROTEOMIKY

VLADIMÍR HAVLÍČEK

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ČR
E-mail: vlhavlic@biomed.cas.cz, tel.: 241 062 786

Učebnicová definice říká, že hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli. Tato věta pro laiky možná zní nebezpečně, nicméně čtenáři si pod pojmem „hmotnostní spektrometr“ mohou představit nějaké detekční analytické zařízení, které dává informaci o struktuře organických látek. Zařízení může být buď velmi malé a přenosné, ale jsou i typy spektrometrů, které mají několik metrů a váží řádově tuny. Složitost spektrometrů se řídí požadavky na kvalitu informace, kterou přístroj dává a samozřejmě platí, že čím je informace detailnější, tím je přístroj dražší. Takže lze pořídit přístroj za 100 milionů korun, ale třeba i za „pouhý“ milion korun. Jedno z těch dražších zařízení je instalováno v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd v Praze a stojí přes 70 milionů korun. Dalších, menších zařízení jsou však po České republice rozesety stovky, málo ovšem o nich veřejnost ví.

Hmotnostní spektrometrie byla vyvinuta počátkem 20. století a původně byla využívána zvláště ve fyzice a chemii, mj. byly pomocí této metody objeveny stabilní izotopy prvků. Po dlouhou dobu pak hmotnostní spektrometrie byla hlavní metodou analýzy ropných produktů a analýzy těkavých organických látek obecně. Během posledních dvaceti let se použití metody rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii a chemii k biologii, k analýze životního prostředí, do farmacie, medicíny. Nyní se s hmotnostní spektrometrií můžeme setkat buď přímo, např. během osobních bezpečnostních prohlídek na letištích, nebo zprostředkován, kdy tato metoda je použita např. v lékařství (jedná se třeba o diagnostiku nádorových onemocnění a metabolických chorob). Metoda je nezastupitelná pro kriminalisty (například v souvislosti s identifikací drog, detekcí výbušnin, identifikací pachatelů zvláště nebezpečné trestné činnosti apod.), hmotnostní spektrometrie je výhradním nástrojem antidopingových kontrol, používá se v archeologii (při datování stáří předmětů) a geologii, v monitorování kvality životního prostředí, v toxikologii, chemii (zde třeba při sledování průběhu chemických reakcí). Hmotnostní spektrometry jsou součástí výbavy většiny vesmírných sond i některé speciální vojenské techniky. Farmaceutické firmy používají hmotnostní spektrometrii při hledání nových účinných léků šířících na míru, metoda se používá i jako zobrazovací technika. Významnou úlohu hraje hmotnostní spektrometrie v otázkách národní bezpečnosti: technika dokáže odhalit a identifikovat látky, které mohou být zneužity při terorismu a bioterorismu.

Na rozdíl od jiných analytických přístupů tato metoda vyžaduje opravdu nepatrné – homeopatické množství měřené látky, např. 10^{-12} g. Je to nepředstavitelně malé množství a proto se hmotnostní spektrometrie často používá ve stopové analýze čehokoli organického. Další důležitá vlastnost této techniky tkví v její schopnosti „poradit si“ i s velmi komplikovanými směsmi látek a strukturní informaci poskytnout rychle.

Za vývoj technik hmotnostní spektrometrie byly uděleny celkem čtyři Nobelovy ceny za fyziku nebo chemii, ale využití této techniky bylo zásadní pro udělení i řady dalších Nobelových cen. Poslední Nobelova cena vyloženě za hmotnostní spektrometrii byla udělena Koichi Tanakovi a Johnu Fennovi v roce 2002. Bylo to za vynález některých ionizačních zařízení, která jsou pro hmotnostní spektrometry nezbytná a umožňují analyzovat i velmi složité látky, jako jsou bílkoviny a nukleové kyseliny. A právě analýze proteinů bude věnována tato přednáška: budou diskutovány nejnovější ionizační techniky (desorpční elektrosprej) a vysoce rozlišující analyzátor (cyklotron a orbitrap) jako základní nástroje pro peptidové mapování, sekvenování a de novo sekvenování.

Podporováno granty MŠMT (LC545), GAČR (203/04/0799), Evropskou Komisí (MTKD-CT-2004-014407) a Institucionálním záměrem (AVOZ50200510).

Přednášky

MINIATURIZACE A METABOLOMICKÝ PŘÍSTUP V ANALÝZE FYTOHORMONŮ

MIROSLAV STRNAD, ONDŘEJ NOVÁK, PETRA AMAKOROVÁ, EVA HAUSEROVÁ, JANA SWACZYNOVÁ, OTA BLAHOUŠEK, KAREL DOLEŽAL, ROMAN BUCHTÍK, MAREK ZATLOUKAL, KAMILA SEDLÁKOVÁ, JAKUB ROLČÍK

Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky AV ČR & Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ČR

E-mail: strnad@aix.upol.cz, tel: 585 634 850

Fytohormony se vyskytují v rostlinách ve velmi nízkých, většinou piko- a femtomolárních koncentracích. Díky tomu není možné je stanovovat přímo pomocí fyzikálně-chemických nebo immunoanalytických metod. Hlavním problémem je velmi vysoké pozadí, které brání spolehlivému stanovení fytohormonů v případě femtomolárního výskytu. Dalším problémem fytohormonů je jejich výskyt ve formě velkého množství metabolitů. Stanovení jednoho hlavního zástupce, např. IAA, ABA, atd. ve své podstatě přináší velmi omezené informace o tom co se v rostlinách vlastně děje. Z těchto důvodů je nezbytné zavádět metabolické přístupy pro komplexní analýzy fytohormonů v rostlinách. Podařilo se nám již vyvinout komplexní systém pro dokonalé čištění a metabolickou analýzu auxinů, cytokininů, brassinosteroidů, fenolických kyselin a derivátů kyseliny abscisové. V čem tyto přístupy spočívají? Metodický postup je založen na purifikaci jednotlivých skupin fytohormonů pomocí monoklonální/polyklonální protilátky specifické ne pro jednu látku, ale pro celou fytohormonální skupinu, např. cytokininy. Taková protilátna nerozpoznává povahu N⁶-postranního řetězce, ale ani druh cukru v pozici N9 a může po imobilizaci na nerozpustný nosič vázat nejen široké spektrum známých isoprenoidních a aromatických cytokininů, ale i velké množství neznámých N⁶-substituovaných derivátů adeninu, adenosinu, atd. Předběžné výsledky naznačily, že po aplikaci rostlinných extraktů na takovou imunoafinitní kolonu je možné získat dokonale přečištěné frakce, které obsahují zejména látky cytokininové povahy, což bylo prokázáno pomocí diode-array HPLC, HPLC/MS i UPLC/MS/MS. Za významnou považujeme UV detekci řady neznámých láttek cytokininové povahy, z nichž některé byly již identifikovány. Podobné generické protilátky se nám podařilo připravit i pro auxiny, brassinosteroidy a deriváty ABA. Pracujeme na JA a giberelinech. Díky zavedení UPLC/MS (více v přednášce O. Nováka) se podařilo výrazně zvýšit citlivost a miniaturizovat analýzy. Rovněž byla vyvinuta metoda imunoextrakce za použití pouze mikrolitrových množství imunogelů a miligramových množství rostlinných vzorků. Věřme, že tento nový metodický přístup povede v nejbližší době k analýzám na buněčné úrovni.

HMOTOVÁ SPEKTROMETRIE VE VÝZKUMU CYTOKININU

Ondřej Novák, Petra Amakorová, Eva Hauserová, Karel Doležal, Miroslav Strnad

Laboratoř růstových regulátorů, PřF UP & ÚEB AV ČR, Šlechtitelů 11, Olomouc, ČR
E-mail: novako@prfholnt.upol.cz

Cytokininy (CK) tvoří jednu z pěti hlavních skupin rostlinných hormonů. Byly definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu (rovněž fytohormon) stimulují buněčné dělení. Mezi jejich hlavní fyziologické účinky patří potlačování apikální dominance, indukce regenerace orgánů, zpomalení stárnutí, udržování vysoké metabolické aktivity rostlinných pletiv a další¹.

Základním problémem spojeným s analýzou endogenních cytokininů je to, že se v rostlinách vyskytují obvykle ve velmi nízkých koncentracích (fmol·pmol.g⁻¹ čerstvé hmoty). Navíc je nutné studované látky z rostlinného extraktu oddělit od velkého množství nečistot². Proto vývoj jednoduché a rychlé metody izolace cytokinů z malého (mg) množství rostlinného materiálu, založené na imunoafinitní chromatografii (IAC), může být považován za základ nového směru ve výzkumu cytokininů. IAC je vysoko specifická. Jejím využitím lze dosáhnout mnohem vyššího stupně přečistění vzorků než konvenčními chromatografickými technikami³. Celá purifikace může být navíc výrazně zrychlena použitím vsádkové metody v kombinaci s rychlou chromatografickou analýzou.

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)⁴ nebo kapilární kapalinové chromatografie (capLC) s hybridním analyzátem na principu hmotové spektrometrie (Q-TOF) může být s výhodou využito pro přesnou a citlivou identifikaci přirozeně se vyskytujících cytokininů a jejich metabolitů. To umožňuje zejména stanovení přesné hmoty a MS-MS analýza. Přesné hmoty mateřských iontů a fragmentů naměřené s přesností pod 5 ppm mohou být nástrojem pro výpočet a ověření elementárního složení identifikovaných látek.

Dalším příkladem je spojení nové chromatografické techniky (Acquity UPLC, Waters) využívající kombinace velmi vysokého tlaku a hybridních částic, s ionizací elektrosprejem a hmotnostním analyzátem na principu trojitěho kvadrupolu. Zde je možné dosáhnout chromatografické separace 20 cytokininů v několika minutách. Stabilita retenčních časů se pohybuje mezi 0,1–0,4 % a přesnost nástřiku mezi 1,5–5,0 %. Ve vysoké selektivním modu (MRM) je možné pro většinu stanovaných cytokininů docílit detekčních limitů pod 1 fmol a lineárního dynamického rozsahu většího než 5 řádů. UPLC-ESI(+) - MS/MS technologie tak může být využita pro velmi rychlou a citlivou kvantitativní analýzu cytokininů, vyznačující se vysokou reprodukovatelností jejich separace z různých rostlinných extraktů.

1. Macháčková I. v knize: Fyziologie rostlin (Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., eds.) kap. 8. Akademia, Praha 1998.
2. Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: 2004 – Chem Listy 98, 834
3. Hauserová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajdúch M., Vydra D., Fuksová K., Strnad M.: 2005 - J Chromatogr A 1100: 116
4. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: 2003 – Anal Chim Acta 480: 207

METODY VÝVOJE A STUDIA NOVÝCH CYTOKININOVÝCH DERIVÁTŮ

KAREL DOLEŽAL¹, JANA MALÁ², MAŁGORZATA PODWYSZYŃSKA³, IGOR POPA¹, LUKÁŠ SPÍCHAL¹, DANA TARKOWSKÁ¹, EVA HAUSEROVÁ¹, MIROSLAV STRNAD¹

¹Laboratoř růstových regulátorů, PřF UP & ÚEB AV ČR, Šlechtitelů 11, Olomouc, ČR

² Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jiloviště-Strnady 136, ČR

³ Research Institute of Pomology and Floriculture, Pomologiczna 18 Str. 96-100 Skierewice, Poland

E-mail: dolezal@risc.upol.cz

6-Benzylaminopurin je dnes již široce používán při komerčním *in-vitro* množení mnoha rostlinných druhů jako vysoce účinný a velmi levný cytokinin. Na druhé straně u některých rostlinných druhů způsobuje problémy, jako například nerovnoměrný růst, inhibici zakořeňování, časnou senescenci a další. Proto je i v současné době žádoucí vývoj alternativních fytohormonů¹.

Při našem hledání nových přirozeně se vyskytujících aromatických cytokinínů v rostlinách metodami imunoafinitní chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS, HPLC-MS/MS) se nám již podařilo objevit několik nových skupin substuovaných 6-benzylaminopurinů²⁻³. Pro tyto a jím strukturně látky jsou následně vypracovávány a optimalizovány metody organické syntézy, jejich fyzikálně-chemické studia (elementární analýza, spektrometrie ve viditelné a infračervené oblasti, rentgenostrukturální analýza, hmotová spetrometrie v kombinaci s plynovou a kapalinovou chromatografií, nukleární magnetická rezonance)³⁻⁴. Biologická aktivita nových derivátů je studována jak klasickými biotesty, tak metodami na úrovni receptorů (AHK3, AHK4) a enzymů zodpovědných za jejich degradaci (CKX) případně toxicitu (CDK). V různých systémech rostlinných tkáňových kultur je porovnávána jejich aktivita i vedlejší negativní účinky. K podrobnému studiu nejaktivnějších látek jsou vyvýjeny metody jejich isolace, přesného a vysoce citlivého kvantitativního stanovení a měření rychlosti biosyntézy v komplexních biologických matricích (plasma, rostlinné extrakty) založené opět na imunoafinitní chromatografii a HPLC-MS/MS⁵⁻⁹.

1. Werbrouck S.P.O., Strnad M., VanOnckelen H.A., Debergh P.C.: 1996 – Physiol Plant 98: 291
2. Doležal K., Astot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Strnad M., Sandberg G.: 2002 – Plant Growth Regul 36: 181
3. Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M.: 2003 – Physiol Plant 117: 579
4. Doležal K., Popa I., Kryštof V., Spíchal L., Fojtíková M., Holub J., Lenobel R., Schmülling T., Strnad M.: 2006 – Bioorg Med Chem 14: 875
5. Astot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: 1998 - J Mass Spectrom 33: 892
6. Astot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: 2000 – J Mass Spectrom 35: 13
7. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: 2003 – Anal Chim Acta 480: 207
8. Nordstrom A., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Astot C., Sandberg G., Moritz T.: 2004 – Anal Chem. 76: 2897
9. Hauserová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajdúch M., Vydra D., Fuksová K., Strnad M.: 2005 - J Chromatogr A 1100: 116

Podporováno granty GA ČR (GA 522/06/0108 a GA 203/04/1168).

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ HLADINY FYTOCHELATINŮ V ROSTLINNÝCH BUŇKÁCH VYSTAVENÝCH KADEMNATÝM IONTŮM

MIROSLAV FOJTA¹, MILOSLAVA FOJTOVÁ¹, RENÁTA ŠELEŠOVSKÁ², LUDĚK HAVRAN¹, HANA PIVOŇKOVÁ¹, VLASTIMIL DORČÁK¹, IVANA ŠESTÁKOVÁ³

¹ Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

² Ústav ochrany životního prostředí, Univerzita Pardubice, Doubravice 41, 533 53 Pardubice

³ Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

E-mail: fojta@ibp.cz, tel.: 541 517 197

Kadmium, které je mezi toxicckými těžkými kovy jedním z nejvýznamnějších polutantů životního prostředí, závažným způsobem ovlivňuje životní funkce jak živočišných, tak rostlinných buněk. Nedávno bylo ukázáno, že buňky *Nicotiana tabacum* BY-2 (TBY-2) po několikadenní kultivaci v médiu, obsahujícím 50–100 µM kadematné ionty, vstupovaly do programované buněčné smrti – apoptózy¹. V této práci jsme se zaměřili na stanovení obsahu fytochelatinů (PC) v buňkách TBY-2 v průběhu jejich kultivace v přítomnosti sub-cytotoxických a cytotoxických koncentrací kadematnatých iontů. PC, nazývané také rostlinnými metallothioneiny, jsou peptidy bohaté na cystein (γ -Glu-Cys)_n-Gly (kde n = 2–11), jejichž syntéza je indukována přítomností těžkých kovů, a které hrají klíčovou roli v procesech jejich detoxifikace². Vzhledem k vysokému obsahu cysteine patří mezi vhodné metody stanovení PC elektrochemické techniky využívající rtuťovou elektrodu (HMDE)³. Měření charakteristických voltametrických nebo chronopotenciometrických signálů na HMDE v přítomnosti iontů kobaltu (tzv. Brdičkova reakce) nám umožnilo sledovat změny hladiny PC v extraktech TBY-2, aniž by bylo nutno PC před analýzou separovat⁴. Nárůst koncentrace PC bylo možno zaznamenat již po 30 minutách kultivace buněk v přítomnosti 10–50 µM CdSO₄. Změny hladiny PC výrazně korelovaly s fyziologickým stavem buněk, zejména s nástupem kadmiem indukované apoptózy. V přítomnosti cytotoxických koncentrací kadmia rostla hladina PC s časem kultivace v pre-apoptotické fázi a dosáhla limitní hodnoty v době, kdy se objevily první známky ireverzibilní apoptózy^{1,4}. Tato limitní hodnota byla stejná odpovídající cca 600 µM v hrubém buněčném extraktu; normalizováno na PC3 – (γ -Glu-Cys)₃-Gly pro obě testované cytotoxické koncentrace kadematnatých iontů (50 a 100 µM), byla však dosažena po různém čase expozice (vždy odpovídajícím vstupu buněk do apoptózy). V přítomnosti sub-cytotoxické koncentrace kadmia (10 µM) byla hladina PC v TBY-2, zjištěná po 5 dnech expozice, zhruba třikrát menší než limitní koncentrace v apoptotických buňkách. Naše nedávné výsledky ukazují, že pro sledování obsahu PC v buněčných extraktech je možno využít i pevné amalgamové elektrody, které mohou být pro některé typy bioanalýz vhodnějším nástrojem než HMDE založená na kapalné rtuti. Závěrem lze říci, že jednoduchá elektrochemická procedura může sloužit jako účinný nástroj detekce PC v buňkách vystavených těžkým kovům.

Reference

- (1) Fojtová, M., Kovárik, A.: 2000 - Plant Cell Environ., 23: 531
- (2) Rauser, W. E.: 1995 - Plant Physiol., 109: 1141
- (3) Palecek, E.: 2005 - In Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics. Palecek, E., Scheller, F., Wang, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam: p 690
- (4) Fojta, M., Fojtová, M., Havran, L., Pivonkova, H., Dorcák, V., Sestakova, I.: 2006 - Anal. Chim. Acta, 558: 171

Podporováno grantem GAAV IAA4004402 a výzkumným centrem LC06035.

ŠLECHTĚNÍ DRUHU *POPULUS NIGRA L.* A PROBLÉMY S VYUŽITÍM MOLEKULÁRNÍCH MARKÉRŮ

VOJTECH BENETKA

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajинu a okrasné zahradnictví, Květnové nám. 391, 252 43 Průhonice
E-mail: benetka@vukoz.cz

Topol černý (*Populus nigra*) je naše původní dřevina, která se již jen sporadicky vyskytuje na našem území. Tento druh řadíme mezi rychle rostoucí dřeviny, které se využívají pro pěstování biomasy jako obnovitelného zdroje energie.

Topol černý se uplatnil ve šlechtění při mezidruhové hybridizaci kdy 60 % takto vzniklých klonů má za jednoho rodiče druh *Populus nigra*. Dnes byl nastolen i požadavek pěstování původních druhů ve zvláště chráněných územích (CHKO, národní parky, přírodní rezervace).

Při šlechtění dřevin ve srovnání s jednoletými a dvouletými druhy setkáváme se s některými odlišnostmi. V prvé řadě je to dlouhé juvenilní období (okolo deseti let). Dále je to potřeba relativně velké plochy pro jednotlivé rostliny, což ztěžuje současně hodnotit větší soubor jedinců stejného genotypu. Při šlechtění setkáváme se s některými otázkami:

- při výběru rodičů ve volné přírodě odlišit druhově pravé jedince od spontánních hybridů na mezidruhové úrovni obzvlášť, když jde o zpětné křížence
- v případě topolu černého, kdy vycházíme z jedinců nalezených v přírodě, máme jen omezené znalosti o jejich fenotypu a žádné znalosti o jejich genotypu. Vhodné by bylo určit stupeň genetické odlišnosti rodičů
- stanovení stupně homozygotisace daného genotypu

Některé z těchto otázek lze řešit použitím molekulárních markérů. Zatím co pro rozlišení druhově pravých jedinců velmi uspokojivě poslouží genetická analýza vybraných izoenzymů, v případě dalších otázek se nabízí molekulární markéry na úrovni DNA. Zde se setkáváme s problémem vztahu molekulárních markérů ke geneticky aktivní části DNA a to jak při hodnocení genetické odlišnosti rodičů, tak i při vyhledávání QTL lokusů. Dalším problémem je vysoká četnost alel v jednom lokusu, což není v souladu s proměnlivostí alel v geneticky aktivním lokusu. Tento problém souvisí s určením stupně homozygotisace daného genotypu. Pro řešení některých otázek použili jsme molekulární markéry DNA – mikrosatellity. Podrobněji budou uvedeny výsledky z hodnocení genetické vzdálenosti mezi rodiči a stupně homozygotisace při příbuzenském křížení s použitím mikrosatelitů. Výsledky analýzy mikrosatelitů jsou srovnávány s hodnotami naměřenými na rostlinách.

Reference

- Benetka V.– Bartáková I. (2002): Výskyt topolu černého (*Populus nigra*) na druhotných stanovištích a význam introdukce pro jeho potomstvo. – Ochrana přírody, 57/5: 144–145.
- Benetka V.– Bartáková I.– Mottl J. (2002): Productivity of *Populus nigra* ssp. *nigra* under short-rotation culture in marginal areas. – Biomass & Bioenergy, 23/5: 327–336.

SINICE JAKO MODELOVÝ SYSTÉM PRO STUDIUM (NEJEN) FOTOSYNTÉZY

ROMAN SOBOTKA^{1,2}, MARTIN TICHÝ^{1,2}

¹ MBÚ AVCR, Opatovický mlýn, Třeboň

² ÚFB JCU, Zamek, Nové Hrady

E-mail: tichym@alga.cz, tel.: 384 722 268

Sinice tvoří prastarou skupinu fotosyntetických prokaryot. Jejich oxygenní fotosyntéza je velmi podobná fotosyntéze vyšších rostlin což vyplývá z toho, že dnešní sinice a chloroplasty mají společného předka, pravděpodobně rovněž sinici. Jednobuněčná sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 je molekulárními biology používána 20 let jako modelový organismus pro studium fotosyntézy. Jako modelový organismus má řadu předností:

- rutinní genetické manipulace,
- vysoká efektivita homologní rekombinace
- přirozená kompetence buněk přijímat DNA
- schopnost heterotrofního růstu umožňující studium nefotosyntetických mutantů
- rychlý růst (doba zdvojení 12 h)

V současnosti sinice neslouží jako model pouze ve studiu fotosyntézy ale i v dalších oblastech jako např. dělení chloroplastu, fixace dusíku, diferenciace buněk, cirkadiální rytmus (sinice jsou jediná prokaryota s cirkadiálními rytmamy). V řadě případů vědci studují vyšší rostliny začnou po lokalizaci mutace do určitého genu hledat a zkoumat tento gen v sinici. Šance že uspějí a příslušný homologní gen tam najdou nejsou málé. Analýza proteinů kódovaných genomem *Arabidopsis* ukázala, že zhruba 18% (4500) jich pochází ze sinic.

Možnosti a rovněž některá omezení práce se sinicemi jako modelovým organismem budou předvedeny na příkladu studia ferochelatázy, enzymu podílejícího se na regulaci syntézy hemu a chlorofylu.

NEMILÁ PŘEKVAPENÍ PŘI KULTIVACI ROSTLIN V LABORATOŘI – PROBLÉMY A JEJICH ŘEŠENÍ

JAN KOLÁŘ¹, JANA SEŇKOVÁ^{1,2}

¹ Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ČR

² Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR
E-mail: kolar@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 414

S výjimkou komplexních postupů kultivace *in vitro* se pěstování rostlin v laboratorních podmínkách může zdát jednoduché. To je jistě pravda u často používaných modelových druhů, pro něž existují prověřené kultivační postupy. Pokud ale pěstujeme buď klasické modelové rostliny v netradičních systémech, nebo méně obvyklé druhy rostlin, můžeme se setkat se značnými komplikacemi. Někdy je obtížné i použít původně spolehlivé metody v mírně odlišných nových podmínkách, např. v jiném klimaboxu. Cílem přednášky je proto vyvolat diskuzi o těchto problémech a o způsobech jejich řešení.

Rostliny nezřídka reagují i na drobné modifikace kultivačních podmínek velmi výraznými změnami růstu a vývoje. Tyto pro nás překvapivé reakce jsou do značné míry způsobeny tím, že co my považujeme za nevýznamné, může být pro rostlinu zásadní. Proto se zmíníme o faktorech, které bývají poněkud opomíjeny, přestože na ně rostliny reagují velmi citlivě. Patří k nim mj. kvalita (spektrální složení) světla, fotoperiodický režim, míra provzdušnění pěstebního substrátu, rychlosť proudění vzduchu v kultivačním prostoru a míra jeho výměny s okolím (která ovlivňuje hladinu etylénu a jiných metabolitů v atmosféře kolem rostlin). Tyto a další faktory přitom mohou velmi komplexně interagovat.

Vznik a řešení problémů při kultivaci budou ilustrovány na dvou příkladech z naší výzkumné skupiny. Prvním je merlík *Chenopodium rubrum*, model pro studium fotoperiodické indukce kvetení. Po uplynutí životnosti původních klimaboxů, v nichž byla v ÚEB optimalizována kultivační metodika, bylo nutno začít rostliny pěstovat v jiném typu klimaboku. V nových podmínkách byl růst rostlin většinou uspokojivý, ale část experimentální populace překvapivě kvetla i v neindukčním fotoperiodickém režimu (stálé světlo). Procento kvetení na stálém světle bylo značně ovlivněno typem substrátu (perlit, vermiculit), velikostí květináčů a zcela zásadně typem klimaboku (tentot faktor nebyl zatím dále analyzován, ale patrně zahrnuje vliv kvality světla a rychlosti výměny vzduchu s okolím).

Druhým příkladem je hydroponická kultivace *Arabidopsis thaliana*. Rostliny ekotypů Col a Ler byly pěstovány na krátkém dni buď v nádobách Magenta (používány pro *in vitro* kultury), nebo ve vaničkách s otvory ve víku. Jako opora pro zakořeňování semenáčků byla použita minerální vlna. V nádobách Magenta byl vývoj rostlin (dny do objevení poupat a do rozkvětu) jen mírně urychlen ve srovnání s pěstováním v půdě. Květy Col ovšem často zasychaly před rozkvětem a problémem byl i silný růst řas v médiu. Ve světlotešných vaničkách byl výskyt řas eliminován, růst růžic byl robustní a dny do objevení poupat srovnatelné s rostlinami v půdě. U Ler byl ale nápadně prodloužen interval od objevení poupat do rozkvětu a habitus kvetoucí rostliny byl abnormální. U Col se tyto efekty neprojevily. Jak ukázal pokus s hnojením Ler v půdě, byl abnormální vývoj Ler v hydroponii způsoben příliš vysokou koncentrací minerálních živin v médiu. Ta neměla negativní vliv na růst, ale pouze na vývoj rostlin.

Výsledky byly získány v rámci grantu KJB600380510 od GAAV ČR.

P Plakátová sdělení

HERITABILITY OF EPIALLELIC STATES GENERATED BY RNA-MEDIATED HOMOLOGOUS INTERACTION: FEATURES THAT PERSIST ACROSS GENERATIONS

JANA BEDŘICHOVÁ, MILOSLAVA FOJTOVÁ, ANNICK BLEYS, LUCIE KHAITOVÁ, ANNA DEPICKER AND ALEŠ KOVÁŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
E-mail: janabed@ibp.cz, tel: 541 517 178

We have studied inheritance of epigenetic state of the tobacco transgenic locus whose expression and DNA methylation status had been modified by exposure to the silencer locus. The reporter *nptII* (neomycinphosphotransferase II) gene residing the target locus was silenced by PTGS in a hybrid containing a trigger homologous locus. Silencing was accompanied by methylation of the coding region at both symmetrical and non symmetrical motifs. After segregation of the trigger, the expression activity of the reporter transgene in the target was re-established. Bisulfite sequencing showed lack of inheritance of non-CG methylation in segregants. Interestingly, CG methylation was not only maintained, but became denser spreading in the 3'-5' direction. These results argue for different modes of epigenetic inheritance and evoke hypothesis on relationship between DNA methylation and transcriptional activity.

NĚKOLIK SOUKROMÝCH PŘIPOMÍNEK K SOUČASNÉMU VÝZKUMU ROSTLIN

LADISLAV BLÁHA

VÚRV, Drnovská 507, 161 06 Praha-6 Ruzyně
E-mail: lblaha@vurv.cz

1) Často se používají modelové rostliny rostoucí jen ve volné přírodě. Je to i výzkumu, který se teprve začíná řešit a tedy kde není třeba se držet tradičního, již rozpracovaného materiálu. Jen v naší republice se pěstuje cca 300 plodin a rostlinných rodů a druhů. Výzkumná práce s rody a druhy, které živí člověka, by jistě mohla přinést v některých případech bezprostřední užitek a nemuselo by se vše, co může mít užitek pro člověka, podruhé zkoušet pro „praktické použití“ jako tzv. „aplikovaný výzkum“.

2) Zanedbává se výzkum kořenů, tedy orgánu, který skutečně, jak každý ví, nejen upevňuje rostlinu v půdě a obstarává vodu a živiny. Často se publikují statisticky zpracované výsledky hodnotící vzájemný vztah dvou vlastností u nadzemních částí rostlin atd., přísně se posuzuje statistická významnost daného vztahu a přitom se zapomíná na to, že daný vztah je hlavně výsledkem vzájemného vlivu kořenů a nadzemní části. Takovéto práce se často vyskytují zejména v zemědělské literatuře (Škoda, že nelze uvést pro nedostatek prostoru příklady).

3) Zanedbává se též značně výzkum semen. Přitom se jedná o část rostliny, která pak jako samostatný organismus svými vlastnostmi dokáže po celou následnou generaci ovlivnit prakticky všechny fyziologické vlastnosti, ale i rozdíl výsledků jednotlivých autorů řešících například stejnou dílčí problematiku metabolismu atd. Odlišná provenience (stejné odrůdy!!) daného druhu totiž zákonitě často a nutně přináší odlišné výsledky na měřených rostlinách.

4) Jak jsem z diskusí s mladšími kolegy u nás i v zahraničí na konferencích zjistil, u rady z nich je často tak úzká specializace (například v oblasti transgenoze, v enzymologii atd.), že u řešené problematiky nedokáží odpovědět i na základní otázky týkající se vztahu jimi řešené problematiky a ostatních metabolických funkcí rostlin. Tito, byť úspěšní kolegové, často nemají o celistvosti rostlin základní představu. To by snad mělo být ale samozřejmostí.

5) Často se při statistickém hodnocení výsledků „nejde“ pod hladinu významnosti 5 %. Volbu hladiny významnosti pro daný jev si volí ale autor sám. Neexistuje žádný předpis jaká hladina se má používat. Z vlastní zkušenosti vím, že například tři důležité vlastnosti semen, u kterých se dvě odrůdy liší „jen“ na 10% hladině významnosti, mohou více ovlivnit následný růst rostlin, jak jenom jedna fyziologická vlastnost (z oněch třech měřených), ve které by se semena lišila na 1% hladině významnosti. Oponent však většinou uzná jen druhý případ... což snad může svědčit o stereotypu myšlení, či o neznalosti metabolismu. 90% jistota (10% nejistota) je v biologii vždy málo?

6) Fyziologie stresu je často velmi dobře zpracována v knihách a v literatuře, tedy separá odolnosti k suchu, k vysoké teplotě, atd. Plasticita druhů v proměnlivých podmírkách – a je to cím dále tím více v Evropě aktuálnější otázka – je velmi málo řešena. Genotyp, který dokáže velmi dobře odolávat nadbytku vody a po krátkém čase opět suchu má však vždy trochu jiný metabolismus a zejména strategii růstu a vývoje než-li genotyp mající jen dílčí odolnost.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO UKOTVENÍ NADŠROUBOVICOVÉ DNA PRO STUDIUM TVORBY TRIPLEXU A VAZBY PROTEINŮ

MARIE BRÁZDOVÁ, JAKUB DVOŘÁK, MICHAL MASAŘÍK, OLGA TICHÁ, MIROSLAV FOJTA, EMIL PALEČEK

BFÚ AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

Trojřetězcová (triplexová) DNA je struktura DNA charakterizovaná přítomností třetího vlákna DNA bohatého na pyrimidinové či purinové báze lokalizovaného uvnitř velkého žlábků homopyrimidinového/homopurinového duplexu DNA. Stability struktury je dosaženo interakcí třetího řetězce s homopurinovým řetězcem duplexu buď pomocí Hoogsteenova (Py triplex) či reverzního Hoogsteenova párování. Tvorba intramolekulárních triplexů byla postulována také *in vivo*, za určitých vhodných podmínek jakým je vysoký negativní torsální stres DNA a bylo ukázáno jejich zapojení v buněčných procesech zahrnujících transkripcii, rekombinaci a replikaci. V současné době je využíváno především tvorby intermolekulární triplexů v homopurinových/homopyrimidinových sekvenčních regulačních oblastech promotorů genů jejichž genové exprese se studují *in vivo*.

Vyvinuli jsme metodu pro studium vazby proteinů na superhelikální DNA *in vitro*, principem je ukotvení nadšroubovicové DNA na povrch magnetických kuliček, které umožňuje studium interakce proteinů s touto formou DNA v roztoku a také studium tvorby intramolekulárního triplexu. Metoda nabízí lepší, více fyziologické, podmínky než poskytuje klasické metody elektroforetické separace komplexů DNA-protein.

