



Ústav experimentální botaniky  
Akademie věd ČR

# VÝROČNÍ ZPRÁVA

za rok  
**2004**

Praha, leden 2005

## Výroční zpráva Ústavu experimentální botaniky AV ČR za rok 2004

### 1. VĚDECKÁ ČINNOST PRACOVIŠTĚ A UPLATNĚNÍ JEJÍCH VÝSLEDKŮ:

#### a) stručná charakteristika vědecké činnosti pracoviště:

Ústav experimentální botaniky AV ČR se zabývá základním a cíleným výzkumem v genetice, fyziologii, patofyziologii a biotechnologiích rostlin.

V roce 1999 byl formulován výzkumný záměr ústavu: Cílem výzkumného záměru ÚEB AV ČR je objasnit na modelových objektech základní molekulární a buněčné mechanismy v následujících oblastech: integrované působení fytohormonů a růstových regulátorů při řízení vývoje rostlin, regulace morfogeneze rostlinné buňky a úloha cytoskeletu a příslušných signálních drah, regulace buněčného cyklu a využití syntetických analogů fytohormonů k jeho inhibici a inhibici nádorového bujení; regulace ontogeneze samčího gametofytu: genové exprese, proteosyntézy a signálních drah; somatická a pylová embryogeneze, prašníkové kultury, produkce haploidů; organizace a funkce genomu na chromozómové úrovni, detekce regulačních genů, dynamika poškození a reparace genomové DNA pod vlivem stresů a mutagenů; faktory ovlivňující fotosyntézu a vodní režim ve stresových podmínkách; reakce rostlin na infekci a molekulární charakteristika virů. Výsledkem bude prohloubení znalostí v těchto oblastech a jejich možné biotechnologické aplikace.

V roce 2000 bylo na ÚEB zřízeno výzkumné centrum SIDROS (Signální dráhy rostlin, 2000-2004, LN00A081). Mimo to se ÚEB v roce 2004 podílel na řešení dvou klíčových projektů (KSK5020115 a KSK5052113).

#### b) výčet několika nejdůležitějších výsledků vědecké činnosti a jejich aplikací:

- 1 Byla vypracována původní metoda třídění jednotlivých ramen chromozómů ječmene. U diploidního ječmene nejsou telosomické linie vitální, a proto byly pro třídění použity speciálně připravené adiční linie pšenice-ječmen. Možnost získat purifikované frakce ramen chromozómů podstatně zjednoduší mapování genomu ječmene. V současné době jsou optimalizovány postupy pro fyzické mapování kódujících sekvencí pomocí sond připravených z tříděných ramen a jejich hybridizace na DNA čipech a pro tzv. HAPPY mapování. **B**
- 2 VLP's HPV16 L1h byly úspěšně produkovány z PVX a pTV vektorů jak v modelové *Nicotiana benthamiana*, tak v rajčeti, a byly získány jejich EM snímky. Produkováné VLP's indukují u myši buněčnou toxicitu (indukce T-lymfocytů) a protilátky imunitní odpovědi selektivně rozeznávají pouze nativní 3D uspořádání. HPV16 onkoprotein E7 je i při expresi v rostlinách agroinfekcí lokalizován v jádře. **B**
- 3 Analýza inzerčních mutantů *Arabidopsis* v genech pro Rab GDP disociační inhibitor (GDI) AtGDI1 a AtGDI2 ukázala, že homozygotní rostliny pěstované za obvyklých podmínek vypadají jako WT. Nepodařilo se získat žádné homozygoty s dvojitou mutací, což ukazuje, že dvojití mutanti nejsou životaschopní. Třetí gen AtGDI3 je specificky exprimován v pylu a dosud nebyla nalezena mutace v tomto genu. **B**
- 4 Z třešně byl izolován gen *PaLAX1* (*Prunus avium* – liše *AUX1*), který má vysokou míru homologie ke genu *AUX1* z *A. thaliana* kódujícímu pravděpodobný přenašeč auxinu do buňky. Byl popsán fenotyp odpovídající zvýšené expresi genu *PaLAX1* v rostlinách *A. thaliana* a tabáku, který má znaky typické pro rostliny s nadoptimální hladinou interního auxinu. **B**
- 5 Geny At1g07230 a At3g03530, které v *Arabidopsis thaliana* kódují proteiny podobné bakteriální fosfatidylcholin-specifické fosfolipáze C, byly klonovány do expresních vektorů pQE-32 (Qiagen) a pGEX-4T-2 (Pharmacia). Pomocí těchto vektorů byla zajištěna na N-konci fúzního proteinu His6 resp. GST kotva. **B**
- 6 Na úrovni regulace transkripce jsme dokončili analýzy transkriptomu a jeho změn během vývoje samčího gametofytu *Arabidopsis*. U rostlin tak byla vůbec poprvé popsána globální dynamika genové exprese v procesu ontogeneze na úrovni jediné buňky. Získaná data byla použita ke studiu funkce členů několika genových rodin, zejména membránových a stěnových bílkovin, aktivních v samčím gametofytu. **B**
- 7 Izoláty 54-15 *mop-top viru bramboru* (PMTV) mají velmi konzervovaný genom. Několik změn v nukleotidových i aminokyselinových sekvencích bylo zjištěno v RNA kódující proteiny "triple gene block" (TGB) a v "read-through" části obalového proteinu (CP). Fenotypová různost by mohla být soustředěna do této oblasti. Pro potvrzení nalezených změn byly osekvenovány oblasti pro TGB a read-through CP pro další izoláty, 54-19 a 54-10. Porovnání získaných sekvencí s databázemi potvrdilo velmi vysoký stupeň genetické stability a pomalou evoluci v populaci PMTV izolátů. Nejzajímavější evoluční událostí, kterou jsme zjistili, je zrušení čtvrtého ORF na RNA kódující TGB, který je u ostatních izolátů PMTV identifikován jako gen pro protein bohatý na cystein. **B**

