

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2015

Tomáš Vlčko

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Charakteristika transgenního ječmene
SCLW-GP-PHYA

Diplomová práce

Tomáš Vlčko

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval sám a že uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci

Podpis.....

Rád bych poděkoval mé školitelce a vedoucí Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení a rady, které mi dávala v průběhu vypracování této práce.

Rád bych také poděkoval laborantce Bc. Janě Vaškové za všestrannou pomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěl velmi poděkovat své rodině a obzvláště svému bratru Petrovi za morální podporu, kterou mi za celou dobu studia poskytovali.

Souhrn

Ječmen je významná hospodářská plodina. Je ve velké míře používán jako krmivo. Významným faktorem pro zvýšení nutričního potenciálu ječmene je zlepšení příjmu fosforu monogastrickými živočichy. Kyselina fytová zásobní forma fosforu v obilkách je nestravitelná pro monogastry. Transgenní ječmen SCLW-GP-PHYA produkuje v obilkách heterologní enzym fytasu, který degraduje kyselinu fytovou, a tak uvolňuje fosfáty, stravitelnou formu fosforu. Tento transgenní ječmen byl v polních pokusech uveden do životního prostředí na dvou lokalitách v České republice. Aktivita fytasy a obsah fosfátu byl stanoven u transgenních linií sklizených v roce 2014. Heterologní enzym mění přirozený poměr zásobní a aktivní formy fosforu v obilkách. Byly vyhodnoceny dynamické změny v obsahu zásobní a aktivní formy fosfátu v obilce v průběhu klíčení u transgenní a kontrolní linie. Kyselina fytová je ukládána do globoidů, kompartmentu ve vakuolách aleuronových buněk. Četnost fytátových globoidů v aleuronových buňkách byla vyhodnocena u transgenní a kontrolní linie v průběhu klíčení. Z výsledků vyplývá, že lokalita pěstování má významný vliv na aktivitu fytasy a obsah fosfátu ve zralých obilkách. Transgenní ječmen vykazuje odlišný vývoj obsahu fosfátu a aktivity fytasy v průběhu klíčení ve srovnání s kontrolou.

Summary

Barley is a prominent agricultural crop. It is broadly utilized as feed. Improving of phosphorus intake by monogastric animals is the substantial factor for increase of the nutrition potential of barley. Phytic acid, which is the storage form of phosphorus in barley caryopsis, is indigestible for monogastric animals. Transgenic barley SCLW GP-PHYA produces heterologous enzyme phytase, which degrades phytic acid thus liberating digestible form of phosphorus, in the caryopsis. Transgenic barley was launched into environment at two locations in the Czech Republic within field trials. Phytase activity and phosphate content were assessed in seeds of transgenic and control lines harvested in 2014. Heterologous enzyme modifies natural ratio of storage and active form of phosphorus in the caryopsis. Dynamic changes in content of storage and active form of phosphorus in seeds of the transgenic and control line during germination were evaluated. Phytic acid is stored in globoids. It is a compartment within vacuoles of aleurone cells. The number of phytate globoids in aleurone cells was evaluated in the transgenic and control line during germination. The results indicate that the locality of cultivation has a substantial impact on the phytase activity and content of phosphate in mature seeds. Transgenic barley shows a different progress in content of phosphate and phytase activity during germination in comparison to the control line.

Obsah

Souhrn.....	5
Summary.....	6
1. Cíle práce.....	9
2. Úvod.....	10
3. Stav řešené problematiky.....	11
3.1 Obecná charakteristika ječmene	11
3.2 Příjem fosforu	12
3.3 Alternativní příjem fosforu	15
3.3.1. Mykorrhizální symbióza a činnost půdních bakterií	15
3.3.2. Biotechnologický přístup	17
3.4 Ukládání fosforu	18
3.5 Mobilizace P v průběhu klíčení	21
4. Materiál a metodika	23
4.1 Rostlinný materiál.....	23
4.2 Stanovení obsahu P_i	25
4.2.1 Chemikálie a roztoky	25
4.2.2 Pracovní postup stanovení obsahu fosfátů v biologickém materiálu	25
4.3 Stanovení aktivity fytasy	26
4.3.1 Chemikálie a roztoky	27
4.3.2 Pracovní postup stanovení aktivity fytasy v biologickém materiálu.....	28
4.4 Stanovení obsahu $InsP_6$	29
4.5 Kvantitativní analýzy naklíčených obilok.....	29
4.5.1 Chemikálie a roztoky	29
4.5.2 Pracovní postup	29
4.6 Charakterizace zásobních globoidů	30
4.6.1 Chemikálie a roztoky	30
4.6.2 Pracovní postup přípravy preparátů	30
4.7 Použité přístroje	31
5. Výsledky.....	32
5.1 Polní pokusy Olomouc, Lukavec 2014.....	32
5.1.1 Lokalita Olomouc2014.....	32
5.1.2 Lokalita Lukavec 2014.....	33

5.2 Obsah zásobní a aktivní formy P v průběhu klíčení	35
5.2.1 Obsah P_i v průběhu klíčení.....	37
5.2.2 Aktivita fytasy v průběhu klíčení	38
5.2.3 Obsah $InsP_6$ v průběhu klíčení	39
5.3 Anatomická charakteristika obilky	40
6. Diskuze	46
7. Závěr.....	49
8. Literatura	50
9. Seznam použitých zkratk a symbolů	57
10. Seznam příloh.....	58
11. Přílohy	59

1. Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce, hodnocení exprese bakteriálního genu *phyA* u transgenní linie SCLW-GP-PHYA
2. Stanovení obsahu kyseliny fytové metodou CE-MS, kolorimetrické stanovení fosforu a aktivity fytasy v obilkách transgenní linie SCLW-GP-PHYA.
3. Stanovení aktivity fytasy u klíčících obilek ječmene.
4. Anatomická charakterizace zásobních vakuol v obilkách transgenní linie SCLW-GP-PHYA.

2. Úvod

Ječmen je jednou z nejdůležitějších hospodářských plodin. Svým významem jej předstihují snad jen kukuřice, pšenice a rýže. Obilky ječmene jsou bohaté na škrob, vitamíny a minerální prvky. Ječmen je plodina, která má stále šlechtitelský potenciál pro zvýšení výnosu a zlepšení odolnosti k biotickým a abiotickým faktorům.

Přes svou vysokou energetickou hodnotu, část nutričního potenciálu ječmene zůstává nevyužita. Kyselina fytová, *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát zkráceně InsP₆, je hlavní zásobní forma fosforu (P) v obilkách ječmene. Je považována za antinutriční faktor, neboť je nestravitelná pro monogastrické živočichy jako vepř nebo kur domácí. Proto jen část fosforu z celkového množství je strávena, a tedy skutečně využita. V důsledku svých fyzikálně-chemických vlastností vytváří kys. fytová soli tzv. fytáty s kationty vápníku, hořčíku ad., čímž dále přispívá ke snížení nutričního potenciálu krmiva či potraviny. Nestrávený fosfor nacházející se ve fekáliích může přispívat k eutrofizaci povrchových vod, je-li hnůj z farem použit k hnojení pole v blízkosti vodních nádrží a toků.

V klíčících zrnech je biosyntetizován enzym fytasa, který odštěpuje fosfátové skupiny z molekuly kyseliny fytové. Fosfáty jsou následně využity klíčící rostlinou. Zralé obilky ječmene však obsahují nedostatečné množství fytasy pro efektivní využití zásob fosforu, jsou-li použity do krmiv. Rostlinné navíc fytasy nesplňují požadavky na teplotní stabilitu, která je žadáným parametrem při výrobě krmiv. Rostlinné fytasy nejsou schopné efektivně hydrolyzovat kys. fytovou v prostředí žaludku a střev z důvodu působení proteolytických enzymů a nehostinného prostředí. Enzymy splňující požadavky na teplotní stabilitu a pH optimum byly nalezeny v bakteriích a houbách.

Zvýšení nutričního potenciálu krmiv a zefektivnění využívání fosforu byly hlavní důvody pro vnesení genu, původem z houby *Aspergillus niger*, který kóduje termostabilní a vysoce aktivní fytasu, do genomu ječmene, modelové odrůdy Golden Promise. Lokalizace exprese heterologního proteinu ve zralých obilkách byla zajištěna použitím amylasového promotoru s amylasovou signální sekvencí. Byla získána transgenní linie pojmenovaná SCLW-GP-PHYA vykazující zvýšenou aktivitu fytasy ve zralých obilkách. Tato linie byla v rámci polních pokusů uvolněna do životního prostředí na dvou lokalitách v Olomouci a Lukavci.