Podařilo se nám zajistit podmínky prostředí takové, při kterých se superhelikální DNA sekvenčně specificky ukotvuje na povrch magnetických kuliček, toto ukotvení je závislé na přítomnosti bloku *oligoT* v sekvenci plasmidové DNA a na podmínkách tvorby intramolekulárních triplexů. Zjistili jsme, že tento způsob stanovení lze také použít pro studium podmínek tvorby těchto triplexů (např. studium vlivu teploty nebo přítomnosti dvojmocných iontů kovů).

S úspěchem jsme využili tuto metodu pro vazbu nádorového supresoru standardního typu wtp53 a jeho mutantních onkogenních forem p53 (R273H, G245S či R273C) získaných z buněčných lyzátů nádorových linií či izolovaných rekombinantních proteinů.

Naše práce navrhuje jednoduchý a rychlý postup pro studium intramolekulárních triplexů v nadšroubovicové DNA na základě jejího ukotvení či neukotvení na povrch magnetických kuliček T_{25} (Dynal) a pro studium vazby proteinů, v našem případě lidských proteinů p53, na superelikální DNA v roztoku.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 204/06/P369, MŠMT 1K04119 a MERG-6-CT-2005-014875.

P Plakátová sdělení

PROTOPLAST SWELLING AS A MEASURE OF AUXIN ACTION IN BY-2 TOBACCO CELL CULTURE

MILADA ČOVANOVÁ^{1,2}, JAN PETRÁŠEK¹, EVA ZAŽÍMALOVÁ¹

¹ IEB CAS, Rozvojová 135, 165 02, Prague 6-Dejvice, CR

² Faculty of Sciences, Charles University, Department of Plant Physiology, Viničná 5, 128 44, Prague 2, CR
E-mail: covanova@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 431

Measurement of protoplast swelling belongs among methods that allow to record changes in a living system in real time. Protoplast swelling is thought to be caused by a shift of transmembrane potential, uptake of potassium and chlorine ions, and concomitant water influx followed by increasing of cell volume. Auxin is a plant growth regulatory compound, which is known to interact with plasma membrane and its action can result in protoplast swelling as well (Ephritikhine et al., 1987). Auxin seems to be recognized by a specific receptor at the plasma membrane (Steffens et al., 2001) and the signal is then transduced to effector structures.

Among all tissues or cell types, which are potentially sensitive to auxin, there are only some of them where the auxin action results in protoplast swelling (Long & Iino, 2001). We have found out that protoplasts prepared from suspension-cultured BY-2 tobacco cells are able to swell in response to auxin; therefore, this technique is useful for analyzing auxin sensitivity of these cells and may help to characterize the effector structures involved in transduction of auxin signal from plasma membrane.

For this approach we used a modified method by Steffens & Lüthen (2000). The cells in exponential growth stage were digested for 4.5 h by gentle shaking in a digesting solution containing 1% cellulose and 0.1% pectolyase in 0,45 M mannitol. After digestion, protoplasts were collected by using 20 µm-mesh-sieve and incubated for 30 minutes in washing solution (1 mM CaCl₂.2H₂O; 10 mM MES; 10 mM KCl in 0,45 M mannitol; pH 6.5). Protoplast solution was then transferred into microtitration plate wells and monitored for 2 hours. Auxin was added after 60 minutes recording. Each well contained about 25 protoplasts in 20 µl washing solution. An inverted microscope Nikon TE2000E (objective 40×) with monochromatic camera COHU was used for observation and image recording. Photographs of individual protoplasts were taken every 10 minutes. The image analysis program PROTOFORWIN by Hartwig Lüthen (personal gift) was used to determine the size of the protoplasts.

Ephritikhine G, Barbier-Briggo H, Muller JF, Guern J.: 1987 – Plant Physiology, 83: 801–804

Long Ch and Iino M.: 2001 – Plant Physiology, 125: 1854–1869

Steffens B, Feckler Ch, Palme K, Christian M, Böttger M, Lüthen H.: 2001 – The Plant Journal, 27 (6): 591–599

Steffens B, Lüthen H.: 2000 – Plant Growth Regulation, 32: 115–122

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project LC06034.

P Plakátová sdělení

EPIGENETIC SILENCING OF PARENTAL rDNA MAY PRECEDE ITS HOMOGENIZATION IN *Nicotiana rustica* ALLOTETRAPLOIDS

M. DADEJOVÁ¹, K. Y. LIM², A. R. LEITCH², A. KOVÁŘÍK¹ AND R. MATYÁŠEK¹

¹ Institute of Biophysics, Academy of Science of the Czech Republic, Královopolská 135, Brno

² School of Biological Sciences, Queen Mary College, University of London, UK

One of the most interesting genetic events associated with allopolyploidy is homogenization of repeated sequences including tandem arrays of units coding for 18-5.8-26S nuclear ribosomal DNA (rDNA). We have studied inheritance and expression of parental rDNA in 7 well-defined varieties of *Nicotiana rustica* ($2n = 4x = 48$), which is a natural 10 000 years dated allotetraploid between the diploid species *N. paniculata* ($2n = 2x = 24$, maternal P- genome donor) and *N. undulata* ($2n = 2x = 24$, paternal U- genome donor), and in synthetic F1 diploid hybrids derived from progenitor species.

RFLP analysis was used to estimate copy number of parental rDNA units. We found out the prevalence of U-type units in *N. rustica* with some variation among varieties. Nevertheless, between 9–35 % of ancestral P-type units remained in the genome. The novel gene families were identified based on intergenic spacer polymorphisms. In synthetic F1 diploid hybrids obtained from P×U and U×P crosses structure and relative amount of P- and U-type units was not altered.

Transcription of rDNA was examined by RT-PCR using cleaved amplified polymorphic sequences method (CAPS). Expression analysis discovered silencing of P-type units in leaves and roots of all varieties and surprisingly also in synthetic hybrids. In addition, transcription of P-originated units was gradually induced in calli derived from diploid hybrids.

P Plakátová sdělení

VLIV SUCHA NA KONSTITUTIVNÍ (35S PROMOTOR) A SENESCENCÍ INDUKOVANOU (SAG12 PROMOTOR) EXPRESI GENU PRO TRANS-ZEATIN O-GLUCOSYLTRANSFERASU V LISTECH A KOŘENECH TABÁKU

JANA DOBRÁ^{1,2}, HELENA ŠTORCHOVÁ¹, JIŘÍ LIBUS¹, RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹

¹ Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, Česká republika

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

Při studiu úlohy rostlinných hormonů během interakce rostlin s vnějším prostředím, např. v případě abiotického stresu (sucho), je možné modulovat hladiny těchto hormonů ovlivněním jejich metabolismu over-expresí genu(ů) pro jednotlivé enzymy účastnící se jejich metabolismu. Pomocí exprese genu pro *trans*-zeatin O-glukosyltransferasu (*ZOG1*) z *Phaseolus lunatus* pod dvěma odlišnými promotory jsme získali (a) rostliny tabáku s rovnoměrně zvýšenou hladinou cytokininů ještě před začátkem stresu (konstitutivní 35S promotor) a (b) rostliny, ve kterých zvýšená hladina cytokininů korelovala s mísťem a mírou senescence urychlené stresem (*SAG12* promotor).

Hladina *ZOG1* byla měřena pomocí real-time RT PCR. Princip této metody spočívá ve stanovení počtu cyklů, kterých je zapotřebí, aby množství produktu reakce přesáhla stanovenou úroveň. Z tohoto počtu cyklů (c) lze, po stanovení účinnosti příslušné PCR reakce, vypočítat výchozí množství templatu.

Hladina *ZOG1* byla měřena v horních, středních a dolních listech a kořenech za kontrolních a stresových podmínek (sucho). Odebrané vzorky byly ihned zmraženy v kapalném dusíku a do dalšího zpracování uloženy při -80 °C. Extrakce RNA byla prováděna pomocí RNeasy Plant Mini Kitu (Qiagen). Pro odstranění zbytků DNA byl použita DNÁza I (kit DNA-free™ Ambion). Pro reverzní transkripcí jsme používali Transcripter (Roche). Pro real-time PCR byl používán FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Kit (Roche) a primery čištěné pomocí HPLC (Metabion).

Variabilitu výtěžku RNA a zejména účinnosti reverzní transkripcí mezi jednotlivými vzorky je nezbytné eliminovat normalizaci naměřených dat vůči exprese genu, jehož exprese se během pokusu (v ideálním případě) nemění. Pro normalizaci exprese jsme vyzkoušeli 4 geny. Nejlépe se osvědčil gen pro aktin (Actin 9, Volkov et al., 2003). Variabilita mezi jednotlivými běhy byla eliminována pomocí kalibrátoru (vybraný vzorek používaný v každém běhu).

Expresa 35S:*ZOG1* v jednotlivých listech byla v celé rostlině srovnatelná. Za stresu signifikantně vzrostla. Ve stresovaných *SAG12:ZOG1* rostlinách byla exprese genu *ZOG1* v horních listech velmi nízká, v závislosti na síle stresu narůstala směrem k dolním listům. V kořenech stresovaných rostlin byla zjištěna pouze velmi nízká hladina *SAG12:ZOG1* exprese. Její velikost byla srovnatelná s expresí v listech horního patra téže rostliny.

Při analýze RNA z kořenů byla zjištěna silná inhibice aktivity DNÁzy I a reverzní transkripcí RNA extrahované ze suchých kořenů se zbytky půdních částic. Inhibice byla odstraněna důkladným umytím kořenů před zmražením v kapalném dusíku.

Získaná expresní data velmi dobře korelovala s hladinou cytokininů (zejména O-glukosidů) stanovenou pomocí MS.

Volkov RA, Panchuk II, Schoffl F (2003) J Exp Bot 54: 2343-2349

Poděkování

Při realizaci této práce bylo využito finanční podpory GA ČR grant č. 522/04/0549.

P Plakátová sdělení

RAPID METHODS FOR TAKE-OFF OF EXTRACELLULAR LIQUIDS FROM PLANTS

FILOVÁ, J., SOLNICKÁ, P., MIKUŠOVÁ Z., PROKEŠOVÁ, Z. AND KLEMŠ, M.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno,
Zemědělská 1, Brno 613 00, Czech Republic

Metabolic and development processes in plants are accompanied by appoplastic transport and distribution of various substances. Study of these processes requires a suitable method of isolating substances from extracellular environment. Modern instrumental techniques (using expensive devices – e.g. for pressure dehydratation) for limited and rapid take-off of extracellular liquids can be replaced by using common laboratory equipment. The easy techniques available for take-off of root or xylem exudats include the following methods: free exudation, vacuum exudation, its direct take-off, gell sorbtion, etc. In order to take the appoplastic liquid from leaves it is possible to take-off after leaf infiltration in infiltration buffer in vacuum. The next stage involves low speed centrifugation in which the liquid is extracted by gravitation. Take-off of liquid from a „liquid endosperm“ of seeds also required short low speed centrifugation for cell sedimentation. Short low speed centrifugation by using 0.2 µm nylon filters (e.g. Alltech) is also useful, where only the testa of seeds is cut. In the process of centrifugation the plant material must not be deformed. Listed methods were used for quantification of abscisic acid (ABA) content: 1, in seed endosperm 2, in xylem exudate and 3, in leaves apoplast. The above mentioned techniques for take-off of extracellular liquids including recovery, photos, difficulty of methods and suitability for particular kind of plants will be described at poster presentation. In the results will be mentioned fractionation and quantification of abscisic acid in the study of stress and its acclimation in barley and potato plants.

Acknowledgement

This research was supported by the project of Grant Agency of MUAF IGA 33/2006.

PREPARATION OF SAMPLES FOR ASSESSMENT OF ETHYLENE AND 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID IN PLANTS BY GAS CHROMATOGRAPHY

HELENA FIŠEROVÁ¹, ZUZANA MIKUŠOVÁ¹, MAREK KLEMŠ¹, VĚRA VAŠATOVÁ¹, VLASTIMIL HANUŠ¹, VILÉM REINÖHL¹, JOSEF PROKEŠ²

¹Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno,
Zemědělská 1, Brno 613 00, Czech Republic

²Brewery and Malting Research Institute, Brno, Czech Republic

Gas hormone ethylene has influence on many growth and developmental processes in plants. This work deals with questions of preparation and take-off of samples for assessment of ethylene production in plants by gas chromatography. The right preparation and take-off of samples affect eminently the reliability of obtained data and their correct interpretation. Concentration of ethylene secreted by plants is relatively low, therefore is necessary to find an acceptable vessel customized for accumulation and take-off of gas, and also for cultivation of plants. Attention was paid to cultivation of plant material, sampling vessels, conditions of ethylene production (time period of cultivation within a closed system, light, temperature, phytopathogens), sampling procedure, and storage of gaseous samples.

More suitable for the assessment of ethylene in isolated plant parts is an analysis of the content of its precursor ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid). The quantification of ACC can be facilitated by oxidation to ethylene followed by gas chromatography. The sampling, possibilities of sample preservation, extraction and ACC oxidation to ethylene are described. In the final part of this study are mentioned the evaluated time consumption and difficulty of individual methods and also their advantages and disadvantages compare to the alternative methods.

P Plakátová sdělení

THE INTERACTION OF 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID AND ETHYLENE DURING GROWTH OF BY-2 SUSPENSION CULTURE

Fišerová HELENA, Klemš MAREK, Prokešová ZDENKA, Mikušová ZUZANA, Havel LADISLAV

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno,
Zemědělská 1, Brno 613 00, Czech Republic

We studied the correlations between accumulation of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and ACC in cells of BY-2 suspension culture and their ethylene production during 6-days period of cultivation with the 0.1, 1, 10 and 100 μM 2,4-D in medium. The BY-2 cells were separated quantitatively using vacuum separator Dorcus (Tessek, Ltd. Czech Republic) from culture medium. The aim of study was: 1, to verify the viability of cells after separation with Dorcus for serial sample preparation without any contamination of cells by compounds contained in the medium (such as 2,4-D, products of metabolism etc.), 2, to prepare samples of cells for 2,4-D (ELISA) and ACC (oxidation and GC) analysis and ethylene (GC) measurement and 3, to describe the interactions between growth regulators in cells (2,4-D, ACC and ethylene) and growth and viability of cells.

We observed that Dorcus separator eliminates medium from the BY-2 cell suspension completely with the maintenance of cell viability. The vacuum separator allowed to prepare in short time great number of samples with the possibility to weight out 200 mg per sample (the suspension after subcultivation, respectively in the beginning of the exponential phase of growth was necessary to take away 12 ml with the count of 5×10^5 cells per ml of suspension, but during stationary phase, was sufficient to take away 1 ml of suspension with the count of $5-6 \times 10^6$ cells per ml of suspension).

Growth and viability of BY-2 cell suspension on media containing 0.1, 1, 10 and 100 μM 2,4-D was compared during 6 days period. The highest viability of BY-2 cells during the cultivation on medium with 1 μM 2,4-D was observed. The increased total cell number was statistically significant in the second day of cultivation. Medium with the 100 μM 2,4-D decreased the total cell number after 3 days of cultivation. Cultivation on medium containing 0.1 μM 2,4-D changed the morphology of cells – elongated cells were observed.

The relationship between the content of growth regulators and ethylene production from cells during 6-days cultivation period and growth and viability of cells will be discussed at poster presentation.

Acknowledgement

This research was supported by the project of Czech Ministry of Education FRVS 2324/2006/F4a.

P Plakátová sdělení

SLEDOVÁNÍ VLIVU CISPALATINY NA PRODUKCI THIOLOVÝCH SLOUČENIN U HRACHU (*PISUM SATIVUM L.*) POMOCÍ DIFERENČNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE

LADislav HAVEL², RENÉ KIZEK¹, VOJTECH ADAM^{1,3}, MIROSLAVA BEKLOVÁ⁴, VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ², KAREL STEJSKAL^{1,3}, ALEŠ HORNA⁵, JOSEF ZEHNÁLEK¹

¹ ÚCHB MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² ÚBR MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

³ KMBC MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

⁴ FVHE VFU, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ČR

⁵ RADANAL Ltd., Okružní 613, 530 03 Pardubice, ČR

E-mail: kizek@sci.muni.cz, tel.: 545 133 350

Do životního prostředí přechází řada chemických sloučenin, které jsou spojeny s lidskou činností. Významnou skupinu představuje skupina platinových kovů (jako například platina, osmium anebo ruthenium), které reagují s nukleovými kyselinami za vzniku DNA aduktů. Platinové komplexy hrají důležitou roli v chemoterapii různých malignit. Biologická aktivita prvního platinového cytostatika – cisplatiny (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)), které je stále jedním z nejvíce používaných cytostatik, byla objevena v roce 1965 panem Rosenborgem během jeho studií závislosti elektrického proudu na bakteriálním růstu. Od té doby byly po 40 let syntetizovány a ověřeny jako antikancerogenní medikament stovky platinových (II) a platinových (V) komplexů. Ačkoliv je cisplatina (*cis*-diamminodichloroplatinum(II)) úspěšně používána v chemoterapii rakovinových onemocnění více než-li 25 let, její biochemický mechanismus účinku je stále nejasný. Nicméně před vstupem do buňky může být cisplatina vázána fosfolipidy a fosfatidylseriny, které se vyskytují v buněčné membráně. A navíc je v cytoplasmě buňky obsaženo mnoho potenciálních platinu vázajících látek zahrnujících RNA a síru obsahující biomolekuly jako je glutathion a metallothionein. Popsanými mechanismy se buňka brání před vstupem a účinky těžkých kovů, mezi něž patří i léčiva jako je platina. Terapeutická koncentrace léčiva je proto výrazně odlišná od aplikované dávky. Současným názorem popisujícím působení cisplatiny je, že léčivo cytotoxicky působí prostřednictvím vazby na jadernou DNA (vazba především na guanin). Vzniklý DNA adukt narušuje obvyklou transkripcii anebo replikaci DNA. Navíc některé z platinových kovů vytvázejí DNA adukty, které je možné využívat jako makery.

Mnoho vědců objevuje vliv cisplatiny na zvířecí DNA, mnohem méně je však známo o vlivu cisplatiny na rostliny, které takto mohou být „léčeny“ odpadní vodou z nemocnic. Proto jsme se v naší práci zaměřili na zjištění vlivu cisplatiny na rostliny hrachu (*Pisum sativum L.*). Provedli jsme tři různé experimenty: **Varianta I:** hrachová zrna klíčila v přítomnosti cisplatiny (0, 5, 40 a 160 µM) po dobu 24 hodin. Poté byla převedena do kultivační nádoby a 14 dní kultivována. **Varianta II:** hrachová zrna byla naklálena a poté převedena do kultivační nádoby, kam bylo přidáno 200 ml 0, 5, 40 a 160 µM cisplatiny. **Varianta III:** hrach klíčil 24 hodin v přítomnosti odpadní vody obsahující cisplatinu. Poté byla zrna převedena do kultivační nádoby a kultivována po dobu 14 dní. Následně jsme zjišťovali obsah thiolů a cisplatiny ve studovaném hrášku pomocí diferenční pulsní voltametrii. Tuto metodu jsme použili pro stanovení celkového obsahu thiolů. Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3 M KCl a pomocnou elektrodou byla grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mM Co(NH₃)₆²⁺Cl₄⁻ a 1 M amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota 4 °C. Pro stanovení cisplatiny jsme užili diferenční pulsní voltametrii s pevnou uhlíkovou elektrodou. Získané výsledky ukazují že cisplatinu významně ovlivňuje obsah thiolů v akumulovaném hrachu.

Petrlova, J., Potesil, D., Zehnalek, J., Sures, B., Adam, V., Trnkova, L. and Kizek, R. (2006) Electrochim. Acta 51, 5169-5173.

Petrlova, J., Potesil, D., Mikelova, R., Blastik, O., Adam, V., Trnkova, L., Jelen, F., Prusa, R., Kukacka, J. and Kizek, R. (2006) Electrochim. Acta 51, 5112-5119.

Potesil, D., Petrlova, J., Adam, V., Vacek, J., Klejdus, B., Zehnalek, J., Trnkova, L., Havel, L. and Kizek, R. (2005) J. Chrom. A 1084, 134-144.

Podporováno granty BW-PLUS (BWR22012), GACR 525/04/P132, MŠMT 6215712402 a MŠMT 06030.

P Plakátová sdělení

STUDIUM THIOLOVÝCH SLOUČENIN V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

LADISLAV HAVEL², ONDŘEJ ZÍTKA^{1,3}, KAREL STEJSKAL^{1,3}, LIBUŠE TRNKOVÁ⁴, MIROSLAVA BEKLOVÁ⁵, VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ², VOJTECH ADAM^{1,3}, ALEŠ HORNA⁶, RENÉ KIZEK¹

¹ ÚCHB MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR;

³ KMBC MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR;

⁵ FVHE VFU, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ČR;

E-mail: kizek@sci.muni.cz, tel.: 545 133 350

² ÚBR MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

⁴ KTFCH MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

⁶ RADANAL Ltd., Okružní 613, 530 03 Pardubice, ČR

Síra je univerzální složkou mnoha biologických systémů. Vysoko aktivní a velmi redukčně významné formy síry v biologických molekulách jsou thiolové sloučeniny. Thioly mají obrovské množství biologických aktivit od řízení genové exprese až po buněčnou signalizaci, a navíc mohou sloužit jako biomarkery stresu. V rostlinách se začnou syntetizovat některé specifické thiolové sloučeniny, je-li rostlina vystavena účinkům toxických kovů. Mezi významné rostlinné thioly patří cystein, glutathion, a fytochelatiny. Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) je nejrozšířenějším neproteinovým thiolem, vyskytujícím se prakticky ve všech buňkách. Vyskytuje se ve dvou formách a to jako redukovaný glutathion (GSH) a oxidovaný glutathion (GSSG). Tyto dvě formy jsou v určitém poměru a jeho narušení může signalizovat oxidativní poškození buňky volnými radikály. Fytochelatiny (PC) mají základní strukturu (γ -Glu-Cys)n-Gly, kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteingu (γ -Glu-Cys) může opakovat 2 až 11krát (nejčastěji 2–5krát).

V naší práci jsme se zabývali stanovením thiolových sloučenin (redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG), fytochelatin (PC₂), fytochelatin (PC₅) L-cystein (Cys), L-cystin, DL-homocystein a N-acetyl-L-cystein). Pro jejich stanovení jsme využili metody vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) a diferenční pulzní voltametrii (DPV). Optimalizované metody byly dále aplikovány na studium obsahu thiolových sloučenin v rostlinném materiálu, kterým byly kukuřice (*Zea mays* L.) a okřehek (*Lemna minor*). Zkoumali jsme vliv kovů na základní vlastnosti zkoumaných rostlin. Konkrétně jsme sledovali vliv kadmia na kukuřici a platiny na okřehek.

Chromatografický systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA, chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A (150 × 4,6; 3 µm velikost částic) a osmi-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA). Chromatografická kolona a elektrochemický detektor jsou termostatovaly. Rostliny kukuřice byly vystavené působení kadmia (0, 50, 100, 150, 200, 400 a 500 µM CdCl₂) po dobu šesti dnů. Každý den byly odebírány rostliny (n = 4), ze kterých byl připraven extrakt pro sledování změny cysteinu, GSH, GSSG a PC₂. Obsah cysteinu u všech rostlin se vzrůstající koncentrací aplikovaného kadmia a dobou expozice vzrůstá asi o 500 – 800 % (porovnání s kontrolou) ve čtvrtém a pátém dni experimentu. Šestý den byl pozorován mírný pokles obsahu cysteinu. Obsah GSH a PC₂ po celou dobu experimentu velmi rychle vzrůstal. Již v první den experimentu byl při nejvyšší aplikované koncentraci pozorovaný nárůst obsahu thiolů o více jako 200 % (oproti kontrole). Od třetího dne experimentu, byly tyto změny pozvolnější (10 – 30 %). Obsah GSSG v rostlinách s rostoucí aplikovanou dávkou kadmia a dobou kultivace rostl. šestý den byl jeho obsah o 100 až 600 % vyšší oproti kontrole. Detekční limity 112 fmol pro Cys, 63,5 fmol pro GSH, 112,2 fmol pro GSSG and 2,53 pmol pro PC₂ na nástrík (5 µl).

Rostliny *Lemna minor* byly kultivovány v prostředí s 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µM cisplatinou po dobu čtyř dní. Všechny aplikované koncentrace cisplatiny způsobily znatelnou růstovou depresi oproti kontrole. Elektrochemickou analýzou (DPV) jsme zjistili, že celkové množství thiolových sloučenin se měnilo s délkou expozice a aplikovaným množstvím cisplatiny. Do druhého dne experimentu bylo množství thiolů nízké a s rostoucí koncentrací cisplatiny se snížovalo. Předpokláme, že v tomto čase dochází k vazbě cisplatiny do DNA a výrazně ovlivňuje proteosyntetický aparát buňky. Zde je také pozorována vysoká koncentrace volné cisplatiny. Od třetího dne dochází k výrazné metabolické změně, která je charakteristická prudkým poklesem obsahu volné cisplatiny a výrazným vzestupem obsahu thiolových látak (1 500 – 2 500 µg/g svěží hmotnosti).

V této práci se nám podařilo optimalizovat a využít metody HPLC-ED a DPV pro stanovení thiolových sloučenin. Zjistili jsme, že vstup téžkého kovu do rostlin je velmi přísně regulován. Výrazný vzestup thiolů je obrannou reakcí rostliny na velmi silný stres způsobený metabolicky vysoko aktivní sloučeninou.

Seregin, I.V., Shpigun, L.K. and Ivanov, V.B. (2004) Russ. J. Plant. Physiology 51, 525-533.

Potesil, D., Petřlova, J., Adam, V., Vacek, J., Klejdus, B., Zehnalek, J., Trnkova, L., Havel, L. and Kizek, R. (2005) J. Chrom. A 1084, 134–144.

Petrek, J., Vitecek, J., Vlasinova, H., Kizek, R., Kramer, K. J., Adam, V., Klejdus, B., Havel, L., Anal. Bioanal. Chem. 2005, 383, 576.

Podporováno grantem GAČR 525/04/P132, MŠMT 06030 a MŠMT 6215712402, INCHEMBIOL MSMT 0021622412.

P Plakátová sdělení

ISOLATION OF MICROSATELLITES IN FLAX (*LINUM USITATISSIMUM L.*)

JIŘÍ HORÁČEK, PETR SMÝKAL

Agritec Plant Research, Zemědělská 2520/16, 787 01, Šumperk, ČR
E-mail: horacek@agritec.cz, tel.: 583 382 127

In flax, no real microsatellite markers are known to date, just several ISSR markers were developed and tested for flax genotyping (Wiesner et al. 2001). We started large-scale isolation of real SSR markers according to method of Jakše and Javorník (2001). This method relies on the cutting of genomic DNA with a cocktail of restriction enzymes and the use of long probes for capturing microsatellite-containing DNA fragments.

In the 1st step, a high quality DNA of flax was cutted with the mixture of restriction endonucleases (*Nhe*I, *Alu*I, *Hae*III and *Rsa*I). Isolation of DNA was made from fresh young leaves of flax plant using commercial column spin kit. Fragments were trimmed of single-stranded overhangs and dephosphorylated. Then, phosphorylated linkers were ligated to DNA fragments and amplified by PCR reaction. Simultaneously, long (GA)_n and (GT)_n probes were prepared by a PCR extension reaction. Denatured probes were bound onto small pieces of nylon membrane and cross-linked. These pieces of membrane were used for enrichment of microsatellites. DNA fragments were denatured and hybridised to probes on nylon membranes. Then, bound DNA was eluted and amplified by PCR again. Linkers were removed from enriched DNA with *Nhe*I restriction enzyme, samples were purified with 2 phenol-chloroform extractions. Fragments were ligated to pBluescript vector. Then, competent cells *Ecoli* were transformed by heat shock and incubated overnight on plates wit LB-agar with ampicillin. White colonies were picked up to another LB-agar plate and simultaneously PCR tested. Colonies with differ size of insert were than picked up to liquid LB medium with ampicillin. Next day, plasmids were isolated and sequenced.

Total number of sequenced samples was 30, from which only 2 sequences included repetitive motifs. For both of these sequences were designed primers. New developed SSR markers were tested on set of 10 different flax genotypes. One of these markers (*Flax1*) was polymorphic among tested varieties.

1	La Plata	Arg
2	Habes	Eth
3	Christiana	Nor
4	Gros bela	Hun
5	LinieV87	Chn
6	Su-45/85	Cze
7	Argentino	USA
8	Sageisan	Jpn
9	Finsko	Fin
10	Puebla de	Esp

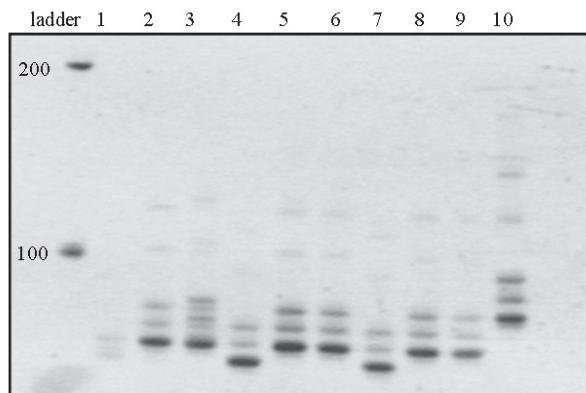


Fig1: Polymorphism of SSR marker *Flax1* tested on different flax varieties. Products of PCR were separated on 10% polyacrylamide vertical gel a visualised using ethidiumbromide.

Jakše J., Javorník B.: Plant Molecular Biology Reporter 19:217-226, 2001

Wiesner I., Wiesnerová D., Tejklová E.: Journal of Agricultural Science, 137, 37-44, 2001

This work was financially supported by Ministry of Education, project number: MSM2678424601.

P Plakátová sdělení

CYTOKININ KINETICS IN BINARY SYSTEM OF INDUCIBLE *IPT* EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF *AHP* GENE FAMILY IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

JANA HRADILOVÁ^{1,2}, JIŘÍ MALBECK³ AND BŘETISLAV BRZOBOHATÝ^{1,2}

¹Institute of Biophysics AS ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

²Dept. of Molecular Biology and Radiobiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

³Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 135, 165 00 Prague, Czech Republic

E-mail: janina@sci.muni.cz, tel.: +420 545 133 297

In higher plants, histidine-aspartate phosphorelays are involved in hormone, stress and light signaling via two-component systems of signal transduction. Histidine-containing phosphotransmitters (AHPs) transfer a phosphoryl group from membrane receptors to effectors in the nucleus. Five *AHPs* have been identified in *Arabidopsis*. Real-time RT-PCR was employed to quantify steady state levels of individual transcripts in *Arabidopsis* leaves, roots, stems, flowers and siliques. The transcripts of all *AHPs* were detected in every organ examined, although at different levels. High organ specificity of gene expression was found in *AHP1*, *AHP2*, *AHP4* while expression of *AHP3* and *AHP5* appears more ubiquitous. We also analyzed the regulation by cytokinins of *AHP* gene expression. We compared the effects on steady state levels of *AHP* transcripts of a short-term treatment with an aromatic cytokinin and increase in endogenous isoprenoid cytokinin levels using an activable *ipt* system in 8-day-old *Arabidopsis* seedlings. Following *ipt* activation, a rapid and highly preferential increase in *trans*-zeatin-type cytokinins was observed while other isoprenoid-type cytokinins showed no or only marginal increases. Transient increases in steady-state levels of *AHP1-4* transcripts in response to both the short-term aromatic cytokinin treatment and the increase in endogenous *trans*-zeatin-type cytokinin levels were observed. On the contrary, increase in steady-state levels of *AHP1-4* transcripts observed in seedlings cultivated continuously in presence of exogenous aromatic cytokinin were not paralleled in seedlings with constitutively increased endogenous *trans*-zeatin-type cytokinins providing further indirect evidence for distinct functions of aromatic and isoprenoid cytokinins. Using RT-PCR we detected two *AHP5* specific PCR products (*AHP5* and *AHP5L*). Real-time RT-PCR revealed distinct differences in the ratio between alternately and completely spliced *AHP5* mRNAs in the organs investigated. The ratio was highest in flowers and lowest in siliques and stems. Two open reading frames were identified in *AHP5L*. The conserved part of the phosphotransfer domain remains unaffected in the longer one as the translation initiation at an intron ATG would result in a polypeptide coded by exons 3 to 6 and a short extension encoded by the intron part of the alternative open reading frame.

Craft J, Šámalová M, Baroux C, Townley H, Martinez A, Jepson I, Tsiantis M, Moore I. 2005. New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 41, 899-918.

Šámalová M, Brzobohatý B, Moore I. 2005. pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. *Plant Journal* 41, 919-35.

This work was supported by grants LN00A081, MSM0021622415, 1M06030 and LC06034 (Ministry of Education of the Czech Republic), AVOZ50040507 (Academy of Sciences of the Czech Republic), IAA600380507 and IAA600040612 (Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic), and a Royal Society Joint Project Grant (rc/jp/jun98).