- 8 Stanovením enzymových aktivit byla potvrzena totožnost glykoproteinů mikrospor tabáku 92 a 98 kDa s  $\beta$ -galaktosidázou a  $\beta$ -xylosidázou, odvozená porovnáním peptidových sekvencí s databází *Arabidopsis*. U *Arabidopsis* se podle microarray analýzy a RT-PCR RNA exprimují během vývoje mikrospor a pylu dva typy  $\beta$ -galaktosidáz. Rané (At 5g 20710 a At 1g 31740) jsou charakteristické pro mitotické mikrospory stejně jako homologický glykoprotein 92 kDa u tabáku. Pozdní geny (At 5g 56870, AT 2g 16730 a At 3g 35010) se exprimují ve zralém pylu a jsou homologické s dříve popsaným pozdním genem tabákového pylu Q 9FSF9. **B**
- 9 Byla studována ligandová specifita cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 a AHK3 za použití bakteriálních kmenů *Escherichia coli* exprimujících tyto receptory a semenáčků *Arabidopsis thaliana* s *ARR5::GUS* reportérovým genem. Oba receptory jsou citlivější k bázím isoprenoidních cytokininů, méně k aromatickým cytokininům. CRE1/AHK4 receptor je vysoce specifický a je citlivý pouze k bázím isoprenoidních cytokininů. AHK3 receptor navíc rozpoznává *cis*-zeatin, považovaný za neaktivní isomer, a také ribosidy isoprenoidních cytokininů. **B**
- 10 Při charakterizaci komplexu exocyst jsme získali prvního inzerčního mutanta *Arabidopsis*, který projevuje vývojové abnormality. Jedná se o mutanta v genu *Exo70A1*; homozygotní rostliny s touto mutací jsou menší, mají narušený reprodukční proces a odchylky ve vývoji kořene. Pomocí RNAi technologie jsme získali rostliny *Arabidopsis* s potlačenou expresí dalších podjednotek exocystu – *Sec3* a *Sec5*. Pomocí RT-PCR byl prokázán specifický pokles příslušných mRNA. **B**
- 11 Byla studována mikrobiální biodegradace TCA v jehličí, zjištěna degradace dekarboxylací a redistribuce TCA v sazenicích smrku. V systému rostlina/půda byl po experimentech ukazujících na mikrobiální degradaci ve fylosféře sledován příjem a distribuce TCA pomocí [1,2-<sup>14</sup>C]TCA. Byl potvrzen nejrychlejší příjem letošním jehličím, pak teprve jehličím C+1 a C+2. Byla studována chlorace půdní organické hmoty pomocí <sup>36</sup>Cl. Byl potvrzen vznik chloroctových kyselin (CAA) a vliv koncentrace chloridu, peroxidu a chloroperoxidázy. **B**
- 12 Transformovali jsme a selektovali rostliny exprimující konstrukt pro RNAi pro  $\gamma$ -tubulin. Protože se konstitutivní exprese pod 35S promotorem ukázala být nevhodná, přikročili jsme k překlónování do etanol-inducibilního systému. Získali jsme transformanty pro RNAi pro protein interagující s  $\gamma$ -tubulinem SPC 98 a pro samotný  $\gamma$ -tubulin. Samotná indukce etanolem se projevuje poměrně silným fenotypem s malformací kořenů a kořenových vlásků. Konstitutivní exprese RNA se vzhledem k nekontrolovatelné nadprodukci transkriptu ukázala být také nevhodná pro studium role Spc 98 i  $\gamma$ -tubulinu v organizaci mikrotubulárního cytoskeletu. Proto jsme přešli k dexametazon-inducibilní expresi. Podařilo se získat transgenní rostliny, reagující na indukci snížením hladiny cílových proteinů. **B**
- 13 Popsali jsme expresi PaVP1 u další embryogenní kultury *Picea abies* a ověřili tak, že vývoj somatických embryí je přímo spojen se zvyšující se hladinou PaVP1 mRNA. Exprese PaVP1 závisí na přítomnosti ABA v médiu. Po odebrání ABA z maturačního média exprese PaVP1 vymizela, což bylo spojeno s vitrifikací a následným rozpadem embryí. **B**
- 14 Po 90 dnech kultivace rostlin brambor na substrátu z lokality Střimice, obsahujícím vysokou koncentrací těžkých kovů (Cd 11,4; Cu 556; Pb 12190 a Zn 1292 mg.kg<sup>-1</sup>), bylo pomocí techniky komet prokázáno slabé, ale průkazné zvýšení poškození jaderné DNA v listech. Růst sledovaných rostlin byl silně inhibován. Zvýšení poškození DNA může být podmíněno nekrózou a apoptózou. **B**
- 15 Byla studována reparace DSB *Arabidopsis* mutantů deficientních v mechanismu NHEJ, o kterém se předpokládá, že je hlavní drahou reparace DSB DNA. Mutace nemá zásadní vliv na rychlost a rozsah reparace. **B**
- 16 Nově vyšlechtěné odrůdy jabloně s genetickou rezistencí *V<sub>r</sub>* byly přihlášeny k právní ochraně ve Švýcarsku (2 odrůdy) a v Německu (3 odrůdy s kompaktním charakterem růstu mutace McIntosh Wijcik), a k patentování v USA (2 odrůdy). Pokračovalo licenční množení odrůd ÚEB, zejména v zemích Evropské unie. Nové licenční smlouvy byly uzavřeny s firmami v ČR (5), Anglii (1), Francii (2), Nizozemí (1), Itálii (1), Jihoafrické republice (2), Maďarsku (1), Německu (3) a Švýcarsku (1). Opční smlouvy na novošlechtění ÚEB byly uzavřeny ve Francii a v Německu. V rámci smlouvy o podpoře výzkumu šlechtění jaderovin v ČR z r. 1996 mezi ÚEB a KSB (Konsortium Südtiroler Baumschuler GmbH.) bylo vyselektováno 13 novošlechtění jabloně odolných k chorobám a předáno ke 2. stupni zkoušení v Itálii. **C**
- 17 Byla licencována řada produktů zejména z oblasti protinádorových léčiv na bázi inhibitorů CDK (Cyclacel Ltd., C3 Bio GmbH.). Roskovitin, chráněný společným česko-francouzským patentem, ukončuje II. fázi klinického zkoušení v řadě Evropských zemí (pod názvem Celiciclib). Firma Cyclacel podala žádost o FDA Approval. Deriváty s antisenescenční aktivitou byly licencovány firmě Senetek Ltd., USA, která je v současné době zkouší preklinicky. Technologie na přípravu protilátek, imunodiagnostik a imunokitů byly licencovány firmě Olchemim, s.r.o. a AgroSlužby, s.r.o. Řada našich

- produktů se nachází v katalogích největších chemických firem, viz. např. olomoucín, bohemin, roskovitin, iso-olomoucín, isopropyl-olomoucín, olomoucín II, *meta*-, *ortho*-, a *para*-, a *methoxy*-topoliny, atd. (web: Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Alexis, Olchemim, a další). **C**
- 18** Naším původním postupem třídění chromozómů pomocí průtokové cytometrie byla připravena subgenomická knihovna specifická pro krátké rameno chromozómu 1B (1BS) pšenice klonovaná ve vektoru BAC. Jedná se o vůbec první BAC knihovnu specifickou pro určité rameno chromozómu. Ve srovnání s genomickou knihovnou pšenice má naše knihovna asi 30 x menší počet klonů, což umožní efektivní izolaci důležitých genů nacházejících se na 1BS. **B**
- 19** V rámci studia struktury a evoluce genomu banánovníku (*Musa* spp.) bylo izolováno a charakterizováno 200 klonů z vysoce repetitivní frakce genomické DNA *Musa acuminata*. Většina sekvencí představovala mobilní genetické elementy; 42 % sekvencí nevykazovalo žádnou homologii se známými sekvencemi DNA. Genomická distribuce vybraných sekvencí byla určena pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s mitotickými chromozómy. **B**
- 20** Při analýze hormonálního stavu rostlin bramboru v průběhu jejich vývoje a skladování hlíz byly zjištěny dramatické rozdíly v hladinách cytokininů mezi jednotlivými odrůdami. Hlavním cytokininem ve všech odrůdách je isopentenyladenin-N7-glukosid a zeatin-N7-glukosid. Hlízy ze sklizně po desikaci mají nižší obsah cytokininů. Ve vegetativním stádiu je vysoký obsah cytokininů v listech a stolonech. **B**
- 21** Přirozená a tmou indukovaná senescence děloh okurky, jakož i její experimentálně navozené regrese, jsou spojeny s odlišnou dynamikou různých forem cytokininů, a to zejména jejich O-glukosidů. Účinek exogenních cytokininů lze inhibicí N-glukosylace prodloužit (zejména u ředkvičky, kde je N-glukosylace dominantní drahou), v případě „poolu“ endogenních cytokininů je inhibice jedné deaktivací dráhy kompenzována aktivací drah jiných. Kyselina jasmonová, která naopak senescenci urychluje, způsobuje pokles hladiny fyziologicky aktivních cytokininů. Působení kyseliny jasmonové na senescenci může být alespoň zčásti zprostředkováno cytokininy. **B**
- 22** Podrobně byly charakterizovány EPP částice dříve popsané v naší laboratoři. Ribonukleoproteinové komplexy translačně blokovanych mRNA obsahují malou ribozomální podjednotku a jejich hmotnost je větší než 500 000 kDa. Byla potvrzena jejich vazba na aktinový cytoskelet, byla provedena analýza vztahu cytoskeletu a translace, a studovány projevy stresu na cytoskeletální úrovni. **B**
- 23** Charakterizace Rab eskort proteinu (REP) pokračovala studiem cytoplasmatické lokalizace GFP-fúze po infiltraci do listů *Nicotiana benthamiana* a studiem stimulačního účinku rekombinantního AtREP na geranylgeranylaci *in vitro* při použití různých Rab GTPáz jako substrátu (N-terminální His-tag bílkovina byla na rozdíl od C-terminální neaktivní). Dále pokračovala charakterizace další podjednotky geranylgeranyl transferasyII (GGTasyII) – podjednotky katalytického dimeru beta. **B**
- 24** Při studiu funkce různých izoenzymů PLD (fosfolipáz D) byla v laboratoři zavedena technika využití transfekce klíčících pylových láček modifikovanými antisense-oligonukleotidy, která umožňuje specificky potlačovat genovou expresi jednotlivých PLD v pylových láčkách. Touto technikou se podařilo identifikovat PLD, která s největší pravděpodobností ovlivňuje dynamiku mikrotubulů. Pokusy se specifickým inhibitorem ovšem ukazují, že PLD jsou také zapojeny do řízení dynamiky aktinového cytoskeletu. **B**
- 25** V chloroplastech tabáku se zvýšenou expresí genu *ZOG1* kódujícího zeatin O-glukozyltransferázu, na rozdíl od listů, nebyla pozorována akumulace zeatin O-glukosidu. Cytokinin O-glukosidy se hromadí v jiných buněčných organelách, zřejmě ve vakuolách. **B**
- 26** Devět axenických klonů mikrořas (*Chlorophyta*) ze 3 rodů (*Protococcus*, *Chlorella*, a *Scenedesmus*) bylo analyzováno na obsah endogenních cytokininů. Všechny řasy vykazovaly podobné cytokininové profily, avšak koncentrace jednotlivých metabolitů se výrazně lišily. Isopentenyladenin a isopentenyladenosin byly nejčastěji zastoupeny; *cis*-zeatin a *cis*-zeatin ribosid se vyskytovaly v mnohem vyšších koncentracích než *trans* isomery. Podařilo se i prokázat výskyt aromatických cytokininů. **B**
- 27** Hladiny volného putrescinu a spermidinu vzrůstají v synchronizované buněčné kultuře tabáku BY-2 v průběhu S a G2-fáze, což koreluje se zvýšením aktivit syntetických enzymů (ODC a SAMDC). S nárůstem mitotické aktivity buněk se hladiny volných polyaminů snižovaly a v oblasti nejvyšší mitotické aktivity buněk bylo nalezeno maximum diaminoxidázy. **B**
- 28** Geny pro obalový protein A viru bramboru (PVACP) a pro různé kombinace PVACP + epitopy ze strukturních a nestrukturních proteinů (E7 +L2) lidského papilloma viru HPV-16 byly vloženy do vektorového systému založeného X viru bramboru (PVX) pro transientní systémovou infekci a expresi výše zmíněných konstruktů v tabáku. U všech vytvořených konstruktů byla pomocí RT PCR prokázána syntéza RNA a pomocí specifických protilátek i exprese uvedených proteinů v rostlinách. **B**
- 29** Auxiny modulují schopnost buněk exportovat auxiny samotné, což ukazuje, že auxiny regulují buněčné