3. Stav řešené problematiky

3.1 Obecná charakteristika ječmene

Ječmen je rostlina s vysokým hospodářským významem. Používá se převážně v pivovarství pro výrobu piva a v živočišné výrobě jako krmivo. Ječmen (*Hordeum*) je klasifikován do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), skupiny jednoděložných rostlin - *Liliopsida*. Hospodářský význam má ječmen setý (*H.vulgare*). Ječmen lze dle doby výsevu dělit na jarní a ozimý. Pro pivovarské účely se používá především jarní ječmen. Jedná se o jednoletou bylinu dorůstající do výšky až 120 cm. Svazčité kořeny sahají převážně do hloubky 30 cm. Dutý stonek - stéblo je rozděleno nody. Jedna rostlina může mít několik stébel tzv. odnoží. Optimální počet odnoží je 2-4. Listy jsou dlouhé čárkovité rozlišitelné na pochvu a čepel. Květenstvím je lichoklas. Vegetační doba ječmene je zhruba 120 dní. Plody - obilky mohou být uskupeny ve dvou nebo šesti řadách, z čehož vychází dělení ječmene na dvouřadý nebo šestiřadý. Zralá obilka ječmene je okoralá, tj. srůstá s pluchami a pluškami.

Ječmen patří k rostlinným druhům, které vytváří bohatý škrobový endosperm, který slouží k výživě embrya v raných fázích klíčení. Stavba embrya je specifická pro skupinu *Poaceae*. Orgány embrya jsou štítek, koleoptile a koleorhiza. Štítek (*scutellum*) zprostředkovává čerpání živin z endospermu. Na štítek přiléhá vzrostný vrchol (plumula), který je obalen blanitým obalem (koleoptile), který chrání vzrostný vrchol během klíčení. Na plumulu navazuje první stonkový článek (mezokotyl). Mezokotyl přechází v kořenový základ embrya (radikulu), která je obklopena koleorizou, jenž má obdobnou funkci jako koleoptile. Z mezokotylu dále vyrůstají postranní kořeny. Škrobový endosperm obaluje aleuronová vrstva. Vně aleuronu jsou poté testa a perikarp, které u obilek srůstají.

Genom ječmene je v diploidním stavu tvořen 14 chromozómy. Haploidní genom je tvořen 5,1 Gb, které kódují přibližně 26 000 genů. Až 84 % genomu je tvořeno mobilními elementy a jinými repetitivními sekvencemi (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).

3.2 Příjem fosforu

Ječmen přijímá kořeny minerální látky, které jsou přítomny v půdě. Významnou úlohu v příjmu minerálních látek, kam se řadí fosfát, hrají kořenové vlásky. Preferovaná forma fosforu, která je přijímána rostlinami z půdy je anorganický orthofosfát (Bucher *et al.*, 2007).

Fosfor je v půdě v organické formě nejvíce zastoupen jako InsP_6 . Není zcela jasné, jsou-li rostliny schopné přijímat P v této formě. V půdě jsou kromě inositolfosfátů (InsP) přítomny v nezanedbatelné míře i nízkomolekulární fosforylované nukleosidy, které mohou sloužit jako zdroj uhlíku a fosforu. Před asimilací mikroorganismy však musí být defosforylovány. Aktivita fosfatas je zde limitujícím faktorem jejich příjmu, neboť při vyšších koncentracích nukleotidů je jejich asimilace signifikantně pomalejší než u nukleosidů (Fransson *et Jones.*, 2007).

Exprese mnoha genů zejména v kořenech je transkripčně řízena signály, které odpovídají výživovému statusu rostliny (Smith *et al.*, 2000). Při hojnosti fosfátu – P_i v půdním substrátu řídí rostlina částečně příjem využitím nízko-afinitních fosfátových transportérů. Naopak nedostatek P indukuje u rostliny expresi vysoko-afinitních transportérů (Epstein *et al.*, 1953). V cytoplasmě rostlinných buněk se koncentrace P_i pohybuje na milimolární hladině. Optimální koncentrace pro růst je 5-20 mmol/l. Vyšší rostliny regulují homeostazi P_i v cytoplasmě transportem fosfátů do vakuoly. Rostlinné buňky s vysokou koncentrací P_i v cytoplasmě jsou schopné pro udržení homeostaze uložit 85-90 % P_i do vakuoly (Natr, 1992).

Příjem fosfátů do buněk kořenového systému zprostředkovávají transmembránové transportéry v buňkách rhizodermis. Vysoká četnost transportérů je v kořenových vláscích, které se dostávají do přímého kontaktu s půdními částicemi. U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* byla popsána rodina Pht1 transmembránových fosfátových transportérů (Muchhal *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997). Jedná se o symportéry fosfátu s kationtem H^+ . Transportéry jsou složeny z 12 podjednotek, které jsou rozdělené hydrofilními oblastmi na dvě skupiny po šesti podjednotkách. Tyto fosfátové transportéry jsou velmi konzervativní. Geny s různou mírou similarity lze nalézt napříč živočišnou a rostlinnou říší (Smith *et al.*, 1997). U *H. vulgare* bylo v rodině Pht1 fosfátových transportérů popsáno celkem 8 homologních genů (Mudge *et al.*, 2002).

Transportéry HvPht1;1 a HvPht1;2 jsou exprimovány v trichoblastech kořenových vlásků a v buňkách stéle. Jejich exprese se zvyšuje při nedostatku P (Shünmann *et al.*, 2004). Bylo prokázáno (Glassop *et al.*, 2005), že u ječmene je v důsledku kolonizace kořenů půdní arbuskulární-mykorhizální houbou rodu *Glomus*, v napadené části rostliny, specificky exprimován transportér Pht1;8. Jedná se o transportér, který je specificky účasten příjmu P_i proudícího ze symbiotické houby do apoplastu kořenů. Promotor tohoto transportéru je pravděpodobně indukován mykorhizální kolonizací. Grace *et al.* (2009) ovšem zaznamenal, že ve srovnání s *G. intraradices*, kolonizace *G. geosporum* vedla pouze k slabé expresi *Pht1;8*. Z uvedeného lze usoudit, že ne všechny mykorhizální houby jsou schopné indukovat expresi tohoto specifického transportéru. HvPht1;1 a HvPht1;4 transportéry jsou aktivní v axilárních pupenech, patrně kvůli poptávce po P_i v důsledku metabolické aktivity pletiva (Mudge *et al.*, 2002).

Rostliny z čeledi *Poaceae* (Lipnicovité) vylučují z kořenů organické kyseliny za účelem acidifikace půdy vedoucímu ke zlepšení příjmu fosfátů. Nicméně mohou vylučovat i vodíkové kationty, které jsou poté zpětně kotransportovány s fosfátem. Pro zlepšení příjmu P a Fe dále rostliny uvolňují chelatory – phytosiderophory. Bakterie kompetující o stejné zdroje vylučují siderophory. Ačkoli organické kyseliny solubilizací fyfátů ulehčují jeho následnou hydrolýzu, mohou při zvýšené koncentraci současně tlumit aktivitu fyfatas (Tang *et al.*, 2006). Nadměrné množství vylučovaných organických kyselin do rhizosféry proto může být kontraproduktivní.

Při nedostatku P_i v substrátu mohou rostliny vylučovat do rhizosféry extracelulární fosfatas s širokou substrátovou specifitou, hydrolyzující mimo nukleosidy dTTP, dCTP i InsP_6 (Lung *et al.*, 2008). Mezi kultivary pšenice existuje variabilita v aktivitě kořenově vylučovaných fosfatas. Nicméně existuje jen slabá korelace mezi příjmem P a aktivitou fosfatas uvolňovaných extracelulárně z kořenů. Větší podíl na variabilitě vytvořené biomasy stonku a akumulaci P je vysvětlen druhem půdy, na které je daná plodina pěstována (George *et al.*, 2008).

Brown *et al.* (2013) odvodil, že největší potenciál pro zvýšení příjmu P s ohledem na energetické požadavky je tvorba kořenových vlásků. Neboť investovat uhlík asimilovaný během fotosyntézy do organických kyselin nebo fosfatas, vylučovaných mimo buňky do rhizosféry, může být energeticky náročné. Brown *et al.* (2012) prokázal, že délka kořenových vlásků je důležitá pro příjem P v podmínkách jeho limitovaného množství.

Jedním z efektivních způsobů asimilace fosforu z půdy je tvorba proteoidních kořenů. Tyto kořeny vytváří v místě zdroje P hustou síť laterálních kořenových vlásků,

které jsou schopny účinně přijímat P_i . Keerthisinghe *et al.* (1998) zaznamenal nejvyšší kapacitu příjmu P_i v segmentu 0-1 cm od vrcholu kořenové špičky proteoidního kořene. Tento segment byl schopen efektivněji přijímat P_i než stejný segment neproteoidního kořene. Už v segmentu následujícím dlouhém 1-3 cm od kořenové špičky je schopnost přijímat P_i mezi proteoidními a neproteoidními kořeny prakticky na stejné úrovni. Proteoidní kořeny jsou schopné vylučovat organické kyseliny - citráty po celé své délce, s výjimkou vrcholového segmentu, který je zaměřen na příjem P_i . Největší schopnost vylučovat citráty má oblast navazující na kořenovou špičku, tj. segment 1-3 cm za vrcholem kořenového vlásku.