P Plakátová sdělení

LEAF-AIR CO₂ GRADIENT AFFECTS STOMATAL PATTERNING

JIŘÍ ŠANTRŮČEK^{1,2}, JANA TOMŠÍČKOVÁ¹, MARIE ŠIMKOVÁ², MARIE HRONKOVÁ^{1,2}

¹Faculty of Biological Sciences, Department of Plant Physiology, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

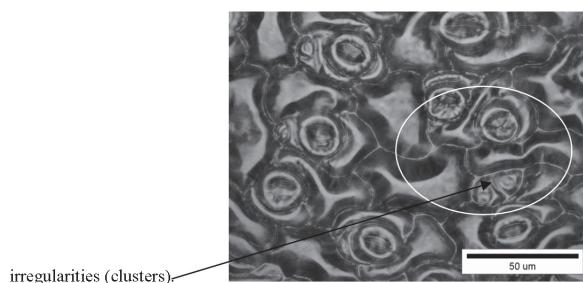
²Institute of Plant Molecular Biology, AS CR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

E-mail: hronkova@umbr.cas.cz, tel.: 723 373 966

Stomata are crucial for productivity and survival of terrestrial plants. Their regular distribution on the leaf surface and their density are controlled by external and internal factors (Woodward 1987, Gray et al. 2000). Recently, the underlying mechanism determining spatial distribution of stomata was attributed to genes in *Arabidopsis thaliana* (e.g. TMM, SDD, FLP) and signalling proteins inducing asymmetrical division of meristemoid mother cells (Nadeau and Sack 2003). Mutation in these genes arranges stomata in clusters. While the external stimulus for stomatal density, CO₂, is known (Woodward 1987, Gray et al 2000), a stimulus and its perception e.g. in TMM signalling cascade is unknown. We show that the CO₂ concentration gradient between leaf epidermal cells and atmosphere or CO₂ efflux from epidermal cells may be the signalling factor affecting the epidermal cell fate.

We grew *Lepidium sativum* L. (fam. Brassicaceae) plants from seeds under conditions of (i) variable ambient CO₂, (ii) increased diffusivity of atmospheric components, (iii) increased respiration rate and (iv) increased permeability of cuticle. The treatments should affect CO₂ concentration and/or CO₂ efflux from epidermal cells. The plantlets were grown in glass dessicators in atmosphere mixed from O₂ (21%) and N₂ (79%) (Nitox) or O₂ (21%) and He (79%) (Helox) both with variable amount of CO₂ (100–9000 µmol mol⁻¹) and water vapour (RH=30–95%) under flow-through open conditions. Helox increased diffusion rate of atmospheric components. High RH was used to increase permeability of leaf cuticle for water and, presumably, also for CO₂. In another set of growth experiments the inert components of atmosphere (N₂ and He) were absent (closed conditions with reduced pressure and controlled O₂ partial pressure). In 7 days old cotyledon leaves, we measured stomatal density, frequency of clusters and stomatal index. Further, transpiration and photosynthesis rates in Helox and Nitox and isotopic ratio of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) in plant mass were investigated.

Reduction of ambient CO₂ and synergetic increase in factors (ii)–(iv) led to highest frequency of stomatal irregularities (clusters).



Gas exchange revealed that the dark respiration rate of 7-days old plants grown in Helox increased when compared to Nitox plants. The reason for this effect is not clear. $\delta^{13}\text{C}$ values indicated re-fixation of CO₂ in chloroplasts at the cluster-prone conditions (low ambient CO₂ and high RH). Because the conditions leading to production of stomatal clusters modify CO₂ concentration gradient between peri/epidermis and atmosphere and accelerate CO₂ efflux from epidermis, we suggest that the epidermal internal CO₂ may be essential in the one-cell spacing rule underlining the proper spatial distribution of stomata.

Gray J.E., Holroyd G.H., van der Lee F.M., Bahrami A.R., Sijmons P.C., Woodward F.I., Schuch W., Hetherington A.M.: 2000 – Nature, 408: 713–716
Nadeau J.A., Sack F.D.: 2003 – Trends in Plant Science, 8: 294–299

Woodward F.I.: 1987 – Nature, 327: 617–618

The work was supported by the grant of GAAS A601410505, Ministry of Education of the Czech Republic MSM6007665801 and AV0Z50510513.

P Plakátová sdělení

DCAPS METHOD: ADVANTAGES, TROUBLES AND SOLUTION

MARTINA Hrubá

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, Brno, CZ-612 65, Czech Republic
E-mail: hrubam@ibp.cz, tel.: +420 541 517 247, fax: +420 541 240 500

Abstract

In our work, we focus on the evolutionary studies of the sex chromosomes. As model organisms we use several species of the plant genus *Silene*. An important part of our research is represented by genetic mapping. Apart from the other methods we also utilize the dCAPS method as a very useful method for the detection of the polymorphisms. Stepwise during the usage of this method, we found out some improvements, which are described in this paper.

Key words: detection of polymorphism; SNP; restriction endonuclease; semi-nested PCR; DNA agar; genetic mapping; *Silene*

Introduction

Many types of genetic studies (e.g., recombination mapping) are based on the analysis of DNA polymorphisms (in length or in sequence). Various methods for the detection of any kind of polymorphisms have been developed (e.g. RFLP, AFLP, minisequencing, SSLP, DFLP). Methods based on utilization of polymerase chain reaction (PCR) are in common use. Very popular methods based on PCR are DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism; Hongtrakul et al., 1998) for detection of the length polymorphism of amplified products, and CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences; Konieczny and Ausubel, 1993) for detection of differences in presence or absence of target sequences for restriction endonucleases. The CAPS method is analogy of RFLP, but the cleavage is performed on the amplified products instead of the original genomic DNA. The usage of this method is restricted only to the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) that create or disrupt the target site for the respective restriction endonuclease. This is the reason why modification of this method, so-called dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; Neff et al., 1998; Michaels and Amasino, 1998), has been developed. dCAPS differs from CAPS especially in using specific primers, which are designed with one or two mismatches. Through these mismatches, primers bring mutations into the target sequences during amplification and in conjunction with the discovered SNP it results in the creation of the unique restriction site, solely in one of the alleles studied in genetic assays. The scheme of this method is described on Figure 1.

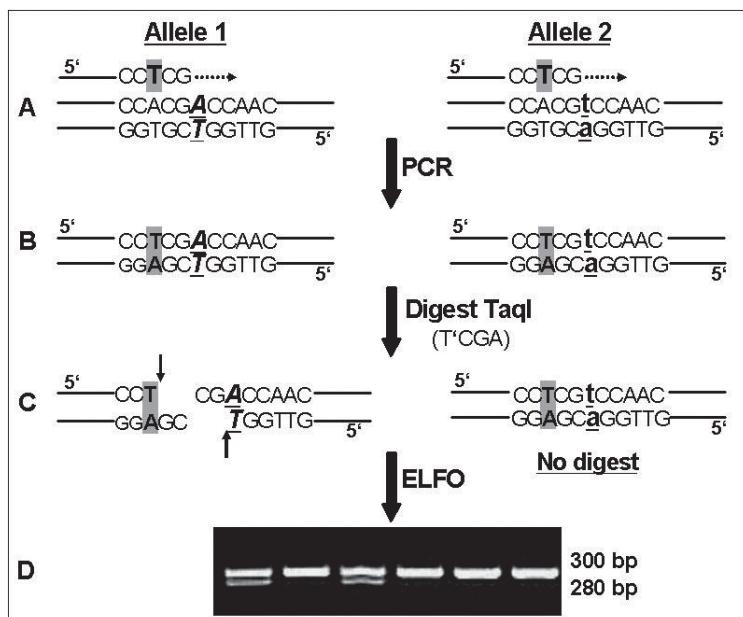


Figure 1:
Scheme of dCAPS method.
(A) Segments of two different alleles (difference is highlighted by bold and underlined letters) of the studied gene with specific dCAPS primer with one mismatch (letters in grey box).
(B) Products of PCR performed with dCAPS primer (originated mutations are marked by grey boxes).
(C) Results of digestion of PCR products by restriction endonuclease.
(D) Separated products of digestion by gel electrophoresis.

P Plakátová sdělení

Protocol and troubleshooting

In our laboratory we usually start genetic studies with specific primers and amplify the segment from the gene of interest. Afterwards, we separate obtained products by agarose gel electrophoresis. If there is a specific length polymorphism among products, we use DFLP method. In the case there is no length polymorphism we have to search for sequence polymorphisms, especially for SNPs. For this purpose, purified PCR products are either directly sequenced or these PCR products are cloned into a suitable plasmid and subsequently sequenced. The sequences obtained from PCR products can be analyzed by PC software to visualize the chromatograms of sequences – e.g., BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Then, we look for two overlapping peaks in the sequence which might indicate a polymorphism (SNP) suitable for mapping. If sequences are derived from a number of plasmid clones, we align all the sequences using program ClustalW 1.8 (Thompson et al., 1994, <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) and visualize the alignment using program BOXSHADE 3.21 (www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Finally, we search for the differences (SNP) among sequences. If the found SNP can be distinguished by specific restriction endonuclease, we use the dCAPS method. In contrary, when the SNP does not affect any restriction site, we utilize the dCAPS method.

The first step in the dCAPS method is designing the primer with a specific mismatch. This procedure can be performed manually, but the useful program exists on web – dCAPS Finder 2.0 (Neff et al., 2002, <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>). If we put two segments of sequences containing SNP in the input form and determine the number of desired mismatches in primers, the program calculates several suitable primers. The output of this program provides a set of suitable primer sequences along with appropriate restriction endonucleases.

We perform PCR with a combination of the dCAPS primer in pair with a primer specific for the target sequence. We test suitability of this primer pair by the program Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/>). As the position of primer is fixed to the surrounding of the SNP, it is often not possible to obtain a primer of optimal PCR performance. Relatively often, PCR with this pair of primers gives either non-specific products or, sometimes, no product. We have solved this problem by two-step amplification – semi-nested PCR. In the first reaction we apply specific primer pair on genomic DNA template. In the second amplification reaction, we use the dCAPS primer in pair with one of the specific primers and a small amount of PCR products (in principle 0.01 µl) from previous reaction instead of the genomic DNA template. Recently, a similar approach has been published by Gale et al., (2005), where the authors described their good experience with the same solution of this problem. They did an extra step of PCR products purification before the second amplification reaction. We think this purification is not necessary, because we also have very good results even if we omit this additional step.

For the economization of the protocol we have tested the minimum amount of Taq polymerase (TopBio) in both steps of semi-nested PCR to obtain sufficient amount of PCR products. In the first step we used 0,5 U; 0,25 U; 0,125 U or 0,05 U of Taq polymerase for one reaction (25 µl). The remaining components of the reaction were as follows: 1/10 of total reaction volume of 10× PCR Blue Buffer (TopBio); 200 µM of each dNTP (Promega); 200 nM forward primer; 200 nM reverse primer; 30ng of genomic DNA; and deionized water to total volume 25 µl. We performed PCR on the PTC 200 MJ Research Thermocycler under the following conditions: primary denaturation 94 °C/3 min; next 35 cycles: 94 °C/30 s, T_m (according used primers)/1 min, 72 °C/t_e (according length of products); final extension 72 °C/5–10 min. At the end of the PCR process, we took small fraction (0.01 µl) from each reaction tube and we used it as a template in the second step. The reaction components and conditions in the second step are similar as in the first step, except template and one primer (dCAPS primer). The amount of Taq polymerase was used according Table 1. Finally, the PCR products of the second step were separated on 1% agarose gel (stained with ethidium bromide). From the results we detected the combination of the minimum amount of Taq polymerase – for the first step it is 0.125 U and then for the second step it is 0.25 U (Figure 2).

After the amplification we digest 10–15 µl of the obtained PCR products by restriction endonuclease specific for the target site created by SNP along with dCAPS primer. The choice of buffer and temperature depends on the used restriction endonuclease. We specify the incubation time for all of digestion reactions to 2–3 hours. After the termination of digestion we have to prepare agarose gel in a high concentration (3–3.5%), because the length difference between digested and non-digested products is usually very small (about 20 base pairs, according to the length of dCAPS primer). We have also a positive experience with the usage of DNA agar (Marine Bioproducts), instead of agarose for preparation of the high-concentrated gels (Žlůvová et al., 2005). The advantage of this improvement is that in the comparison with agarose, there is only a half consumption of agar to obtain the gel with the same differentiation ability. It is therefore much easier to prepare highly concentrated gels. We prepare the gels in TAE buffer and the electrophoresis is run in the same buffer. Before pouring the melted gel into tray, we add ethidium bromide to the final concentration 0.5 µg/ml. After the electrophoresis is run, we observe the gel under UV light. Usually we can distinguish three types of patterns according to the presence or absence of the restriction site – two bands (heterozygote), only the shorter one (homozygote type I) or only the longer one (homozygote type II).

P Plakátová sdělení

**Figure 2:**

Gel separation of products obtained from semi-nested PCR with dCAPS primer. The amount of Taq polymerase (TopBio) in both steps was reduced consequently. The numbers of the lines correspond to the number of tubes in Table 1.

tube	1st step	2nd step
1	0.5U	0.5U
2	0.25U	0.5U
3	0.125U	0.5U
4	0.05U	0.5U
5	0.5U	0.25U
6	0.25U	0.25U
7	0.125U	0.25U
8	0.05U	0.25U

Table 1:

The amount of Taq polymerase used in semi-nested PCR.

Conclusion

We use CAPS and dCAPS approach for the detection of SNP very successfully for genetic mapping of sex chromosomes of the plant *Silene latifolia* (Nicolas et al., 2004; unpublished data) and *S. otites* (unpublished data). During our work we discovered some improvements for performing the dCAPS method. These improvements can resolve some troubles, which can appear during process, and they economize the protocol.

Acknowledgments

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic (521/05/2076, 204/05/P505 and 204/05/H505) and Institutional Research Plan AVOZ50040507. I would like to give special thanks to my supervisor Bohuslav Janoušek.

Literature

- Gale L.R., Bryant J.D., Calvo S., Giese H., Katan T., O'Donnell K., Suga H., Taga M., Usgaard T.R., Ward T.J., Kistler H.C. (2005): Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. *Genetics*, 171: 985-1001.
- Hongtrakul V., Slabaugh M.B., Knapp S.J. (1998): DFLP, SSCP, and SSR markers for delta 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. *Mol. Breeding*, 4: 195-203.
- Koniczny A., Ausubel F.M. (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, 4: 403-410.
- Michaels S.D., Amasino R.M. (1998): A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J.*, 14: 381-385.
- Neff M.M., Neff J.D., Chory J., Pepper A.E. (1998): dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.*, 14: 387-392.
- Neff M.M., Turk E., Kalishman M. (2002): Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.*, 18: 613-615.
- Nicolas M., Marais G., Hykelová V., Janoušek B., Laporte V., Vyskot B., Mouchiroud D., Negritiu I., Charlesworth D., Monéger F. (2004): A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. *PLoS Biology* 3: e4.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673 – 4680.
- Žlůvová J., Lengerová M., Marková M., Hobza R., Nicolas M., Vyskot B., Charlesworth D., Negritiu I., Janoušek B. (2005): The inter-specific hybrid *Silene latifolia* x *S. viscosa* reveals early events of sex chromosome evolution. *Evol Dev*, 7: 327 – 336.

THE USE OF C₀T ANALYSIS TO CHARACTERIZE REPEATED PART OF THE BANANA GENOME

EVA HŘIBOVÁ¹, JIŘÍ MACAS², MARIE DOLEŽELOVÁ¹, JAROSLAV DOLEŽEL¹

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

² Institute of Plant Molecular Biology, CZ-370 05 České Budějovice, Czech Republic

E-mail: hribova@ueb.cas.cz

Bananas and plantains (*Musa* ssp.), hereafter called bananas, are the world's largest perennial herbs grown in tropical and subtropical regions. The annual production of bananas exceeded 100 million tons, which ranks them the fourth among the most important food crops. About 90 % of the production is consumed locally, being an important nutrition source for hundreds millions of people in developing countries. Despite this, the banana genome has been studied to a limited extent. Only a small set of repetitive sequences were isolated and little is known about their genomic organization. In this study we isolated highly repeated DNA sequences from the genome of *M. acuminata* (1C ~ 630 Mbp), a diploid progenitor of most of cultivated bananas. We used a so called C₀t analysis, a biochemical technique that facilitates fractionation of DNA sequences according to their relative abundance in the genome. C₀t-0.05 and C₀t-0.1 fractions corresponding to highly repeated DNA were prepared and used to construct two DNA libraries. The libraries consisting of 7296 clones were screened with probes for ribosomal DNA and other known repetitive DNA sequences of *Musa* that were characterized previously. In total, 614 anonymous DNA clones that gave no signals after hybridization with the known sequences were sequenced. Dot-plot analysis identified a variety of tandem repeated DNA sequences, including satellite DNA, minisatellite and microsatellite sequences, which represented seventeen per cent of sequenced clones. Homology search using BLAST and FASTA showed that in addition to tandem repeats, the library was composed mostly of other highly repeated sequences such as retrotransposons. Sixty per cent of sequences were novel and did not share a homology with known DNA sequences. This work confirmed the utility of the C₀t analysis to dissect a nuclear genome to fractions differing in relative abundance and provides the first insights into the repetitive part of the *Musa* genome.

This work was supported by the International Atomic Energy Agency (Research Contract No. 12230) and the Generation Challenge Programme (SP2-15).

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ SEMI-NESTED PCR PRO AMPLIFIKACI ÚPLNÝCH 5' A 3' KONCŮ cDNA A ZÍSKÁNÍ ÚPLNÝCH SEKVENCÍ GENŮ

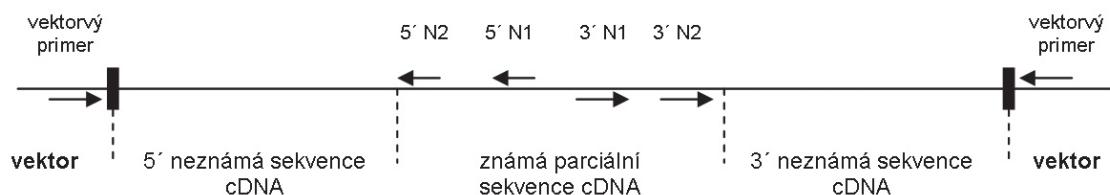
CHÁB DAVID¹, ŠTORCHOVÁ HELENA¹

¹ ÚEB AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-Lysolaje
E-mail: chab@ueb.cas.cz, tel.: 220 390 420

Za účelem nalezení úplných sekvencí slabě transkribovaných květních genů *LEAFY* (*LFY*), *Flowering Locus T* (*FT*) a *CONSTANS* (*CO*) u merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*) byla připravena cDNA knihovna pomocí soupravy SMART cDNA Library kit (Clontech) na základě celkové RNA získané z apexů třídyenních rostlin *C. rubrum*. cDNA byla klonována do vektoru pGEM-T Easy (Promega). Úplné 5'a 3' konce cDNA byly amplifikovány pomocí semi-nested PCR s jedním primerem zacíleným do vektoru a dvěma vůči němu obráceně orientovanými primery zacílenými do známé sekvence cDNA hledaného genu vložené do vektoru.

Pomocí PCR s degenerovanými i nedegenerovanými primery, navrženými na základě analýzy sekvence známých *CO* a *FT* genů z kvetoucích rostlin, byly z genomické DNA získány parciální sekvence hledaných genů. Pro identifikaci úplného 5'once byl ze známé sekvence příslušného hledaného genu navržen vnitřní nestovací primer (5'N1) vzdálenější od 5'once známé parciální sekvence a vnější nestovací primer (5'N2) blíže konci známé parciální sekvence. Pro amplifikaci 5'once byla použita semi-nested PCR. V prvním kole PCR byl použit primer zacílený do sekvence vektoru blízko klonovacího místa (vektorový primer) a příslušný vnitřní nestovací primer (5'N1). Produkt PCR (často nedetektovatelný na elektroforetickém gelu) byl použit jako templát pro druhé kolo PCR se stejným vektorovým primerem a vnějším nestovacím primerem (5'N2) – zacíleným blíže konci známé parciální sekvence – tedy do sekvence mezi vektorovým a 5'N1 primerem. Obdobný je postup pro 3'konec s použitím nestovacích primerů pro 3' konec. Získané fragmenty byly klonovány do vektoru pGEM-T Easy a sekvenovány (ABI PRISM 3100 Genetic Analyser).

Fragmenty obsahující úplnou kódující sekvenci hledaného genu byly získány pomocí PCR s primery zacílenými do nepřekládaných oblastí (UTR) genů. Poté byly opět klonovány do pGEM-T Easy, sekvenovány a připraveny pro transformaci do *Agrobacterium tumefaciens* a *Arabidopsis thaliana*.



Jun-Chao Huang and Feng Chen: 2006 – BioTechniques 40: 187-189 (February 2006)

Podporováno grantem GACR 522/05/0300

P Plakátová sdělení

MAPPING OF NON-RECOMBINING REGIONS

BOHUSLAV JANOUŠEK AND JITKA ŽLŮVOVÁ

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Kralovopolska 135, 61265 Brno, Czech Republic, tel.: +420 541 517 247, fax: +420 541 240 500, e-mail: janousek@ibp.cz

Keywords: physical maps, radiation hybrid mapping, recombination, deletion, HAPPY mapping, RH mapping software

Where and why to use the recombination independent mapping?

Genome maps are used for comparative phylogenetic studies, map based cloning and marker assisted molecular breeding. So far widely used kinds of genetic maps are maps which measure distances between loci using recombination frequencies, usually called linkage maps. Advantage of these maps is that their obtaining is relatively easy and they also enable simultaneous mapping of phenotypic and molecular markers. However there are also factors which complicate construction of this kind of maps. Variability in the crossing-over frequency along the chromosomes is a phenomenon which generally occurs in higher organisms (Korol et al. 1995). Sometimes, the reduced rate of recombination can cause serious problems in recombination mapping of some parts of chromosomes as was observed in *Zea mays* (discussed e. g. by Kynast et al. 2004), or even whole chromosomes (as are non-recombining regions of heterochromosomes of mammals or in dioecious species, reviewed in Vyskot and Hobza 2004). In some cases, the problem of non-recombining regions is avoided by construction of physical maps which are based on arranging of large cloned fragments of the studied genome. When the non-recombining region is relatively small it is possible to perform physical mapping of the given non-recombining region (as is currently being performed in *Carica papaya* by the team of Professor R. Ming (Laboratory of Plant Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign - personal communication)). However, construction of this kind of maps is much more difficult in comparison with recombination mapping and in the species with large genomes it needs some previous mapping data. A typical example was the physical mapping of the non-recombining region of the human Y-chromosome. This afford started with preparation of the initial map using the methods named radiation hybrid mapping (this map served as a scaffold for assembling contigs of BACs, the radiation hybrid method will be discussed in detail below) together with FISH techniques and continued by complex special methods, as is genomic clone subtraction and dissection of sequence family variants (both methods serve to overcome problem with repetitive sequences, Tilford et al. 2001).

Radiation hybrid mapping variants in animals and plants

Radiation hybrid (RH) mapping is a method based on the fact that after irradiation, the probability of the simultaneous rescue of two markers is proportional to their proximity on the chromosome (Goss and Harris 1975). Panel of radiation hybrid cell lines is usually constructed by fusion of irradiated diploid human fibroblasts with hamster cells. Whole-genome RH panels have been constructed and characterized for a variety of mammalian species including human, pig, cow, rat, dog, cat and mouse (reviewed in Himmelbauer et al 2000).

In spite of the progress in the last five years, the methodology of the radiation hybrid mapping in plants is not yet developed as much as in animal models. Technique of RH mapping was applied to only a limited amount of species and the maps are not as detailed as in mammals. Basically, there are three possible approaches:

1.) The approach of Wardrop et al. (2002) used for the construction of radiation hybrid panels for the mapping in barley is the most similar to the protocols used in mammals. Their method is based on the fusion of the irradiated barley protoplasts with the protoplasts of tobacco, and subsequent cultivation of the calli coming from individual fused protoplasts.

2.) Even better results were obtained using approach based on "the radiation hybrid lines" obtained from addition lines obtained by cross of oat (*Avena sativa*) and maize (*Zea mays*), using embryo rescue technique. In this kind of experiment, addition lines are subjected to irradiation and the further approach is the same as in study of the true radiation hybrids (Kynast et al. 2004). Similar approach was also used in *Gossypium* (Gao et al. 2004) and in wheat 1D chromosome (Kalavacharla et al. 2006).

3.) New possibilities are opened by usage of the "radiation hybrid" approach in the study of the large non-recombining regions in sex chromosomes (Y or W). In this case, it is not necessary to perform inter-specific hybridisation, as it is usually possible to distinguish Y chromosome linked copies from the X linked ones and design sex specific primers. The only dioecious plant species where this approach is being applied is *Silene latifolia*

P Plakátová sdělení

(e.g. Lebel-Hardenack et al. 2002). The main reasons why researchers prefer this model species are the fact that *Silene latifolia* has well distinguished pair of sex chromosomes (Y being larger) that enables to combine cytological and molecular data, and a long tradition of the studies of sex determination in this species (reviewed in Vyskot and Hobza 2004). This method can be however very useful also in the other species with a large sex specific non-recombining region.

Deletion mapping of the Y chromosome in plants – experiments

The series of deletion mutants are usually induced by irradiation of pollen (using X-rays (Lebel-Hardenack et al. 2002) or gamma irradiation (Barbacar et al. 1997, Zluvova et al., manuscript in preparation)) which is subsequently used for direct pollination. The experiments are based on the fact that deletions of markers on autosomes and on the X chromosome will be masked by their wild-type variants coming from the maternal genome, whereas deletions of Y-specific markers are detectable because the Y chromosome is present in one copy only. The most commonly used kind of markers is represented by PCR-based ones (e. g. STS, EST or AFLP). Contrary to the genetic mapping, relatively high number of markers is necessary. When the number of markers is low, the obtained map might not correspond to the true marker order. For example, doubling of the number of informative markers led to the higher statistical support and change of marker order on the *Silene latifolia* Y chromosome map (Zluvova et al. 2005).

Statistical evaluation of the deletion mapping data

The frequency at which markers are co-retained or co-deleted determines not only the marker order (Goss and Harris 1975), but also relative distance between markers in centiRads (Jones 1997). The parameters for the probability of breakage and the probability of retention are dependent on a given radiation dose. It means that when data from different experiments are combined, only the marker orders but not the distances may be counted.

It is necessary to stress that it is not possible to evaluate correctly data without usage of an appropriate computer software. It is caused not only by a huge amount of data obtained from one mapping experiment, but also by a possible occurrence of multiple deletions within one mutant. Fortunately, there are many programs freely available. One of the oldest programs, but still often used, is RHMAP package (Boehnke et al. 1991) which is relatively fast and runs on the Windows platform. Program can be downloaded from the address: <http://csg.sph.umich.edu/boehnke/rhmap.php>. The only disadvantage is the interface which is not intuitive and user-friendly. Relatively recently, new program CARHTA GENE, which is much more user-friendly, was published (de Givry et al. 2005). The program is available for free on www.inra.fr/bia/T/CarthaGene. Numerous RH mapping programs are listed by Ben-Dor et al. (2000). Another comprehensive list of RH mapping programs is also available on <http://compgen.rutgers.edu/rhmap/>.

The first step in the analysis is to predict the logarithm of the odds of linkage (LOD) for every possible marker pair. A marker pair has a LOD = 1 when a chance of linkage is 10:1. A LOD score of at least 3 (i. e., a chance of linkage is 1,000:1) is generally accepted as an indicator that two sequences are linked. Other method how to test linkage is represented by Fisher exact test. Program for the computation of the Fisher exact test is available on the Web page: www.physics.csbsju.edu/stats/exact.html. Based on the analysis, every group of markers showing absolute linkage (i. e., LOD is infinite) is reduced to one representative, and markers showing no linkage to any other markers (i. e., LOD is zero) are omitted.

The simplest algorithm used is based on minimum obligate breaks criterion and it calculates the minimal number of chromosome breaks required to account for the observed deletions in the mutant chromosomes. This method has no special computational requirements. However, although it (intuitively) seems to be perfect, it is not always the case (reviewed in Ben-Dor et al. 2000). Other algorithms (e. g. maximum likelihood) are from this point of view much better but they often require prior knowledge of the system analysed. In principle, it is possible to compare by these methods all marker orders and to choose the order with the highest probability. However, this approach is extremely slow. To significantly decrease the computational time, different algorithms for the solution of the travelling salesman problem are used (reviewed in Agarwala et al. 2000).

Conclusions and perspectives

Recombination independent mapping methods represent not only important parts of the research in new model species, but they also enable to complete mapping in relatively well studied species. In the near future, we can expect broader usage of these methods in plant genetics and breeding. The refining of existing maps should create better conditions for cloning of agriculturally important genes. The detailed comparative studies of extremely large non-recombining regions (as are some Y-chromosomes) should bring new insight on the evolutionary mechanisms leading to recombination arrest.

P Plakátová sdělení

Very interesting alternative for the construction of scaffold for the physical mapping projects is strategy called HAPPY mapping (mapping based on the analysis of approximately HAPloid DNA samples using the Polymerase chain reaction) is a tool to make accurate maps of genomes which was devised by Dear and Cook (1994). Its principle is similar to the radiation hybrid mapping with the difference that the subjects of breakage are isolated DNA molecules. Afterwards, dilutions of the sample are prepared so that there are produced numerous samples containing just one copy of the studied region. The subsequent experimental and statistical treatment is similar to the radiation hybrid mapping. This approach was with success applied in human, *Dictyostelium*, *Tetrahymena*, and *Arabidopsis* (reviewed in Waugh et al. 2002). The only limitation seems to be necessity of many markers for the studied region.

Acknowledgements

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic (521/05/2076, 204/05/P505) and Institutional Research Plan AVOZ50040507.

References

- Agarwala R., Applegate D.L., Maglott D., Schuler G.D., Schaffer A.A. (2000): A fast and scalable radiation hybrid map construction and integration strategy. *Genome Res.*, 10: 350-364.
- Barbacar N., Hinnidaels S., Farbos I., Moneger F., Lardon A., Delichere C., Mouras A., Negrutiu I. (1997): Isolation of early genes expressed in reproductive organs of the dioecious white campion (*Silene latifolia*) by subtraction cloning using an asexual mutant. *Plant J.*, 12: 805-817.
- Ben-Dor A., Chor B., Pelleg D. (2000): RHO--radiation hybrid ordering. *Genome Res.*, 10: 365-378.
- Boehnke M., Lange K., Cox D. R. (1991): Statistical methods. *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 1174-1188.
- Dear P.H., Cook P.R. (1993): HAPPY mapping: linkage mapping using a physical analogue of meiosis. *Nucleic Acids Res.*, 21: 13-20.
- Gao W., Chen Z.J., Yu J.Z., Kohel R.J., Womack J.E., Stelly D.M. (2006): Wide-cross whole-genome radiation hybrid mapping of the cotton (*Gossypium barbadense* L.) genome. *Mol. Genet. Genomics*, 275: 105-113.
- de Givry S., Bouchez M., Chabrier P., Milan D., Schiex T. (2005): CARHTA GENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics*, 21: 1703-1704.
- Goss S.J., Harris H. (1975): New method for mapping genes in human chromosomes. *Nature*, 255: 680-684.
- Himmelbauer H., Schalkwyk L.C., Lehrach H.. (2000): Interspersed repetitive sequence (IRS)-PCR for typing of whole genome radiation hybrid panels. *Nucleic Acids Res.*, 28: e7.
- Lebel-Hardenack S., Hauser E., Law T.F., Schmid J., Grant S.R. (2002): Mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism. *Genetics*, 160: 717-725.
- Kalavacharla V., Hossain K., Gu Y., Riera-Lizarazu O., Vales M.I., Bhamidimarri S., Gonzalez-Hernandez J.L., Maan S.S., Kianian S.F. (2006): High-resolution radiation hybrid map of wheat chromosome 1D. *Genetics*, 173: 1089-99.
- Korol, A.B., Preygel, I.A., Preygel, S.I. (1994): Recombination variability and evolution, Chapman & Hall, London.
- Kynast R.G., Okagaki R.J., Galatowitsch M.W., Granath S.R., Jacobs M.S., Stec A.O., Rines H.W., Phillips R.L. (2004): Dissecting the maize genome by using chromosome addition and radiation hybrid lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101: 9921-9926.
- Tilford C.A., Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Rozen S., Brown L.G., Rosenberg M., McPherson J.D., Wylie K., Sekhon M., Kucaba T.A., Waterston R.H., Page D.C. (2001): A physical map of the human Y chromosome. *Nature*, 409: 943-945.
- Vyskot B., Hobza R. (2004): Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends Genet.*, 20: 432-438.
- Wardrop J., Snape J., Powell W., Machray G.C. (2002): Constructing plant radiation hybrid panels. *Plant J.*, 31: 223-228.
- Waugh R., Dear P.H., Powell W., Machray G.C. (2002): Physical education - new technologies for mapping plant genomes. *Trends Plant Sci.*, 7: 521-523.
- Zluvova J., Janousek B., Negrutiu I., Vyskot B. (2005): Comparison of the X and Y chromosome organization in *Silene latifolia*. *Genetics*, 170: 1431-1434.