procesy nejen na úrovni regulace exprese určitých genů, ale také přímo regulací dějů probíhajících na úrovni plasmatické membrány - pravděpodobně inhibicí endocytózy. **B**

- 30** Termostabilní glykoproteiny (TGP) pylu tabáku 64 kDa (pI = 6-7), 59 kDa (pI = 4,5), 55 kDa (pI = 6-7) a 50 kDa (pI = 6-7) byly charakterizovány podle afinity k lektinům jako N-glykoproteiny vysoce manosového či hybridního typu s lokalizací v cytosolické frakci. Spektrum peptidů TGP 59 kDa odpovídá calreticulínu. To bylo potvrzeno detekcí bílkoviny protilátkou proti lidskému calreticulínu a RT-PCR analýzou mikrosporové a pylové RNA. K expresi calreticulínu dochází u tabáku ve všech fázích vývoje samčího gametofytu. **B**
- 31** U transgenních tabáků s vneseným genem pro isopentenyltransferázu, který je řízen promotorem pro senescenční gen SAG<sub>12</sub>, je u starých listů při nástupu senescence zvýšená hladina cytokininů. V těchto listech na rozdíl od kontrolních rostlin jsou zvýšené aktivity superoxidodismutázy, katalasy, askorbátperoxidázy a glutathionreduktázy. Zároveň fotochemická účinnost v těchto listech neklesá se stářím listu, ale je zvýšena. **B**
- 32** Volné baze cytokininů (zeatinu a izopentenyladeninu) fixované formaldehydem v listech transformovaných rostlin tabáku *Nicotiana tabacum* L. se změněným metabolismem cytokininů byly imunolokalizací detekovány v cévních svazcích a ve fotosyntetizujícím pletivu, zejména v palisádovém parenchymu. V ranných stádiích somatické embryogeneze *Picea abies* byly tyto cytokiny detekovány v meristematických centrech a v pozdějších stádiích v prokambiu, kortexu a kořenové části. **B**

### **c) nejvýznamnější popularizační aktivity pracoviště**

Den otevřených dveří (10. listopadu 2004) na pracovišti Lysolaje (60 návštěvníků), v olomouckém pracovišti jsou pořádány pravidelné exkurze studentů gymnázií i mimo Den otevřených dveří.

Populárně vědecké články v časopisech (Bramborářství, Živa, Vesmír). Popularizační přednáška „Biologické hodiny“ v rámci cyklu Akademická kavárna. Příspěvek o biologických rytmech a fotoperiodizmu rostlin do pořadu Planetárium, Český rozhlas. Popisy deseti odrůd jabloně vyšlechtěných v ÚEB v Katalogu nových odrůd 2004 školkařské firmy FYTOS Plzeň.

Zpracování podkladů pro článek o vývoji vědy v ČR pro redaktora P. Huntera pro časopis The Scientist.

### **d) domácí a zahraniční ocenění zaměstnanců pracoviště:**

Na 10. Fyziologických dnech v Bratislavě byla udělena Cena Dr. Márie Luxové za plakátovou prezentaci Renatě Pechové. Na konferenci INBISCO 2004, Riga, Lotyšsko byla oceněna prezentace Davida Reňáka jako nejlepší přednáška akce. Na Mezinárodním kongresu FESPB v Krakově byla udělena 1. cena v kategorii Buněčná biologie posteru autorů Potocký *et al.*

Jaroslav Doležel byl zvolen řádným členem Učené společnosti České republiky a získal Bronzovou medaili za zásluhy o rozvoj Univerzity Palackého v Olomouci. Cenu Učené společnosti České republiky v kategorii vědeckých pracovníků obdržel Miroslav Strnad.

### **e) další specifické informace o pracovišti, o změnách v jeho struktuře a vědecké orientaci, o výsledcích atestací a o překážkách a problémech v činnosti pracoviště:**

V roce 2004 byla hodnocena činnost ústavu za období 1999 - 2003 a nový předkládaný vědecký záměr. Na základě mezinárodního hodnocení byl nový záměr přijat a ústav byl hodnocen v nejvyšší kategorii 1a.

V roce 2004 proběhly v ÚEB pravidelné atestace, atestováno bylo celkem 45 VŠ pracovníků.

## **2. VĚDECKÁ A PEDAGOGICKÁ SPOLUPRÁCE PRACOVIŠTĚ S VYSOKÝMI ŠKOLAMI**

Jmenovité zhodnocení všech významných spoluprací pracoviště s tuzemskými vysokými školami:

### **a) nejvýznamnější vědecké výsledky ústavu vzniklé v další spolupráci s vysokými školami:**

Nejvýznamnější výsledky spolupráce s vysokými školami jsou uvedeny v části 1b pod čísly 10, 11, 13, 14, 22, 24.

### **b) nejvýznamnější výsledky činnosti výzkumných center a dalších společných pracovišť ústavu s vysokými školami:**

Nejvýznamnější výsledky činnosti výzkumného centra *Signální systémy u rostlin* za rok 2004 jsou uvedeny v části 1b pod čísly 3, 4, 5, 10, 13, 21, 23, 24, 25, 27, 32.