3.3 Alternativní příjem fosforu

3.3.1. Mykorhizální symbióza a činnost půdních bakterií

Mikroorganismy mohou změnit kvalitu a kvantitu organických a kondenzovaných forem P v půdě. Složité makromolekuly obsahující P mohou mikroorganismy rozložit na jednodušší molekuly a uvolnit P_i . Půdní mikroorganismy vyskytující se v rhizosféře jsou schopné degradovat fytát (Jorquera *et al.*, 2011). Fosfáty potom mohou rostliny přijímat přímo z půdy, nebo zprostředkovaně skrze hyfy mykorhizálních hub. Hnojení půdy zdroji uhlíku (celulosa, škrob, glukosa) vede ke zvýšení půdní biomasy. Nicméně složení mikrobiální komunity je silně ovlivněno druhem půdy (Bunemann *et al.*, 2008).

V dnešní době velmi rozšířené hnojení anorganickými fosfáty je limitováno omezenými ložisky nerostných fosfátů. Efektivitu tohoto přístupu zatěžuje skutečnost, že více než 90 % P obsaženého v hnojivu, které je aplikováno do půdy, se stává nedostupným pro rostlinu v důsledku interakce P_i s půdními částicemi adsorpcí nebo precipitací (Shang *et al.*, 1992). Dlouhodobá polní studie (Krey *et al.*, 2013) prokázala, že organická hnojiva (kompost či kravská mrva) aplikovaná jednou za 3 roky mají srovnatelný, ne-li silnější, účinek na výnosové charakteristiky (suchá hmotnost, vzrůst, ad.) než každoročně aplikované fosfáty. Autor navrhl vysvětlení zlepšenými vlastnostmi půdy a dostupností živin. Hnojení fosfáty ovlivňuje půdní mikroorganismy, neboť přihnojení P do půdního substrátu vedlo k snížené kolonizaci kořenů a kratším hyfám mykorhizální houby (Li *et al.*, 2006; Raiesi *et al.*, 2006). Z dlouhodobého hlediska je proto důležité dbát nejen o plodiny a jejich maximální výnosy, nýbrž také o půdu jakožto zdroj živin.

Východiskem pro rostliny s nedostatkem P_i může být symbióza s půdními mikroorganismy, které jsou schopné fosfátové skupiny z molekuly $InsP_6$ odštěpit, hovoří se o tzv. mineralizaci $InsP_6$. Půdní mikroflóra se mění v závislosti na vegetativní fázi rostlinného vývoje. Mahmoud *et al.* (1973) pozoroval v rhizosféře pšenice a fazolu, že nejvyšší hustota mikroorganismů koincidovala s dobou kvetení a tvorbou semen u rostlin.

Mikroorganismy a rostliny zvyšují dostupnost P solubilizováním P_i a mineralizací organického P (Jorquera *et al.*, 2008). Půdní bakterie podobně jako rostliny jsou schopné do svého nejbližšího okolí uvolňovat organické kyseliny. V *in vitro* studii produkovaly organické látky až do koncentrace 40 mM, a dokázaly tak snížit pH média až o 2 stupně. (Giles *et al.*, 2014). Obdobně i arbuskulární-mykorhizální (AM) houby jsou schopné

vylučováním organických kyselin acidifikovat rhizosféru a tak zlepšit činnost fosfatas vedoucí k vyššímu příjmu P_i (Wang *et al.*, 2013).

Jetel luční (*Trifolium pretense*) byl schopen akumulovat významně více P v kořenech a stonku, byly-li kořeny inokulovány půdní houbou *G. versiforme*. Suchá váha přitom zůstala srovnatelná (Feng *et al.*, 2003). Li *et al.* (2006) studoval vliv mykorhizální symbiózy *G. intraradices* na příjem P u pšenice. Mykorhizální cesta příjmu P byla schopná přispívat dle podmínek pokusu 50-80 % z celkového příjmu P. Nicméně AM houby nepřispívaly k růstu rostlin nebo zlepšení celkového příjmu P v prvních týdnech po vyklíčení. Ve své předchozí práci (Li *et al.*, 2005) zaznamenal dokonce zpomalení růstu indukované AM kolonizací. Rozporující výsledky dále zaznamenal Grace *et al.* (2009) v studii prováděné na ječmenu. Rostliny kolonizované mykorhizální houbou vykazovaly sníženou suchou hmotnost a celkově nižší obsah P. Z výsledků hypotetizoval, že omezený růst rostliny je pravděpodobněji zapříčiněn důsledky řízení příjmu P_i houbou než poptávkou houby po uhlíku.

Tisserant *et al.* (2012) překvapivě nedetekoval v transkriptomu mykorhizální houby rodu *Glomus* mRNA kódující enzym fytasu. Simbiotická houba má především schopnost přijímat fosfát a dále jej transportovat hyfami do kořenů. Vlastní degradaci fytátů v půdě pravděpodobně zajišťují fytát degradující bakterie, které jsou asociovány s houbovými hyfami a které tak nabývají velkého významu pro příjem P_i rostlinou (Zhang *et al.*, 2014). Tuto tezi podporuje skutečnost, že inokulace tabáku půdní bakterií z rodu *Pseudomonas* vedla k signifikantnímu zvýšení obsahu P ve stonku (Giles *et al.*, 2014). Inokulace půdními bakteriemi vedla k vyšším výnosům a úrodnosti půdy i v případě pšenice a kukuřice v polních pokusech provedených na třech rozdílných lokalitách (Kaur *et Reddy*, 2014). Půdní mikroorganismy se přizpůsobují podmínkám, ve kterých se vyskytují. V rhizosféře s nízkým obsahem P_i vykazují půdní bakterie významně kratší dobu lag fáze ve srovnání s bakteriemi z půdy bohaté na P_i (Maougal *et al.*, 2014). Autor dále předpokládal, že rostliny skrze kořeny mohou napomáhat rozvoji těch druhů bakterií, které se prezentují zvýšenou fytasovou aktivitou při nedostatku P_i .

3.3.2. Biotechnologický přístup

Byly s různými výsledky prováděny experimenty s transgenními rostlinami vylučujícími z kořenů heterologní fosfatasy nebo fytasy ve snaze o využití fytátového fosforu jakožto hlavního zdroje P pro rostlinu. George *et al.* (2005) prokázal, že rostliny potřebují pro získání P z InsP_6 extracelulárně uvolňované heterologní enzymy. Transgenní tabák (*Nicotiana tabacum*) byl oproti kontrole schopen akumulovat až o polovinu více P přijímaného z půdy přihnojené fytátem. Transgenní jetel plazivý (*Trifolium repens*) exprimující v kořenech heterologní fytasu nabyt v půdním substrátu obsahujícím fytát jako hlavní zdroj P až dvounásobnou suchou hmotnost netransgenní kontroly. Transgenní rostliny byly schopné oproti kontrole akumulovat až 2,6krát více P (Ma *et al.*, 2009). Lze se tedy domnívat, že rostliny jsou schopné akumulovat P i nad rámec vlastní potřeby. Ať již je příjem zprostředkovaný přirozeně mykorhizální symbiózou, či v důsledku aktivity heterologního proteinu. Pozitivní účinky mykorhizy u pšenice pěstované na vulkanické půdě zaznamenal i Rubio *et al.* (2003).

Byly zaznamenány pozitivní výsledky hydroponicky pěstovaných transgenních rostlin extracelulárně vylučujících fytasy (Lung *et al.*, 2005). Přesto extracelulární vylučování ať už nativní nebo heterologní fytasy do rhizosféry nejspíše nezajistí významné zlepšení asimilace fytátového P z půdního prostředí (Lung *et al.*, 2006). Jedním z faktorů snižujících efektivitu extracelulárně vylučovaných enzymů je jejich rychlá adsorpce na půdní částice v krátkém čase po uvolnění z kořenů. To může vést k snížené schopnosti rostlin využít fytát, popřípadě jinou formu organického fosforu pro růst (George *et al.*, 2005).

3.4 Ukládání fosforu

Vyšší rostliny ukládají P_i ve formě polyfosfátů. Nejhojnějším zásobním polyfosfátem, který je současně považován za hlavní antinutriční faktor, je $InsP_6$. Kyselina fytová je schopna vytvářet fytátové komplexy asociací s bivalentními kationty kovů. Lott *et al.* (2000) odhadl, že ročně je vyprodukováno až 51 miliónů tun fytátu, který obsahuje takřka 10 mil. tun P, což odpovídá 65 % P aplikovaného ročně ve hnojivech.

Z pohledu ukládání P v semenech lze u ječmene a pšenice dobu vývoje semen rozdělit na fázi růstovou, trvající tři týdny po odkvetení, a fázi dozrávání dlouhou následujících 5 týdnů. V první fázi se akumulují v zrně P_i a $InsP_6$. V druhé fázi postupně klesá podíl P_i a tempo akumulace se zpomaluje. Zvyšuje se exprese enzymů pozdní fáze syntézy $InsP_6$ a postupně se zvyšuje obsah $InsP_6$. U pšenice byl pozorován nejvyšší obsah $InsP_6$ 6 týdnů po odkvetení (Bhati *et al.*, 2014; Hatzack *et al.*, 2000).