P Plakátová sdělení

DISRUPTING CYTOKININ METABOLISM *IN VIVO* BY ALTERING THE SUB-CELLULAR LOCATION OF A MAIZE β -GLUCOSIDASE

NAGAVALLI S. KIRAN^{1,2}, EVA BENKOVÁ^{2*}, ALENA REKOVÁ², JAROSLAVA DUBOVÁ³, JIŘÍ MALBECK⁴,
BRZETISLAV BRZOBOHATÝ^{1,2}

¹Department of Molecular Biology and Radiobiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, CZ-613 00 Brno, Czech Republic;

²Institute of Biophysics AS CR, CZ-612 65 Brno, Czech Republic;

³Department of Plant Physiology and Anatomy, Masaryk University, Brno, Czech Republic;

⁴Institute of Experimental Botany AS CR, Prague, Czech Republic;

*Present Address: Centre for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

Email: kiran@mendelu.cz

Maintaining effective hormone concentrations requires a balance between the rates of biosynthesis, metabolism and breakdown. Moreover, the efficacy of each cytokinin is determined by a complex interplay of factors such as cellular/tissue location, stability, and its metabolism (Mok and Mok, 2001). Further, sub-cellular compartmentation plays a significant role in modulating active cytokinin levels. The quantity of cytokinin measured in mixed tissues or whole plants may or may not reflect its biological significance *in vivo*. Hence, it will be more informative to associate phenotypic variations with changes in a specific metabolic step.

In order for this approach to be successful, it is necessary to identify factors responsible for such metabolic conversions. A β -glucosidase, Zm-p60.1, capable of releasing active cytokinins from their O- and N3-glucoside conjugates was isolated from maize coleoptiles (Brzobohatý et al. 1993). Over-expression of Zm-p60.1 enabled protoplasts to divide on medium containing *t*-zeatin-O-glucoside (ZOG) as the sole source of cytokinin. The wild type protein was localised to plastids and shown to be in chloroplasts in adult leaves (Kristoffersen et al. 2000).

Overexpressing wild-type Zm-p60.1 disrupts zeatin metabolism in transgenic tobacco (Kiran et al. 2006). We constructed tobacco plants over-expressing a recombinant Zm-p60.1 retargetted to the vacuole. On medium containing zeatin, transgenic seedlings between 21 and 28 days after sowing were significantly heavier than wild-type and showed ectopic outgrowths at the base of the hypocotyl. The β -glucosidase enzyme is found preferentially in these structures. The ectopic presence of the enzyme leads to a disruption in zeatin metabolism, that further leads to ectopic cell division. These plants cannot accumulate the substrate zeatin-O-glucoside to levels seen in wild-type, thus showing, for the first time in intact plants, that the vacuole is the storage organelle for ZOG. Results from detailed analyses of histology and cytokinin metabolism will be presented.

Altering the sub-cellular location of this enzyme will thus allow us to disrupt zeatin metabolism in a hitherto unavailable, sensitive fashion.

Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bakó L, Campos N, Schell J, Palme K (1993) Science 262: 1051-1053

Kiran NS, Polanská L, Fohlerová R, Mazura P, Válková M, Šmeral M, Zouhar J, Malbeck J, Dobrev PI, Macháčková I, Brzobohatý B. (2006) J. Exp. Bot. 57: 985–96.

Kristoffersen P, Brzobohatý B, Höhfeld I, Bakó L, Melkonian M, Palme K, (2000) Planta 210: 407-415

Mok DWS, Mok MC, (2001) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52:89-118.

Supported by grant Nos. MSM 143100008, LN00A081, AVOZ50040507, IAA600380507, LC06034 and INT-9600462.

P Plakátová sdělení

HYDROPONICKÁ KULTIVACE *ARABIDOPSIS THALIANA*

JAN KOLÁŘ¹, JANA ŠEŇKOVÁ^{1,2}

¹ Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ČR

² Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ČR
E-mail: senkova@ueb.cas.cz, kolar@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 414

Pokusili jsme se zavést v naší laboratoři systém hydroponické kultivace *Arabidopsis thaliana*. Cílem bylo studovat vliv stresu z deficitu minerální výživy na indukci kvetení. Srovnávali jsme dva způsoby hydroponického pěstování vytvořené speciálně pro *Arabidopsis*. V obou jsme použili jako oporu pro zakořenování semenáčků minerální vlnu Grodan, což je podle Gibeaut et al. (1997) optimální materiál pro tento účel. Rostliny ekotypů Col a Ler byly kultivovány v klimaboxech Sanyo MLR-350H při 20 °C, 75% vlhkosti vzduchu a 8-hodinové délce dne (bílé zářivky, 155 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Jako živné médium byl použit modifikovaný Hoaglandův roztok (50% koncentrace makroprvků, 100% mikroprvků, pH 6,3).

První systém (*Magenta boxy*) byl modifikován z Arteca a Arteca (2000). Rostliny byly individuálně pěstovány v nádobách Magenta (běžně používány pro *in vitro* kultury) se 150 ml médiem. Na hladině média byl umístěn plovák LifeRaft (Osmotec), uprostřed s hranoletem vyříznutým z Grodanu, na jehož horní povrch byla vyseta semena. Médium bylo měněno každý týden a nebylo provzdušňováno. Růst rostlin byl velmi dobrý až do přechodu ke kvetení. Vývoj (dny do objevení poupat a do rozkvětu) byl srovnatelný s pěstováním v půdě; v Magenta boxech byl urychlen pouze o několik dnů. Rovněž habitus kvetoucích rostlin Col i Ler byl podobný rostlinám v půdě. Senescence listů v růžici ovšem nastupovala dříve a u podstatné části rostlin Col zasychaly květy ještě před rozkvětem. Problémem byl také silný růst řas v médiu, který začal po několika týdnech kultivace.

Druhý systém (vaničky) byl přejat z Gibeaut et al. (1997). Plastové vaničky byly opatřeny plastovým víkem s vyvrtanými otvory, do nichž byly zasunuty válečky Grodanu s vysetými semeny. Ve vaničce (4,5 l média) bylo kultivováno 10 rostlin, médium bylo měněno každé 2 týdny a přerušovaně provzdušňováno (15 min každé 3 hodiny). Výskyt řas byl ve vaničkách eliminován díky jejich světlotěsnosti. Růst růžic obou ekotypů byl robustní a počet dnů do objevení poupat byl téměř totožný s rostlinami v půdě. U Ler byl ale výrazně prodloužen interval od objevení poupat do rozkvětu (ze 14 na cca 30 dnů) a habitus kvetoucí rostliny byl abnormální, s postranními květenstvími vyššími než hlavní stonek. U Col se tyto efekty neprojevily. Jak ukázal následný pokus s hnojením Ler v půdě, byl abnormální vývoj Ler ve vaničkách způsoben příliš dobrou minerální výživou. Ta neměla negativní vliv na růst (žádné viditelné symptomy přehnojení), ale pouze na vývoj rostlin.

Výsledky ukazují, že dlouhodobá hydroponická kultivace *Arabidopsis thaliana* (v našem pokuse s vaničkami až 90 dnů) je realizovatelná. Je však nutno optimalizovat její podmínky pro zamýšlený účel a rovněž pro použitý ekotyp.

Arteca RN, Arteca JM (2000) Physiol Plant 108: 188

Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, Seemann JR (1997) Plant Physiol 115: 317

Podporováno grantem KJB600380510 od GAAV ČR.

P Plakátová sdělení

SEKVENČNÍ ANALÝZA A OVĚŘENÍ AKTIVITY GENU PRO 4-HYDROXYFENYL PYRUVÁT DIOXYGENÁZU V JEČMENI

MICHAL KOSAŘ, LUDMILA HOLKOVÁ, JAROSLAVA EHRENBERGEROVÁ

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Česká republika
Email: michal.kosar@email.cz

Rostlinné látky tokoferoly a tokotrienoly souhrnně označované jako tokoly, tj. α -, β -, γ - a δ - izomery vitamínu E hrají důležitou úlohu přímo v rostlinách (chrání fotosyntetický aparát před poškozením volnými radikály, udržují stabilitu membrán a pomáhají rostlinám překonat stresové podmínky způsobené suchem nebo chladem) a jsou důležitou součástí lidské výživy. Zdrojem vitamínu E pro lidskou výživu jsou například rostlinné oleje, obilné klíčky, ořechy, kapusta a v neposlední řadě se k nim řadí i ječmen, výchozí surovina pro kroupy, slad, mouku, která vysokým obsahem vitamínu E obohacuje zejména pečivo vyrobené z celozrnné mouky. To je důvod pro šlechtění nových odrůd ječmene s vyšším obsahem vitamínu E v pletivech.

Ukazuje se, že jedním z důležitých enzymů, které ovlivňují celkový obsah tokolů v rostlinných tkáních je 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenáza (HPPD). Zvýšená exprese tohoto genu vedla k vyššímu obsahu vitamínu E v listech i plodech u některých experimentálních druhů rostlin, např. huseníčku, tabáku nebo sóji. Vyšší exprese tohoto genu byla nepřímo prokázána zvýšenou odolností vůči herbicidu sulcotrionu, který není v České republice registrován. Daleko přesnější hodnocení exprese tohoto genu by umožnilo přímé hodnocení jeho transkripcí na molekulární úrovni pomocí RT PCR.

Z dosavadních experimentů vyplývá, že linie ječmene s odlišným obsahem vitamínu E pravděpodobně nenesou odlišnou či méně funkční alelu tohoto genu. Zatím byl hodnocen délkový polymorfismus u 21 odrůd a 7 šlechtitelských linií. U kontrastních odrůd v obsahu vitamínu E byly navíc provedeny restrikční analýzy specifických produktů. Ukázalo se, že sekvence genu je delší než uváděná sekvence cDNA v GenBank (HVAJ693). Proto jsme přistoupili k sekvenování druhé části genu obsahující intron u odrůd lišících se obsahem tokolů. Část sekvence genu o délce 816 pb obsahovala intron o délce 411 pb v místě, kde ho předpokládal Falk et al. (2002), konkrétně v poloze 1113 pb. Na základě přesných hraničních sekencí tohoto intronu jsme navrhli reverzní primer do místa sestřihu, který bude využit při hodnocení aktivity transkripce tohoto genu. Výhodou takto umístěného primeru je, že nenasedá na sekvence genomové DNA, které často kontaminují vzorky RNA z aktivované tkáně i po enzymatickém štěpení Dnázou.

Následné kvantitativní hodnocení transkripčních aktivit u odrůd se stanoveným obsahem vitamínu E v pletivech blíže objasní vliv tohoto genu na celkový obsah vitamínu E a jeho význam při šlechtění nových odrůd.

1)Falk, J., Krauß, N., Dähnhardt, D., Krupinska, K.: The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J Plant Physiol*, 2002, Vol. 159.

Tato práce byla financována z grantu VC č. 1M6215648902

P Plakátová sdělení

PIN PROTEIN FAMILY AND AUXIN TRANSPORT – A BIOINFORMATIC STUDY

PAVEL KŘEČEK^{1, 2}, EVA ZAŽÍMALOVÁ¹

¹Institute of Experimental Botany, Prague, Czech Republic

²Faculty of Science, Charles University, Department of Plant Physiology, Prague, Czech Republic

The distribution of auxins in plant organs is an important factor for orientation of plant growth. The differences in spatial distribution of auxin in plant organs result from polar auxin transport (different from long-distance transport of auxin in vascular tissues). The polarity of the cell-to-cell transport is determined by asymmetrical distribution of auxin efflux carriers.

We employ bioinformatic tools for evaluation of candidates for auxin efflux carriers – proteins from the PIN family – with respect to their similarity to other transporters. The purpose of this work is to address the questions: 1. Are the PIN proteins transporters of auxin? 2. Are all members of this protein family involved in auxin transport? 3. Are there any structure-function relations useful for further study of mechanism of polar auxin transport?

Survey of public sequence databases (NCBI Non-redundant and various genomic ones) revealed 59 homologues of PINs with complete sequence. Alignment of these protein sequences was used for large part of presented work. Besides, scanning of ESTs and incomplete genomic sequences revealed more than 1200 fragments showing strong similarity to the PIN proteins. These fragments were used for further characterization of sequence diversity. The sequences were used for construction of a dendrogram based on the similarity. This dendrogram shows clear division of this protein family into two classes with a prominent difference in the size and structure of the hydrophilic domain.

The complete protein sequences of PINs have the same predicted structural topology: two hydrophobic domains (N-terminal and C-terminal), each with 5 transmembrane helices, and hydrophilic domain between them. This general already known topology is similar to other transporters; thus, we focused on further similarities between PINs and other transporters. Analysis of invariant and highly conserved amino acid residues allowed us to construct several structural motifs common to both PINs and a large group of ion-driven transporters, even if the sequence similarity between PINs and these transporters is low. The tertiary structure of PINs was partially characterized by identification of possible interactions between acid residues. The interacting residues were identified by the analysis of mutual information. The pairs of interacting amino acid residues were incorporated into a model of general PIN structure and compared with known structures of transporters.

The large structural diversity of this protein family led us to the question whether all PINs are involved in polar auxin transport. Changes in the specificity of the transporter would result in changes of selective pressure on the amino acid residues involved in binding of the ligand. The possible change of selective pressure was investigated by maximum-likelihood analysis of these two classes of proteins and the rates of change of amino acid residues were compared. No significant changes in the selection between the two main classes of PINs were found.

Finally, we have analyzed the presence of different forms of PINs in various plant taxons. This analysis shows large diversification of PINs in angiosperms and differences in groups of PINs present in monocots and dicots.

Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project LC06034.

P Plakátová sdělení

ACCUMULATION OF RADIOACTIVELY LABELED COMPOUNDS AS A TOOL FOR STUDY OF AUXIN INFLUX

MARTINA LAŇKOVÁ^{1,2}, KLÁRA HOYEROVÁ¹, JAN PETRÁŠEK¹, LUCIE PERRY¹, EVA ZAŽÍMALOVÁ¹

¹ Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6 - Dejvice, CR

² Faculty of Science, Charles University, Department of Biochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, CR

Auxin is the only plant hormone which is transported through the plant body by a special polar auxin transport machinery. This machinery consists of a balanced system of passive diffusion combined with the effects of the influx and efflux carriers.

We aimed our attention to the uptake of auxin by the cells, especially to the uptake mediated by a presumptive auxin influx carrier PaLAX1.

For our studies we had 3 model systems:

- 1) Suspension-cultured tobacco cells lines BY-2,
- 2) Segments of main veins of tobacco leaves,
- 3) Segments of *Arabidopsis* inflorescence stems.

These three systems were used for transformation with the gene *PaLAX1* from *Prunus avium*, which is a gene that is sequentially highly homologous to the gene *AUX1* (coding for a putative auxin influx carrier).

For measurements of auxin uptake, we optimized the accumulation assay which we present here. We measured accumulation of radioactively labeled 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (a synthetic auxin, which enters the cells via a carrier) and naphthalene-1-acetic acid (a synthetic membrane permeable auxin, which enters cells by passive diffusion). We also characterized the effects of auxin transport inhibitors, 1- and 2-naphthoxyacetic acids (inhibitors of auxin influx), in relation to function of PaLAX1 in auxin uptake.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project LC06034.

POUŽITÍ TUNEL REAKCE PRO DETEKCI PCD V ROSTLINNÝCH PLETIVECH A BUNĚČNÝCH KULTURÁCH

ZUZANA LENOCHOVÁ, ANDREA KUTHANOVÁ, OLGA VOTRUBOVÁ, ZDENĚK OPATRNÝ, ALEŠ SOUKUP

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Viničná 5, Praha 2, 128 44

E-mail: lenoska1@seznam.cz, tel.: 221 951 697

Výzkum programované buněčné smrti u rostlin je i přes mnohé metodické komplikace v současnosti stále velmi populární. PCD je jevem, který se uplatňuje v řadě fyziologických procesů, a to jak v rámci normálního vývoje, tak i jako reakce na stresové působení okolního prostředí. Jedním ze základních znaků PCD, nejen u živočichů, ale zřejmě i u rostlin, je fragmentace jaderné DNA za vzniku volných 3'OH-skupin.

Pro detekci PCD je tradičně používána řada metod, mezi něž patří i TUNEL reakce. Jejím principem je navázání krátkého řetězce značených nukleotidů na volné 3' OH-konce vzniklé fragmentací DNA. Základem této reakce je enzym terminální transferáza, nejběžněji bývá používáno značení nukleotidů pomocí fluorescenčních sond. Výhodou této reakce je možnost sledování výsledků *in situ*.

Ačkoli je tato reakce používána u živočišných buněk v podstatě rutinně a v některých případech i na rostlinném materiálu (buněčné kultury BY-2, Kuthanová et al. 2004) jsou její výsledky přesvědčivé, můžeme se setkat s nečekanými komplikacemi. V literatuře běžně používané fluorescenční značení se ukázalo jako značně nespolehlivé a přinášející nereprodukované výsledky. Jak bylo experimentálně zjištěno, jejich příčinou může být jednak autofluorescence rostlinných buněk, jednak i použité fixativum či šáraž komerčně dostupných TUNEL kitů.

Jako nadějně řešení pro rostlinné buněčné kultury i pro celá pletiva se jeví použití nukleotidů značených alkalickou fosfátázou a následné sledování světelným mikroskopem, spolu s dalšími metodami a dostatkem kontrol ověřujícími relevanci výsledků.

P Plakátová sdělení

MEZIDRUHOVÝ HYBRID JAKO INTERNÍ CYTOGENETICKÁ KONTROLA

MICHAELA MARKOVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno, 612 65
E-mail: m.markova@email.cz, tel.: 541 517 247

Při cytogenetických experimentech založených na fluorescenční *in situ* hybridizaci jsou častými problémy velké fluorescenční pozadí nebo slabý signál, které snižují informační hodnotu dat. Z tohoto důvodu je třeba používat pozitivní a negativní kontroly, které omezují možnost vzniku artefaktů. Nicméně každý jednotlivý preparát je originál s vlastní hladinou pozadí. Stejně tak sonda není naznačena vždy stejně intenzivně, liší se také kvalita cytogenetických objektů, stupeň kondenzace chromozomů a další parametry. Dalším problémem je jednoznačně prokázat nepřítomnost signálu určité sondy u daného typu tkáně (list, poupě) či druhu (*Silene latifolia*, *Silene viscosa*). Vždy lze namítat, že signál byl pod úrovni detekovatelnosti, a nebo byl pokus nezdařený.

Elegantním řešením je použití interní kontroly. Pokud je sledovaný vzorek i kontrola součástí téhož preparátu, hybridizace probíhá u obou ve stejném prostředí a za stejných podmínek. Další výhodou je finanční stránka, spotřebujeme poloviční objem sond a roztoků. Jednou z možností, jak zavést do pokusu interní kontrolu, je použití mezidruhových hybridů. Ideální je zkřížit dobře popsaný druh s druhem nově studovaným. Mnoho parametrů tak lze získat pouhým srovnáním dat. Lze porovnávat velikosti chromozomů, rodičovských genomů, počty signálů a jejich lokalizaci či intenzitu.

My jsme pracovali s mezidruhovým hybrudem *S. latifolia* × *S. viscosa*, který byl připraven opylením květů *S. latifolia* (ekotyp Brno) pylém *S. viscosa* (ekotyp Rohatec). Rod *Silene* L. z čeledi Caryophyllaceae (hvězdíkovité) představuje jedinečný systém pro studium determinace pohlaví a evoluce pohlavních chromozomů u rostlin. Konstrukce hybrida umožnila mimo jiné přímo srovnat druh dvoudomý s druhem hermafroditním. Velmi přínosné bylo také studium interakce rodičovských genomů. Metodou GISH (genomová *in situ* hybridizace) jsme jednoznačně rozlišili rodičovskou příslušnost chromozomů v hybridi, což nám umožnilo oba genome přímo porovnávat. Podrobnejší analýza chromozomů pomocí FISH sond ukázala, že hybrid má striktně aditivní charakter a nedochází u něj k žádným přestavbám. Sledovali jsme také průběh buněčného cyklu. Mitóza probíhá bez aberací, což svědčí o stabilitě hybridního genomu. Problemy nastávají až při meióze, zejména v anafázi I a anafázi II, kdy dochází ke vzniku četných opožděných chromozomů a můstků. Přičinou je, kromě evoluční divergence, také odlišná velikost rodičovských genomů. Díky párovému uspořádání pokusu jsme jednoznačně prokázali, že subtelomerická abundantní repetitivní sekvence X43.1, izolovaná ze *S. latifolia*, se u *S. viscosa* nenachází. Podobné druhově specifické sekvence odpovídají zřejmě také za rozdíl ve velikostech obou rodičovských genomů. Hybrid *S. latifolia* × *S. viscosa* bude nadále využíván pro studium evoluce repetitivních DNA sekvencí.

Žlůšková, J., Lengerová M., Marková M., Hobza R., Nicolas M., Vyskot B., Charlesworth D., Negrutiu I., Janoušek B.: 2005 - Evol. Devol, 7: 327
Marková, M., Lengerová M., Žlůšková J., Janoušek B., Vyskot B.: 2006 - Genome, 49: 373

Tato práce je finančně podporována Grantovou agenturou ČR (204/05/H505 a 521/05/2076) a výzkumným záměrem AVOZ50040507.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ KVANTITATIVNÍ PCR PŘI STUDIU EXPRESE HOMEOLOGNÍCH rRNA GENŮ U ALLOTETRAPLOIDNÍCH DRUHŮ RODU TRAGOPOGON

ROMAN MATYÁŠEK

BFÚ AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, ČR

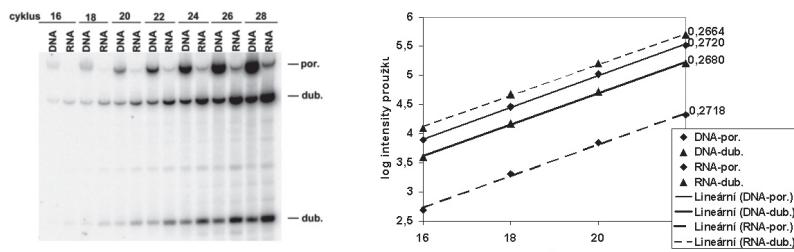
E-mail: matyasek@ibp.cz, tel.: 541 517 230

Při PCR amplifikaci homeologních genů (zde rRNA genů) u allotetraploidních druhů není často možné navrhnut primery specifické pro jednotlivé homeologní geny (rDNA rodiny), pocházející od jednotlivých diploidních rodičů, a proto pro kvantitativní měření exprese jednotlivých rodin nemůžeme použít real time PCR. V těchto případech jsme však většinou schopni následně odlišit PCR produkty pocházející od jednotlivých rodin pomocí RFLP nebo SSCP. Pro správnou interpretaci je nutno mít jistotu, že se obě rodiny amplifikují stejně účinně. Za tím účelem je potřeba provést kvantitativní PCR tj. změřit množství amplifikovaného produktu po různém počtu cyklů během exponenciální fáze reakce a následně analyzovat množství produktu metodou lineární regrese, kdy směrnice přímky je mírou účinnosti PCR reakce (teoretická hodnota $\log_2 = 0.301$).

Možnost využití kvantitativní PCR při studiu exprese jednotlivých rodin rDNA jsme testovali na dvou allotetraploidních druzích rodu *Tragopogon*, *T. mirus* = *T. dubius* × *T. porrifolius* a *T. miscellus* = *T. dubius* × *T. pratensis*. Oba druhy vznikly v posledních asi 80 letech nezávisle na několika lokalitách v USA po introdukcí evropských diploidních druhů. Jednotlivé populace se liší charakterem exprese rDNA. U většiny populací dominují jednotky pocházející z *T. dubius*, některé populace však vykazují kodominanci a některé rostliny jedné z populací vykazují dokonce dominanci *T. porrifolius*. Byly analyzovány všechny tři případy.

Pro amplifikaci jsme zvolili ITS1, středně variabilní část rDNA genu, často využívanou pro fylogenetická studia. Je vhodné provést PCR jak na cDNA (RNA, RT-PCR), tak i na genomové DNA jako kontrolu, jež umožní stanovit vzájemný počet jednotek obou rodin v genomu. Před vlastním experimentem je nutné vyvážit množství templátu ve vzorku cDNA a DNA např. využitím pomocné PCR. PCR směs je pipetována po alikvotech do několika zkumavek a reakce v nich je postupně ukončena vždy po určitém počtu cyklů. PCR produkt je následně štěpen diagnostickou restrikční endonukleázou, schopnou odlišit ITS1 produkt pocházející z jednotlivých rDNA rodin. Po rozdělení elektroforézou jsou jednotlivé specifické proužky detekovány buď měřením intenzity radioaktivity po inkorporaci značeného dATP během PCR (STORM) nebo fluorescenčně po vhodném nabarvení (ethidium bromid – CCD kamera; vistra green -STORM) (levý panel obrázku) a jejich intenzita je kvantitativně vyhodnocena pomocí programu Image Quant. V programu Microsoft Excel je stanovena směrnice semilogaritmické závislosti relativní intenzity signálu v jednotlivých specifických proužcích (DNA-prat/por, DNA-dub, RNA- prat/por a RNA-dub) na počtu cyklů (pravý panel obrázku). Je zřejmé, že přímky jsou téměř rovnoběžné (směrnice uvedeny vlevo), tudíž amplifikace probíhala u obou rDNA rodin jak na DNA tak na cDNA s přibližně stejnou účinností.

U použitého systému *Tragopogon* bylo zjištěno: (i) i když se v některých konkrétních případech směrnice produktů obou rodin amplifikovaných na DNA nebo cDNA liší, nebyly tyto odlišnosti statisticky významné, z čehož plyne, že obě rodiny se amplifikují jak na DNA tak na cDNA statisticky stejně účinně. Je tedy nutné provádět analýzu tak, aby směrnice v daném konkrétním případě byly podobné (obrázek) a není-li tomu tak, potom experiment modifikovat a zopakovat (ii) z hodnoty směrnice plyne, že nejlépe teoretické hodnotě (0.301) odpovídají hodnoty naměřené při použití radioaktivity a nejméně při použití ethidium bromidu pro detekci. Použití radioaktivity je tedy nejpřesnější, zároveň však experimentálně nejnáročnější.



Obrázek. Příklad analýzy populace 2601 druhu *T. mirus* s výraznou transkripční dominancí rDNA, pocházející z *T. dubius* (dub.). Levý panel znázorňuje gel po radioaktivní detekci proužků a pravý panel po vyhodnocení pomocí programu Microsoft Excel. PCR produkt, pocházející z jednotek dub., obsahuje cílové místo pro *BstNI*, kdežto PCR produkt pocházející z jednotek *T. porrifolius* (por.) toto místo neobsahuje.

P Plakátová sdělení

IN VITRO METODY V LESNICTVÍ – PRINCIPY, METODY A APLIKACE

MICHAELA MAULEOVÁ¹, JAN VÍTÁMVÁS¹

¹ ČZU, FLE, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchdol, ČR
E-mail: mauleova@fle.czu.cz, tel.: 224 383 785

Mikropagace, nebo-li kultivace rostlin *in vitro*, je v současnosti rychle se rozvíjejícím oborem biotechnologie. Jedná se o metody množení explantátů v kontrolovaných laboratorních podmínkách, kdy v krátkém časovém období na relativně malém prostoru, s použitím aseptických explantátů, je možné rostlinný materiál namnožit na požadované množství. Mikropagace je stále součástí výzkumných experimentů, které objasňují záhadu růstu a vývoje rostlin (anatomie, fyziologie, biochemie atd.). V posledních letech jsou metody *in vitro* využívány i ke komerční produkci velkého objemu reprodukčního materiálu – banánovníků, okrasných dřevin (např. rododendrony) či pro lesnickou výsadbu (eukalypty, sekvoje, smrky, borovice atd.).

A. Somatická embryogeneze a organogeneze jako nástroj šlechtitelských programů

Moderní biotechnologie přináší významný pokrok v oboru reprodukce a šlechtění různých druhů a populací lesních stromů. K množení lesních stromů se nejčastěji používají metody - somatická embryogeneze (a to především pro druhy *Picea*, *Pinus*, *Larix* a další jehličnany) a organogeneze (pro druhy *Fagus*, *Quercus*, *Tilia* a další nejen listnaté dřeviny). Tyto metody spolu s možností kryokonzervace (uchování meristémů, kalusových buněk, buněčných suspenzí, atd.) a zakládáním genových bank (např. VÚLHM Jíloviště – Strnady) jsou efektivními nástroji využitelnými při realizaci různorodých šlechtitelských programů.

Se zdokonalováním metod regenerace *in vitro* pro jednotlivé dřeviny, spolu se studiem funkcí biologických systémů se začíná rýsovat několik směrů a perspektiv dalšího vývoje výzkumu. Zavádění nových genů do cílových organismů poskytne možnost vytvářet modifikované druhy lesních stromů (např. druhy rezistentní vůči specifickým škůdcům).

B. Studium vývojových procesů u somatické embryogeneze

Studiem vývojových procesů a principů na nižší úrovni a jejich objasňováním se zabývá fyziologie, která slouží i jako základ evoluční ekologie. Studium rostlinné fyziologie a jejích principů napomáhá pochopit, proč k určitému procesu dochází s ohledem na ucelený systém vyššího stupně organizace. Možným nástrojem pro studium převážně vývojových principů na nižší úrovni je somatická embryogeneze.

Somatická embryogeneze u jehličnanů reprezentuje sled specificky regulovaných vývojových stádií od získání primárního explantátu (kotyledony, zygotická embra atd.), přes stádia iniciace a proliferace PEM (proembryogenní pletivo), formování a dozrávání embryí, zakořeňování a vysévání embryí, získání sadebního materiálu, až po růst a vývoj sazenic.

Vývoj PEM od formování PEM do pozdní fáze vývoje embryia je součástí studia regulace vývoje embryí. Absence růstových regulátorů (auxinů a cytokinů) spustí PEM k přechodu poskytujícímu synchronizovaný start k časnému vývoji embrya a aktivaci programované buněčné smrti. Extracelulární lipofilní oligosacharidy (LCO), vylučované Rhizobiem, představují signální molekuly pro stimulaci PEM a vývoje embryí. Spolu s Nod faktorem aktivují PEM také chitinázy a arabinogalaktanové proteiny (AGP).

Pomocí DNA čipů (microarray) jsou zkoumány geny regulující vývoj embryogeneze. Na SLU - Uppsala byly u *Picea abies* izolované a popsány některé homeotické geny (HBK2 apod.).

Doporučená literatura

- Laux, T., Jürgens, G.: 1997-Phe Plant Cell 9:989-1000.
- Tzfira, T., Zuker, A., Altman, A.: 1998-Tibtech 16: 439-443.
- Filonova, L. H., Boykhov, P. V., von Arnold S.: 2000 - Journal of Experimental Botany 51: 249-264.
- Dyachok, J. V., Wiweger M., Kenne L., von Arnold S.: 2002 – Plant Physiology 128: 523-533.
- Stasolla, C., Yeung, E. C.: 2003 - Plant cell Tissue and organ culture 74: 15-35.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C., Thorpe, T. A.: 2002 - In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 38:93-105

Podporováno grantem VGA FLE - 41130/1312/41/3163.

P Plakátová sdělení

MAINTENANCE OF ARABIDOPSIS TELOMERES BY ATM

PETR MOKROŠ, JIŘÍ ŠIROKÝ, LAURENT VESPA¹ AND DOROTHY SHIPPEN¹

Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Brno, Czech Republic and ¹Department of Biochemistry & Biophysics, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

The mammalian protein kinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) has an essential role in the DNA damage response. Upon recognition of DNA damages, such as double strand breaks (DSBs), ATM promotes cell cycle arrest and repair by homologous recombination through the phosphorylation of a plethora of downstream targets including p53, Chk2, Nbs1 and BRCA1. If non-repairable breaks are present, ATM will induce apoptosis. Accordingly, ATM deficiency leads to a hypersensitivity to DSB-inducing agents, cancer predisposition, and meiotic defects. If non-repairable breaks are present, ATM will induce apoptosis. ATM is also involved in the maintenance of telomeres. Recent data in mammals indicate that ATM is recruited to telomeres at the end of S-phase and induces locally a mini-DNA damage response that is required for telomere protection (Verdun RE et al., Molecular Cell 23: 551, 2005). However, it is still unclear if ATM has a direct protective function specifically at telomeres or if the phenotypes observed are the result of a deficient checkpoint. We addressed this question by fluorescence in situ hybridization (FISH). FISH with probes specific for particular chromosomes and/or chromosome loci can reveal the exact types of fusions, thus enabling to approximate the molecular mechanisms of *atm* mutation. Previously, it was shown that *atm* mutants have wild type telomere length, but in *atm* *tert* mutants an early onset of chromosome end deprotection is observed (Vespa et al., Genes & Development 19: 2111, 2005). We show here that, although chromosome fusions are induced by critically short telomeres, most of the anaphase bridges contain no telomeric DNA signals. We also have identified primary fusions between two chromosome ends in which subtelomeric sequences were observed, which strongly suggests that ATM protects short telomeres against an exonucleolytic attack.

This work is supported by Czech Science Foundation (522/06/0380)

P Plakátová sdělení

INCREASE IN SENSITIVITY OF CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE RADIOISOTOPE ASSAY BY INTRODUCING ELECTRON ACCEPTOR(S) TO THE REACTION SOLUTION CONTAINING CRUDE ENZYME PREPARATIONS

BLANKA SÝKOROVÁ, PETRE I. DOBREV, MIROSLAV KAMÍNEK, VÁCLAV MOTYKA

ÚEB AV ČR, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6-Lysolaje, ČR
E-mail: vmotyka@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 437

Irreversible degradation of cytokinins in plants is catalysed by cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) enzymes that selectively cleave unsaturated cytokinin isoprenoid side chains resulting in the formation of adenine/adenosine and the corresponding side chain aldehyde (Armstrong 1994). The rate of this reaction can be determined *in vitro* using either radioisotope or spectrophotometric assays. The radioisotope methods are based on the measurement of conversion of purine ring-radiolabelled cytokinins *N*⁶-(Δ²-isopentenyl)adenine (iP), *trans*-zeatin (Z) or their ribosides as substrates in assays in which adenine or adenosine are separated from unreacted cytokinin substrates by appropriate chromatographic procedures. The latter techniques rely on spectrophotometric determinations of changes in UV absorption associated with cytokinin degradation. Poor reliability and relatively low sensitivity of spectrophotometric measurements of CKX activity have been recently improved by addition of a variety of artificial electron acceptors such as 2,6-dichloroindophenol (DPIP) to the reaction (Galuszka et al. 2001, Frébort et al. 2002). However, the concentration of substrate cytokinins for spectrophotometric detection of products considerably exceeds their physiological level. Moreover, the CKX colorimetric assays require extensive enzyme purification (Laskey et al. 2003) that is time consuming and could cause losses of the enzyme activity.