Nejdůležitější výsledky společného pracoviště ÚEB a University Palackého v Olomouci jsou uvedeny v části 1b pod čísly 9, 17, 26.

**c) informace o spolupráci s VŠ na uskutečňování doktorských studijních programů (DSP) a magisterského a bakalářského studia:**

Pracovníci ÚEB jako školitelé vedli v roce 2004 24 diplomových a 70 doktorských prací. 8 doktorandů úspěšně obhájilo, 14 nových bylo do DSP přijato.

ÚEB má společnou akreditaci (1 a 3) či smlouvu (2) o uskutečňování DSP:

- 1) s PřFUK Praha pro studijní program BIOLOGIE: studijní obory: Molekulární a buněčná biologie, Genetika a virologie,
  - 2) s VŠCHT v Praze pro studijní program BIOCHEMIE A BIOTECHNOLOGIE: studijní obor Biotechnologie, a studijní program CHEMIE: studijní obor Biochemie,
  - 3) s PřFUP Olomouc pro doktorský studijní program BIOLOGIE: studijní obor Botanika.
- Mimo to ÚEB spolupracuje s AF ČZU v Praze.

**3. SPOLUPRÁCE PRACOVIŠTĚ S DALŠÍMI INSTITUCEMI A S PODNIKATELSKOU SFÉROU**

Zhodnocení spolupráce s dalšími mimovysokoškolskými výzkumnými a mimoakademickými pracovišti:

**a) společné projekty výzkumu a vývoje podpořené z veřejných prostředků:**

V roce 2004 bylo řešeno celkem 16 projektů (seznam uveden v příloze 1). Nejvýznamnější výsledky jsou shrnuty v části 1b pod čísly 1, 7, 20, 21.

**b) výsledky výzkumu a vývoje pro ekonomickou sféru na základě hospodářských smluv:**

Výzkum se v roce 2004 opíral o několik desítek uzavřených hospodářských smluv (převážná část z nich se týká šlechtění jabloní). Za nejvýznamnější aktivity v této oblasti považujeme šlechtění jabloní (výsledek č. 16 v části 1b), produkci inhibitorů CDK (výsledek č. 17 v části 1b) a vydávání vědeckých časopisů *Biologia Plantarum* a *Photosynthetica* (příloha 2).

**c) nové firmy, které vznikly na základě výsledků činnosti ústavu v oblasti aplikovaného výzkumu:**

Žádné.

**d) odborné expertizy zpracované v písemné formě pro státní orgány a instituce:**

Několik desítek posudků návrhů projektů pro GAČR, GA AV ČR, GA PřFUK, NAZV, Agenturu na podporu vedy SAV, GA MŠ SR, NATO Science Fellowships Programme, VAJP. Více než sto oponentních posudků publikací v časopisech domácích i zahraničních (hlavně Biol. Plant., Photosynthetica, Plant Production, Physiol. Plant., Mikrobiologia, Agr. Ecosyst. Environm., J. of Phytopathol. a další). Oponentní posudky diplomových a doktorských prací, dílčích i závěrečných zpráv nejrůznějších projektů.

**4. MEZINÁRODNÍ VĚDECKÁ SPOLUPRÁCE PRACOVIŠTĚ**

Informace o významných mezinárodních vědeckých spolupracích pracoviště:

**a) přehled mezinárodních projektů, které pracoviště řeší v rámci mezinárodních vědeckých programů:**

Seznam je uveden v příloze 3.

**b) nejvýznamnější vědecké výsledky dosažené v rámci mezinárodní spolupráce:**

Nejvýznamnější výsledky jsou shrnuty v části 1b pod čísly 1, 2, 3, 6, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 29.

**c) akce s mezinárodní účastí, které pracoviště organizovalo nebo v nich vystupovalo jako spolupořadatel:**

Spolu s GSF National Center for Environment and Health, Institute for Soil Ecology, Neuherberg, byl zorganizován workshop "Occurrence and Fate of Organohalogenes in the Environment: Chloroacetic Acids in the European Forest Ecosystem" v Garmisch-Partenkirchen ve dnech 24.-26.10.2004 za podpory GSF, ÚEB a Čs.-něm. Fondu budoucnosti. Účastníků 23, z toho 5 ČR, 9 SRN, 3 GB, 2 Maďarsko, 2 Švédsko.

**d) výčet jmen nejvýznamnějších zahraničních vědců, kteří navštívili pracoviště AV ČR:**

Výčet jmen významných hostů, kteří navštívili naše pracoviště, je uveden v příloze 4.

**e) počet fungujících meziústavních dvoustranných dohod:**

Žádné.

---

## VÝROČNÍ ZPRÁVA ÚEB AV ČR ZA ROK 2004

text vlastní zprávy (body 1- 4)

### **Přílohy:**

#### **A. přílohy k textu zprávy**

- 1) příloha 1 k bodu 3a (výčet řešených projektů ve spolupráci s mimoakademickými mimoškolskými výzkumnými subjekty)
- 2) příloha 2 k bodu 3 b (vydávané vědecké časopisy)
- 3) příloha 3 k bodu 4a (projekty se zahraničními partnery)
- 4) příloha 4 k bodu 4d (seznam vědeckých návštěv v roce 2004)

#### **B. kvantitativní údaje o pracovišti**

- 1) 2A (vědečtí pracovníci)
- 2) 2B (údaje o mezinárodní vědecké spolupráci)
- 3) 2C (přehled o počtech vynálezů, patentů...)

#### **C. text tří anotací**

- 1) Doležel: Analýza genomu pšenice pomocí tříděných chromozómů
- 2) Angelis: Reparace dvojláknových zlomů DNA v rostlinách
- 3) Žárský: Kyselina fosfatidová (PA) produkovaná fosfolipázami D (PLD) se účastní regulace buněčné expanse rostlin