V době vývoje semene se s dozráváním a tím i zvyšováním suché váhy zvyšuje podíl P. Až 60 % asimilovaného P je uloženo do $InsP_6$ od 16. dne po vykvetení a později je téměř veškerý asimilovaný P uložen jako $InsP_6$ (Coelho *et al.*, 2007). Na syntézu $InsP_6$ má zásadní dopad aktivita myo-Inositolfosfátsyntasy (MIPS) enzymu rané fáze biosyntetické dráhy kys. fytové. U pšenice byla zaznamenána nejvyšší aktivita MIPS 7 dnů po kvetení s pozvolným poklesem aktivity enzymu 14-21 dní po kvetení (Ma *et al.*, 2013). Význam $InsP_6$ pro rostlinný metabolismus podtrhuje skutečnost, že celou syntetickou dráhu $InsP_6$ je schopen zastat i jediný enzym *HvIpk*. Avšak nespecifická exprese *HvIpk* ve všech pletivech napovídá, že nemá konkrétní funkci při akumulaci $InsP_6$ v semenech (Josefsen *et al.*, 2007).

U ječmene je většina $InsP_6$ ukládána do zásobních vakuol – PSV (protein storage vacuole) aleuronových buněk. Zásobní vakuoly jsou složeny celkem ze tří kompartmentů. Hlavní kompartment je vakuolární matrix, který obklopuje zbylé dva kompartmenty. Prvním jsou krystaloidy složeny výhradně z proteinů. Druhý kompartment jsou globoidy obsahující molekuly $InsP_6$ (Lott *et al.*, 1978; Reyes *et al.*, 2011). Globoidy jsou sférického tvaru a jsou složeny přibližně ze 40 % fytovou kyselinou (Bohn *et al.*, 2007).

Regvar *et al.* (2011) pozoroval u pšenice dvě vrstvy buněk tvořících aleuronový obal semene. Každá z těchto vrstev se lišila svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Globoidy jsou v těchto buňkách významným kompartmentem. V jednotlivých buňkách

aleuronu se vyskytuje velké množství globoidů, jejichž distribuce je náhodná a globoidy se nejeví být vzájemně propojené.

Globoidy jsou hlavní kompartment, do kterého jsou ukládány molekuly kyseliny fytové. V semenech okurky (*Cucurbita maxima*) se globoidy vytváří v období 4-9 týdnů po opylení. V tomto období se nezvýšil výrazně procentuální podíl P₁ k suché váze semene, změnila se však forma fosforu ve prospěch InsP₆ (Ockenden *et al.*, 2001). V obilkách ječmene se začal InsP₆ akumulovat 7 dní a stabilní hladiny dosáhl po 49 dnech od kvetení (Hatzack *et al.*, 2001). Ma *et al.* (2013) podobně detekoval v obilkách pšenice InsP₆ již 7 dní po odkvetení. Nejvyšší tempo akumulace fytátu bylo potom zaznamenáno v období 2. týdne vývoje semene.

Jelikož je primární funkcí globoidů ukládání kyseliny fytové, lze odvodit, že tvorba globoidů je důsledkem syntézy InsP₆ a že tedy tvorba globoidů koinciduje s aktivitou syntetického aparátu kys. fytové. Ma *et al.* (2013) pozoroval, že kultivar pšenice s vysokým obsahem InsP₆ vykazoval vyšší enzymatickou aktivitu a současně i zvýšenou expresi enzymu MIPS než kultivar s nízkým obsahem InsP₆. Syntéza InsP₆ probíhá pravděpodobně v cytosolu. Akumulace InsP₆ v cytoplasmě je řízena negativním zpětnovazebným mechanismem (Shi *et al.*, 2007). Po dokončení syntetické dráhy je InsP₆ transportován z cytosolu do vakuoly, kde následně vytváří globoidy. Na transportu se podílí MRP ABC transportéry, např. u pšenice TaMRP3. Nejbližší homolog TaMRP3 je ZmMRP4, jehož knock-out vedl k low phytic acid (lpa) fenotypu. Exprese MRP4 byla zaznamenána 15 dní po oplození s píkem 21. den, což odpovídá potřebě transportovat nasyntetizovaný InsP₆ do vakuoly (Shi *et al.*, 2007). Veiga *et al.* (2006) odhadl, že při koncentraci InsP₆ vyšší jak 49 mM dojde k jeho precipitaci s kationty na Mg-fytát. Tato teoreticky navržená hladina je hluboko pod koncentrací InsP₆ v globoidech.

Globoidy vyskytující se v aleuronových buňkách zrn ječmene obdobně jako u pšenice jsou na průřezu velké 1-2 μm (Bohn *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004; Ockenden *et al.*, 2004; Regvar *et al.*, 2011). Na snímcích elektronového mikroskopu jsou globoidy vidět jako místa s vysokou hustotou elektronů (Nishizawa *et al.*, 2003). Globoidy lpa mutantních linií s nízkým obsahem InsP₆ jsou v PSV četnější, ale zároveň jsou mnohé menší než 0,5 μm (Liu *et al.*, 2004; Ockenden *et al.*, 2004). Globoidy jsou ohraničené jednovrstevnou membránou tvořenou lipidy, jejichž zastoupení a složení může být rozdílné od složení lipidů v tonoplastu. V této membráně byly nalezeny krystaly oxalátu vápenatého, ale také zde byly identifikovány transmembránové transportéry

H⁺-pyrofosfatasa a γ -TIP (Jiang *et al.*, 2001), který dále vyvozoval, že globoidy obsahující pyrofosfatasa mohou mít funkci úložiště pro vysoce energetické pyrofosfáty.

Globoidy mohou obsahovat proteiny, do kterých mohou být vklíněny právě molekuly kys. fytové. Nicméně se zdá, že InsP₆ vytváří velký krystal uprostřed globoidu a proteiny jsou vytlačeny po okraji k membráně (Jiang *et al.*, 2001). Nishizawa *et al.* (2003) objevil i potenciální signální sekvenci, která může sloužit pro transport proteinů do globoidů. Studii však prováděl na sóji, která ukládá vysoké množství proteinů β -konglycininů do semen. Fytátové globoidy obsahují i nezanedbatelné množství kationtů, které jsou vázané na fosfátové skupiny, tvořící soli - fytáty. Globoidy však neobsahují škrobové granule ani částice glukózy (Bohn *et al.*, 2007). Ukládání proteinů a InsP₆ v průběhu zrání obilky se jeví být na sobě nezávislé, neboť Wu Wei *et al.* (2007) nezaznamenal korelaci mezi obsahem InsP₆ a obsahem proteinu.

V rámci klasu se mohou vyskytnout mírné rozdíly v obsahu InsP₆ u některých kultivarů (Liu *et al.*, 2005). Ram *et al.* (2010) provedl analýzu 400 genotypů pšenice. Vyplývalo, že na hladinu fytátu a aktivitu fytasy v zrnech má významný vliv genotyp a lokalita výskytu.

Do globoidů jsou ukládány i kationty Ca, Mg, K, ad., které jsou důležité pro tvorbu fytátových komplexů. Globoidy nejsou vytvářeny pouze v buňkách aleuronu, ale byly pozorovány i v embryu - skutelu ječmene (Bergman *et al.*, 2000; Ockenden *et al.*, 2004). U lpa mutanta ječmene se sníženým obsahem InsP₆ nebyla výrazně pozměněna kapacita pro skladování minerálních látek, tj. Mg, K, Zn, Ca (Hatzack *et al.*, 2000).

U *A. thaliana* byly v PSV detekovány K, Ca, a Mg fytáty. Nikoli však Mn a Zn fytáty. Mn-fytáty se objevují brzy během klíčení, avšak nikoli v globoidech v PSV, nýbrž jako ve vodě-rozpustné krystaly uložené v endoplazmatickém retikulu (ER), které jsou využity při syntéze proteinů zapojených v OEC (kyslík uvolňujícím komplexu) fotosystému II (Otegui *et al.*, 2002). Skutečnost, že ne všechny kationty jsou uloženy v globoidech v komplexu s InsP₆, ale využívají InsP₆ jako nosič, ze kterého se uvolňují v konkrétním vývojovém stádiu a navíc ve specifickém pletivu, ukazuje na mnohem více komplexní roli InsP₆ v rostlinném metabolismu.

3.5 Mobilizace P v průběhu klíčení

Klíčení je proces, v rámci kterého dochází k aktivaci řady biochemických reakcí. Rostlina vytváří pletiva pro příjem živin, primární kořen a list. Než začne rostlina čerpat živiny z půdy a energii z fotosyntézy, je odkázána na své vlastní zdroje. Velké množství energie je uloženo v škrobovém endospermu. Endosperm je obalen aleuronovými buňkami, ze kterých jsou uvolňovány hydrolasy štěpící škrob na jednodušší sacharidy (Briggs D.E., 1968). Ve zralých obilkách ječmene nebyla zaznamenána aktivita α -amylasy. Ta je *de novo* syntetizována během klíčení. Nárůst aktivity α -amylasy byl pozorován po 24 h a nejvyšší aktivita byla zaznamenána 4. den klíčení. Šestý den je sledován pokles aktivity amylas (Briggs D.E., 1968; Ritchie *et al.*, 2000). Obdobně jako amylasy jsou produkovány i fytasy.