In this work, we studied effects of DPIP and other artificial electron acceptors on the CKX activity in crude plant extracts using the standard radioisotope assay (Motyka et al. 2003) with [³H]iP as the substrate. The data obtained for enzyme preparations of different plant origin (developing wheat grains, pea leaves, radish seedlings, tobacco calli etc.) revealed a significant enhancement (ca. 20 to 40-fold) of the sensitivity of the CKX radioisotope assay by introducing DPIP (30 to 300 μM) to the reaction solution. Even higher increase in the sensitivity of the CKX radioisotope detection (up to 50-fold) was found after addition of corresponding concentrations of phenazine methosulfate (PMS), while the other tested electron acceptors (Basic Blue 24, Coenzyme Q₁₀, Toluidine Blue O, MTT) were less effective than DPIP. Elevated sensitivity of the CKX assay allowed easy detection of the enzyme activity in crude extracts from various plant materials including leaves, roots as well as callus and cell suspension cultures. The *in vitro* degradation of [³H]iP to adenine by CKX was found to proceed in a time-dependent manner in the presence of DPIP with optimal conversion (20–40 %) achieved after 30 to 90 min incubation depending on the enzyme origin. The analysis of pH dependence of CKX revealed no shifts in the pH optima of the enzyme in response to DPIP. This, in contrast to the previously reported stimulation of sensitivity of the CKX radioisotope assay by copper-imidazole complexes (Chatfield and Armstrong 1987), indicates that the tested electron acceptors do not affect the pH optima of CKX. Other data concerning the pH and substrate concentration dependence as well as effects of other electron acceptors on the CKX activity from different plant sources will be presented.

Armstrong D.J.: 1994 – In: Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function (Mok,D.W.S., Mok,M.C., eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 139-154.
Chatfield J.M., Armstrong D.J.: 1987 – Plant Physiol. 84: 726-731.

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

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

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

Motyka V., Vaňková R., Čapková V., Petrášek J., Kamínek M., Schmülling T.: 2003 – Physiol. Plant. 117: 11-21

Supported by grants from Ministry of Education, Youth and Sports CR (LC 06034), Ministry of Agriculture CR (QF4176) and AVOZ50380511.

P Plakátová sdělení

DETEKCE A ANALÝZA KRUHOVÝCH MOLEKUL NUKLEOVÝCH KYSELIN DVOUDIMENZIONÁLNÍ GELOVOU ELEKTROFORÉZOU

Alice Navrátilová, Jiří Macas

Biologické centrum AVČR, Ústav molekulární biologie rostlin, Laboratoř molekulární cytogenetiky,
Branišovská 31, České Budějovice, 37005
E-mail: navratil@umbr.cas.cz

Jednu ze základních metod molekulární biologie představuje 2- dimenzionální (2-D) gelová elektroforéza umožňující separaci a identifikaci různých molekul. Ačkoliv je primárně používána pro analýzu komplexních vzorků proteinů, umožňuje také efektivní dělení nukleových kyselin. Obvykle neutrální-neutrální agarózová gelová elektroforéza zahrnuje separaci nukleových kyselin ve dvou směrech a za různých podmínek. V 1. dimenzi jsou molekuly principiálně separovány podle velikosti, v gelech o nízké koncentraci za nízkého napětí. V druhé dimenzi vzorky migrují ve směru kolmém na původní. Použití gelů o vyšší hustotě (1,5–2 %) a vyššího napětí (4–5 V/cm), navíc za přítomnosti ethidium bromidu v gelu, vede k rozdělení molekul také podle jejich formy. Výsledkem jsou kontinuální oblouky populací molekul stejné formy ale různých velikostí odpovídající superspiralizovaným kruhovým molekulám, relaxovaným kroužkům či lineárním molekulám. Pro ověření příslušnosti konkrétních forem molekul k obloukům a testování rozlišovací schopnosti elektroforézy jsou vzorky před separací enzymaticky ošetřeny (např. mung bean nukleázou) či obohaceny o markery se známou formou a velikostí, včetně relaxovaných kroužků o velikosti pod 2 kB. V kombinaci s následnou hybridizací umožňuje 2-D elektroforéza vysoce specifickou a citlivou identifikaci různých forem nukleových kyselin odpovídajících konkrétním sekvencím.

Mezi nové aplikace 2-D elektroforézy patří detekce a analýza extrachromozomálních kruhových molekul, vyskytujících se v genomech živočichů a vyšších rostlin. Primárně byla zo optimalizovaná pro studium těchto forem u člověka, *Drosophila* a *Xenopus*. Umožnila např. studium jejich sekvenčního složení, regulace jejich vzniku a detekci replikačních intermediatů. V naší laboratoři byla 2-D elektroforéza adaptována pro studium kruhových molekul satelitní DNA u vybraných druhů rostlin.

Podporováno grantem GAČR 204/06/P360.

P Plakátová sdělení

PROLIN – DŮLEŽITÁ SOUČÁST OBRANNÝCH MECHANISMŮ PŘI ODEZVĚ NA ABIOTICKÝ STRES

MARIE NOVÁKOVÁ^{1,2}, JOZEF GUBIŠ³, RADOMÍRA VAŇKOVÁ¹

¹Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, Česká republika

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

³Slovenské centrum polnohospodářského výzkumu-Výzkumný ústav rostlinné výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovensko

Jedním z hlavních faktorů limitujících růst, vývoj a produktivitu rostlin je nízký vodní potenciál způsobený nedostatkem vody v půdě. Rostliny proto vyvinuly řadu mechanismů, s jejichž pomocí se snaží působení sucha eliminovat. Vodní deficit může být částečně kompenzován jak prostřednictvím snížení ztrát vody (uzavření průduchů), tak zvýšením jejího příjmu (zvětšení a prodloužení kořenového systému). Kromě toho rostliny dokáží minimalizovat ztráty vody z buněk zvýšením svého osmotického potenciálu pomocí akumulace osmoprotektivních látek (např. prolinu). Prolin působí během stresu jako ochranný faktor pro mnoho cytosolických enzymů a buněčných organel. Umožňuje rostlině zajistit některých fysiologických procesů (např. fotosyntézy, udržení vodivosti průduchů aj.) za stresových podmínek. Navíc může prolin v rostlinných buňkách fungovat také jako zdroj dusíku pro syntézu jiných organických molekul, zejména při zotavování rostlin po ukončení stresu. Z těchto důvodů je prolin velmi důležitou látkou účastnící se fysiologické odpovědi rostlin na abiotický stres.

Ke stanovení prolinu lze využít spektrofotometrického měření barevného komplexu, který prolin tvoří s ninhydrinem (za nízkého pH), a to díky skutečnosti, že se jeho absorpcní maximum (A_{520}) výrazně liší od maxima komplexů ostatních aminokyselin s ninhydrinem (největší interference, která je v případě glutaminu, nepřesahuje 1,5 %). Není tedy nutné používat analyzátor aminokyselin, který je v případě ostatních aminokyselin nezbytný. Po extrakci vzorků 3% kyselinou salicylovou a následným povařením s ninhydrinem lze stanovit koncentraci prolinu přímo ve vodné fázi.

Z řady studií je zřejmé, že množství prolinu se v rostlině během stresu mnohonásobně zvyšuje. Dále bylo zjištěno, že transgenní rostliny se zvýšenou tvorbou prolinu se vyrovňávají se suchem daleko lépe než rostliny, u nichž byla jeho tvorba naopak potlačena. V naší práci jsme studiovali vliv zvýšené hladiny prolinu (over-exprese pyrrolidine-5-karboxylát synthetase-klíčový enzym v syntéze prolinu) na odezvu rostlin tabáku vůči dvěma abiotickým stresům (sucho, zvýšená teplota) a jejich kombinaci. Z našich výsledků je patrné, že transgenní rostliny *M51-1* mají i za normálních podmínek výrazně vyšší hladinu prolinu než kontrolní rostliny (WT). Po aplikaci stresu dochází u transgenů k dalšímu rapidnímu zvýšení obsahu prolinu, zejména v listech. V kořenech jsou hladiny prolinu obecně mnohem nižší. Kombinace zvýšené teploty a sucha vede k ještě vyšší produkci prolinu (až 20-ti násobný nárůst oproti nestresovaným rostlinám). Po opětovném zalití hladina prolinu klesá, nejrychleji v horních (nejmladších) listech.

Prolin se tedy zdá být spolehlivým a citlivým markerem intenzity stresu, a to jak v případě sucha, tak v kombinaci sucha s vyšší teplotou.

Literatura

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39, 205-207.

Poděkování

Při realizaci této práce bylo využito finanční podpory GA ČR grant č. 206/06/1306 a MP SR grant č. 2003 SP 27/028 OD 01/028 OD 01/

P Plakátová sdělení

FLOWERING TIME GENE/S ON CHROMOSOME 3B OF WHEAT (*T. AESTIVUM* L.)

K. PÁNKOVÁ¹, Z. MILEC¹, I. T. PRÁŠIL¹, P. PRÁŠILOVÁ¹, JAMES SIMMONDS², MICHELLE LEVERINGTON-WAITE², LESLEY FISH², JOHN W. SNAPE²

¹RESEARCH INSTITUTE OF CROP PRODUCTION, DRNOVSKÁ 507, PRAGUE 6, CZ-161 06, CZECH REPUBLIC

²JOHN INNES CENTRE, NORWICH RESEARCH PARK, COLNEY, NORWICH NR4 7UH, UK

The presence of a flowering time gene(s) on chromosome 3B was indicated by the earlier flowering of wheat plants with substitutions of chromosome 3B of the wheat alternative variety Česká Přesívka (CP3B) into the background of a spring variety Zlatka. The effect of a possible eps gene was also revealed in other substitution lines: Jara (CP3B), Sandra (CP3B), Kosutka (CP3B), Zdar (CP3B) and Vala (CP3B). To describe the phenotype more precisely, substitution lines and their parental varieties were grown under different photoperiod and vernalization regimes. Vernalization influenced the time to heading and lowered the differences in heading, which, though, remained significant under long days in the winter wheat materials.

The shoot apical development of wheat plants under short day conditions (10 hours) was delayed by 5–7 days in the substitution line Zlatka (CP3B) compared to the parental variety Zlatka.

To locate the gene(s) for flowering time on the CP 3B chromosome, a population of recombinant substitution lines (RSLs) was developed from the F₁ hybrid between Sandra (CP 3B) and Sandra.

These lines were grown in a growth room experiment at the John Innes Centre, UK, where four replicate plants of each line were grown under conditions of 20 °C with 12 hr day lengths. Flowering times were measured on each plant as the time (in days from sowing) of the first spike on each plant to emerge. A genetic map was developed using publicly available SSR markers and compared to the consensus map of wheat on GrainGenes. The results of a preliminary QTL analysis using the current genetic map and the mean flowering time values for the RSLs using 'QTL Café' indicate two possible QTL for flowering time, one distal on the short arm of 3B between the markers gwm389 and gwm493, and one near the centromere between gwm285, and barc164.

Acknowledgements

The work was supported by the grant no.521/05/0257 of the Grant Agency of the Czech Republic and by the research plan MZe ČR 0002700602.

P Plakátová sdělení

DETEKCE ANCESTRÁLNÍCH TELOMEROVÝCH PROTEINŮ U *CESTRUM PARQUI* (SOLANACEAE)

VRATISLAV PEŠKA¹, EVA SÝKOROVÁ^{1,2} A JIŘÍ FAJKUS^{1,2}

¹ Laboratoř MKD, Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, CZ-612 65 Brno

² Oddělení FGP, Ústav exp. biologie, PřF MU, Kamenice 5, CZ-625 00 Brno

E-mail: vpeska@sci.muni.cz, tel: 728 747 095

Konce eukaryotických chromozomů (telomery) jsou u rostlin tvořeny zpravidla minisatelitní repetitivní sekvencí (TTTAGGG)n a asociovanými proteiny. Telomerové repeticce DNA jsou po neúplné replikaci konců chromozomů dosyntetizovány enzymovým komplexem telomerázy na principu reverzní transkripce. Mutace v genech kódujících proteinovou nebo RNA složku telomerázy mohou mít za následek změnu syntetizované sekvence nebo úplnou ztrátu aktivity telomerázy. K takové události zřejmě došlo uvnitř čeledi Solanaceae. Zatímco modelové rostliny této čeledi (např. tabák, rajče, brambor) mají telomery tvořené typickými rostlinnými (TTTAGGG) repeticemi, u rostlin příbuzných rodů *Cestrum*, *Vestia* a *Sessea* došlo ke ztrátě těchto telomerů. Přitom zřejmě nedošlo pouze k bodové změně telomerové sekvence syntetizované telomerázou [např. na sekvenci lidského typu (TTAGGG)n], ale k celkové ztrátě aktivity telomerázy (1, 2).

Vzhledem k tomu, že funkce telomer značně závisí na specifických interakcích telomerových proteinů s telomerovou DNA, zabýváme se otázkou, jak se ztrátě typických telomerových sekvencí přizpůsobila proteinová složka telomer.

Pomocí retardáční analýzy (EMSA – *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) a následné SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) retardovaných frakcí byly v jaderných extraktech *Cestrum parqui* detekovány proteiny, které jsou schopné specifické interakce s oligonukleotidovými sondami o sekvenci telomerových repetic. Hexamery rostlinné nebo lidské telomerické repetitivní jednotky byly použity jednak jako jednořetězcové sondy pro G- a C-bohaté vlákno, jednak jako dvouřetězcové sondy. Výsledky u druhu *Cestrum parqui* byly porovnávány s výsledky paralelních kontrolních experimentů prováděných s extraktem jaderných proteinů *Nicotina sylvestris*. V případě interakce s G-bohatým telomerickým řetězcem byly u obou druhů nalezeny proteiny o velikosti přibližně 20 a 40 kDa, které specificky vážou rostlinnou i lidskou sondu. Z těchto výsledků vyplývá, že i přes evoluční ztrátu typických telomerů u *Cestrum parqui* v jeho proteomu stále existují proteiny, které si udržely schopnost vázat rostlinnou i obdobnou lidskou telomerickou sekvenci. Zatímco v případě *N. sylvestris* detekované proteiny patrně regulují přístup telomerázy k jejímu substrátu - jednovláknovému přesahu G-bohatého vlákna telomerové DNA (3), jejich role v *C. parqui* je po ztrátě ancestrálního typu telomerů zatím nejasná.

Literatura

1. Sykorova, E., Lim, K. Y., Chase, M. W., Knapp, S., Leitch, I. J., Leitch, A. R., Fajkus, J. (2003) *Plant J* **34**, 283-91.
2. Sykorova, E., Lim, K. Y., Fajkus, J., Leitch, A. R. (2003) *Chromosoma* **112**, 164-72.
3. Fulnečková, J., Fajkus, J. (2000) *FEBS Lett* **467**, 305-10.

Tento výzkum byl podporován projekty GAČR (521/05/0055, 204/04/P105), GA AVČR (IAA600040505) a MŠMT (LC06004). Institucionální podpora: MSM0021622415, AVOZ50040507.

P Plakátová sdělení

YEAST TWO-HYBRID SYSTEMS FOR STUDY OF PROTEIN INTERACTIONS IN VIVO

HELENA PLCHOVÁ, NOEMI ČEROVSKÁ

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

Key words: yeast two-hybrid system, plant, protein interactions, potato mop-top virus

Introduction

Protein interactions are fundamental to all biological processes. The function of not yet characterized proteins and the genes that encode them is often possible to infer from identification of proteins with which they interact. Moreover, by already known proteins it is possible to elucidate more deeply in which processes and pathways they may play a role.

The yeast two-hybrid system is a method allowing analyses of protein interactions *in vivo* and is known already for 17 years (Fields and Song, 1989). Since its introduction, a lot of variations have been developed to overcome the limitations of the original yeast two-hybrid system and to extend its use. The first report using this method for study of interactions of plant proteins appeared in 1995 (Zhou et al., 1995). Over time the system has been used extensively in plant research to study protein interactions involved in different biological processes. From our experience with yeast two-hybrid system in previous investigations (Hartung et al., 2000) we would like to establish this method in our lab and will focus our study on elucidation of the role of potato mop-top virus (PMTV) proteins in infection process.

Principle of the method

The classical yeast two-hybrid system and some of its modifications are based on the finding that many eukaryotic transcription factors have functionally and physically separable DNA-binding (BD) and transcription activation domain (AD). If the domains are separated, they do not interact and do not activate responsive genes. Physically interacting test proteins fused to each separate domain bring BD and AD together and activate the transcription (Figure 1).

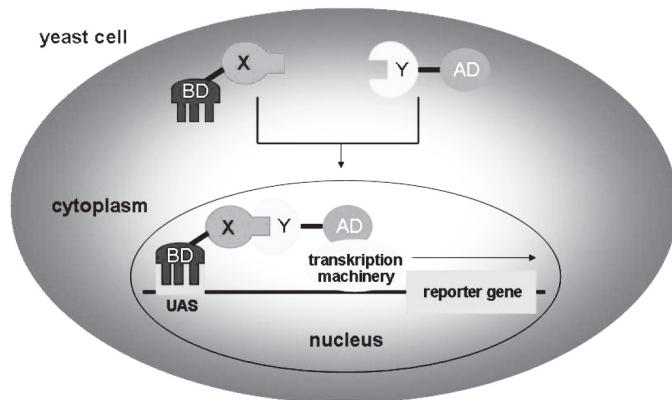


Figure 1.
The principle of yeast two-hybrid system. Protein X fused to DNA-binding domain (BD) interacts with protein Y fused to transcription activation domain (AD), BD and AD are brought together and the transcription of reporter gene is so activated. BD binds to upstream activation sequences (UAS) in the promoter of reporter gene.

The two-hybrid systems

The most commonly used systems are the GAL4 system (Fields and Song, 1989) and the LexA system (Gyuris et al., 1993). The GAL4 system relies on BD and AD of yeast GAL4 protein, the LexA system uses the bacterial repressor protein LexA and *E. coli* B42 activation domain. Other systems based on transcriptional readout are Dual-bait system (uses two sets of reporter genes bound to different BDs; Serebriiskii et al., 1999), Three protein system (for analysis of protein complexes, Zhang and Lautar; 1996) and Reverse two-hybrid system (utilizes the expression of reporter genes that are toxic to yeast cell; Vidal et al., 1996). All these systems above need the test proteins localized in the nucleus. There are also other systems, where the test proteins interact in the cytoplasm, such as hSos/Ras recruitment system (Aronheim et al., 1997) and Split-ubiquitin system (Johnsson and Varshavsky, 1994). The last system has been modified for the study of membrane proteins interactions. The transcription

P Plakátová sdělení

factor A-LexA-VP16 was here used as a reporter protein (Stagljar et al., 1998). The yeast two-hybrid system has also been adapted to detect protein interactions with other molecules. The yeast One-hybrid system detects interaction between protein and DNA (Wang and Reed, 1993), the protein-RNA interaction can be determined by RNA three-hybrid system (SenGupta et al., 1996) and to find the small molecule-protein interaction the Small ligand-dependent system can be used (Brent and Finley, 1997).

Material and chemicals

Grow'n'Glow: The GFP Two-Hybrid System Kit (MoBiTec), usual laboratory equipment for molecular biology, laminar flow box, toothpicks.

Method

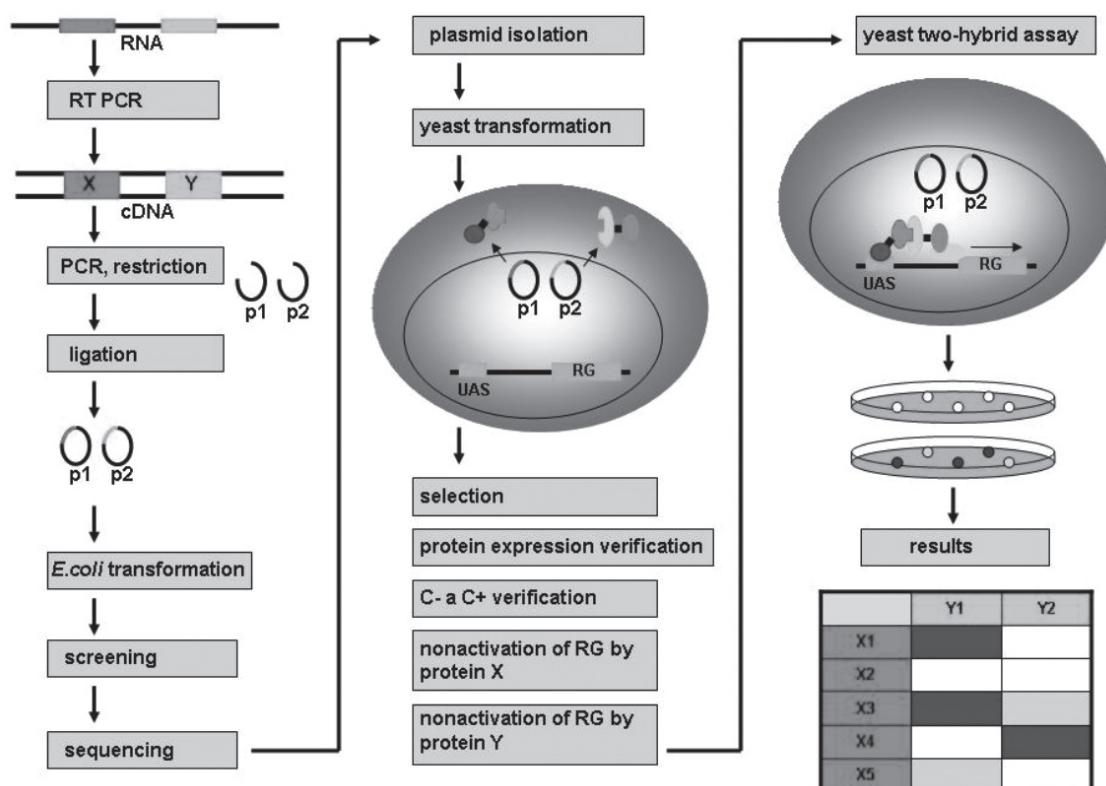
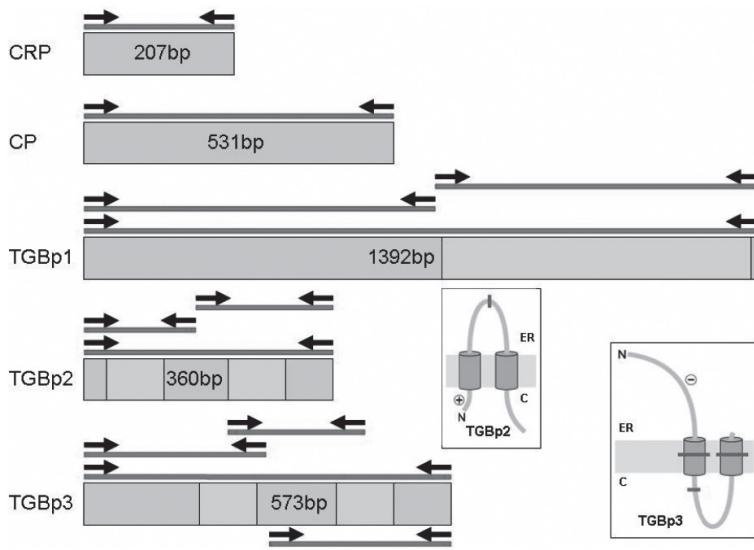


Figure 2. The flow diagram describes a typical yeast two-hybrid screen for interaction of known proteins (X and Y). RG – reporter gene; p1, p2 – plasmid 1and 2; C-, C+ - negative and positive control.

The flow diagram of work procedure is shown in Figure 2. The RT-PCR was performed converting the RNA2 and RNA3 of potato mop-top virus into cDNA. Primers to the whole open reading frames (ORFs), but also to their parts were designed (Figure 3) to investigate not only the interaction between TGB proteins, CRP and CP but also to determine in detail the participation of different membrane and nonmembrane domains of TGB proteins in infection process. The resulted PCR products will be cloned into the appropriate vectors from Grow'n'Glow: The GFP Two-Hybrid System Kit (LexA system) and the clones will be transformed into *E. coli*. After the screening and sequence verification, the huge amounts of DNA clones will be isolated and yeast transformation will be performed. Obtained single and double transformants will be tested for protein expression. Single transformants will be checked, if they do not activate transcription of reporter genes (LEU2 and GFP gene). Positive and negative controls will be included. If the tested proteins alone do not activate the transcription of RGs, the yeast two-hybrid assay will be done (testing of double transformants). Obtained results will be evaluated by comparison with C+ and C- and checked by switching of cloning vectors and by another independent method (co-immunoprecipitation, pull-down assays, affinity chromatography, far-Western blot, protein array chips or surface plasmon resonance).

P Plakátová sdělení

**Figure 3.**

Primer design for 5 ORFs of potato mop-top virus (PMTV) encoded by RNA2 (CP-coat protein) and RNA3 (CRP-cysteine rich protein, TGBp1,2,3-triple gene block proteins). TGBp1 is a helicase (helicase motifs are shown in grey). On the right site of the figure are shown two membrane proteins (ER-endoplasmatic reticulum, C-cytoplasm), 2 grey boxes indicate the membrane domains, the blue lines indicate different parts of tested proteins.

Requirements and comparison with other methods

The method is rather expensive, but more sensitive than usual *in vitro* techniques and relatively not time consuming. The yeast two-hybrid system allows also mapping of motifs or residues required for protein interactions.

Disadvantages

In common, the true interactions must be confirmed with an alternative method, because false positives may arise. Some proteins don't enter the nucleus because of strongly hydrophobic domains or signals for localisation to other cell compartment. In this case the truncation of such proteins may help to overcome this problem. Another proteins may be not properly expressed or are toxic to the cell. The solution can be the use of inducible promoters or maintainance of protein expression on low level (modified promoters or low copy plasmids).

Tips and tricks

To avoid false positives, it is very important to perform appropriate controls and tests before starting the interaction experiment.

Concluding remarks

This method allows us to study viral protein-protein interactions. In the future we would like to broaden our investigation to protein interactions virus-host plant and virus and its vector *Spongopora subterranea*.

Acknowledgments

This research is supported by Grant No. 522/04/1329 of the Grant Agency of Czech Republic and by Grant M106030 of Ministry of Education.

Literature

- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., and Karin, M. 1997. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. Mol. Cell Biol. 17: 3094-3102.
- Brent, R. and Finley R.L. 1997. Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. Annu. Rev. Genet. 31: 663-704.
- Fields, S. and Song, O.K. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340: 245-246.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertov, H. and Brent, R. 1993. Cdk1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. Cell 75: 791-803.
- Hartung, F., Plchova, H. and Puchta, H. 2000. Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. 28: 4275-4282.
- Johnsson, N. and Varshavsky A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interaction in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10340-10344.
- SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. and Wickens, M. 1996. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8496-8501.

P Plakátová sdělení

- Serebriiskii, I., Khazak, V. and Gomelis E.A. 1999. A two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions. *J. Biol. Chem.* 274: 17080-17087.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. and Te Hessen, S. 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5187-5192.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. and Boeke, J. D. 1996. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10315-10320.
- Wang, M.M. and Reed, R.R. 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* 364: 121-126.
- Zhang, J. and Lautar, S. 1996. A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal. Biochem.* 242: 68-72.
- Zhou, J., Loh, Y.T., Bressan, R. A. and Martin, G.B. 1995. The tomato gene Pt1 encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83: 925-935.

Further reading:

Grow'n'Glow: The GFP Two-Hybrid System, Handbook 2004, MoBiTec.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ KE ŠLECHTĚNÍ WAXY JEČMENŮ

MILAN POUCH¹, KATEŘINA VACULOVÁ¹

¹ Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, ČR
E-mail: pouch@vukrom.cz, tel. +420 573 317 113

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) je po pšenici druhou nejrozšířenější obilninou v České republice. Využívá se ve sladovnictví, ke krmným účelům, avšak v lidské výživě je neprávem opomíjen. Cílem šlechtitelů je získání odrůd ječmene s dobrými výnosovými parametry a pozměněným látkovým složením zrna, které produkují zdraví prospěšné látky, jsou snáze stravitelné a mají tedy šanci dostat se do popředí zájmu zpracovatelů a následně i konzumentů. Tyto předpoklady splňují tzv. „waxy“ ječmeny s nízkým nebo nulovým obsahem amylózy v endospermu zrna. Běžný poměr amylózy a amylopektinu ve škrobových zrnech endospermu obilnin je 23:77 %. Metodami klasického šlechtění byly získány odrůdy a kultivary ječmene se sníženým obsahem amylózy (2–10%) a chemickou mutagenezí byli indukováni i mutantní s nulovým obsahem amylózy, u kterých je škrob tvořen pouze amylopektinem. Waxy ječmeny jsou lépe technologicky zpracovatelné při výrobě potravin, pozitivním znakem je často vysoký obsah β-glukanů. Klinickými studiemi bylo prokázáno, že rozpustná vláknina je důležitou součástí potravy snižující riziko vzniku civilizačních chorob.

Waxy lokus ječmene je lokalizován na chromozómu 7HS a kóduje enzym GBSSI, jenž řídí syntézu amylózy. Sekvence waxy lokusu je k dispozici v genových databázích (X07931). Materiály waxy charakteru je možné od běžných odrůd odlišit metodami molekulární biologie. Před několika lety byl zjištěn inzerčně-deleční polymorfismus v 5' leader sekvenci waxy lokusu a byly také navrženy PCR primery ohraničující tuto sekvenci. Mezi zdroje ječmene můžeme detektovat tři různé alely waxy lokusu: Waxy (PCR produkt 800 bp) a novel Waxy (1000 bp) se vyskytují u ječmenů se standardním složením škrobu, alela waxy (600 bp) charakterizuje ječmeny s nízkým obsahem amylózy. Podchycení waxy ječmenů s nulovým obsahem amylózy je složitější, protože změny DNA ve waxy lokusu jsou například na úrovni bodových mutací.

V naší práci jsme využili tři odrůdy waxy charakteru s nízkým obsahem amylózy pocházející ze Severní Ameriky: CDC Candle, HB803 a Merlin. Hybridní materiály byly připraveny křížením waxy ječmenů s odrůdou Nordus a šlechtitelskou linií No94609D7. Potomstva ze štěpících F2 a F3 generací, která měla vhodné hospodářské charakteristiky, byla selektována prostřednictvím molekulárních markerů (Marker Assisted Selection). Rostlinné vzorky byly rozdraceny v homogenizátoru Qiagen-Mixer Mill MM 300 umožňujícím simultánní zpracování několika desítek vzorků. K rychlé izolaci DNA byl použit DNeasy plant mini kit od firmy Qiagen. Inzerčně-deleční polymorfismus ve waxy lokusu byl zjištován pomocí kodominantního intragenového markeru (primery p-197 a p+606). Podmínky PCR a složení reakční směsi byly testovány a optimalizovány. Rozdíly v délce PCR produktů (200 bp) umožňují separaci na agarózovém gelu (barvení ethidium bromidem, vizualizace na UV transiluminátoru). U vybraných materiálů pěstovaných ve výnosových zkouškách byl stanoven obsah β-glukanů a poměr amylózy a amylopektinu (v obou případech byly použity kity od firmy Megazyme).

Souhrn dosažených výsledků:

- 1) Metody molekulární biologie (MAS) implementované do šlechtitelských postupů usnadnily a finančně i časově racionalizovaly selekci hybridního potomstva ve filiálních generacích.
- 2) Byly vyšlechtěny linie waxy ječmenů s nízkým obsahem amylózy ve škrobových zrnech, vyšším obsahem β-glukanů, které jsou přípůsobené podmínek výroby a hospodářských parametrů v porovnání s původními waxy donory.
- 3) Nové linie waxy ječmenů vykazovaly štěpení hospodářských znaků nezávislé na složení škrobu.

Použitá literatura

- Domon E., Fujita M., Ishikawa N.: 2002 – Theor. Appl. Genet. 104: 132-138
 Patron N. J., Smith A. M., Fahy B. F., Hylton C. M., Naldrett M. J., Rossnagel B. G., Denyer K.: 2002 – Plant Physiology 130: 190-198
 Poláková K., Vaculová K., Kučera L.: 2004 – 9th Barley Genet. Symp., Brno. CD-ROM, 566-573
 Rohde W., Becker D., Salamini F.: 1988 – Nucleic Acids Res. 16: 7185-7186
 Washington J. and Box A. J.: 2005 – 12th Australian Barley Techn. Symp., paper presentation, 6 p.

Práce na tomto projektu byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT - MSM2532885901.