V Praze dne 7. ledna 2005

---

RNDr. Ivana Macháčková, CSc.  
ředitelka ÚEB AV ČR

---

RNDr. Radomíra Vaňková, CSc.  
předsedkyně VR ÚEB AV ČR

**PŘÍLOHA 1** k Výroční zprávě ÚEB AV ČR za rok 2004:

**Seznam projektů řešených ve spolupráci s mimoakademickými mimovysokoškolskými partnery:**

<i>poskytovatel</i>	<i>číslo</i>	<i>partner</i>	<i>název</i>	<i>řešitel (spoluřešitel)</i>
Grantová agentura AV ČR	IBS5038352	VÚB Havlíčkův Brod	Vitalita sadbových brambor ve vztahu k agroekologickým faktorům a obsahu endogenních hormonů	Macháčková Ivana
Grantová agentura AV ČR	IBS4055014	Agritec Šumperk	Radiofytoemediace a radiofytomonitoring	Vágner Martin
Grantová agentura ČR	GA522/04/1329	VÚB Havlíčkův Brod	Molekulárně biologická charakterizace, detekce a funkční analýza mop-top viru bramboru (PMTV)	Filigarová Marie
Grantová agentura ČR	GA206/04/0999	VÚLHM Strnady	Studium obranných mechanismů smrku ztepilého na napadení houbovými patogeny ( <i>Ascochyta blight</i> , <i>Sirococcus strobilinus</i> , <i>Phoma</i> sp. aj.)	Cvikrová Milena
Grantová agentura ČR	GA301/02/0475	Ministerstvo obrany	Protinádorové a antimetastatické látky na bázi purinových inhibitorů cyklin-dependentních kinas	Strnad Miroslav
Grantová agentura ČR	GA521/02/0479	VÚRV Praha	Užití živin u různých druhů pšenice a její projev v kvalitě zásobních bílkovin	Franěk František
Grantová agentura ČR	GA522/01/1121	VÚB Havlíčkův Brod	Identifikace mop-top viru bramboru (PMTV) založená na detekci virových proteinů	Filigarová Marie
Grantová agentura ČR	GA522/02/0530	VÚRV Praha	Hormonální regulace senescence listů a její vztah k využití dusíku u obilnin	Kamínek Miroslav
Grantová agentura ČR	GA521/03/1380	Sativa Keřkov, a.s., VÚB Havlíčkův Brod	Dva způsoby vedoucí ke snížení obsahu redukujících cukrů ve skladovaných bramborových hlízách	Navrátil Oldřich
Grantová agentura ČR	GA521/03/0113	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.	Studium přenosu, stabilizace a exprese translokací 1R.1D 5+10 u tritikale ve vztahu k prolaminovým bílkovinám a kvalitě zrna	Ohnoutková Ludmila
MPO ČR	PZ-Z2/29	LACHEMA a.s., Brno	Nová léčiva pro terapii nádorových onemocnění	Strnad Miroslav
MZ ČR	QF4176	VÚRV Ruzyně	Omezení negativního vlivu abiotických stresů na příjem a využití živin obilovinami	Motyka Václav
MZ ČR	QF4133	Sativa Keřkov, a.s., Selekta Pacov, a.s., Vesa Velhartice, a.s., VÚB Havlíčkův Brod	Tvorba výchozích šlechtitelských materiálů s geny horizontální rezistence k plísni bramborové	Vagera Jiří
MZ ČR	QC 1336	Chmelařský institut s.r.o., VÚRV	Vývoj nových metod pro monitorování diverzity a hodnocení genových zdrojů a zhodnocení jejich potenciálu	Doležel Jaroslav
MZ ČR	QE 1093	ZVÚ KROMĚŘÍŽ, s.r.o., VÚPS, Obchodní sladovny a.s.	Studium a tvorba nových genotypů dvouřadého ozimého sladovnického ječmene pro potřeby sladovnického průmyslu klasickými a biotechnologickými metodami	Ohnoutková Ludmila
MZ ČR	QE 1174	VÚB Havlíčkův Brod, Solana, VÚRV Praha, VÚZT	Rozhodovací systémy pro optimalizaci produkce a kvality konzumních brambor a pro jejich uplatnění na trhu	Macháčková Ivana



## **PŘÍLOHA 2** k Výroční zprávě ÚEB za rok 2004:

### **Ediční činnost**

#### **Biologia Plantarum**

Mezinárodní časopis, který publikuje původní články, přehledné články, krátká sdělení a recenze knih spadajících do všech odvětví experimentální botaniky od molekulární biologie, biotechnologie až po vztahy rostlina – prostředí. Časopis je vydáván ÚEB. Editorem je RNDr. Jiří Čatský, CSc., výkonným editorem RNDr. Jana Pospíšilová, CSc. Časopis je šířen vydavatelem a nakladatelstvím Kluwer Academic Publisher Group, Dordrecht, Nizozemí. Časopis vychází čtvrtletně, články jsou psány v angličtině. Bližší informace a obsah jsou k dispozici na adrese: [www.ueb.cas.cz/bp/bp.htm](http://www.ueb.cas.cz/bp/bp.htm).

#### **Photosynthetica**

Mezinárodní časopis zaměřený na výzkum fotosyntézy, který publikuje přehledné články, původní články, krátká sdělení z oboru biofyzika, biochemie, fyziologie a ekologie fotosyntézy. Obsahuje i recenze knih, bibliografie přehledných článků a metodologických prací všech oblastí rostlinné fyziologie. Photosynthetica je nejstarší časopis specializovaný na fotosyntézu. Časopis je vydáván ÚEB. Editorem je RNDr. Zdeněk Šesták, DrSc. Časopis je šířen vydavatelem a nakladatelstvím Kluwer Academic Publisher Group, Dordrecht, Nizozemí. Časopis vychází čtvrtletně, články jsou psány v angličtině. Bližší informace a obsah jsou k dispozici na adrese: [www.ueb.cas.cz/ps/ps.htm](http://www.ueb.cas.cz/ps/ps.htm).

<b>ROK</b>	<b>Impakt faktor</b>	
	<b><i>Biologia Plantarum</i></b>	<b><i>Photosynthetica</i></b>
<b>1995</b>	<b>0.30</b>	<b>0.52</b>
<b>1996</b>	<b>0.41</b>	<b>0.66</b>
<b>1997</b>	<b>0.39</b>	<b>0.94</b>
<b>1998</b>	<b>0.57</b>	<b>0.66</b>
<b>1999</b>	<b>0.41</b>	<b>0.73</b>
<b>2000</b>	<b>0.42</b>	<b>0.48</b>
<b>2001</b>	<b>0.43</b>	<b>0.81</b>
<b>2002</b>	<b>0.58</b>	<b>0.77</b>
<b>2003</b>	<b>0.92</b>	<b>0.66</b>

#### **Photosynthesis Bibliography**

Bibliografie zahrnuje práce ze všech oblastí fotosyntézy – od studií na modelových biochemických a biofyzikálních systémech fotosyntetických mechanismů až po primární produkci studovanou metodami růstové analýzy. Každý svazek obsahuje 4000 – 5000 citací, a rejstříky autorů, předmětů a vědeckých názvů rostlin. V každém pátém svazku je kumulativní rejstřík. Editory jsou RNDr. Zdeněk Šesták, DrSc. a RNDr. Jiří Čatský, CSc.

### **PŘÍLOHA 3** k Výroční zprávě ÚEB za rok 2004:

#### Programy COST:

OC844.10	Franěk František RNDr. DrSc.	01.07.2000	31.12.2004
OC843.50	Vágner Martin RNDr. CSc.	01.07.2000	31.12.2004

#### Programy KONTAKT:

ME406	Vaňková Radomíra RNDr. CSc.	01.01.2001	31.12.2003
ME433	Ohnoutková Ludmila Ing. PhD.	01.01.2001	31.12.2003
ME434	Ohnoutková Ludmila Ing. PhD.	01.01.2001	31.12.2003
ME505	Motyka Václav Ing. CSc.	01.01.2002	31.12.2004
ME527	Doležel Jaroslav Ing. CSc.	01.08.2002	31.12.2004
ME528	Doležel Jaroslav Ing. CSc.	01.08.2002	31.12.2004
ME534	Angelis Karel RNDr. CSc.	01.08.2002	31.12.2004

#### Programy INTAS:

INTAS 602	Macháčková Ivana RNDr. CSc.	01.01.2002	31.12.2004
-----------	-----------------------------	------------	------------

#### Další mezinárodní programy a projekty:

MŠMT2001/007	Zažimalová Eva RNDr. CSc.	01.01.2002	31.12.2004
CNRS: QAEF16678:	Angelis Karel RNDr. CSc.	01.01.2002	31.12.2004
Cyclacel 20671	Strnad Miroslav Prof. Ing. CSc.	01.01.2001	31.12.2005
I/76865 Volkswagen Stiftung	Strnad Miroslav Prof. Ing. CSc.	01.01.2001	31.12.2004
DFG GSF FE-74413	Matucha Miroslav RNDr. CSc.	01.01.2000	31.12.2004

#### **Výzkum je dále zabezpečován na základě smluv se zahraničními partnery:**

- Společná licenční smlouva s CNRS a fa. Cyclacel – roskovitinový patent WO 97/20842 (od 1999)
- Smlouva o spolupráci s fa. Senetek, USA (od 2003)
- Smlouva o spolupráci s Max-Planck Institut for Biochemistry, Martiensried, Německo (od 2003)
- Smlouva o spolupráci s Cornell Univ., USA
- Gie Star Fruits, Contrat de sponsoring et licence, Francie
- Henri Fleuren b.v., Sponsored Research Agreement, Nizozemí
- Konsortium Südtiroler Baumschuller (KSB), Vertrag über Unterstützung von Züchtungsforschung bei Kernobst in der Tschechischen Republik, Itálie
- Robustplant, Sponsored Research Agreement, Švýcarsko
- Smlouva o spolupráci s GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH, Neuherberg ("Verhalten von Chloressigsäuren im System Jungfichte/Boden mit Hilfe von radioaktiv markierten Verbindungen", 2000-2004)
- C3 Bio – smlouva o vývoji nových protinádorových látek na bázi derivátů cytokininů (2004-2007)