Aminokyseliny potřebné pro iniciační syntézu hydrolytických enzymů, jsou získávány štěpením zásobních proteinu proteasami. Část proteas se akumuluje v obilce již v průběhu zrání (Ritchie *et al.*, 2000).

V průběhu klíčení jsou zmobilizovány uložené zásoby fosfátů ve formě kyseliny fytové, která je lokalizována v globoidech v PSV (Goyoaga *et al.*, 2011). V aleuronových buňkách zralých obilek jsou četné PSV, které jsou v průběhu klíčení nahrazeny jedinou centrální lytickou vakuolou (Bethke *et al.*, 2007). V PSV se v průběhu 1. dne klíčení vytváří heterogenní otvory, které mohou být v některých případech propojeny s cytolem (Bolte *et al.*, 2011). Může tak dojít rychle k zvýšení hladiny fosfátů v cytosolu, nejsou-li fosfáty imobilizovány v rámci InsP_6 .

Enzym fytasa odštěpuje ortofosfátové skupiny z molekuly InsP_6 za vzniku nižších InsP . Uvolněný fosfát je transportován do místa spotřeby. Na transportu P_i se pravděpodobně podílí fosfátový transportér Pht1;5 (Mudge *et al.*, 2002). Fytasy aktivně se podílející na udržování hladiny a mobilizaci P_i v průběhu klíčení u ječmene spadají do skupiny kyselých fosfatas PAP z anglického (Dionisio *et al.*, 2011). Jelikož byly zaznamenány stejné InsP u zralých obilek a v průběhu klíčení, vyvodil Hatzack *et al.* (2001), že přinejmenším na bazální úrovni jsou fytasy aktivní i ve zralých zrnech. U ječmene je tímto enzymem HvPAPhy_a, který je syntetizován během vývoje semene mezi 15. až 21. dnem po opylení. Následně je ukládán do PSV a může zasahovat do hladiny InsP_6 i ve zralém zrnu a částečně i během klíčení. Během klíčení jsou *de novo* syntetizovány enzymy HvPAPhy_b1 a b2 (Dionisio *et al.*, 2011).

U PAPHy_a se vyvinul Cis-aktivní regulační element, který řídí expresi genu v průběhu zrání semene, zatímco PAPHy_b má zachovanou archaickou úlohu, tj. řízení exprese během klíčení. Aktivita fytasy ve zralých zrnech ječmene a pšenice je tedy s největší pravděpodobností důsledkem neofunkcionalizace. Geny pro HvPAPHy_a jsou lokalizované na chromozomu 5H a geny pro HvPAPHy_b na chromozomu 3H (Madsen *et al.*, 2013).

Obsah InsP₆ v semenech se po uplynutí 10 dnů klíčení snížil až o 81-88%. První den klíčení nebyl zaznamenán signifikantní úbytek InsP₆. Bylo pozorováno výrazné snížení obsahu InsP₆ druhý den klíčení. Většina fytátu byla odbourána do 8. dne klíčení, což koincidovalo s nejvyšší zaznamenanou aktivitou fytasy v průběhu celého experimentu. (Azeke *et al.*, 2011; Greiner *et al.*, 1998).

Jelikož je v transgenní linii ječmene SCLW-GP-PHYA řízena exprese heterologní fytasy pod α -amylasovým promotorem, lze předpokládat, že aktivita heterologního enzymu bude kopírovat trend aktivity amylasy přinejmenším v průběhu klíčení. U zralých semen ječmene a rýže byla detekována jen velmi nízká aktivita α -amylasy, která se markantně zvýšila až v průběhu klíčení (Briggs D.E., 1968; Sun *et al.*, 2015).

Narušení metabolismu InsP₆ může vést i k změně klíčivosti rostlin. MRP4 je typ ABC transportéru, který se podílí na transportu InsP₆ do vakuoly. Transgenní kukuřice s vyřazeným MRP4 ABC transportérem, která měla z více jak 80% snížen obsah InsP₆, vykazovala sníženou frekvenci klíčivosti a samo klíčení bylo opožděno o 1-2 dny (Shi *et al.*, 2007).

4. Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál

- V roce 2014 byl proveden výsev transgenních linií SCLW-GP-PHYA na dvou agronomicky rozdílných lokalitách Olomouc a Lukavec. Současně bylo vyseto osivo generace T7 (sklizeň 2012) a T8 (sklizeň 2013) původem z lokality Olomouc na lokalitu Lukavec a naopak z lokality Lukavec na lokalitu Olomouc.
- Za účelem stanovení aktivity fytasy a obsahu P_i u ječmene pěstovaného v polních pokusech v roce 2014 na lokalitách v Olomouci a Lukavci byly odebrány vzorky z různých transgenních linií SCLW-GP-PHYA generace T7 a T8. Analyzovány byly také kontrolní netransgenní odrůdy ječmene Azit (krmná odrůda) a Golden Promise (sladovnická odrůda). Analyzována byla také směs dihaploidních (DH) linií z křížení SCLW-GP-PHYA x Azit. Hybridizace byla provedena v rámci diplomové práce Hanáková (2014). Přehled analyzovaných linií je uveden v tabulce 1.
- Pro stanovení aktivity fytasy, obsahu P_i a $InsP_6$ v klíčících obilkách byla vybrána transgenní linie ječmene SCLW-GP-PHYA 1015-7. Jako kontrola byl vybrán netransgenní kultivar ječmene Golden Promise.
- Pro charakterizaci zásobních vakuol v buňkách klíčících obilek byla vybrána transgenní linie ječmene SCLW-GP-PHYA 1015-7. Jako kontrola byl vybrán netransgenní kultivar ječmene Golden Promise.

Tabulka 1. Transgenní linie a netransgenní odrůdy z polních pokusů v roce 2014

Genotyp	Lokalita	Linie	Rok	Původ osiva
				Lokalita
Transgenní	Lukavec	1015-7	2012	Olomouc
		1015-7	2013	Olomouc
		1015-7	2013	Lukavec
		1085-5	2013	Olomouc
		880-1	2012	Lukavec
		880-4	2013	Lukavec
		1015-7	2012	Olomouc
		1080-1	2012	Olomouc
	Olomouc	1015-7	2012	Olomouc
		1015-7	2013	Olomouc
		1015-7	2013	Lukavec
		1015-7S	2013	Olomouc
		1015-7S	2013	Olomouc
		1085-5	2013	Olomouc
		880-1	2012	Lukavec
		880-4	2013	Lukavec
		Směs DH linií	2014	Olomouc
Netransgenní	Olomouc, Lukavec	0309	2013	Olomouc
		Azit	2013	Olomouc
		Golden Promise	2013	Olomouc, Lukavec

Zkratka DH označuje dihaploidní linie.

4.2 Stanovení obsahu P_i

Pro stanovení obsahu P_i byl použit pracovní postup z metodiky Vaculová *et al.* (2011). Pro potřeby laboratoře byla metodika v několika krocích modifikována. Principem metody je reakce P_i obsaženého v biologickém vzorku s Chenovým činidlem (Chen *et al.*, 1956) na bázi molybdenanu amonného, kyseliny sírové a askorbové. Vznikající fosfomolybdenová kyselina se redukuje na molybdenovou modř. Spektrofotometricky je stanovena absorbance a na základě kalibrační křivky kvantifikován obsah fosfátu. Stanovení obsahu P_i u všech vzorků bylo provedeno ve třech opakováních, byla vypočítána průměrná hodnota obsahu P_i a směrodatná odchylka.

4.2.1 Chemikálie a roztoky

$C_6H_8O_2$ – Kyselina askorbová 10% roztok

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – Molybdenan amonný 2,5% roztok

H_2SO_4 – Kyselina sírová 6N

K_2HPO_4 – Hydrogenfosforečnan draselný

HCl – Kyselina chlorovodíková 0,4 mol·l⁻¹

H_2O destilovaná

Chenovo činidlo: 2 díly dd H_2O smíchat s 1 dílem 10% kyseliny askorbové, 1 dílem 2,5% molybdenanu amonného a 1 dílem kyseliny sírové.

Fosfátový standard: rozpustit 0,174 g K_2HPO_4 v 100 ml dd H_2O .

4.2.2 Pracovní postup stanovení obsahu fosfátů v biologickém materiálu

1. Homogenizace 12 obilek v kulovém mlýnku (Retsch MM 301) po dobu 2 min při frekvenci 27/s.
2. K navážce 50 mg homogenizovaných obilek byl přidán 1 ml extrakčního roztoku.
3. Extrakce přes noc při 4°C.
4. Protřepání a centrifugace 5 min při 10 000 rpm.
5. Příprava standardních vzorků pro stanovení kalibrační křivky dle tabulky 2.
6. Naneseno 90 μ l destilované vody do 96-jamkové desky.
7. Přidáno 10 μ l extraktu vzorku, každý vzorek v duplikátu.
8. Přidáno 100 μ l Chenova činidla a pipetováním promícháno.
9. Inkubace reakční směsi 2 hod v temné komoře.
10. Stanovena hodnota absorbance při vlnové délce 822 nm.