RENATURATION OF TELOMERE-BINDING PROTEINS FRACTIONATED BY SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

GABRIELA ROTKOVÁ

Institute of Biophysics ASCR, Laboratory of DNA Molecular Complexes, Královopolská 135, CZ-612 65 Brno
E-mail: rotkova@ibp.cz, tel.: 541 517 199

Abstract

A simple method for identification and characterization of telomere-binding proteins is described in this article. After Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), proteins are eluted, renatured and used for retardation analysis with labelled oligonucleotide of telomeric sequence. A large phylogenetic group of plants in the order of Asparagales lacks *A. thaliana*-like telomeres and we focus on studying telomere-binding proteins in nuclear extracts of two plants from this group. We show here that this method is efficient to recover sequence-specific DNA-binding abilities of putative telomere-binding proteins.

Introduction

Telomeres are the physical ends of eukaryotic chromosomes. These nucleoprotein complexes protect chromosomes from degradation and end-to-end fusion and are essential in solving end replication problem. Telomere-binding proteins are necessary building blocks of telomere structure. These proteins participate in localization of chromosomes in cell nucleus and they are also involved in regulation of telomere length as well as in protective function of telomeres. Telomeric DNA is characterized by tandem repeats with small differences across phylogenetic spectrum. In most studied plants $(TTAGGG)_n$ repeats were found, but there are some exceptions. One of these exceptions is the order of Asparagales. Sýkorová et al. (2003) found that in several families of this order, the "typical" (*A. thaliana*-like) telomeres have been partially or fully replaced by alternative telomere sequences. Consistently with this change, our previous results have shown changes in telomeric chromatin structure of these plants (Rotková et al., 2004). The present method of rapid renaturation of DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis can further elucidate changes, which have happened at the proteomic level to cope with the telomere DNA sequence change.

Method

Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is the efficient method for separation of proteins according to their size. DNA-binding abilities of proteins fractionated by this simple method can be found by elution of these proteins from polyacrylamide slices followed by retardation analysis (Fulnečková 2000).

Previously a procedure has been published (Hager and Burges 1980), in which proteins are eluted by elution buffer (0.1% SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, and 0.15 or 0.20 M NaCl) from the SDS-PAGE gel, precipitated with acetone to remove SDS, then denatured with 6 M guanidium hydrochloride (Gd-HCl) and renatured by the removal (diluting) of Gd-HCl with dilution buffer (0.05 M Tris HCl, pH 7.9, 20% glycerol, 0.1 mg/ml BSA, 0.15 M NaCl, 1 mM DTT and 0.1 mM EDTA). This denaturation/renaturation method usually results in low recoveries of active DNA-binding proteins, and becomes unpractical if large number of gel slices have to be handled.

But there is a simpler method, described by Ossipow et al. (1993), which is based on the observation, that mild non-ionic detergents, such as Triton X-100, remove SDS form protein-SDS complexes and sequester it into micelles, that don't interfere with DNA binding. This method is not time-consuming and makes it possible to analyse DNA-binding abilities of SDS-PAGE-fractionated proteins. It can also reveal if proteins bind their target sequences as monomers, homo-multimers or hetero-multimers. Here we show that the method is applicable for a more convenient analysis of plant telomere-binding proteins.

Chemicals and instrumentation

Chemicals – SDS, acrylamide, bisacrylamide, TEMED, ammoniumpersulphate, marker protein ladder, Tris-HCl, glycine, Hepes, EDTA, NaCl, Triton X-100, BSA, DTT, PMSF, glycerol, bromophenol blue.

Instrumentation – equipment for polyacrylamide gel electrophoresis, thermoregulator or thermocycler, microfuge.

P Plakátová sdělení

Technique

Nuclear proteins were extracted from plant tissue as described Espinas and Carballo (1993) and protein concentration was determined according to Bradford (1976). Nuclear protein extracts (30 µg of total protein) are heated for 10 min at 37 °C in SDS-PAGE loading buffer (2× conc.: 0,125 mM Tris-Cl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glycerol, 0,02% bromophenol blue, 0,2 M DTT) and then separated in 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, bands of fractionated proteins are cut out. Gel pieces are homogenized in 3 volumes of elution-renaturation buffer (20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mg/ml BSA, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF) and incubated at 37 °C for 3 to 4 hours. The polyacrylamide gel residues are centrifuged in a microfuge for 10 min. Supernatants can be used directly in further analyses, e.g. in retardation assay.

Results (retardation analysis with renatured proteins)

The first step is SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 1) and renaturation of fractionated proteins. Products of this separation are proteins eluted in elution-renaturation buffer, which can be used in further downstream reactions. In this particular case, renatured proteins were used in retardation analysis. Since it was expected that the surveyed plants possess both plant and human type of telomeres, two types of probes (HutlG – 5'-[TTAGGG]₆-3' and PtTelG -[TTAGGG]₆-3') were used. It was found that telomere-binding abilities were recovered for proteins, which were supposed as telomere-binding ones according to previous experiments. As shown in Fig. 2, when fractionated and subsequently renatured proteins from *Muscari armeniacum* plants (Asparagales) were used, retardation analysis revealed binding activity in 15, 25 and 40 kDa proteins with plant telomere probe. When the same analysis was applied to *Scilla peruviana* (Asparagales) nuclear extract, similar results were obtained with one exception: retarded band was formed between Hutl probe and a protein of 15 kDa. It can also be seen that there are proteins in nuclear protein extract, which lack telomere-binding abilities.

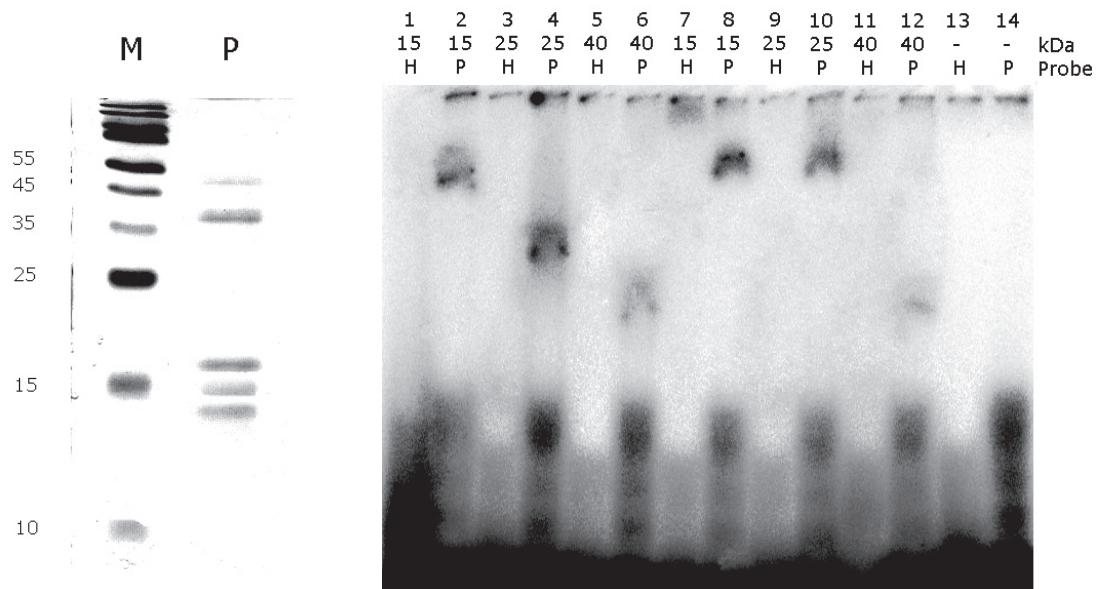


Figure 1.
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
M – prestained protein ladder,
P – protein nuclear extract.

Figure 2.
Gel retardation assays with SDS-polyacrylamide gel-fractionated proteins.
Lanes 1–6 show interactions between *Muscari* proteins and HutlG (H) or PtTelG (P). Lanes 7–12 show interactions between *Scilla* proteins and HutlG (H) or PtTelG (P). Lanes 13 and 14 contain free probe.

P Plakátová sdělení

Classification of the method

This method is timesaving, requires only basic equipment which is available in most molecular biology or biochemical laboratories.

The only difficulty that should be mentioned is that using of 3 volumes of elution-renaturation buffer can result in diluting of renatured proteins to unsuitably low concentrations without subsequent concentration step.

The essential advantage of the method is obtaining of a “purified” protein, which makes subsequent analyses easier and more informative than analyses with whole protein extracts, which contain complex mixtures of proteins, sugars and other products of cell metabolism.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (521/05/0055), Grant Agency of the Academy of Sciences (IAA600040505) and the Ministry of Education (LC06004)

Literature

- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Espinás M.L., Carballo M., 1993. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of higher-order chromatin structures of Zea mays. Highly methylated DNA in the 50 kb chromatin structure. *Plant Mol Biol* 21: 847-57
- Fulnečková J., 2000. Retardační analýza. *Biologické listy* 65: 168-72
- Hager D.A., Burgess R.R., 1980. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulphate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal Biochem* 109: 76-86
- Ossipow V., Laemmli U.K., Schibler U., 1993. A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res* 21: 6040-41
- Rotková G., Skleničková M., Dvořáčková M., Sýkorová E., Leitch A. R., Fajkus J., 2004. An evolutionary change in telomere sequence motif within the plant section Asparagales had significance for telomere nucleoprotein complexes. *Cytogenetic and Genome Research* 107: 132-138.
- Sýkorová E., Lim K.Y., Kunická Z., Chase M. W., Bennett M.D., Fajkus J., Leitch A.R., 2003. Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 1893-904

ACCUMULATION ASSAY: A POTENT TECHNIQUE FOR ASSESSING AUXIN EFFLUX CARRIER SPECIFICITY AND AFFINITY

SIBU SIMON^{1,2}, JAN PETRÁŠEK^{1,3}, MARTINA LAŇKOVÁ^{1,2}, PETR SKŮPA^{1,3}, MARTIN KUBEŠ^{1,3} AND EVA ZAŽÍMALOVÁ¹

¹ Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic;

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 128 40, Prague 2, Czech Republic

³ Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

E-mail: zazimalova@ueb.cas.cz

Polar auxin transport is crucial for plant growth and development. It is driven mainly by polar efflux of auxin molecules from cells, which is controlled by different auxin efflux carriers. Our aim is to characterize different auxin efflux carriers by determining their affinity and specificity towards different auxins and auxin-related compounds by using the assay based on accumulation of radio-labeled auxins.

Accumulation of radio-labeled auxins can be measured in suspension-cultured tobacco (BY-2) cell lines – either wild type or transformed with different genes coding for auxin efflux carriers (Petrášek et al. 2006). This method allows monitoring of different auxin efflux carriers *in vivo* by measuring the accumulation in cells of such radio-labeled auxin, which is taken up into cells passively but it is a good substrate for efflux carriers. Since the data fit to classical Michaelis-Menten equation (Delbarre et al. 1996; Imhoff et al. 2000) the kinetic parameters of carriers can be evaluated either directly or using a simple displacement by non-labeled analogs. Information about the level of inhibition of each efflux carrier by different auxin transport inhibitors also can be produced. Advantages and limits of this method are discussed.

References

- Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J. (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198:532-541
- Imhoff V., Muller P., Guern J., Delbarre A. (2000) Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 210: 580-588
- Petrasek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee JJ., Abas M., Seifertova D., Wiśniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanova M., Dhonukshe P., Skupa P., Benkova E., Perry L., Krecek P., Lee OR., Fink GR., Geisler M., Murphy AS., Luschnig C., Zazimalova E., Friml J. (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312: 914-918

Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project LC06034. The authors thank to Markéta Pařezová for her excellent technical assistance.

ACCUMULATION OF RADIOACTIVELY LABELED COMPOUNDS AS A TOOL FOR STUDY OF AUXIN EFFLUX

PETR SKÚPA^{1,2}, MARTIN KUBEŠ^{1,2}, DANIELA SEIFERTOVÁ^{1,2}, SIBU SIMON^{1,3}, JAN PETRÁŠEK^{1,2}, EVA ZAŽÍMALOVÁ^{1,2}

¹ Institute of Experimental Botany, the Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic

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

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 128 44 Prague 2, Czech Republic

E-mail: skupa@ueb.cas.cz, tel.: 225 106 425

Auxins play an important role in the regulation of cell fate destination and plant development. The spatiotemporal regulation of auxin distribution between the neighbouring cells is a crucial coordinative step. Auxin transport on the cellular level is a complex process that runs via both passive diffusion and specific auxin uptake and efflux carriers. Auxins are weak organic acids, so, at conditions of extra-cellular pH (ca. 5.5) auxins are partly protonated (to various extents for various auxins). This protonated (undissociated) molecular form is apolar and thus most auxins can enter cells freely by passive diffusion. However, at conditions of the higher pH inside cells (ca. 7.0), molecules of all auxins dissociate in their anion form and these auxin ions are then trapped in the cell and can leave it only by an active transport. Therefore, specific auxin efflux carriers were postulated by chemiosmotic hypothesis (Rubery and Sheldrake, 1974; Raven, 1975). These auxin efflux carriers are believed to drive polar auxin transport through plant tissues.

Our aim is to characterize the putative auxin efflux facilitators/carriers, the proteins of PIN and PGP type, which are considered to control the flow of auxin from the cell. We measure accumulation of radioactively labeled auxins in cells *in vivo*. It reflects total sum of actions of all auxin influx and efflux processes. By this method the efflux rate can be characterized in the case of constant auxin influx, i.e. if such an auxin is used which enters cells almost entirely by passive diffusion but it is a good substrate for efflux carrier(s). Here we show the methods for detailed comparison and determination of affinity and activity of different auxin efflux facilitators. We are using methods according to Delbarre *et al.* (1996) as modified by Petrášek *et al.* (2002), employing there various inhibitors of components of the polar auxin transport. This approach allows us to describe flow of auxin across plasma membrane. Accumulation of radiolabeled synthetic auxins 1-naphthaleneacetic (1-NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) acids, as well as that of native auxin indole-3-acetic acid (IAA) has been measured in suspension-cultured tobacco (BY-2) and *Arabidopsis* cells, both wild types and transformed with *pin* or *pgp* genes controlled by inducible promoters.

Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J. (1996) – Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532-541

Petrášek J., Elčkner M., Morris D.A., Zažímalová E. (2002) – Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. *Planta* 216: 302-308

Raven J.A., (1975) - Transport of indolacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist* 74: 163-172

Rubery P.H., Sheldrake A.R. (1974) - Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118: 101– 121

This work was supported by the Grant of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project no. LC06034 and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, project no. KJB600380604.

P Plakátová sdělení

CYANOBACTERIAL FERROCHELATASE IS INVOLVED IN REGULATION OF TETRAPYRROLE BIOSYNTHESIS VIA CHLOROPHYLL BINDING TO ITS MEMBRANE DOMAIN

ROMAN SOBOTKA^{1,2}, MONIKA ŽUBEROVÁ³, JOSEF KOMENDA^{1,2}, BERNHARD GRANVOGL⁴, LUTZ EICHACKER⁴, MARTIN TICHÝ^{1,2}

¹Institute of Microbiology, Department of Autotrophic Microorganisms, Trebon, Czech Rep.

²Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Nove Hrady, Czech Rep.

³Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Rep.

⁴Botanical Institute, Ludwig-Maximilian University, Munich, Germany

E-mail: sobotka@alga.cz, tel: 384 722 268

Chlorophyll (Chl) and heme share common biosynthetic pathway branched at the point, where magnesium chelatase and ferrochelatase (FeCH) insert either magnesium for Chl biosynthesis or ferrous iron for heme biosynthesis. Distinctive feature of plant and cyanobacterial FeCHs is their membrane domain with Chl-binding motif (CAB domain). Recently, we have demonstrated that increase in FeCH activity is responsible for decreased steady-state levels of Chl precursors in several *Synechocystis* mutants (Sobotka et al., JBC 280, 31595–31602, 2005).

Our latest research provides evidence that Chl binds to the CAB domain of FeCH and regulates activity of this enzyme. This is based on two different approaches: **a)** we have overexpressed FeCH CAB domain in *Synechocystis* as a His-tagged protein, purified the protein under native conditions and showed that it binds Chl. Moreover, FeCH was co-purified with the CAB domain indicating that FeCH monomers may interact through this domain. **b)** we have replaced putative Chl ligands in the CAB domain by residues that are unlikely to bind Chl. These mutations did not influence FeCH activity in the wild type. However, the CAB domain mutants did not exhibit 4-fold increase in FeCH activity upon deletion of PSII as observed in the wild type. We propose that this different behaviour is caused by inability of the CAB domain mutants to bind Chl.

We are presenting a model suggesting that FeCH activity is activated by Chl binding to its C-terminal CAB domain. When there is an oversupply of Chl, the FeCH Cab domain will be in occupied state and FeCH activity will increase, preventing accumulation of toxic free Chl. Vice versa, in the situation of high demand for Chl the FeCH CAB domain will be in empty state and FeCH activity will decrease, releasing the flux through the Chl pathway.

P Plakátová sdělení

CHROMOSOME-BASED GENOMICS OF BARLEY, RYE AND WHEAT

PAVLA SUCHÁNKOVÁ¹, MARIE KUBALÁKOVÁ¹, JAN ŠAFÁŘ¹, PAVLÍNA KOVÁŘOVÁ¹, JAN BARTOŠ¹, JARMILA ČÍHALÍKOVÁ¹, HANA ŠIMKOVÁ¹, JAROSLAV DOLEŽEL¹

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

E-mail: dolezel@ueb.cas.cz, tel.: 585 205 852

The genomes of barley (~5000 Mb/1C), rye (~8000 Mb/1C), durum wheat (~13,000 Mb/1C) and common wheat (~17,000 Mb/1C) are complex, consisting mainly of various classes of repetitive DNA sequences. In addition, the recent evolution of wheat involved two episodes of polyploidization giving rise to progenitors of allotetraploid durum wheat and allohexaploid bread wheat. These features hamper physical mapping and gene cloning. We have developed a strategy that overcomes these difficulties. Using laser flow cytometry, chromosomes in liquid suspension are classified according to DNA content and particular chromosomes can be sorted at high speed. The use of deletion and alien chromosome addition lines facilitates purification of any chromosome arm of barley, durum wheat and common wheat and each of the seven chromosomes of rye. This advance provides a universal approach for dissecting nuclear genomes to small and defined parts. As the DNA of flow-sorted chromosomes is intact, they are suitable for a range of applications including construction of large-insert subgenomic DNA libraries. Until now, five BAC libraries were created from sorted chromosomes in wheat and rye, and their utility has been demonstrated by a rapid progress in development of a physical contig map of the wheat chromosome 3B by the group of C. Feuillet (INRA, Clermont-Ferrand, France). Currently we are exploring possibilities for the use of flow-sorted chromosomes for high-resolution and high-throughput cytogenetic mapping to aid in assembling physical maps. Other attractive applications of sorted chromosomes include physical mapping using PCR, targeted isolation of molecular markers, isolation of low-copy (genic) sequences from specific genome regions, high-throughput physical mapping of DNA sequences by hybridization to DNA arrays, as well as HAPPY and optical mapping.

This work has been supported by the Czech Science Foundation (grant awards 521/04/0607, 521/05/0257, 521/06/1723, 521/05/P257, 521/06/P412, and 521/05/H013).

P Plakátová sdělení

A NEW BAC RESOURCE FOR TARGETED ANALYSIS OF THE SHORT ARM OF RYE CHROMOSOME 1R (1RS)

H. ŠIMKOVÁ¹, L. ŠAFÁŘ¹, P. SUCHÁNKOVÁ¹, P. KOVÁŘOVÁ¹, J. BARTOŠ¹, J. JANDA¹, R. KOFLER², M. KUBALÁKOVÁ¹, J. ČÍHALÍKOVÁ¹, T. LELLEY², J. DOLEŽEL¹

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

²Institute of Agrobiotechnology, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln, Austria

Many cultivars of common wheat carry the short arm of chromosome 1R of rye (1RS), which replaces the short arm of wheat chromosomes 1B, 1A or 1D. The presence of 1RS in the wheat genome confers resistance against important diseases, such as powdery mildew, leaf rust, stem rust, yellow rust and insects such as green bug and yellow mite. In addition, the 1RS arm improves the adaptation and increases yield in certain genetic backgrounds. However, further improvement of existing wheat cultivars is needed to eliminate potential negative effect of 1RS on bread making quality. This requires a detailed knowledge of the molecular structure of the arm. To facilitate the analysis of gene content and molecular organization of 1RS, we constructed 1RS-specific BAC library. We used wheat-rye telosome addition line to isolate 9.2 million copies of 1RS by sorting using flow cytometry. Chromosomal DNA was partially digested either with *Hind*III or with *Bam*HI and used to construct two arm-specific BAC libraries. The first library (*Hind*III) consists of 66,816 clones with average insert size of 85 kb. Chromosome arm coverage was estimated as 11.2x. The second library (*Bam*HI) comprises 36,864 clones with the average insert size of 80 kb and represents approximately 5.8 equivalents of 1RS. Coverage of chromosome 1RS by these libraries (17x) was determined taking into account 13% contamination by other chromosomes. Probability of identifying a clone corresponding to any sequence on the short arm of chromosome 1R is 99.99%. PCR with primers for 1RS-specific markers on plate pools is being used to verify the library coverage. We expect that the library will be a useful BAC resource for construction of local physical maps and map-based cloning of agronomically important genes. Four plates (1536 BAC clones) of both libraries have already been BAC-end sequenced and the sequencing data are being used to develop 1RS-specific SSR markers.

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant awards 521/04/0607, 521/05/H013, and 521/06/P412) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant award LC06004).

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ ANALÝZY OBRAZU PŘI STUDIU INTERAKCE ROSTLINA – PATOGEN

VLADIMÍR ŠAŠEK, BARBORA KORBELOVÁ, LENKA BURKETOVÁ

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

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

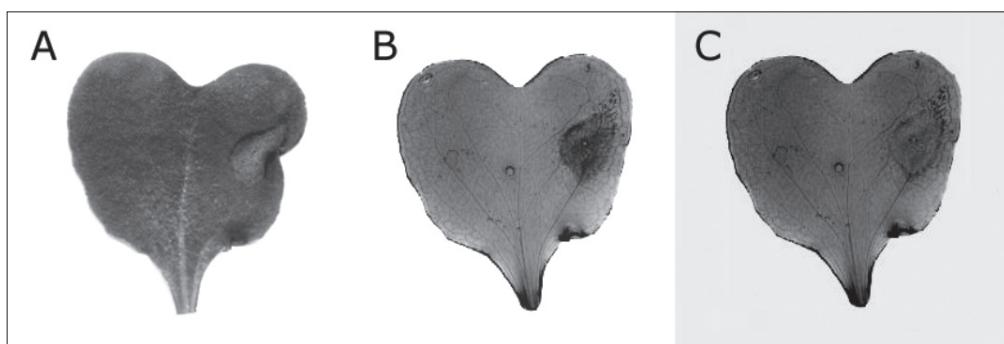
Hodnocení symptomů na rostlině je jednoduchý prostředek k určení rozvoje choroby. Pro svou rychlosť a nepotřebnost jakýchkoli přístrojů se dosud ve velké míře používá vizuální hodnocení, které symptomy choroby boduje podle různých stupnic a klíčů. Tato metoda však kvůli subjektivnímu posuzování často nesplňuje požadavky na přesnost a reprodukovatelnost výsledků. Tyto nedostatky lze zcela nebo částečně odstranit využitím digitální analýzy obrazu.

Analýza obrazu má široké použití při studiu interakce rostlina – patogen, především v kombinaci s různými laboratorními metodami jako je specifické barvení těla patogenu v listech nebo barvení obranných struktur a látek rostliny (kalóza, H_2O_2 , fenolické látky) a jejich kolokalizace s patogenem.

V našem pokusu byl sledován účinek elicitorů z askomycety *Leptosphaeria maculans* na klínovou rostlinu řepky *Brassica napus*. Elicitory byly získány filtrací kultivačního média, ve kterém byl patogen *L. maculans* pěstován po dobu 14 dnů. Nejprve byla sledována závislost retardace růstu děložních listů na stupni ředění filtrátu, kterým byly mladé rostliny ošetřeny. Po 14 dnech od ošetření byly děložní listy skenovány a z pořízených snímků byla změřena listová plocha. Roztoky se stupněm ředění, který neovlivňoval růst děložních listů, byly použity k ošetření rostlin, jež byly následně inkulovány konidiemi virulentního a avirulentního izolátu *L. maculans*. Po 14 dnech od ošetření byly děložní listy skenovány a z pořízených snímků byla pomocí programu DPlan4LAB změřena listová plocha a plocha lézí utvorených po inkulaci. Tytéž listy bylyobarveny trypanovou modří v roztoce laktofenolu (Melton et al., 1998), znova skenovány a analyzovány.

Listy rostlin ošetřených neředěnými filtráty mely až o 60% menší plochu v porovnání s rostlinami ošetřenými kultivačním médiem, ve kterém nebyl patogen pěstován. Ošetření filtráty kultivačních médií obou izolátů *L. maculans* ani ošetření médiem vlastním nepůsobilo na velikost utvářejících se lézí. Výsledky získané ze snímků zelených listů a listů obarvených trypanovou modří se relativně nelišily, a proto lze barvení pro účely pouhého měření plochy lézí považovat za zbytečné.

Pro potřeby této práce byla vytvořena aplikace pro analýzu obrazu DPlan4LAB (<http://4lab.smyslivota.cz>). Její princip spočívá v označení libovolné oblasti uvnitř léze uživatelem, kdy aplikace vyhodnotí rozptyl barev uvnitř vybraného bodu a označí veškerou plochu s intenzitou barvy, která spadá do spočteného rozptylu, jenž může být uživatelem i pozmenován. Následně může být tento krok dle nastavení vícekrát opakován. Dochází tak k efektu, kdy se z vybraného bodu rozšíří kontrastní plocha představující poškození na oblast celé léze. Nastavení uživatele se automaticky ukládá a při práci se sérií podobných listů pak již stačí pouze kliknutím označovat léze, které se automaticky ohraničí a je spočtena jejich plocha.



Tři kroky při hodnocení symptomů analýzou obrazu: A – zelený list se zřetelnou lézí způsobenou kmenem JN2 *Leptosphaeria maculans*. B – tentýž list obarvený trypanovou modří. C – zpracování listu v programu DPlan4LAB. Růžová plocha představuje detekované pozadí, zelená vybranou oblast léze.

Melton, R. E. et al.: 1998 - Molecular plant-microbe interactions, 11: 228-236.

Podporováno grantem GAČR 203/05/0559

P Plakátová sdělení

COT-BASED CLONING AND SEQUENCING OF THE SHORT ARM OF WHEAT CHROMOSOME 1B

HANA ŠIMKOVÁ, JAROSLAV JANDA, EVA HŘIBOVÁ, JAN ŠAFÁŘ, JAROSLAV DOLEŽEL

Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Sokolovská 6,
CZ-772 00 Olomouc, Czech Republic
E-mail: simkovah@ueb.cas.cz

Abstract

Sequencing of cereal genomes is not a feasible task due to their large size and high content of repetitive DNA sequences. There are two basic approaches to simplify analysis of such genomes: reduced representation approaches, such as EST sequencing, methyl filtration and Cot-based cloning and sequencing, and analysis of genomes in a step-wise manner, e.g. through creation of chromosome-specific genomic resources. Combination of both approaches – i.e. Cot-based cloning and sequencing of DNA obtained from a chromosome-arm-specific BAC library - was tested in this work.

Keywords: Cot, CBCS, BAC library, 1 BS, wheat, genome analysis

Introduction

Cot-based cloning and sequencing (CBCS), a method combining Cot analysis, DNA cloning and high-throughput sequencing, was described as a new and efficient approach to capture unique sequences from eukaryotic genomes (PETERSON et al. 2002a, <http://www.mgel.msstate.edu/cf.htm>). In particular, CBCS should 1) permit efficient gene discovery in species with substantial quantities of repetitive DNA, 2) allow the sequence complexity of large genomes to be elucidated at a fraction of the cost of whole-genome shotgun sequencing, and 3) facilitate capture of low-copy sequences not secured by EST sequencing.

CBCS includes Cot analysis, a biochemical method set on principles of DNA reassociation kinetics. This method is based on the observation that in a solution of heat-denatured, sheared genomic DNA, a specific sequence reassociates at a rate proportional to the number of times it occurs in the genome (BRITTON and KOHNE, 1968). Whereas highly repetitive sequences reassociate at a low Cot value (Cot value = product of a sample's nucleotide concentration in moles per liter, its reassociation time in seconds and a factor based upon the cation concentration of the buffer, see BRITTON et al. 1974), low-copy and unique sequences reassociate at high Cot values. Based on these observations, Cot analysis can be used to fractionate the genome into subpopulations of DNA fragments differing in their iteration frequency. Hydroxyapatite (HAP) chromatography is then employed to separate single-stranded DNA (ssDNA) from double-stranded DNA (dsDNA) (see PETERSON et al. 1998, Peterson et al. 2002b for details). Until now, CBCS was used to analyze highly repetitive part of the genome of chicken (WICKER et al. 2005), banana (HŘIBOVÁ et al. 2004) or *Panax ginseng* (HO and LEUNG, 2002), to characterize the genome of *Sorghum* by separating highly repetitive, moderately repetitive, and single/low-copy components of the genome (PETERSON et al. 2002b) and to analyze high-Cot fraction of the maize genome (YUAN et al. 2003). Recently, the efficacy of this technique for gene enrichment was also tested in wheat (LAMOUREUX et al. 2005), in which the high-Cot libraries exhibited 13.7 fold enrichment in genes compared with sequences from a shotgun-library. In maize, representation of genic sequences in the high-Cot fraction was fourfold higher compared with the non-fractionated genomic DNA, increasing from 5% for a random library to more than 20% for a high-Cot library (YUAN et al. 2003).

A completely different approach to simplify analysis of large genomes is based on their analysis in a step-wise manner. The pre-requisite of this approach is the availability of subgenomic large-insert libraries, usually cloned in bacterial artificial chromosome (BAC). In bread wheat, one of the most important crops ranking with its composed genome of about 17 Gbp among the largest, were constructed several subgenomic BAC libraries from flow-sorted chromosomes: BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D (JANDA et al. 2004), for chromosome 3B (ŠAFÁŘ et al. 2004) and for the short arm of chromosome 1B (JANDA et al. 2006). These libraries markedly simplify genome analysis, construction of physical maps and isolation of genes (KOTA et al. 2006).

Combination of both strategies, i.e. CBCS and creation of chromosome-specific genomic resources, could provide an even more focused and efficient tool to capture unique sequences from extremely large genomes.

P Plakátová sdělení

Materials and methods

Plant materials and DNA preparation

BAC library specific for the short arm of chromosome 1B was constructed from flow-sorted chromosome arms 1BS present as telosomes in a ditelosomic line of hexaploid wheat *Triticum aestivum* L. cv. 'Pavon 76' ($2n=40+2t1BS$) (JANDA et al. 2006). The library consists of 65,280 BAC clones ordered in 170 plates. BAC clones from each of the 384-well plates were grown overnight on a solid medium and then resuspended in 4 mL of TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Bacterial suspensions from several plates were combined. The suspensions were used to isolate DNA by standard alkaline lysis method. Remnants of bacterial chromosomal DNA were removed by Microcon YM-100 column (Millipore).

Cot fractionation and cloning of the DNA was performed following the protocol of YUAN et al. (2003) with some modifications.

Shearing, denaturation and reassociation

The DNA was filtered using Ultrafree-MC filter unit (Millipore) to remove tiny particles. The filtered DNA was sheared mechanically using Hydroshear DNA Shearing Device (GeneMachines) to obtain fragments of 0.8-2.5 kb (1.5 kb average). 40 µg of DNA were diluted with 20xSSC and water to reach final concentration of SSC 1× and that of DNA 400 ng/µl. The samples were denatured in boiling water for 5 min and the DNA was let reassociate at 65°C for 23 hours and 32 min to reach Cot value 100. The reassociation was stopped by freezing the samples at -80 °C.

HAP chromatography

HAP chromatography was performed in columns with 125 mg hydroxyapatite (Bio-Rad Laboratories) at 60 °C. Samples were loaded in 40 mM sodium phosphate buffer (SPB, 40 mM sodium phosphate, 10 mM EDTA), the ssDNA was eluted with about 3 ml 110 mM SPB and afterwards the dsDNA was eluted with 3 ml 300 mM SPB. The samples were purified and concentrated using Microcon YM-30 column (Millipore) and the ssDNA:dsDNA ratio was checked by electrophoresis. Concentration of ssDNA was estimated by Fluorimeter TD700 (Turner Designs) using Oligreen (Molecular Probes).

Synthesis of the second strand and cloning of DNA fragments

The ssDNA was converted into dsDNA using hexamer random priming system. The reaction was carried out in a 20-µl volume containing about 400 ng ssDNA, 12 µM random hexanucleotides, 250 µM dNTPs and 0.1 U Klenow exo - (Fermentas) and performed at room temperature for 4-5 hours. The reaction was stopped by adding 1 µl 0.5 M EDTA and concentration of dsDNA was estimated. The reaction buffer was removed using Microcon YM-30 column (Millipore) and the DNA was washed out with a suitable amount of water to reach final concentration of DNA 100 ng/µl. The dsDNA was treated with mung bean nuclease in concentration 2 U/µg DNA for 30 min at 30°C to generate blunt-ended molecules. The reaction was stopped by adding 1/10 volume of 0.1% SDS. The buffer was exchanged and the DNA was concentrated using Microcon YM-30 (Millipore).

To clone fragments of desired size, size selection was performed in 1% low-melting agarose gel in 1×TAE. Fragments of 800–1500 bp were isolated from the gel using Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned into *E. coli* using Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen).