#### **PŘÍLOHA 4** k Výroční zprávě ÚEB za rok 2004:

Jména významných zahraničních hostů, kteří navštívili v roce 2004 ÚEB:

Prof. H. van Onckelen	Univ. Antwerpen	Belgie
Prof. Koen Goethals	Univ. Gent	Belgie
Dr. Wim Temmerman	Univ. Gent	Belgie
Dr. Charles White	CNRS UMR6547-Biomove, 63177 Aubiere	Francie
Prof. Charles White	Université Blaise Pascal, Paris	Francie
Dr. Pierre Sourdille	Catherine Feuillet, INRA	Francie
AmitGal-On Ph.D	Institute of Plant Protection, Volcani Center-ARO	Izrael
Prof. Aliza Benzioni	Ben Gurion University, Beer Sheva	Izrael
Prof. Lorenzo Pinna	Univ. Milan	Itálie
Prof. J. van Staden	Research Centre for Plant Growth and Development, University of Kwazulu-Natal	Jihoafriká republika
Dr. Karoly Boka	Eotvos Lorand University, Budapest	Maďarsko
Dr. Peter Ott	Institute of Plant Protection, Budapest	Maďarsko
Prof. Vince Ördög	West Hungarian Univ.	Maďarsko
Prof. Istvan Gyurján	Eotvos Lorand University, Budapest	Maďarsko
Prof. Jutta Ludwig-Müller	Univ. Dresden	Německo
Dr. Jiří Friml	ZMBP, Universität Tübingen	Německo
Prof. Jan Barciszewski	Instit. Bioorganic Chemistry, Poznaň	Polsko
Dr. Zdeno Šubr, CSc.	Virologický ústav SAV	Slovensko
Priv. Doz. Dr. Martin Müller	DKFZ, D-69120 Heidelberg	SRN
Dr. Andeas Tobler	Senetek PLC	USA
Prof. Carol Auer	University of Connecticut Storrs	USA
Dr. Michael J. Plewa	University of Illinois at Urbana-Champaign	USA
Dr. Tim Close	University of California,	USA
Dr. Adam Lukaszewski	University of California	USA
Dr. David J. Leader	Rothamsted Research Centre	Velká Británie
Dr. John Snape	John Innes Centre	Velká Británie

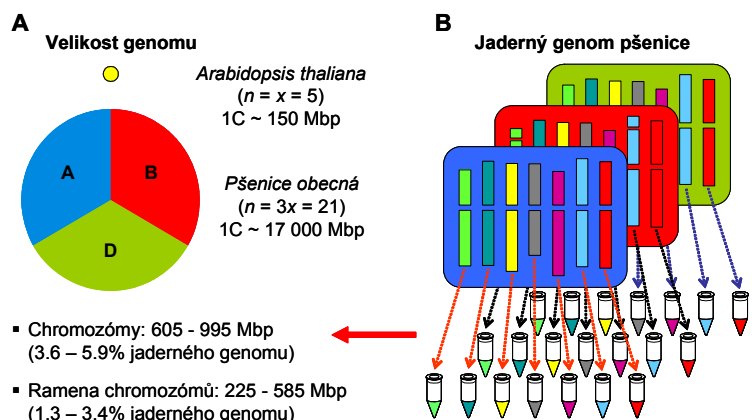
## ANALÝZA GENOMU PŠENICE POMOCÍ TŘÍDĚNÝCH CHROMOZÓMŮ

Jaroslav Doležel a kolektiv

Většina dědičné informace rostlin i živočichů je uložena v buněčném jádře ve formě chromozómů. Je zajímavé, že množství jaderné DNA, která tuto informaci nese, neodpovídá složitosti organismu. Zatímco jedna úplná kopie této informace (jaderný genom) je u člověka představována asi třemi miliardami párů bází DNA, genom mnoha rostlin je podstatně větší. Tak je tomu i u nejdůležitější zemědělské plodiny, pšenice obecné, jejíž genom představuje sedmáct miliard párů bází. Analýza tak obrovského genomu je nesmírně obtížná a nákladná nejen díky jeho velikosti, ale také proto, že vznikl postupným křížením tří planých druhů trav s podobnými genomy, označovanými jako A, B a D.

S cílem tuto analýzu zjednodušit jsme vypracovali původní metodu umožňující izolovat malé a definované části genomu pšenice. Metoda je založena na přípravě suspenzí chromozómů, které jsou pomocí laserové průtokové cytometrie velkou rychlostí analyzovány a klasifikovány podle obsahu DNA. Současně s analýzou je možné vybraný typ chromozómu oddělovat od ostatních a získávat čisté frakce jednotlivých typů chromozómů nebo jejich ramen. Vzhledem k tomu, že chromozómy představují pouze zlomek celého genomu pšenice, využití jejich DNA umožňuje zásadní zjednodušení jeho analýzy.

V návaznosti na tento výsledek jsme zjistili, že DNA tříděných chromozómů je intaktní a měla by tedy být vhodná pro konstrukci knihoven DNA. Tyto knihovny jsou tvořeny souborem fragmentů DNA o velikosti asi sto tisíc párů bází, které reprezentují celý genom a jsou klíčovým materiálem pro sekvenování a izolaci genů. Úspěšná konstrukce tří knihoven DNA z tříděných chromozómů pšenice\* znamenala nejen potvrzení této hypotézy, ale především získání unikátních materiálů pro genomiku pšenice. V současné době jsou knihovny využívány při mapování genomu a studiu jeho evoluce a pro izolaci zemědělsky významných genů.



Obr. Srovnání velikosti jaderného genomu (1C) modelové rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), který již byl téměř celý sekvenován, a genomu pšenice obecné, který je tvořen třemi subgenomy (A, B a D) po sedmi chromozómech (A). DNA jednotlivých tříděných chromozómů představuje pouze 3 - 6% celého genomu pšenice (B). Ještě menší části genomu lze získat tříděním ramen chromozómů, jejichž velikost se blíží velikosti genomu *A. thaliana*.

Janda J., Bartoš J., Šafář J., Kubaláková M., Valárik M., Číhalíková J., Šimková H., Caboche M., Sourdille P., Bernard M., Chalhoub B., Doležel J.: Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. – *Theor. Appl. Genet.* 109: 1337-1345, 2004.

Kubaláková M., Vrána J., Číhalíková J., Šimková H., Doležel J.: Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). – *Theor. Appl. Genet.* 104: 1362-1372, 2002.

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.: Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. – *Plant J.* 39: 960-968, 2004.

\*Spolupráce s Dr. Boulos Chalhoub (*Unité de Recherches en Génomique Végétale, Évry, France*)

## ANALYSIS OF THE WHEAT GENOME USING FLOW-SORTED CHROMOSOMES

Jaroslav Doležel et al.

A majority of heritable information in plants and animals is localized in the cell nucleus in the form of chromosomes. Interestingly, the amount of nuclear DNA bearing this information does not correlate with organismic complexity. Whereas in human one complete copy of this information (nuclear genome) is made up of about three billion DNA base pairs, genomes of many plant species are much larger. This is the case of the most important crop plant – bread wheat, whose genome is made up of 17 billion base pairs. Analysis of such a huge genome is extremely difficult and expensive not only due to its enormous size but also because of its complexity, which reflects its origin. The wheat genome arose by hybridization of three wild grass species with similar genomes, marked as A, B and D.