11. V programu MS Excel byla z absorbancí standardních vzorků sestrojena kalibrační křivka a vypočtena rovnice lineární regrese.

12. Výpočet obsahu fosfátu ve vzorku na základě rovnice lineární regrese.

Tabulka 2. Příprava standardních vzorků

Standard číslo	K ₂ HPO ₄ [μl]	Extrakčního roztok [μl]	H ₂ O [μl]	P _i [ng]
1	0	10	90	0
2	5	10	85	155
3	15	10	75	465
4	30	10	60	960
5	45	10	45	1395

4.3 Stanovení aktivity fytasy

Metoda stanovení aktivity fytasy u homogenizovaných semen obilovin je založena na vytvoření komplexní sloučeniny mezi fosfátem, uvolněným účinkem fytasy z molekuly InsP₆, a molybdenan-vanadičnanovým činidlem. Vznikající komplex je spektrofotometricky stanoven při vlnové délce 415 nm. Množství fosfátu reagujícího s molybdenan-vanadičnanovým činidlem je vypočítáno z rovnice kalibrační křivky vypočtené z grafu regresní závislosti absorbance standardních vzorků na množství fosfátu v nich obsaženém. Obsah fosfátu uvolněného z InsP₆ účinkem fytasy je vypočítán odečtením počátečního obsahu P_i od obsahu po 30minutové inkubaci. Aktivita enzymu je uvedena v jednotce FTU. Tato jednotka je definována jako množství enzymu, které uvolní 1 μmol·l⁻¹ anorganického fosfátu z fytátu sodného za 1 min při pH 5,5 a teplotě 37°C. Aktivita fytasy byla stanovena podle metodiky prováděné v naší laboratoři a uvedené v diplomové práci (Pauk, 2011). Stanovení aktivity fytasy u všech vzorků bylo provedeno ve třech opakováních, byla vypočítána průměrná hodnota aktivity fytasy a směrodatná odchylka.

4.3.1 Chemikálie a roztoky

Amoniak (NH_3) 25% roztok

HCl – Kyselina chlorovodíková 25% roztok

HNO_3 – Kyselina dusičná 22% roztok

KH_2PO_4 – Dihydrogenfosforečnan draselný

$\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_{12}\text{O}_{24}\text{P}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$ – Fytát sodný Sigma (Kat. č. 68388)

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Heptamolybdenan amonný tetrahydrát

$(\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O})$ – Octan sodný trihydrát

Tween 20 10% roztok

NH_4VO_3 – Vanadičnan amonný

H_2O destilovaná

Acetátový pufr 1: 34 g octanu sodného rozpustit v 900 ml dd H_2O ; upravit pH kyselinou chlorovodíkovou na 5,5; doplnit do 1000 ml dd H_2O .

Acetátový pufr 2: 34 g octanu sodného rozpustit v 900 ml dd H_2O ; upravit pH kyselinou chlorovodíkovou na 5,5; přidat 1 ml 10% Tween 20; doplnit do 1000 ml dd H_2O .

Extrakční pufr: 50 μl 10% Tween 20 rozpustit v 50 ml dd H_2O .

Fytátový roztok: rozpustit 2 g fytátu sodného v 200 ml acetátového pufru 1; upravit pH kyselinou chlorovodíkovou na 5,5; doplnit do objemu 250 ml acetátovým pufrem 1.

Molybdenanové činidlo: rozpustit 10 g heptamolybdenanu amonného v 80 ml dd H_2O ; smíchat s 1 ml 25% roztoku amoniaku; doplnit do 100 ml dd H_2O .

Vanadičnanové činidlo: 235 mg vanadičnanu amonného rozpustit v 50 ml dd H_2O o teplotě 50-60°C; přidat 2 ml 22% kyseliny dusičné; doplnit do 100 ml dd H_2O .

STOP činidlo: 1 díl vanadičnanového činidla smíchat s 1 dílem molybdenanového činidla; přidat 2 díly 22% kyseliny dusičné.

Standardní fosfátový roztok: 2,72 g dihydrogenfosforečnanu draselného rozpustit v 100 ml acetátového pufru 2.

4.3.2 Pracovní postup stanovení aktivity fytasy v biologickém materiálu

1. Homogenizace 12 obilek v kulovém mlýnku (Retsch MM 301) po dobu 2 min při frekvenci 27/s.
2. K navážce 100 mg homogenizovaných obilek byl přidán 1 ml extrakčního pufru. Suspenze třepána 60 min na horizontální třepače při frekvenci 560/s.
3. Separace extraktu od matrice 5 min při 10 000 rpm.
4. Do tří 2ml mikrozkušavek bylo odebráno po 100 μ l extraktu. Dvě mikrozkušavky pro paralelní měření a jedna mikrozkušavka pro srovnávací vzorek. Bylo přidáno 300 μ l acetátového pufru 2. Směs promíchána a inkubována 5 min při 37°C.
5. Do mikrozkušavky se srovnávacím vzorkem bylo přidáno 800 μ l STOP činidla a 800 μ l fytátového roztoku. Směs byla protřepána, vyvíjena 10 min při laboratorní teplotě. Centrifugace 5 min při 10 000 rpm.
6. Do mikrozkušavek pro paralelní měření bylo přidáno 800 μ l fytátového roztoku a směs byla po promíchání inkubována 30 minut při 37°C. Bylo přidáno 800 μ l STOP činidla. Směs byla protřepána, vyvíjena 10 min při laboratorní teplotě. Centrifugace 5 min při 10 000 rpm.
7. Stanovení absorpance všech vzorků při vlnové délce 415 nm.
8. Standardní zásobní fosfátový roztok byl naředěn acetátovým pufrem 2 na koncentraci 0,24 – 7 μ mol·ml⁻¹.
9. Do 2ml mikrozkušavek bylo přidáno 360 μ l acetátového pufru 2 a 40 μ l standardu o známé koncentraci. Bylo přidáno 800 μ l fytátového roztoku a 800 μ l STOP činidla.
10. Směs byla promíchána, vyvíjena 10 min při laboratorní teplotě. Centrifugace 5 min při 10 000 rpm.
11. Stanovení absorpance při vlnové délce 415 nm. Sestavení kalibrační křivky.
12. V programu MS Excel byl z rovnice lineární regrese kalibrační křivky vypočítán obsah uvolněného fosfátu.
13. Výpočet obsahu aktivity fytasy.

4.4 Stanovení obsahu InsP₆

Obsah InsP₆ byl stanoven v naklíčených obilkách transgenního ječmene linie 1015-7 a kontrolní odrůdy Golden Promise. Stanovení bylo provedeno metodou kapilární zónové elektroforézy s detekcí hmotnostním spektrometrem (CE-ESI-MS). Metodika byla vypracována a stanovení obsahu InsP₆ provedeno doc. Vítězslav Maier, Ph.D. (Katedra analytické chemie, PřF UP). Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

4.5 Kvantitativní analýzy naklíčených obilek

Zralé obilky ječmene byly naklíčeny po dobu od 1 do 7 dnů. Jako materiál pro stanovení výchozí hodnoty aktivity fytasy, obsahu InsP₆ a P_i byly použity nenaklíčené zralé obilky. Nenaklíčené obilky byly vyřazeny. Rostlinný materiál byl homogenizován a následně analyzován výše uvedenými metodami. Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány. Byl použit dvou-výběrový studentův T-test pro srovnání hodnot aktivity fytasy, obsahu P_i a InsP₆ mezi jednotlivými dny u kontrolní a transgenní linie.

4.5.1 Chemikálie a roztoky

NaClO – Chlornan sodný 0,3% roztok

4.5.2 Pracovní postup

1. Dezinfekce obilek v 0,3% chlornanu sodném. 2krát promytí destilovanou vodou.
2. Výsev na vlhčený filtrační papír.
3. Klíčení 1 – 7 dní. Po uplynutí stanovené doby klíčení, byly obilky zbaveny všech zelených částí a kořínků.
4. Vysušení obilek při laboratorní teplotě 3 dny.
5. Homogenizace obilek v kulovém mlýnku (Retsch MM 301) 2 min při 27/s.
6. Uložení ve 4°C do analýzy.

4.6 Charakterizace zásobních globoidů

K přípravě mikroskopických preparátů byl námi modifikován pracovní postup publikovaný Matsushima (2014). Byly charakterizovány globoidy v zásobních vakuolách aleuronových buněk pozorované světelným mikroskopem. Obilky ječmene transgenní linie 1015-7 a kontrolní netransgenní odrůdy Golden Promise byly naklíčeny po dobu 1, 2, 3 dnů na filtračním papíře v Petriho miskách. Poslední den klíčení, před fixací, byly z obilek odstraněny kořeny a primární list. Byly také pořízeny snímky nebarvených vybraných preparátů doc. PharmDr. Petrem Babulou Ph.D. (Fyziologický ústav MU Brno) na fluorescenčním mikroskopu.