DNA sequencing and sequence analysis

The obtained clones were checked for the insert size and 85 clones with inserts above 500 bp were sequenced at the Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, USA. DNA sequences were assembled and edited using BioEdit software. The homology search was done against sequences deposited in GenBank and GrainGenes database for *Triticum* and *Avena* (http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi) using BLASTn and BLASTx (ALTSCHUL et al. 1997). The presence of duplicated and tandem organized regions was detected using Tandem Repeats Finder (TRF, BENSON 1999).

Results and discussion

For preparation of the Cot100 fraction, 40 µg of DNA were isolated from the pooled 1BS BAC library. After HAP chromatography, 730 ng of ssDNA were eluted, from which 660 ng were used for synthesis of the second strand of DNA. The yield of the random primed synthesis was 1511 ng of dsDNA. After size selection, 480 ng of DNA were isolated from the gel and 78 ng were used for the TOPO cloning reaction, providing thousands of clones. 1536 clones were picked and ordered in four 384-well plates. Despite the size selection, average insert size was only 435 bp. 85 clones with inserts above 500 bp were sequenced and analysed and the data were send to

P Plakátová sdělení

GenBank database. The sequenced clones were screened for homology with sequences deposited in GenBank and GrainGenes database for *Triticum* and *Avena*. Five clones showed homology with 1BS-specific ESTs, nine clones were homologous to different parts of retrotransposons (five clones were homologous to genes for different retrotransposon proteins, three clones showed homology with reverse transcriptase and one clone was homologous to transposase) and further 14 clones were homologous to other known DNA sequences (Fig. 1). Tandem Repeat Finder analysis revealed, that 31 clones contained tandem organized repetitive units. Most of them (23) consisted of duplicated sequence units, two clones consisted of microsatellite sequences and six clones contained more than two tandem organized repetitive units (with minimal unit size 20 bp).

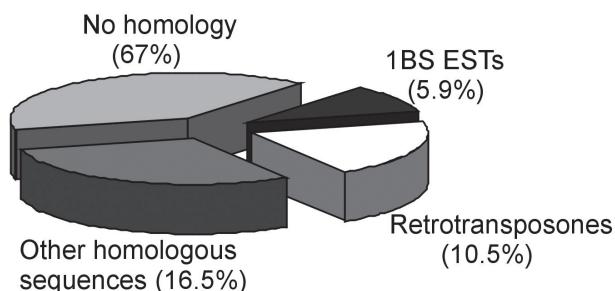


Fig. 1.
Homology of sequences from the Cot100 library with sequences deposited in GenBank and GrainGenes database.

For comparison, Cot200 fraction was prepared from 1BS using the same protocol, however the yield of ssDNA after HAP chromatography and number of obtained clones was significantly lower. Moreover, prolonged reassociation led to shortening of fragments obtained after HAP chromatography. Thus cloning of higher Cot fractions of 1BS does not seem feasible. On the other hand LAMOUREUX et al. (2005) succeeded in cloning wheat DNA collected at Cot values of 1188 and 1639. This can be due to the fact that the size of the whole wheat genome is 53 fold larger than that of 1BS, thus its complexity must be higher and the reassociation proceeds much slower.

There are some critical steps of this procedure, which can result in lower yield or production of artifacts. Prolonged denaturation should be avoided as it showed to damage the DNA. The most critical step is the synthesis of the second strand by random priming reaction. The composition of the reaction must be carefully considered, as lower concentration of random hexanucleotides leads to low yield but higher concentration results in significant production of reaction artifacts. Relatively high content of sequences with no homology to known sequences present in our library (67 %) but also in Cot466 library of maize (44 %) (YUAN et al. 2003) could be due to such artifacts although it can be also interpreted as a potential of this method to discover previously unknown functional sequences. Moreover, BRITTEN and KOHNE (1968) and BRITTEN (1974) found that the resolution of distinct kinetic components can only be achieved if the DNA fragments in the Cot analysis are relatively short (200–600 bp). However, such a length of fragments is not efficient for sequencing and will not provide much information.

Considering relatively high costs, time consumption and difficulty of CBCS together with difficulties of assembly of short DNA fragments into contigs, we do not consider it as a progressive method for analyzing large genomes in combination with chromosome-specific and arm-specific libraries. These libraries can be more reasonably used for contig assembly and clone-by-clone sequencing.

Acknowledgements

This work was supported by research grant from the Czech Science Foundation (grant award 521/05/P257).

References

- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- BENSON G., 1999. Tandem repeat finder - a program to analyze DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 27: 573-580.
- BRITTEN R.J., KOHNE D.E., 1968. Repeated sequences in DNA. *Science*, 161: 529-540.
- BRITTEN R.J., GRAHAM D.E., NEUFELD B.R., 1974. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol.*, 29: 363-405.
- HO I.S., LEUNG F.C., 2002. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from *Panax ginseng*. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 951-961.
- HŘIBOVÁ E., MACAS J., NEUMANN P., DOLEŽEL J., 2004. Isolation of highly repetitive DNA sequences in *Musa acuminata* using reassociation kinetics. – In: Abstracts of the 1st International Congress on *Musa*. INIBAP, Penang. P. 98.

P Plakátová sdělení

JANDA J., BARTOŠ J., ŠAFÁŘ J., KUBALÁKOVÁ M., VALÁRIK M., ČÍHALÍKOVÁ J., ŠIMKOVÁ H., CABOCHE M., SOURDILLE P., BERNARD M., CHALHOUB B., DOLEŽEL J., 2004. Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 1337-1345.

JANDA J., ŠAFÁŘ J., KUBALÁKOVÁ M., BARTOŠ J., KOVÁŘOVÁ P., SUCHÁNKOVÁ P., HŘIBOVÁ E., PATEYRON S., ČÍHALÍKOVÁ J., SOURDILLE P., ŠIMKOVÁ H., FAIVRE-RAMPANT P., BERNARD M., LUKASZEWSKI A., DOLEŽEL J., CHALHOUB B., 2006. Novel resources for plant genomics: BAC library specific for short arm of wheat chromosome 1B. *Plant J.*, in press.

KOTA R., SPIELMEYER W., DOLEŽEL J., ŠAFÁŘ J., PAUX E., MCINTOSH R.A. LAGUDAH E.S., 2006. Towards isolating the durable stem rust resistance gene Sr2 from hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Abstracts of the International Conference "Plant and Animal Genome XIV". Sherago International, Inc., San Diego. P. 181.

LAMOUREUX D., PETERSON D.G., LI W.L., FELLERS J.P., GILL B.S., 2005. The efficacy of Cot-based gene enrichment in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 48: 1120-1126.

PETERSON D.G., PEARSON W.R., STACK S.M., 1998. Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. *Genome*, 41: 346-356.

PETERSON D.G., SCHULZE S.R., SCIARA, E.B., LEE S.A., BOWERS J.E., NAGEL A., JIANG N., TIBBITTS D.C., WESSLER S.R., PATERSON A.H., 2002b. Integration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res.*, 12: 795-807.

PETERSON D.G., WESSLER S.R., PATERSON A.H., 2002a. Efficient capture of unique sequences from eukaryotic genomes. *Trends in Genetics*, 18: 547-550.

ŠAFÁŘ J., BARTOŠ J., JANDA J., BELLEC A., KUBALÁKOVÁ M., VALÁRIK M., PATEYRON S., WEISEROVÁ J., TUŠKOVÁ R., ČÍHALÍKOVÁ J., VRÁNA J., ŠIMKOVÁ H., FAIVRE-RAMPANT P., SOURDILLE P., CABOCHE M., BERNARD M., DOLEŽEL J., CHALHOUB B., 2004. Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J.* 39: 960-968.

WICKER T., ROBERTSON J.S., SCHULZE S.R., FELTUS F.A., MAGRINI V., MORRISON J.A., MARDIS E.R., WILSON R.K., PETERSON D.G., PATERSON A.H., IVARIE R., 2005. The repetitive landscape of the chicken genome. *Genome Res.*, 15:126-136

YUAN Y., SANMIGUEL P.J., BENNETZEN J.L., 2003. High-Cot sequence analysis of the maize genome. *Plant J.*, 34: 249-255.

P Plakátová sdělení

GLUTATHIONE AND ZEAXANTHIN FORMATION DURING HIGH LIGHT STRESS IN FOLIOSE LICHENS

JANA ŠTEPIGOVÁ, HANA VRÁBLÍKOVÁ, JAROSLAV LANG, KRISTÝNA VEČEŘOVÁ, MILOŠ BARTÁK

Department of Plant Physiology & Anatomy, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ
E-mail: pamba@sci.muni.cz

Abstract

In the presented study, we described techniques for glutathione and pigment determination in lichens used in our laboratory. Glutathione and xanthophyll cycle pigments, especially zeaxanthin, are important antioxidants protecting plants against various stresses. In our laboratory, high light stress in lichens has been intensively studied for several years. We extract glutathione in HCl and determine it by thiol-binding fluorescence label monobromobimane. For pigment determination, homogenized lichen thalli are extracted with pure acetone. According to our results, total amount of glutathione decreased after short-term high light exposure, while the amount of zeaxanthin increased.

Keywords: antioxidants, glutathione, high light stress, lichens, xanthophyll cycle, zeaxanthin

Introduction

Reactive oxygen species (ROS, e.g. O_2^{\cdot} , O^{\cdot} , O_3) occur within plant tissues as a consequence of various stresses. Since they are very unstable, they can damage cell structures. They react with a wide range of cell components, such as e.g. pigments, proteins (Bhattacharjee 2005). To avoid cell damage, plants possess several mechanisms that deactivate ROS. Antioxidants (AO) represent one of protective mechanisms against harmful ROS. Glutathione, ascorbate, pigments of xanthophyll cycle and tocopherol belong to the most important of them (Blokhina et al. 2003). Beside higher plant tissues, the AO are also present in green algae, which form lichen thalli in symbiosis with lichenized fungi. In plants and lichens, ROS formation leads to changes in amount and redox state of AO. Therefore, investigation of AO dynamics under various stresses allows us to quantify capacity of protective mechanisms in a plant cell. In a majority of plants, total amount of glutathione increases during or immediately after a long-term stress (Noctor et Foyer 1998). In a short-term stress, opposite response is reported as documented e.g. for shade leaves of *Begonia* after their transfer to full sunlight (Burritt et MacKenzie 2003). A similar rapid decrease in total glutathione was observed during a short-term pathogen attack (Vanacker et al. 2000) and drought stress (Loggini et al. 1999). Turnover of glutathione in plants under long-lasting stress reflects both short- and long-term response of glutathione. During stress, also redox state of glutathione is altered. It was shown (e.g. Barták et al. 2004) that the ratio of oxidized to reduced glutathione increased after treatment of thalli by high light. In lichens, majority of studies focused on glutathione dealt with its dynamics during thallus desiccation (e.g. Weissman et al. 2005, Kranner et Birtic 2005). Involvement of glutathione into high light stress in lichens has been studied just recently (Kranner et al. 2005).

Zeaxanthin (Z) is a xanthophyll cycle pigment present in thylakoid membranes. It plays an important role in a dissipation of an excess light energy. It is formed from a diepoxide violaxanthin (V) via monoepoxide antheraxanthine (A). Deepoxidation of V to Z requires presence of light. V recovers from Z in dark. There are several hypotheses trying to describe Z photoprotective mechanism. It is likely that Z acts as a direct acceptor of energy from excited chlorophyll a in a reaction centre of photosystem II (Frank et al. 1994). Havaux et Nyogi (1999) suggested that Z interacts and deactivates ROS. Another hypothesis postulates that Z changes conformation of light harvesting complexes and results in enhanced thermal dissipation of excess energy (e.g. Gilmore 1997).

Material and Methods

Lichen collection and handling

Lichens are poikilohydric organisms. Their collection and storage differ from that used for homoiohydric plants. We investigated foliose species *Lasallia pustulata* and *Umbilicaria antarctica* collected from different locations (Ketkovice near Brno in the Czech Republic, Galindez Island in maritime Antarctica, respectively). Thalli of the above lichen species were transferred to a laboratory in Brno, air-dried and stored in a temperature-controlled room at 5 °C under dim light (10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation – PAR). Before experiments,

P Plakátová sdělení

thalli were rewetted with demineralized water under dim light at 15 °C for 24 hours. Throughout the experiments, the thalli were kept in a fully hydrated state by regular spraying with demineralized water.

Set up for a photoinhibitory experiment

To quantify the effect of high light (HL) on the content of AO in thalli, we exposed lichens to 1500 resp. 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR for 30 min. A halogen lamp was used as a source of homogenous light. Excess heat was eliminated by water filter with circulating water placed between the light source and exposed lichen thalli. Throughout the experiments, the thalli were kept in a fully hydrated state by contact of lower thalli surfaces with wet filter paper and by regular spraying the thalli with demineralized water. Constant thallus temperature and air relative humidity were controlled by temperature and air humidity sensors connected to a data logger HOBO (Onset Computers, USA).

Sample preparation

Segments of lichen thalli (typically 80–100 mg DW for glutathione and 50–80 mg DW for pigment extraction) were taken regularly during high light experiments. They were immediately frozen in liquid nitrogen. After freeze-drying (Heto Maxi Dry Lyo, Denmark), dry thalli segments were homogenized using a ball mill (Retsch ZM 100, Germany). Dry powder was used for extraction of glutathione and pigments as specified below.

Glutathione

In lichens, three different methods are used for determination of glutathione and glutathione disulphide (Kraner 1998). In our study, a method with labeling thiols with monobromobimane (mBBr) was used. The method allows determination of both oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione. Dry lichen powder was extracted with 0.1 M HCl with addition of polyvinylpyrrolidone (PVP). Lichens content phenolic secondary metabolites that can interact with glutathione during extraction. PVP binds phenolic compounds and eliminates their negative effect on reactions. The extract was divided into 2 parts. Total glutathione (GSH + GSSG) is determined from the first part. In the second part of the extract, thiol groups of GSH were oxidized by N-ethylmaleimide (NEM). This step blocked GSH present in extract and allowed to determine the amount of GSSG. Disulphidic groups ($-S-S-$) in both parts of original extract were reduced by dithiotreitol (DTT) during next step. Thiol groups were labeled with mBBr, a compound that can be detected with fluorescence detector after acidification of sample. GSH and GSSG were separated from low molecular thiols present in extract and quantified by a reverse-phased HPLC (see Fig. 1). We used HPLC (Separation modul 2690, Waters, USA) with fluorescence detector (Shimadzu RF-535), and separation column C₁₈. We used separation protocol described in Kraner 1998.

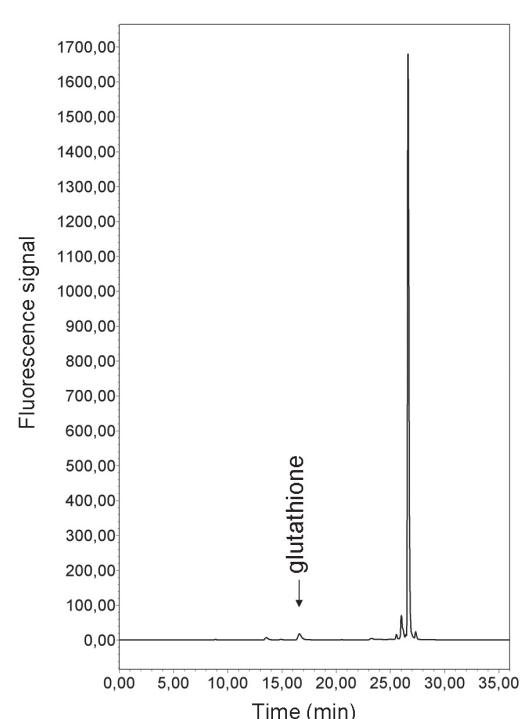


Fig.1: Typical HPLC chromatogram of thiol separation in *L. pustulata*

Xanthophyll cycle pigments

Pigments were extracted according to Pfeifhofer et al. (2002) with the following slight modifications. We used 100% acetone as an extraction medium. Instead of mortar and pestle, as used in Pfeifhofer et al. (2002), we added small glass balls to lichen powder (see Sample preparation) for more effective homogenization. Small amount of CaCO₃ was added to lichen powder to eliminate secondary metabolites, lichen acids in particular. Chilled acetone was added into a microtube with lichen powder, shook vigorously (VORTEX) for few seconds and centrifuged. Supernatant with extracted pigments was saved. The process was repeated 3–4 times. Pigments were separated by HPLC (Separation modul 2690, Waters, USA) using photodiode-array detector (DAD 996, Waters, USA). Solvent A consisted of acetonitrile, methanol and 0.1 M Tris-HCl buffer (72:8:3). Solvent B contained methanol and hexane (4:1). Linear gradient started with 100% of solvent A. Its volume decreased to 0 % within 6.5 minutes and pure solvent B ran through the separation column for next 7 minutes. Volume of solvent A was changed back to 100 % within next 2 minutes. The flow rate was 2 ml per minute. Pigments were detected at 440 nm. The used protocol of extraction allowed evaluation of Z, V, A, neoxanthin, lutein and chlorophylls a and b (see Fig. 2). The content of xanthophyll cycle pigments was expressed as a deepoxidation state of xanthophyll cycle pigments DEPS = (Z+A)/(Z+A+V).

P Plakátová sdělení

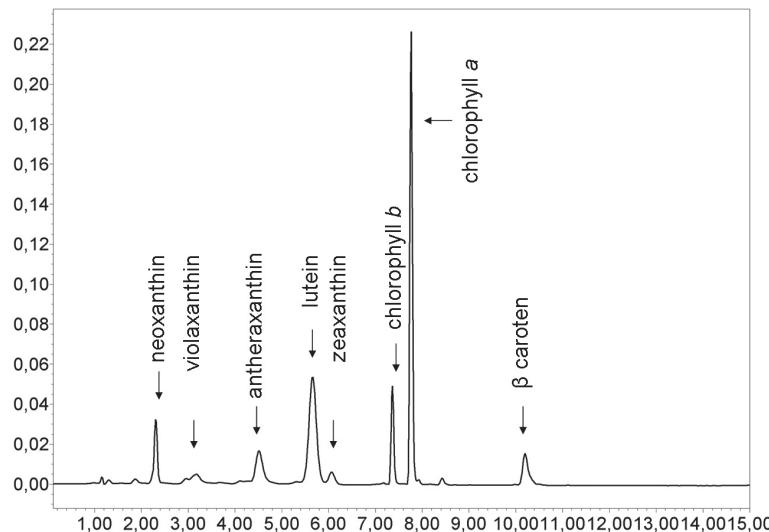


Fig. 2.
Typical HPLC chromatogram
of pigments separation in
L. pustulata

Results and discussion

The response of AO to HL in two lichen species is shown in Table 1. In both species, HL induced apparent increase in DEPS. The increase is well comparable to the evidence reported for HL-treated higher plants (e.g. Wehner et al. 2006) and lichens (Vráblíková et al. 2006). Amount of chlorophylls a and b, as well as the amount of other pigments remained unchanged after HL treatment. The amount of total GSH decreased after HL exposure. The response corresponds to the general trends reported for higher plants (Burritt et MacKenzie 2003).

	DEPS before HL exposure	DEPS after HL exposure	Total GSH before HL exposure (nmol g ⁻¹ DW)	Total GSH after HL exposure (nmol g ⁻¹ DW)
<i>L. pustulata</i> ¹	0.06938 ± 0.011293	0.544754 ± 0.046581	3354.96837 ± 373.4212	1220.74672 ± 159.7987
<i>U. antarctica</i> ¹	0.138023 ± 0.005171	0.448041 ± 0.072315	1897.08012 ± 232.8332	258.10377 ± 41.26204
<i>U. antarctica</i> ²	0.232346 ± 0.003363	0.624357 ± 0.052016	1756.85893 ± 800.6829	614.02107 ± 143.5701

Table 1. The table expresses effect of HL exposures on DEPS and total GSH in two lichen species using methods as described above. The values are means of at least 3 replicates ± standard error. 1- Vráblíková et al. 2005; 2- Barták et al. 2004

The aim of experiments presented in this paper was to test and improve the methods of Z and glutathione quantification in lichens. We may conclude that both used methods are well applicable in the investigation of HL-induced stress in lichens. In Z determinaton, we used acetone as an extraction medium. Compared to other options (ethanol, DMSO-see Pfeifhofer et al. 2002), acetone is cheaper and relatively safe. To prevent evaporation of acetone, the extraction and all laboratory manipulations must be done quickly. We recommend to do the extraction on ice smash and use chilled acetone to prevent evaporation. DMSO, on the other hand, is more effective solvent and extraction with DMSO requires less labor (see Pfeifhofer et al. 2002). Based on our experience, we recommend to grind freeze-dried thalli of foliose lichens for at least 2 minutes in a ball mill. However, the used protocol of homogenization cannot be generalized for all lichen species. Thalli of fruticose lichens are more resistant to mechanic destruction. Therefore, homogenization of fruticose lichens probably requires longer time of homogenization and stronger extraction medium.

P Plakátová sdělení

References

- BARTÁK, M., HÁJEK, J., VRÁBLÍKOVÁ, H., DUBOVÁ, J., 2004. High-light stress and photoprotection in *Umbilicaria antarctica* monitored by chlorophyll fluorescence imaging and changes in zeaxanthin and glutathione. *Plant Biology*, 6 (3): 333-341
- BHATACHARJEE S., 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.*, 89: 1113-1121
- BLOKHINA O., VIROLAINEN E., FAGERSTEDT K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Botany*, 91: 179-194.
- Burritt D.J., Mackenzie S., 2003. Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia x erythrophylla* to high light levels. *Ann. Botany*, 91: 783-794.
- FRANK H. A., CUA A., CHYNWAT V., YOUNG A., GOSZTOLA D., WASIELEWSKI M. R., 1994. Photophysics of the carotenoids with the xanthophylls cycle in photosynthesis. In FRANK H. A. et al., eds. *The photochemistry of carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- GILMORE A.M., 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll-cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.*, 99: 197-209.
- HAVAUX M., NYIOGI K. K., 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *PNAS USA*, 96: 8762-8767.
- HEBER U., SHUVALOV V. A., 2005. Photochemical reactions of chlorophyll in dehydrated Photosystem II: Two chlorophyll forms (680 and 700 nm). *Photosynth. Res.*, 84 (1-3): 85-91
- KRANNER I., CRAM W. J., ZORN M., WORNIK S., YOSHIMURA I., STABENTHEINER E., PFEIFHOFER H. W., 2005. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *PNAS USA*, 102: 3141-3146.
- Kranner I., 1998. Determination of glutathione, glutathione disulphide and two related enzymes, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in fungal and plant cells, In: VARMA A., ed. *Mycorrhizal manual*, Springer Verlag, Berlin, Germany, 227-241.
- KRANNER I., BIRTIC S., 2005. A modulating role of antioxidants in desiccation tolerance. *Integr. Comp. Biol.*, 45: 734-740.
- Kranner I., Grill D., 1996. Determination of glutathione and glutathione disulphide in lichens: a comparison of frequently used methods. *Phytochem. Anal.*, 7 (1): 24-28.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F., 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol.*, 119: 1091-1099
- Noctor G., Foyer C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249-279.
- PFEIFHOFER H. W., WILLFURTH R., ZORN M., KRANNER I., 2002. Analysis of chlorophylls, carotenoids, and tocopherols in lichens. In: Kranner I. et al., eds. *Protocols in lichenology*, Springer Verlag, Berlin, Germany, 363-378.
- Vanacker H., Carver T. L. V., Foyer C. H., 2000. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol.*, 123: 1289-1300.
- VRÁBLÍKOVÁ H., BARTÁK M., WÖNISCH A., 2005. Changes in glutathione and xanthophyll cycle pigments in high light-stressed lichens *Umbilicaria antarctica* and *Lasallia pustulata*. *J. Photochem. Photobiol. B – Biology* 79: 35-41.
- VRÁBLÍKOVÁ H., McEVOY M., SOLHAUG K. A., BARTÁK M., GAUSLAA Y., 2006. Annual variation in photoacclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *J. Photochem. Photobiol. B – Biology* 83: 151-163.
- WEHNER A., GRASSES T., JAHNS P., 2006. De-epoxidation of vioalxanthin in the minor antenna proteins of photosystem II, LHCb4, LHCb5, and LHCb6. *J. Biol. Chem.*, 281: 21914-21933.
- Weissman L., Garty J., Hochman A., 2005. Rehydration of the lichen *Ramalina lacera* results in production of reactive oxygen species and nitric oxide and a decrease in antioxidants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 2121-2129.

P Plakátová sdělení

VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉHO DETEKTORU COULOCHEM III PRO STUDIUM KAPSAICINU V PAPRICE

VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ^{1,2}, HELENA STAVĚLÍKOVÁ³, SOŇA KŘÍŽKOVÁ^{2,4}, LADISLAV HAVEL¹, VOJTECH ADAM⁴, FILIP HLÁVKA¹, ALEŠ HORNA⁵, RENÉ KIZEK²

¹ ÚBR MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² ÚCHB MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

³ VÚRV Oddělení genové banky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice, ČR

⁴ KMBG MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

⁵ RADANAL Ltd., Okružní 613, 530 03 Pardubice, ČR

E-mail: kizek@sci.muni.cz, tel.: 545 133 350

Paprika (*Capsicum*, Solanaceae) je rostlina pocházející z Jižní a Střední Ameriky, která se stala velmi rychle oblíbenou a běžnou součástí našeho jídelníčku. Její pálivá chuť je vyvolána společným účinkem asi šesti chemicky příbuzných látek ze skupiny fenylalkylamidových alkaloidů (kapsaicinoidů), z nichž nejsilnější účinky má kromě samotného kapsaicinu jeho derivát dihydrokapsaicin. Kapsaicin je odpovědný za pálivý pocit při styku se sliznicemi a zvyšuje sekreci žaludečních štáv. Papriky si kapsaicin vyuvinuly jako účinnou obranu proti býložravcům. Pravděpodobně nejpálivějším druhem papriky je habanero (*Capsicum chinense*). Kapsaicin je pro své vlastnosti využíván v celé řadě oblastí např. proti bolestem zad nebo v pepřových sprejích sloužících k osobní obraně. Letos v březnu byl prokázán léčebný efekt kapsaicinu na rakovinné buňky u nádoru prostaty.

Cílem tohoto projektu bylo stanovit čistý kapsaicin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) s využitím detektoru Coulochem III, ESA. Následně pak studovat kapsaicin v reálných vzorcích paprik. Konkrétně jsme se zabývali změnou jeho obsahu v částech plodů (semeník, dolní dužnina, horní dužnina a semínka) různých odrůd paprik. Dále jsme se zaměřili na porovnání získaných výsledků s pálivostí daného druhu papriky.

Cistý kapsaicin je elektroaktivní látka, proto jsme se v našich experimentech nejdříve zaměřili na studium základního elektrochemického chování čistého kapsaicinu pomocí cyklické voltametrii na přístroji AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Nizozemí) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Charakterizace a optimalizace stanovení kapsaicinu pak byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem Coulochem III (HPLC-ED) nejdříve bez zařazení kolony v tzv. průtokovém systému (průtoková injekční analýza – FIA), a poté byla aplikována na vhodné chromatografické kolony. Metodou cyklické voltametrii, kdy základním elektrolytem byl acetátový pufr o pH 4,0, teplota 20 °C, jsme potvrzili, že stanovaná látka je elektroaktivní a poskytuje svůj elektrochemický signál při potenciálu okolo 0,6 V. Výsledky získané z cyklické voltametrii jsme použili pro navržení nejvhodnějších podmínek pro kapalinovou chromatografiu. Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii, jejíž detekce byla provedena na přístroji Coulochem III (ESA, Inc.), byla použita elektrochemická cela o objemu 50 µl, v níž byla umístěna referenční hydrogenpaladiová elektroda, pomocná uhlíková elektroda a pracovní elektroda ze skelného uhlíku. Separace v reálných vzorcích byla uskutečněna na koloně ESA MD-150 × 3,2 mm, průměr částic 3 µm s použitím předkolony Polaris C18-A. Dávkovací smyčkou byl aplikován vzorek o objemu 5 µl. Mobilní fází byla směs acetátového pufru o pH 4 a methanolu v poměru 60/40. Při analýze bylo aplikováno 5 µl vzorku.

Optimalizovanou metodu jsme dále použili pro analýzu rozdílů v obsahu kapsaicinu u jednotlivých sbírkových odrůd paprik (Takanotsume, Novoselská kapie, Jubila, Koral, Karmina, Vera, Severka a další). Zjistili jsme, že obsahy kapsaicinu jsou v jednotlivých částech plodu rozdílné. Nejvyšší koncentrace kapsaicinu jsou v semeníku a dolní dužnině (Takanotsume - semeník 227,475 mg/100g čerstvé hmoty, Jubila - semeník 1,382 mg/100 g čerstvé hmoty), mnohonásobně nižší koncentrace jsou v horní části dužiny a nejméně kapsaicinu obsahují semínka (Takanotsume - semínka 6,171 mg/100 g čerstvé hmoty, Jubila - semínka 0,824 mg/100 g čerstvé hmoty). Z výsledků vyplývá, že čím je plod papriky pálivější, obsahuje i vyšší koncentraci kapsaicinu a naopak, málo pálivý či nepálivý plod kapsaicin téměř neobsahuje. V naší práci se nám podařilo, díky použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem (HPLC-ED), vyuvinout nový způsob detekce kapsaicinu. Námi navržený postup bude dále využit pro charakterizaci jednotlivých odrůd papriky uložených v genové bance s ohledem na obsah kapsaicinu.

Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J.C., Pervan, M., McBride, W.H., Kizaki, M. and Koeffler, H.P. (2006) Cancer Res. 66, 3222-3229.
Patocka, J. (2005) Vesmír 84, 711-711.

Supalkova, V., Stavelikova, H., Krizkova, S., Adam, V., Horna, A., Havel, L. and Kizek, R. (2006) 2. letní škola elektrochemické a coulochemické detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií. Mendelova zemedělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, Czech Republic, p. 24-29.

Podporováno granty Výzkumné centrum M06030 a projektem Genové banky Olomouc.

P Plakátová sdělení

SQUARE WAVE VOLTAMETRIE PRO DETEKCI SALICYLÁTŮ V KŮŘE A LETOROSTECH VRB NA UHLÍKOVÝCH ELEKTRODÁCH

VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ², PETR BABULA⁴, SOŇA KŘÍŽKOVÁ^{1,3}, LADISLAV HAVEL², VOJTECH ADAM³, RENÉ KIZEK¹

¹ ÚCHB MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

² ÚBR MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ČR

³ KMBG MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR

⁴ FVHE VFU, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ČR

E-mail: kizek@sci.muni.cz, tel.: 545 133 350

Salicyláty, konkrétně kyselina salicylová SA a kyselina acetylsalicylová AcSA, byly používány jako analgetikum ve formě kůry z vrb již v dobách Hippokrata a jejich protihorečkový efekt byl rozpoznán před více než 200 lety. Dnes jsou tyto látky hojně využívány právě pro svůj protihorečkový a protizánětlivý efekt v celé řadě medikamentů. Inhibují také růst bakterií *Helicobacter pylori* a *Staphylococcus aureus*. Rovněž byl prokázán příznivý terapeutický vliv těchto látek při různých kardiovaskulárních chorobách. Kyselina salicylová je dále hojně využívána v řadě nápojů a potravin jako konzervační přísada, kde však vyšší koncentrace mohou být na druhou stranu toxicke nebo vyvolávat alergické reakce. SA je navíc signální molekulou u rostlin, kde reguluje expresi systematické obranné odpovědi na potenciálního patogena v případě, že je rostlina vystavena abiotickým i biotickým stresům (potenciální patogeny jako jsou bakterie, viry a houby nebo environmentální stres přítomný v jejich bezprostředním okolí). I přesto, že jsou tyto sloučeniny hojně využívány v celé řadě oblastí je mechanismus jejich účinku prozatím velmi málo prozkoumán.

Pro stanovení SA a jejích derivátů bylo již v současnosti využito mnoho analytických metod a postupů, jako průtoková injekční analýza a vysoko-účinná kapalinová chromatografie spojená s různými druhy detektorů. Cílem této práce bylo studovat elektrochemické chování SA a AcSA na povrchu uhlíkové pastové elektrody (CPE) a na uhlíkové tužkové elektrodě (GPE) pomocí square wave voltametri (SWV). Metodu následně využít pro stanovení salicylátů v kůře a letorostech různých druhů vrb.