With the aim to simplify this analysis, we have developed an original method for isolation of small and defined parts of the wheat genome. The method is based on preparation of suspensions of chromosomes, which are analyzed and classified according to their DNA content at high speed using laser flow cytometry. Simultaneously with the analysis, it is possible to separate a chosen chromosome type and obtain pure fractions of the particular chromosome types and their arms. Since individual chromosomes constitute only a small and defined part of the wheat genome, the availability of their DNA offers a radical simplification of its analysis.

Subsequently to this achievement we found out that the DNA of flow-sorted chromosomes remains intact and thus should be suitable for construction of BAC DNA libraries. These libraries consist of a set of DNA fragments of about 100 thousand base pairs that represent the whole genome. They are a crucial resource for genome sequencing and gene isolation. A successful construction of three large-insert DNA libraries from flow-sorted chromosomes\* not only approved our proposition but provided a unique resource and tool for the wheat genomics. At present the libraries are used for wheat genome mapping and evolution studies and for isolation of agriculturally important genes.

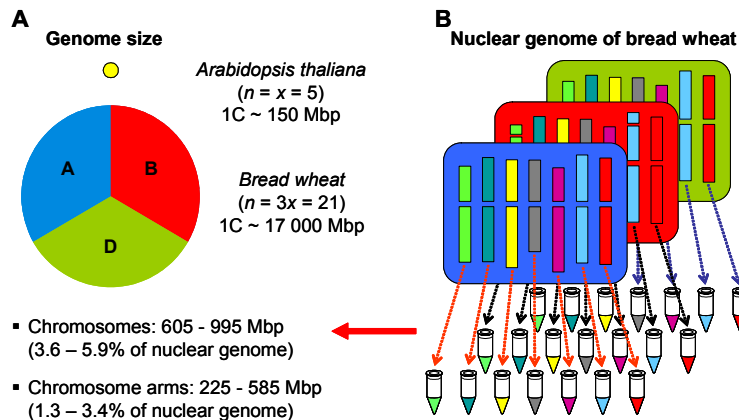


Fig. Comparison of nuclear genome size (1C) of a model plant *Arabidopsis thaliana*, which has been nearly completely sequenced, and that of wheat, which is composed of three subgenomes (A, B and D) each with seven chromosomes (A). DNA of particular sorted chromosomes represents only 3-6% of the wheat genome (B). Even smaller fragments of the genome can be obtained after sorting chromosome arms, whose size approaches that of the *A. thaliana* genome.

Janda J., Bartoš J., Šafář J., Kubaláková M., Valárik M., Číhalíková J., Šimková H., Caboche M., Sourdille P., Bernard M., Chalhoub B., Doležel J.: Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. – *Theor. Appl. Genet.* 109: 1337–1345, 2004.

Kubaláková M., Vrána J., Číhalíková J., Šimková H., Doležel J.: Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). – *Theor. Appl. Genet.* 104: 1362-1372, 2002.

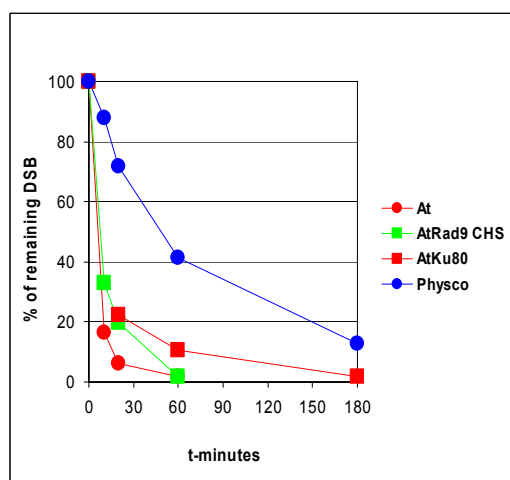
Šafář J., Bartoš J., Janda J., Bellec A., Kubaláková M., Valárik M., Pateyron S., Weiserová J., Tušková R., Číhalíková J., Vrána J., Šimková H., Faivre-Rampant P., Sourdille P., Caboche M., Bernard M., Doležel J., Chalhoub B.: Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. – *Plant J.* 39: 960-968, 2004.

\* Cooperation with Dr. Boulos Chalhoub (Unité de Recherches en Génomique Végétale, Évry, France)

## Reparace dvojlákových zlomů DNA v Rostlinách

Karel J. Angelis a kol.

Dvojlákové zlomy DNA jsou genotoxické poškození neslučitelné s normální funkcí genomu jakéhokoli organismu. K jejich odstranění se vyvinula řada reparačních drah, jejichž preference se liší podle organismu. Zatímco u prokaryot a nižších eukaryot převažuje homologní rekombinace (HR), u vyšších eukaryot včetně rostlin se předpokládá reparace mechanismem nehomologního spojování konců (NHEJ). Možnost změny preference reparace dvojlákových zlomů ve prospěch HR u vyšších rostlin by měla zásadní biotechnologický význam pro cílenou modifikaci genů (tzv. gene targeting).



Proto je reparace dvojlákových zlomů genomové DNA v naší laboratoři dlouhodobě analyzována u řady mutantů huseníčku *Arabidopsis* a mechu *Physcomitrella patens* pomocí tzv. metody komet. Kinetika reparace dvojlákových zlomů indukovaných radiomimetikem Bleomycinem (Obr. 1) ukazuje u *Arabidopsis* na účast více mechanismů. V úvodní velmi rychlé fázi je více než 70 % zlomů opraveno během prvních 10 minut a na rychlost nemá vliv mutace v HR ani NHEJ. Tato rychlá fáze reparace dvojlákových zlomů chybí u mechu *Physcomitrella patens*, který oproti *Arabidopsis* téměř výlučně reparuje zlomy mechanismem HR (viz Obr. 1). Z našich dat proto vyplývá, že u *Arabidopsis* (a tabáku) musí existovat další mechanismus reparace dvojlákových zlomů nezávislý na HR a NHEJ, který je zodpovědný za reparaci většiny zlomů. Tento mechanismus je pravděpodobně totožný s tím, který reparuje DSB během prvních hodin klíčení. Obr. 1

Závěrem lze shrnout, že vyšší rostliny reparují většinu dvojlákových zlomů v genomu způsobem, který je nezávislý na dosud molekulárně prostudovaných mechanismech HR a NHEJ. V případě mechu *Physcomitrella patens* je potřeba nejprve prokázat, zda reparace dvojlákových zlomů pouze pomocí HR není důsledkem haploidního vývojového stádia, ve kterém se všechny pokusy dělají.

**Angelis K.J., Dušínská M., Collins A.R.:** Single cell gel electrophoresis; detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20: 2133-2138, 1999.

**Heitzeberg F., Chen I.-P., Hartung F., Orel N., Angelis K.J., Puchta H.:** The Rad9 and Rad17 homologues of *Arabidopsis* are Involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. *Plant J.* 38:954-968, 2004.

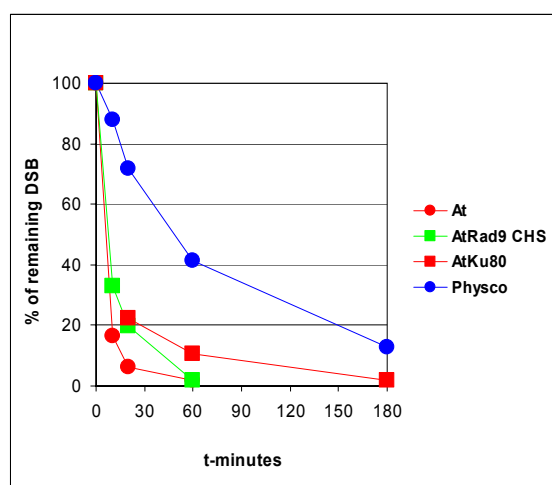
**Takeda S., Tadele Z., Hofmann I., Angelis K.J., Kaya H., Araki T., Mengiste T., Scheid O.M., Probst A.V., Shibahara K., Scheel D., Paszkowski J.:** BRU1, a novel link between genetic/epigenetic inheritance and meristem development in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18: 782-793, 2004.