4.6.1 Chemikálie a roztoky

CH_2O – Formaldehyd 36-38% roztok

$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ – Etanol 96%

$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ – ethanová kyselina (triv. náz. ledová kyselina octová)

Mowiol[®] 4-88 – zalévací médium, Sigma (Kat. č. 81381)

Toluidinová modř – barvivo, Sigma (Kat. č. 89640)

4.6.2 Pracovní postup přípravy preparátů

1. Fixace, odvodnění a infiltrace zalévacím médiem (Matsushima, 2014).
2. Příprava 7 μm silných řezů mikrotonem.
3. Barvení řezů v 0,01% roztoku toluidinové modři po dobu 1 min.
4. Vymytí barviva destilovanou vodou.
5. Uzavření preparátu krycím médiem a přikrytí krycím sklem.
6. Bylo provedeno pozorování mikroskopem Olympus BX 40 (objektiv 20/okulár 10).
7. Fotografie byly pořízeny digitální kamerou.

4.7 Použité přístroje

Synergy 2 Multi-Mode Reader spektrofotometr

Retsch MM 301 homogenizátor

Eppendorf 5418 Microcentrifuge stolní centrifuga

Yellow Line OS 5 Basic orbitální třepačka

Olympus BX 40 světelný mikroskop

Olympus DP 70 digitální kamera

Zeiss Hyrax M 40 mikrotom

Kapilární elektroforéza CE Agilent G7100

Hmotnostní spektrometr Agilent 6460 TripleQuad

Izokratická pumpa LC Agilent

5. Výsledky

5.1 Polní pokusy Olomouc, Lukavec 2014

Na lokalitách v Olomouci a Lukavci byly sklizeny linie transgenního ječmene SCLW-GP-PHYA a původní netransgenní odrůdy. Ze sklizených linií byla odebrána zrna pro spektrofotometrickou analýzu. Celkem byl stanoven obsah P_i a aktivita fytasy ve zralých obilkách u 25 linií transgenních linií a netransgenních odrůd z výše zmíněných lokalit, viz tabulka 3. Celkově vyšší aktivitu fytasy vykazovaly linie pěstované na lokalitě Lukavec ve srovnání s lokalitou Olomouc, viz graf 1. Obsah P_i byl průměrně vyšší u linií z lokality Olomouc a nižší u linií z lokality Lukavec, viz graf 2. Nebyla nalezena korelace (Korelace 0,0077 při $n=21$) mezi obsahem fosfátů (P_i) a aktivitou fytasy ve zralých obilkách ječmene z obou lokalit, viz graf 3. Hodnoty uvedené v tabulce 3 jsou průměry tří nezávislých měření, pro každou průměrnou hodnotu byla vypočítána směrodatná odchylka.

5.1.1 Lokalita Olomouc 2014

Na lokalitě Olomouc byl ve vzorcích stanoven obsah P_i v rozmezí od 2,765 mg/g do 6,214 mg/g. Nejvyšší obsah P_i byl ve vzorku směs DH linií. Nejnižší obsah P_i byl naměřen u transgenní linie 1015-7 (osivo Lukavec 2013). Ve srovnání s netransgenním kultivarem Azit (4,125 mg/g), který byl pěstován na stejné lokalitě, vykazovala směs DH linií o 50 % vyšší obsah P_i (6,214 mg/g). Obsah P_i v obilkách transgenní linie 1015-7 (osivo Olomouc 2012) 4,07 mg/g však srovnatelný s obsahem P_i u kontroly Golden Promise 4,049 mg/g.

Nejvyšší aktivita fytasy byla naměřena ve směsném vzorku DH linií 0,821 FTU/g. Nejnižší aktivitu fytasy vykazovala linie 1085-5 (osivo Olomouc 2013) 0,484 FTU/g. Směs DH linií vykazovala ve srovnání s netransgenní odrůdou Azit 0,564 FTU/g a Golden Promise 0,566 FTU/g o 45 % vyšší aktivitu fytasy. Transgenní linie 1015-7 (osivo Lukavec 2013) vykazovala z původních transgenních linií nejvyšší aktivitu fytasy 0,675 FTU/g. Kontrolní odrůda Golden Promise vykazovala aktivitu pouze 0,566 FTU/g.

5.1.2 Lokalita Lukavec 2014

Ze vzorků ječmene sklizeného na lokalitě Lukavec byl z transgenních linií stanoven nejvyšší obsah P_i u linie 1015-7 (osivo Olomouc 2012) 2,773 mg/g. Kontrolní odrůda Golden Promise obsahovala v obilkách 2,919 mg/g P_i . Nejvyšší obsah P_i v rámci lokality však vykazovala netransgenní odrůda Azit 4,084 mg/g. Nejnižší obsah fosfátů vykazovala linie 1015-7S (osivo Olomouc 2013) 1,656 mg/g.

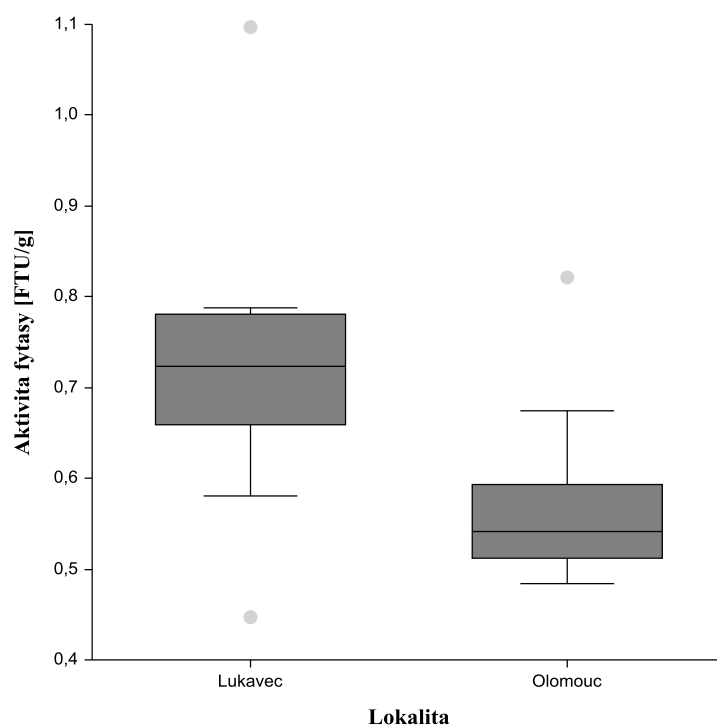
Z transgenních linií z lokality Lukavec vykazovala nejvyšší aktivitu fytasy linie 880-4 (osivo Lukavec 2013) 0,787 FTU/g. Nejnižší aktivita fytasy v této lokalitě byla naměřena u netransgenní odrůdy Golden Promise 0,447 FTU/g. Avšak nejvyšší aktivita fytasy ze všech testovaných linií byla naměřena u netransgenní odrůdy Azit 1,096 FTU/g.

Tabulka 3. Aktivita fytasy a obsah P_i - polní pokusy 2014

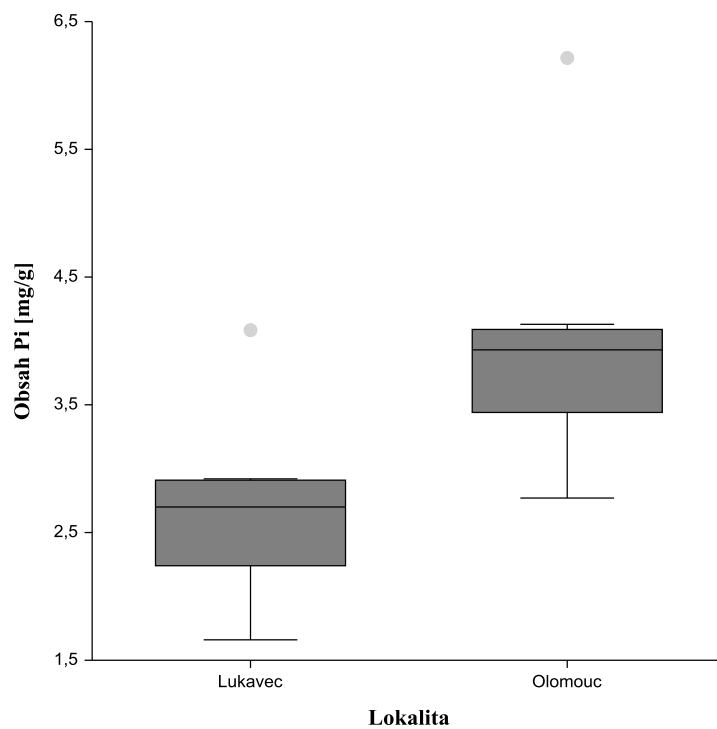
Lokalita	Linie	Osivo	Aktivita fytasy FTU/g	Obsah P_i [mg/g]
Lukavec	1015-7	Olomouc 2012	0,723 ± 0,09	2,773 ± 0,24
	1015-7	Olomouc 2013	0,72 ± 0,07	2,745 ± 0,25
	1015-7	Lukavec 2013	0,781 ± 0,07	2,695 ± 0,2
	1085-5	Olomouc 2013	0,732 ± 0,09	2,244 ± 0,12
	880-1	Lukavec 2012	0,58 ± 0,07	2,097 ± 0,19
	880-4	Lukavec 2013	0,787 ± 0,06	2,442 ± 0,13
	1015-7S	Olomouc 2013	0,676 ± 0,12	1,656 ± 0,22
	1080-1S	Olomouc 2013	0,763 ± 0,02	2,481 ± 0,32
	0309 14	Olomouc 2013	0,659 ± 0,03	2,908 ± 0,22
	GPUK 99	Olomouc 2013	0,447 ± 0,1	2,919 ± 0,21
	Azit	Olomouc 2013	1,096 ± 0,11	4,084 ± 0,22
Olomouc	1015-7	Olomouc 2012	0,528 ± 0,08	4,07 ± 0,38
	1015-7	Olomouc 2013	0,545 ± 0,002	3,46 ± 0,15
	1015-7	Lukavec 2013	0,675 ± 0,02	2,765 ± 0,03
	1085-5	Olomouc 2013	0,484 ± 0,11	3,635 ± 0,26
	880-1	Lukavec 2012	0,515 ± 0,05	3,381 ± 0,35
	880-4	Lukavec 2013	0,535 ± 0,08	4,084 ± 0,19
	0309 14	Olomouc 2013	0,503 ± 0,07	3,802 ± 0,21
	GPUK 99	Lukavec 2013	0,566 ± 0,03	4,049 ± 0,15
	Azit	Olomouc 2013	0,564 ± 0,01	4,125 ± 0,09
	DH	Olomouc 2013	0,821 ± 0,04	6,214 ± 0,12