Elektrochemické měření bylo prováděno na přístroji AUTOLAB Analyser spojeného s VA-Stand 663. Byl použit tříelektrodový systém, který byl složen z uhlíkové pastové elektrody nebo z uhlíkové tužkové elektrody jako pracovní elektrody s plochou $0,4 \text{ mm}^2$, Ag/AgCl/3 mol.⁻¹ KCl elektrody jako referenční elektrody a uhlíkové elektrody jako pomocné. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od 0,7 V do 1,5 V. Ostatní parametry byly optimalizovány. Britton-Robinson pufr skládající se z 0,4 M H_3PO_4 , 0,4 M CH_3COOH a 0,4 M H_3BO_3 byl použit jako základní elektrolyt. Optimalizovaná metoda byla následně použita pro stanovení SA a AcSA v letorostech a kůře různých druhů vrb (*Salix laponum*, *S. planifolia*, *S. foetida*, *S. foetida* × *hastata*, *S. × „Aegma Brno“*, *S. purpurea* cv. *Nana*, *S. reinii*, *S. repens*, *S. × erythrotoslexuosa*, *S. caterii*, *S. fragilis*, *S. triandra* a *S. viminalis*), dále ve farmaceutickém přípravku a pivu. V případě vrb jsme zjistili, že průměrný obsah SA (v $\mu\text{g/g}$ svěží hmotnosti) byl vyšší u dvouletých větviček než v kůře. Nejvyšší obsah SA byl pozorován v kůře *S. laponum* (2986 $\mu\text{g/g}$ svěží hmotnosti) a letorostech *S. purpurea* cv. *Nana* (2095 $\mu\text{g/g}$ svěží hmotnosti) a *S. planifolia* (2168 $\mu\text{g/g}$ svěží hmotnosti). Je zajímavé, že hybrid (*S. cv. Aegma Brno*) vyšlechtěný v Brně vykazoval velmi nízké obsahy SA (průměrný obsah SA 85 $\mu\text{g/g}$ svěží hmotnosti). Získaný detekční limit pro SA byl 1,3 ng/ml. Dále jsme navrhli metodu pro nepřímé stanovení AcSA, která byla hydrolyzována na SA. Hydrolyza proběhla v prostředí Britton-Robinson pufru (pH 1.81) při 90 °C po dobu jedné hodiny. Samotná AcSA je totiž látka elektroneaktivní a nelze ji stanovit přímou detekcí. Tuto metodu jsme pak aplikovali pro analýzu farmaceutického přípravku. Stanovený obsah AcSA byl v dobré shodě s množstvím deklarovaným výrobcem se zjištěnou chybou 5 %. Elektrochemické techniky, konkrétně použitá square wave voltametrie, představují výslovně selektivní a nepříliš drahý analytický nástroj pro stanovení kyselin salicylové na uhlíkových elektrodách. Navržený postup SWV analýzy je tedy možné využít pro stanovení salicylátů.

Pereira, A.V., Aniceto, C. and Fatibello, O. (1998) Analyst 123, 1011-1015.

Rover, L., Garcia, C.A.B., Neto, C.D., Kubota, L.T. and Galembeck, F. (1998) Anal. Chim. Acta 366, 103-109.

Quintino, M.S.M. and Angnes, L. (2004) Talanta 62, 231-236.

Jen, J.F., Tsai, Y.Y. and Yang, T.C. (2001) J. Chrom. A 912, 39-43.

Petrek, J., Havel, L., Petrlova, J., Adam, V., Potesil, D. and Kizek, R. (2006) Russ. J. Plant. Phys. submitted.

Podporováno granty: GAČR 525/04/P132, Výzkumné centrum M06030 a IGA MZ 1A/8666-3.

P Plakátová sdělení

OXIDATIVE STRESS IN SEEDLINGS OF *A. THALIANA* WITH ELEVATED ENDOGENOUS CYTOKININ CONTENT

PAVLÍNA VÁŇOVÁ¹, FRANÇOIS CHEVALIER³, VALÉRIE ROFIDAL³, MICHEL ROSSIGNOL³, JIŘÍ MALBECK⁴, ONDŘEJ NOVÁK⁵, JAN NOVÁK^{1,2}, BŘETISLAV BRZOBOHATÝ^{1,2}

¹Department of Molecular Biology and Radiobiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Institute of Biophysics AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

³Unité de Protéomique, INRA, 2 place Viala, 340 60 Montpellier, France

⁴Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 135, 165 02 Prague, Czech Republic

⁵Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic
E-mail: vanova@sci.muni.cz, tel.: +420 545 133 297

The plant hormone cytokinin (CK) plays an indispensable role in plant development from germination to senescence. Sequencing of the genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* facilitated global approaches to the study of CK action. We report here a classical, 2-D electrophoresis-based proteomic approach aimed to reveal more information about CK action in *Arabidopsis*.

The availability of an improved pOp-ipt/LhGR transgenic system in which the production of CK is inducible by dexamethasone (DEX) (Craft et al., 2005) allowed us to compare proteomes of seedlings with large differences in endogenous CK content. To exclude the potential effects of DEX on protein composition, wild type Columbia-0 was included in the experiment as a control. Both wild-type and transgenic lines were grown for 15 days under long-day conditions (16h light/8h dark) on MS media, in parallel with and without 2.5 µM DEX.

Image analysis of two-dimensional gels in triplicates and subsequent statistical evaluation revealed changes in protein expression between plants with elevated cytokinin content and controls, whereas no significant effects of DEX on wild-type protein maps were observed. A total of 58 differentially expressed spots were characterized by MALDI-TOF MS and classified into functional categories. The majority of them were related to oxidative stress and defense mechanisms including jasmonic acid (JA) inducible proteins.

Subsequent analyses revealed increased levels of hydrogen peroxide and JA in seedlings with elevated CKs, as well as changes in activities of several antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase, dehydroascorbate reductase and catalase. The data demonstrate, for the first time, a link between CKs and oxidative stress at the proteome level, implying cross-talk between CKs and JA *in planta*.

Reference

Craft J., Šámalová M., Baroux C., Townley H., Martinez A., Jepson I., Tsiantis M., Moore I.: 2005 – Plant J 41: 899

Supported by grants Nos. 1M06030, MSM143100008 and AVOZ50040507.

P Plakátová sdělení

ANALYSIS OF WHEAT PROTEINS SOLUBLE UPON BOILING BY PROTEOMIC METHODS

PAVEL VÍTÁMVÁS, ILJA T. PRÁŠIL

VÚRV, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: vitamvas@vurv.cz, tel.: 233 022 443

In our laboratory, we study effects of cold-acclimation on protein level of cereals. We focused on the one group of the COR (cold-regulated) proteins accumulated during cold acclimation in wheat (*Triticum aestivum*) – WCS120 proteins. The WCS120 proteins (as many of other COR proteins) belong to the proteins soluble upon boiling (Sarhan et al., 1997). Here, the aim of our work was to analyze the heat stable fraction of proteins in wheat by several methods – 2DE, protein gel blot analysis, image analysis and LC-MS/MS.

Total soluble proteins from wheat leaves were extracted in Tris buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM PMSF) and subsequently boiled for 15 min. Proteins were separated on 2D SDS-PAGE (2-Dimensional Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel), and visualized by Coomassie Blue or silver staining (O'Farrell 1975). 2D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad) were used for the calibration of MW and pl.

The separated proteins were also identified by the protein gel blot analysis using the WCS120 polyclonal antibody (Houde et al., 1992) and dehydrin antibody (against the consensus K-segment, Close et al. 1993). The proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose (0.45 µm, Pharmacia Biotech).

WCS 120 proteins (WCS120, WCS66, WCS40, WCS200 and WCS180) have been identified according to their MW and pl value on 2-DE gels and using polyclonal WCS 120 antibody on W-blotted membranes. Furthermore, WCS66 and WCS120 were also confirmed by mass spectrometry (Shevchenko et al., 1996).

LC-MS/MS was used to analyze the tryptic peptides. The analyses were performed on a Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) at Risoe National Laboratory (Roskilde, Denmark). A nano-LC system (Famos, Switchos, Ultimate, LC-Packings, Amsterdam, The Netherlands) equipped with RP-columns was used and interfaced directly to the Q-TOF Ultima Global instrument using an electrospray source. The analytical nano-column (75 µm ID × 15 cm) was (self)-packed with Zorbax 300SB-C18, 3.5µm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A) and a trap column (300 µm × 5 mm) packed with 5 µm C18, 100 Å, PepMap™ (LC Packings) was used.

We distinguished different levels of WCS120 proteins in the wheat cultivars by the image analysis of 2-D electrophoresis gels. The accumulation of WCS120 proteins was significantly higher in the cold-acclimated (CA) wheat cultivars with higher levels of frost tolerance measured by LT₅₀. Very low accumulation of WCS120 protein was observed in the non-acclimated samples (NA, 17 °C) of winter cultivars Mironovskaya 808 (MIR) and Bezostaya 1 (BEZ), and this protein was not detected in the NA samples of spring cultivar Leguan (LEG). The lowest level WCS120 proteins in CA cultivars were observed in the LEG. BEZ had lower level of WCS120, WCS66 and WCS40 than MIR (Vítámvás et al., in press). The level of WCS120 proteins extracted from partially or fully vernalized MIR corresponded with measured LT₅₀ of the plants. The plants with fully satisfied vernalization had the lowest level of WCS120 proteins and LT₅₀.

The changes in protein pattern of proteins soluble upon boiling extracted from cold-acclimated (cultivated at 3 °C) and non-acclimated (cultivated at 17 °C) leaves of winter wheat cultivar Mironovskaya 808 were studied by mass-spectrometry. We identified a number of proteins in the total protein sample without any preceding separation of these proteins due to capillary liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Higher proportion of COR proteins was identified in cold-acclimated plants contrary to non-acclimated plants due to LC-MS/MS (Vítámvás et al., in press). Furthermore, other proteins specific for cold- or non-acclimated tissue were identified (e.g. cystatin or 14-3-3homologues). The specific proteins together with the previously characterized COR proteins (like COR14a) could be tested for the ability to distinguish wheat cultivars with different levels of frost tolerance and to use them as protein markers of frost tolerance.

- Close TJ, Fenton RD, Moonan F. (1993) Plant Mol. Biol. 23: 279–286
 Houde M, Danyluk J, Laliberte JF, Rassart E, Dhindsa RS, Sarhan F. (1992) Plant Physiol. 99: 1381-1387
 O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250: 4007-4021
 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996) Anal. Chem. 68: 850–858.
 Sarhan F, Ouellet F, VazquezTello A. (1997) Physiol Plant. 101: 439-445
 Vítámvás P, Saalbach G, Prášil IT, Čapková V, Opatrná J, Jahoor A. (2006) J. Plant. Phys., in press

We thank F. Sarhan and T. J. Close for providing us the polyclonal anti-WCS120 and anti-dehydrin antibody and G. Saalbach for access to the LC-MS/MS. This work was supported by the Grants MZE 0002700602, GA ČR 206/03/H137 and EU Marie Curie Host Fellowships HPM'T-CT-2000-00194.

R Rejstřík autorů

- Adam 59, 60, 108, 109
 Adamec 42
 Amakorová 45, 46
 Babula 109
 Barták 104
 Bartoš 97, 98
 Bedřichová 15, 52
 Beklová 59, 60
 Benetka 49
 Benková 72
 Bláha 52
 Blahoušek 45
 Bleys 52
 Brázdová 53
 Brzobohatý 62, 72, 110
 Buchtík 45
 Bumba 42
 Burketová 99
 Čeřovská 86
 Číhalíková 97, 98
 Čovanová 54
 Dadejová 55
 Depicker 52
 Dobrá 56
 Dobrev 81
 Doležal 45, 46, 47
 Doležel 18, 67, 97, 98, 100
 Doleželová 67
 Doonan 40
 Dorčák 48
 Dubová 72
 Dupláková 25, 27
 Dvořáčková 40
 Dvořák 53
 Ehrenbergerová 74
 Eichacker 96
 Fajkus 40, 85
 Falát 42
 Filová 57
 Fish 84
 Fišerová 57, 58
 Flegel 16
 Fojta 48, 53
 Fojtová 15, 48, 52
 Friml 23
 Fulneček 32
 Granvogl 96
 Gubiš 83
 Hanuš 57
 Hauserová 45, 46, 47
 Havel 58, 59, 60, 108, 109
 Havlíček 44
 Havlíčková 43
 Havran 48
 Hejátko 23
 Hlávka 108
 Holková 74
 Honys 25, 26
 Horáček 61
 Horna 59, 60, 108
 Hoyerová 17, 76
 Hradilová 62
 Hronková 63
 Hrubá 64
 Hřibová 67, 100
 Cháb 68
 Chevalier 110
 Janda 98, 100
 Janoušek 69
 Jiřina 17
 Kamínek 81
 Kašparovský 35
 Khaitová 52
 Kiran 72
 Kizek 59, 60, 108, 109
 Klemš 57, 58
 Kofler 98
 Kolář 51, 73
 Kolouchová 23
 Komenda 96
 Korbelová 99
 Koroleva 40
 Kosař 74
 Kovařík 15, 52, 55
 Kovářová 97, 98
 Křeček 75
 Křížková 108, 109
 Kubálková 97, 98
 Kubát 19
 Kubeš 94, 95
 Kuthanová 76
 Lang 104
 Laňková 76, 94
 Leitch 40, 55
 Lelley 98
 Lenochová 76
 Leverington-Waite 84
 Lexa 8
 Libus 24, 56
 Lim 55
 Lindenau 41
 Lochman 35
 Macas 16, 67, 82
 Malá 47
 Malbeck 62, 72, 110
 Marková 77
 Masařík 53
 Matyášek 55, 78
 Mauleová 79
 Michu 12
 Mikeš 35
 Mikušová 57, 58
 Milec 84
 Mokroš 80
 Moore 41
 Motyka 81
 Navrátilová 82
 Nebesářová 42
 Novák 45, 46, 110
 Nováková 83
 Opatrný 76
 Paleček 53
 Pánková 84
 Perry 76
 Peška 85
 Petrášek 54, 76, 94, 95
 Pivoňková 48
 Plchová 86
 Podhorská 23
 Podwyszyńska 47
 Popa 47
 Potocký 8
 Pouch 90
 Prášil 84, 111
 Prášilová 84
 Prokeš 57
 Prokešová 57, 58
 Reinöhl 57
 Reková 72
 Renák 25
 Roždídal 110
 Rolčík 45
 Rossignol M. 110
 Rossignol P. 40
 Rotková 91
 Sarafis 42
 Sedláková 45
 Seifertová 95
 Seňková 51, 73
 Shaw 40
 Shippen 80
 Simmonds 84
 Simon 94, 95
 Skúpa 94, 95
 Smýkal 22, 61
 Snape 84
 Sobotka 50, 96
 Solnická 57
 Soukup 76
 Spíchal 47
 Stavělková 108
 Stejskal 59, 60
 Strnad 45, 46, 47
 Suchánková 97, 98
 Swaczyňová 45
 Sýkorová B. 81
 Sýkorová E. 40, 85
 Šafář 97, 98, 100
 Šantrůček 63
 Šašek 99
 Šelešovská 48
 Šestáková 48
 Šimková H. 18, 97, 98, 100
 Šimková M. 63
 Široký 80
 Štepigová 104
 Štorchová 24, 56, 68
 Šupálková 59, 60, 108, 109
 Talianová 9
 Tarkowská 47
 Tichá 53
 Tichý 50, 96
 Tomšíčková 63
 Trnková 60
 Vaculová 90
 Vácha 42
 Vaňková 56, 83
 Váňová 110
 Vašatová 57
 Večeřová 104
 Vespa 80
 Vítámvás J. 79
 Vítámvás P. 111
 Vogl 15
 Votrubová 76
 Vráblíková 104
 Vrbský 28
 Vyskot 36
 Weger 43
 Zatloukal 45
 Zažímalová 17, 54, 75,
 76, 94, 95
 Zehnálek 59
 Zítka 60
 Žárský 17
 Žlůvová 37, 69
 Žuberová 96

S Seznam účastníků

Bedřichová Jana, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 178, e-mail: janabed@ibp.cz

Benetka Vojtěch

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajину a okrasné zahradnictví (VÚKOZ)
Květnové nám. 391, Průhonice, 252 43
tel.: 296 528 253, e-mail: benetka@vukoz.cz

Bláha Ladislav, Ing., CSc

Výzkumný ústav rostlinné výroby
Drnovská 507, Praha-6, Ruzyně, 161 06
tel.: 233 022 448, e-mail: lbla@vurv.cz

Bohdanecká Dita, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 224 322 603, e-mail: bohdanecka@ueb.cas.cz

Bratršovská Pavlína, Ing.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 545 133 134, e-mail: P.Bratrsovska@seznam.cz

Brázdová Marie, Ph.D.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 176, e-mail: maruska@ibp.cz

Brouzdová Jitka, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 224 322 603, e-mail: brouzdova@ueb.cas.cz

Brzobohatý Břetislav, Dr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 184, e-mail: brzoboha@ibp.cz

Burketová Lenka, Ing., CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00
tel.: 224 310 108, e-mail: burketova@ueb.cas.cz

Cvikrová Milena, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6, 165 02
tel.: 225 106 409, e-mail: cvikrova@ueb.cas.cz

Čeřovská Noemi, RNDr., CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00
tel.: 233 320 338, e-mail: cerovska@ueb.cas.cz

Čovanová Milada, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6, 165 02
tel.: 225 106 431, e-mail: covanova@ueb.cas.cz

Dadejová Martina, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 230, e-mail: dadejova@ibp.cz

Dědič Petr, Ing., CSc.

VÚB Havlíčkův Brod
Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 580 01
tel.: 569 466 232, e-mail: dedic@vubhb.cz

S Seznam účastníků

Dobrá Jana, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 00 tel.: 220 390 426, e-mail: dobra@ueb.cas.cz
Doležal Karel, Dr.	Univerzita Palackého Olomouc a ÚEB AV ČR Šlechtitelů 11, Olomouc, 783 71 tel.: 585 634 940, e-mail: dolezal@risc.upol.cz
Doležel Jaroslav, doc. Ing., DrSc.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 585 205 852, e-mail: dolezel@ueb.cas.cz
Dupláková Nikoleta, RNDr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 00 tel.: 225 106 452, e-mail: duplakova@ueb.cas.cz
Dvořáčková Martina, Mgr.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 549 495 601, e-mail: mdvorackova@ibp.cz
Eva Nocarová, RNDr.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 43 tel.: 221 951 707, e-mail: evanocarova@seznam.cz
Fajkus Jiří, doc. RNDr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 199, e-mail: fajkus@ibp.cz
Filová Jana	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno Zemědělská 1, Brno, 61300 tel.: 545 220 098, e-mail: filova10@seznam.cz
Fišerová Helena, Dr. Ing.	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 tel.: 545 133 015, e-mail: hfiser@post.cz
Flegel Martin, RNDr., CSc.	PolyPeptide Laboratories s r.o. Radiová 1, Praha 10, 102 27 tel.: 267 008 426, e-mail: martin.flegel@polypeptide.cz
Fojta Miroslav, doc. RNDr., CSc.	Biofyzikální ústav AVČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 197, e-mail: fojta@ibp.cz
Fojtová Miloslava, Mgr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 230, e-mail: fojtova@ibp.cz
Fulneček Jaroslav, Mgr., CSc.	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 230, e-mail: fulnecek@ibp.cz
Griga Miroslav, Dr.	Agritec Plant Research s.r.o. Zemědělská 2520/16, Šumperk, 787 01 tel.: 583 382 126, e-mail: griga@agritec.cz

S Seznam účastníků

Grunt Michal	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 44 tel.: 221 951 685, e-mail: grunt.m@centrum.cz
Hála Michal, RNDr., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 00 tel.: 225 106 458, e-mail: hala@ueb.cas.cz
Havel Ladislav, prof. RNDr., CSc.	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 tel.: +420 545 133 350, e-mail: lhavel@mendelu.cz
Havlíček Vladimír, doc. Ing. Dr.	Mikrobiologický ústav AV ČR Vídeňská 1083, Praha 4, 142 20 tel.: 241 062 786, e-mail: vlhavlic@biomed.cas.cz
Havlíčková Kamila	Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajинu a okrasné zahradnictví (VÚKOZ) Květnové nám. 391, Průhonice, 252 43 tel.: 605 205 999, e-mail: havlickova@vukoz.cz
Hejátko Jan, RNDr., Ph.D.	Masarykova univerzita Kamenice 5, Brno, 625 00 tel.: 549 494 165, e-mail: hejatko@sci.muni.cz
Holková Ludmila, RNDr.	Ústav pěstování a šlechtění rostlin a rostlinolékařství MZLU Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 tel.: 545 133 136, e-mail: holkova@mendelu.cz
Honyš David, RNDr., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 00 tel.: 225 106 450, e-mail: honys@ueb.cas.cz
Horáček Jiří, Dr.	Agritec Plant Research Zemědělská 2520/16, Šumperk, 787 01 tel.: 583 382 127, e-mail: horacek@agritec.cz
Hoyerová Klára, Ing., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 00 tel.: 225 106 436, e-mail: hoyerova@ueb.cas.cz
Hradilová Jana, Mgr.	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno Zemědělská 1, Brno, 613 00 tel.: 545 133 297, e-mail: janina@sci.muni.cz
Hronková Marie, Ing., Ph.D.	Biologické centrum AV ČR, UMBR Braníšovská 31, České Budějovice, 370 05 tel.: 387 775 519, e-mail: hronkova@umbr.cas.cz
Hrubá Martina	Biofyzikální ústav AV ČR Královopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 247, e-mail: hrubam@ibp.cz
Hřibová Eva, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 7, Olomouc, 772 00 tel.: 585 205 854, e-mail: hribova@ueb.cas.cz

S Seznam účastníků

Cháb David, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 420, e-mail: chab@ueb.cas.cz

Jandová Diana, Mgr.

Agritec Plant Research s.r.o.
Zemědělská 2520/16, Šumperk, 787 01
tel.: 583 382 135, e-mail: jandova@agritec.cz

Janoušek Bohuslav, Ph.D.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 736 130 232, e-mail: janousek@ibp.cz

Kamínek Miroslav, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6, 165 00
tel.: 225 106 445, e-mail: kaminek@eb.cas.cz

Kiran Nagavalli S., Ph.D.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 776 364 977, e-mail: kir'an@mendelu.cz

Klemš Marek, RNDr.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 545 133 296, e-mail: klems@mendelu.cz

Klíma Petr, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 431, e-mail: klima@ueb.cas.cz

Kolář Jan, Ph.D.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 414, e-mail: kolar@ueb.cas.cz

Kolouchová Tereza, Mgr.

Masarykova univerzita
Kamenice 5, Brno, 625 00
tel.: 549 494 165, e-mail: tereyka@atlas.cz

Kosař Michal, Ing.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 728 548 581, e-mail: michal.kosar@email.cz

Kovařík Aleš, RNDr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská, Brno, 612 65
tel.: 541 517 178, e-mail: kovarik@ibp.cz

Kreuz Lukáš, Ing.

Výzkumný ústav bramborářský s.r.o.
Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 580 01
tel.: 569 466 244, e-mail: kreuz@vuhb.cz

Křeček Pavel

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 431, e-mail: Krecek@ueb.cas.cz

Křížová Kateřina, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 129, e-mail: 13kaca@seznam.cz

S Seznam účastníků

Kubát Zdeněk, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: +420 541 517 203, e-mail: kubat@ibp.cz

Kubeš Martin, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 431, e-mail: kubes@ueb.cas.cz

Kuthanová Andrea, RNDr.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Albertov 6, Praha 2, 128 43
tel.: 221 951 707, e-mail: azelena@natur.cuni.cz

Laňková Martina, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 431, e-mail: lankova@ueb.cas.cz

Lenochová Zuzana, Mgr.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Albertov 6, Praha 2, 128 43
tel.: 221 951 697, e-mail: lenoska1@seznam.cz

Lexa Matěj, Ing.

Masarykova univerzita
Botanická 68a, Brno, 602 00
tel.: 549 495 765, e-mail: lexa@fi.muni.cz

Libus Jiří, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 604 796 329, e-mail: libus@ueb.cas.cz

Lochman Jan, Mgr.

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Kotlářská 2, Brno, 611 37
tel.: 549 495 602, e-mail: jlochman@seznam.cz

Macas Jiří, Dr.

Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05
tel.: 387 775 513, e-mail: macas@umbr.cas.cz

Macháčková Ivana, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 453, e-mail: machackova@ueb.cas.cz

Markoš Anton, doc.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Viničná 7, Praha 2, 128 44
tel.: 221 951 921, e-mail: markos@natur.cuni.cz

Marková Michaela, RNDr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 247, e-mail: m.markova@email.cz

Martinec Jan, RNDr., CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 416, e-mail: martinec@ueb.cas.cz

Matušínský Pavel, Ph.D.

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

S Seznam účastníků

Matyášek Roman, RNDr., CSc.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 230, e-mail: matyasek@ibp.cz

Mauleová Michaela, Ing.

Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129, Praha 6, 165 21
tel.: 224 383 785, e-mail: mauleova@fle.czu.cz

Michu Elleni, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 247, e-mail: michu@ibp.cz

Mikušová Zuzana, Ing.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 545 133 027, e-mail: ZMikusova@seznam.cz

Mokroš Petr, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 194, e-mail: mokros@ibp.cz

Moore Ian

Dept. Plant Sciences, University of Oxford
South Parks Rd., Oxford, OX1 3RB
tel.: +44 (0)1865 275 040, e-mail: ian.moore@plants.ox.ac.uk

Moravec Tomáš

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00
tel.: 224 310 108, e-mail: tmoravec@danforthcenter.org

Motyka Václav, Ing., CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 437, e-mail: vmotyka@ueb.cas.cz

Navrátilová Alice

Biologické centrum AV ČR, ÚMBR
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05
tel.: 387 775 511, e-mail: navratil@umbr.cas.cz

Novák Ondřej, Dr.

Univerzita Palackého Olomouc a ÚEB AV ČR
Šlechtitelů 11, Olomouc, 783 71
tel.: 585 634 859, e-mail: nowako@atlas.cz

Nováková Marie, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 426, e-mail: novakovam@ueb.cas.cz

Novotná Zuzana, Dr. Ing.

VŠCHT – FPBT Ústav biochemie a mikrobiologie
Technická 5, Praha 6, 166 28
tel.: 604 763 210, e-mail: zuzana.novotna@vscht.cz

Pánková Kateřina, Mgr.

Výzkumný ústav rostlinné výroby
Drnovská 507, Praha 6, 161 06
tel.: 233 022 331, e-mail: k.pankova@vurv.cz

Pařezová Markéta, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 431, e-mail: parezova@ueb.cas.cz

S Seznam účastníků

Patzak Josef, Ing. Ph.D.

Chmelařský institut s.r.o.
Kadaňská 2525, Žatec, 43846
tel.: 415 732 109, e-mail: j.patzak@telecom.cz

Pejchar Přemysl, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 136, Praha 6-Lysolaje, 16502
tel.: 296 780 418, e-mail: pejchar@ueb.cas.cz

Peška Vratislav, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR Laboratoř MKD
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 728 747 095, e-mail: vpeska@sci.muni.cz

Petrášek Jan, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 425, e-mail: petrasek@ueb.cas.cz

Pícková Denisa, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 449, e-mail: pickova@ueb.cas.cz

Pleskot Roman

Vysoká škola chemicko-technologická
Technická 5, Praha 6, 166 28
tel.: 604 179 263, e-mail: roman.pleskot@vscht.cz

Plchová Helena, Dr. rer. nat. Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 233 320 338, e-mail: plchova@ueb.cas.cz

Podhorská Radka, Ing.

Masarykova univerzita – Přírodovědecká fakulta
Kotlářská 2, Brno, 611 37
tel.: 549 491 454, e-mail: gabinan@sci.muni.cz

Potocký Martin, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 457, e-mail: potocky@ueb.cas.cz

Pouch Milan, Mgr.

Agrotest fyto, s.r.o.
Havlíčkova 2787, Kroměříž, 767 01
tel.: 573 317 113, e-mail: pouch@vukrom.cz

Prášil Ilja, Dr.

Výzkumný ústav rostlinné výroby
Drnovská 507, Praha, 161,6
tel.: 233 022 440, e-mail: Prasil@vurv.cz

Prokešová Zdeňka, Ing.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 545 133 188, e-mail: xprokes5@mendelu.cz

Ptáček Jiří, RNDr.

VÚB Havlíčkův Brod
Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 580 01
tel.: 569 466 231, e-mail: ptacek@vubhb.cz

Reňák David, Mgr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 451, e-mail: renak@ueb.cas.cz

S Seznam účastníků

Rotková Gabriela	Biofyzikální ústav AV ČR Kralovopolská 135, Brno, 612 65 tel.: 541 517 199, e-mail: rotkova@ibp.cz
Seifertová Daniela, Mgr.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02 tel.: 225 106 425, e-mail: seifertova@ueb.cas.cz
Simon Sibu, Mgr.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02 tel.: 225 106 425, e-mail: simon@ueb.cas.cz
Skůpa Petr, Ing.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6, 165 02 tel.: 225 106 431, e-mail: skupa@ueb.cas.cz
Smýkal Petr, Dr.	AGRITEC PLANT RESEARCH, s.r.o. Zemědělská 2520–16, ŠUMPERK, 787 01 tel.: 583 382 127, e-mail: smykal@agritec.cz
Sobotka Roman, Dr.	Ústav fyzikální biologie JU Zámek 136, Nové Hrady, 373 33 tel.: 384 722 268, e-mail: sobotka@alga.cz
Sofrová Danuše, prof. RNDr.	Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK Praha Albertov 2030, Praha, 128 40 tel.: 221 951 276, e-mail: sofrova@natur.cuni.cz
Solnická Pavla, Bc.	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno Olomoucká 585/43, Opava, 746 01 tel.: 776 099 886, e-mail: Pavla.Solnicka@seznam.cz
Soukup Aleš, RNDr., PhD.	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze Albertov 6, Praha 2, 128 43 tel.: 221 951 697, e-mail: asoukup@natur.cuni.cz
Soukupová Hana, Mgr., Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02 tel.: 225 106 449, e-mail: soukupova@ueb.cas.cz
Steinbauerová Veronika, Mgr.	Biologické centrum AVČR, ÚMBR Branišovská 31, České Budějovice, 370 05 tel.: 387 775 511, e-mail: veronika_s@centrum.cz
Strnad Miroslav, prof. Ing., CSc.	Univerzita Palackého Olomouc a ÚEB AV ČR Šlechtitelů 11, Olomouc, 783 71 tel.: 585 634 953, e-mail: strnad@aix upol.cz
Suchánková Pavla	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 585 205 859, e-mail: suchankova@ueb.cas.cz
Šafář Jan, Ph.D.	Ústav experimentální botaniky AV ČR Sokolovská 6, Olomouc, 772 00 tel.: 585 205 860, e-mail: safar@ueb.cas.cz

S Seznam účastníků

Šašek Vladimír, Ing.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00
tel.: 224 310 109, e-mail: vladimir.matej@volny.cz

Šimková Hana, Ing., CSc.

Ústav experimentální botaniky
Sokolovská 6, Olomouc, 772 00
tel.: 585 205 854, e-mail: simkovah@ueb.cas.cz

Šmídková Markéta, RNDr.

Ústav experimentální botaniky
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 224 322 603, e-mail: smidkova@ueb.cas.cz

Štajnrťová Olga

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 416, e-mail: stajnrtova@ueb.cas.cz

Štepigová Jana

Ústav exp. biologie, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Kotlářská 2, Brno, 611 37
tel.: 608 379 403, e-mail: pamba@sci.muni.cz

Štorchová Helena, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 433, e-mail: storchova@ueb.cas.cz

Šupálková Veronika, Ing., DiS.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: +420 545 133 350, e-mail: kizek@sci.muni.cz

Švábová Lenka, Dr.

Agritec Plant Research s.r.o.
Zemědělská 2520/16, Šumperk, 78701
tel.: 583 382 125, e-mail: svabova@agritec.cz

Talianová Martina, Mgr.

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 247, e-mail: talianka18@ibp.cz

Tichá Ingrid, doc. RNDr., CSc.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Za Viaduktem 4, Praha 7, 170 04
tel.: 220 875 934, e-mail: iticha@natur.cuni.cz

Tichý Martin

Jihočeská univerzita v ČB, Ústav fyzikální biologie
Zámek 136, Nové Hrady, 373 33
tel.: 384 722 268, e-mail: tichym@alga.cz

Vácha František, doc. RNDr., Ph.D.

Biologické centrum AV ČR
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05
tel.: 387 775 533, e-mail: vacha@jcu.cz

Vaňková Radomíra, RNDr.

Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 427, e-mail: vankova@ueb.cas.cz

Váňová Pavlína, Mgr.

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita
Zemědělská 1, Brno, 613 00
tel.: 545 133 297, e-mail: vanova@sci.muni.cz

S Seznam účastníků

- Veselková Štěpánka, Ing.
- Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 220 390 416, e-mail: veselkova@ueb.cas.cz
- Vítámvás Pavel, Mgr.
- Výzkumný ústav rostlinné výroby
Drnovská 507, Praha 6-Ruzyně, 161 06
tel.: 233 022 443, e-mail: vitamvas@vurv.cz
- Vítámvás Jan, Ing., Ph.D.
- Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129, Praha 6, 165 21
tel.: 224 383 785, e-mail: vitamvas@fle.czu.cz
- Vrbský Jan, Mgr.
- Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 194, e-mail: vrbsky@ibp.cz
- Vyskot Boris, prof. RNDr., DrSc.
- Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 240 500, e-mail: vyskot@ibp.cz
- Weger Jan, Ing.
- Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajину a okrasné zahradnictví (VÚKOZ)
Květnové nám. 391, Průhonice, 252 43
tel.: 296 528 327, e-mail: weger@vukoz.cz
- Wilhelmová Naďa, Dr.
- Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 224 310 109, e-mail: wilhelmove@ueb.cas.cz
- Žářský Viktor, RNDr., CSc.
- Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Viničná 5, Praha 2, 128 44
tel.: 220 390 457, e-mail: zarsky@ueb.cas.cz
- Zima Jan, RNDr., CSc.
- CHROMSPEC s.r.o.
Lhotecká 594, Mníšek pod Brdy, 252 10
tel.: 318 599 083, e-mail: zimachromspec@vol.cz
- Žižková Petra
- Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje, 165 02
tel.: 225 106 449, e-mail: zizkova@ueb.cas.cz
- Žlůvová Jitka, Ph.D.
- Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, Brno, 612 65
tel.: 541 517 247, e-mail: jitka@ibp.cz