*Ve spolupráci s Prof. Holgerem Puchtou, Univ. Karlsruhe, SRN; Dr. Charlesem Whitem, CNRS-Biomove, Aubière, Francie a Prof. Jerzym Paszkowskim, Univ. Genéve, Švýcarsko.*

## PLANT REPAIR OF DNA DOUBLE STRAND BREAKS

Karel J. Angelis et al.

DNA double strand breaks (DSB) are genotoxic lesions incompatible with normal genome function in any organism. Several repair pathways have evolved to seal DSB. While in prokaryotes and lower eukaryotes DSB are repaired by homologous recombination (HR), in most eukaryotes, including higher plants, DSB are stabilized by the mechanism of nonhomologous end joining (NHEJ). Possibility to increase DSB repair by HR in higher plants has crucial importance for biotechnologically important targeted modification of DNA (gene targeting).



This is why our lab is analyzing *Arabidopsis* and their repair mutants as well as moss *Physcomitrella patens* for DSB repair capacity of genomic DNA by single cell gel electrophoresis (comet assay). As seen on Fig. 1, repair kinetics of DSB induced by radiomimetic Bleomycin suggests involvement of two processes in *Arabidopsis*. During first very rapid phase, more than 70 % of all DSB are repaired within first 10 minutes. This rapid repair of DSB is not influenced by knock-out mutations in crucial genes for HR or NHEJ. Rapid DSB repair is absent in moss *Physcomitrella patens* and repair kinetics suggest only one, already proven, HR pathway (see Fig. 1). From our data we can draw that in *Arabidopsis* (and tobacco) is active other mechanism repairing majority of DSB that is independent on HR a NHEJ genes. This mechanism is probably the same that restores contiguous genomic DNA during first hours of seed germination.

We can summarize that higher plants repair majority of DSB by mechanism independent on genes identified in HR and NHEJ pathways. Absence of this mechanism and exclusive repair of DSB in moss *Physcomitrella patens* by HR have to be reexamining because experiments were so far carried only at haploid protonema development stage.

**Angelis K.J., Dušínská M., Collins A.R.:** Single cell gel electrophoresis; detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20: 2133-2138, 1999.

**Heitzeberg F., Chen I.-P., Hartung F., Orel N., Angelis K.J., Puchta H.:** The Rad9 and Rad17 homologues of *Arabidopsis* are involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. *Plant J.* 38:954-968, 2004.

**Takeda S., Tadele Z., Hofmann I., Angelis K.J., Kaya H., Araki T., Mengiste T., Scheid O.M., Probst A.V., Shibahara K., Scheel D., Paszkowski J.:** BRU1, a novel link between genetic/epigenetic inheritance and meristem development in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18: 782-793, 2004.

*In collaboration with Prof. Holger Puchta, Univ. Karlsruhe, Germany; Dr. Charles White, CNRS-Biomove, Aubière, France and Prof. Jerzy Paszkowski, Univ. Genève, Switzerland.*

ANNOTATION 3:

## **PHOSPHATIDIC ACID (PA) PRODUCED BY PHOSPHOLIPASES D (PLD) HAVE A ROLE IN THE REGULATION OF PLANT CELL EXPANSION**

**Viktor Žárský et. al.**

Understanding of processes that regulate plant growth and development is among important conditions to address contemporary ecological as well as social challenges to humanity. In spite of rather conserved basic eukaryotic cellular machinery plants have evolutionarily adopted specific set of regulators of different metabolic and morphogenic pathways. Sessility of plants associated with the evolution of elaborate dynamic cell walls is supported by plant specific regulators of cell expansion. We have shown that these include superfamily of plant PLDs producing PA as a signaling molecule within the membrane.

Using bioinformatic databases and resources we underwent thorough comparative analysis of PLD family in eukaryots and unveiled unprecedented evolutionary dynamics of PLDs in plants. In *Arabidopsis* and similarly in other plant species, there are two major subfamilies – two member subfamily of animal-like PLDs and ten other isoenzymes specific for plants (Eliáš *et al.* 2002, Potocký unpublished). Regulation of different PLD types by lipids, phosphoinositides and calcium makes production of PA signal a context dependent event allowing fine-tuning of cellular processes within the plant cell. Using *in vitro* growing tobacco pollen tubes as a model system we have proved direct involvement of PA produced by PLDs in the regulation of polarized cell expansion (Potocký *et al.* 2003). Cloning of pollen PLDs allowed us to distinguish function of specific PLD isoenzymes (Potocký *et al.* 2004). Our data support predicted involvement of specific PLDs in cytoskeleton regulation.

Eliáš M., Potocký M., Cvrčková F., Žárský V.: Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics* 3: 2, 2002.

Potocký M., Eliáš M., Profotová B., Novotná Z., Valentová O., Žárský V.: Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta* 217: 122-130, 2003.

Potocký M., Bezvoda R., Synek L., Valentová O., Žárský V.: Multiple Phospholipase D Isoforms Are Involved In Regulation Of Polar Growth In Tobacco Pollen Tubes. 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, August 23-27 2004, Cracow, Poland. (poster and award lecture)

*This research is done in collaboration with the laboratory of Prof. Olga Valentová, Institute of Biochemistry and Microbiology, ICT Prague.*



ANOTACE 3:

## KYSELINA FOSFATIDOVÁ (PA) PRODUKOVANÁ FOSFOLIPÁZAMI D (PLD) SE ÚČASTNÍ REGULACE BUNĚČNÉ EXPANZE ROSTLIN

Viktor Žárský et. al.

Pro hledání odpovědí na ekologické a sociální problémy, které dnes před námi stojí, potřebujeme mezi jiným rozumět také tomu, jak rostliny řídí svůj růst a vývoj. Přes značný stupeň zachování společných buněčných procesů rostliny během evoluce získaly také specifický soubor regulátorů různých metabolických a morfogenních drah. Přisedlost rostlin spojená s evolucí rozvinuté dynamiky buněčných stěn je spojena s rostlinně specifickými regulátory buněčné expanze. Zjistili jsme, že mezi ně patří také nadrodina rostlinných PLD, které produkují v membráně PA jako signální molekulu.

Pomocí bioinformatických databází a programů jsme provedli důkladnou srovnávací analýzu rodiny PLD u eukaryot a při tom jsme odhalili nebývalou evoluční dynamiku rodiny PLD u rostlin. U *Arabidopsis* a podobně i u dalších rostlinných druhů existují dvě velké skupiny PLD – dvoučlenná rodina PLD příbuzných živočišným PLD a dalších deset isoenzymů specifických pro rostliny (Eliáš *et al.* 2002, Potocký nepublikováno). Regulační závislost různých typů PLD na lipidech, fosfoinositidech a vápníku umožňuje jemnou regulaci buněčných procesů v rostlinách v závislosti na kontextu. Na modelovém systému pylových láček tabáku pěstovaných *in vitro* jsme prokázali, že PA produkovaná aktivitou PLD se přímo podílí na regulaci polarizované buněčné expanze (Potocký *et al.* 2003). Rozlišení funkce specifických isoenzymů PLD nám umožnilo klonování pylových PLD (Potocký *et al.* 2004). Naše výsledky podporují předpokládanou účast specifických PLD v regulaci cytoskeletu.

Eliáš M., Potocký M., Cvrčková F., Žárský V.: Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics* 3: 2, 2002.

Potocký M., Eliáš M., Profotová B., Novotná Z., Valentová O., Žárský V.: Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta* 217: 122-130, 2003.

Potocký M., Bezvoda R., Synek L., Valentová O., Žárský V.: Multiple Phospholipase D Isoforms Are Involved In Regulation Of Polar Growth In Tobacco Pollen Tubes. 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, August 23-27 2004, Cracow, Poland. (poster and award lecture)

*Tento výzkum probíhá ve spolupráci s laboratoří prof. Olgy Valentové na VŠCHT v Praze.*