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření s vyjádřenou směrodatnou odchylkou.

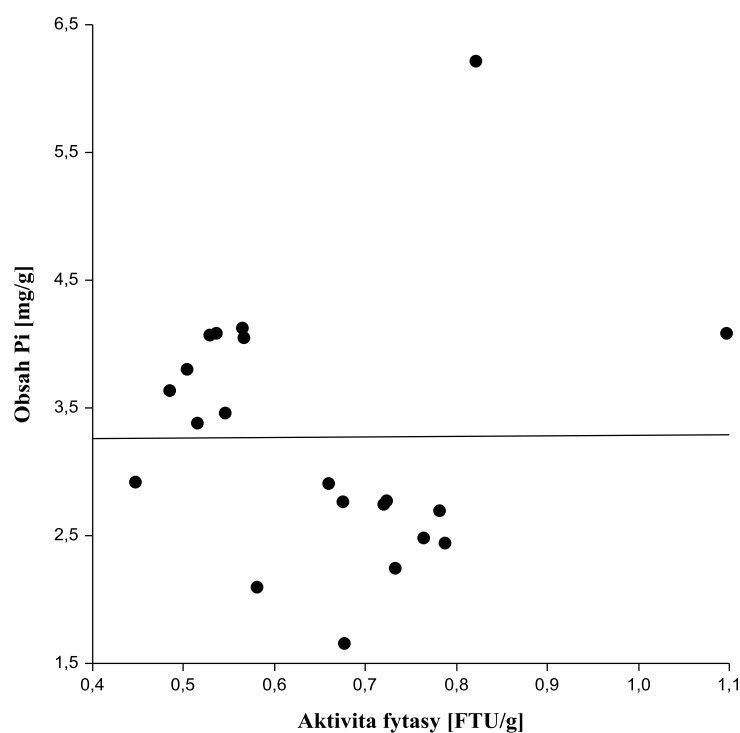
Graf 1. Aktivita fytasy - lokalita Olomouc, Lukavec 2014



Graf 2. Obsah P_i - lokalita Olomouc, Lukavec 2014



Graf 3. Korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i



Korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i 0,0077, $n=21$.

5.2 Obsah zásobní a aktivní formy P v průběhu klíčení

Byly charakterizovány změny v obsahu zásobní a aktivní formy P v průběhu klíčení. Byly srovnávány transgenní linie se zvýšenou aktivitou fytasy SCLW-GP-PHYA 1015-7 a netransgenní kontrolní odrůdy Golden Promise. U naklíčených obilok transgenní linie 1015-7 a netransgenní kontrolní odrůdy bylo provedeno stanovení aktivity fytasy a obsahu P_i a obsahu $InsP_6$, viz tabulka 4. Klíčivost u obou testovaných linií ve všech opakováních se pohybovala od 98-100 %. Proti údajům z literatury (Shi *et al.*, 2007) nebyly pozorovány ani jiné fyziologické změny během začátku klíčení u transgenní linie. Ze 3 nezávislých měření byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tabulka 4. Obsah P_i, InsP₆ a aktivita fytasy v klíčících obilkách ječmene

Den klíčení	InsP ₆ [mg/g]		P _i [mg/g]		Aktivita fytasy [FTU/g]	
	1015-7	Golden Promise	1015-7	Golden Promise	1015-7	Golden Promise
0	12,63 ± 0,82	9,52 ± 0,93	9,97 ± 0,4	3,61 ± 0,36	1,63 ± 0,19	0,85 ± 0,02
1	11,81 ± 1,21	9,84 ± 1,03	7,99 ± 0,4 ^c	3,13 ± 0,39	1,17 ± 0,19	1,06 ± 0,02 ^b
2	10,12 ± 1,11 ^a	8,84 ± 0,82	7,67 ± 0,77	3,8 ± 0,45	3,25 ± 0,32 ^b	2,66 ± 0,1 ^b
3	10,51 ± 13,2	9,21 ± 1,12	12 ± 1,11 ^b	8,42 ± 0,86 ^b	4,29 ± 0,15 ^b	2,87 ± 0,07
4	8,74 ± 1,23 ^a	7,74 ± 1,14	21,07 ± 1,68 ^b	14,23 ± 0,58 ^b	4,55 ± 0,15	3,53 ± 0,27 ^b
5	8,32 ± 1,14 ^a	6,92 ± 1,13 ^a	27,15 ± 1,85 ^b	21,01 ± 0,78 ^b	4,66 ± 0,13	3,06 ± 0,01
6	7,81 ± 1,24 ^a	7,22 ± 1,12	39,84 ± 1,71 ^b	23,35 ± 0,76 ^b	5,07 ± 0,09 ^b	2,95 ± 0,05 ^c
7	7,03 ± 1,42 ^a	8,01 ± 1,11	44,73 ± 4,2	24,63 ± 0,75	4,55 ± 0,02 ^c	2,19 ± 0,03 ^c

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření s vypočítanou směrodatnou odchylkou.

^a značí statisticky průkazné snížení obsahu InsP₆ od výchozí hodnoty ze dne 0 (P < 0,05).

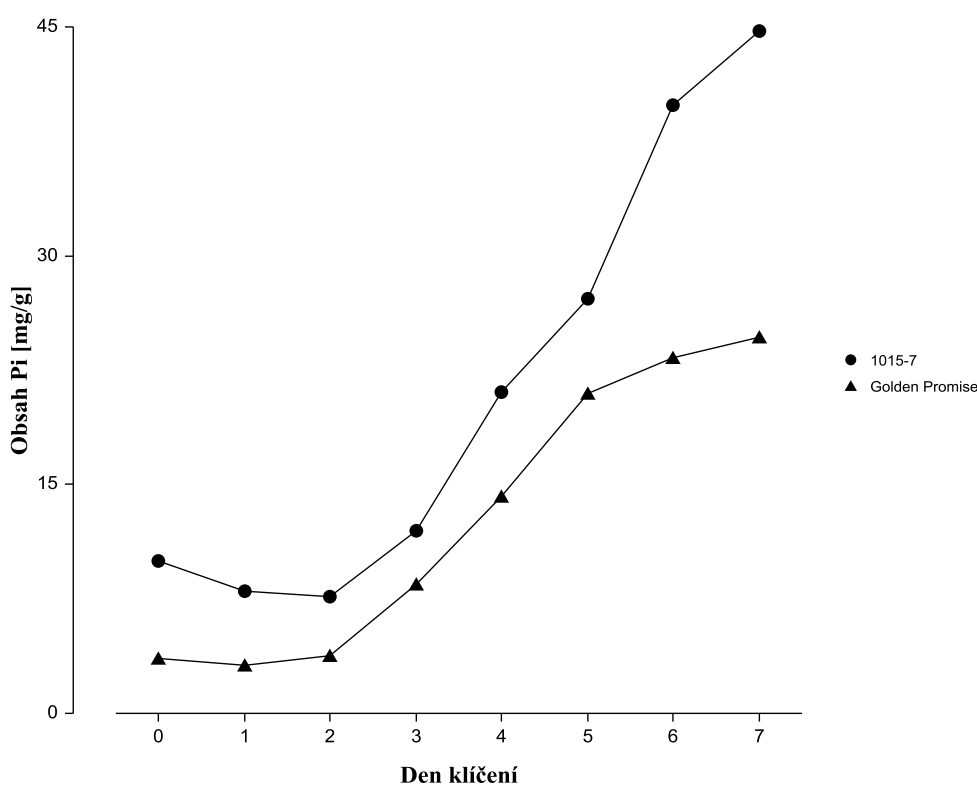
^b značí statisticky průkazné zvýšení obsahu P_i či aktivity fytasy oproti předcházejícímu dnu (P < 0,05).

^c značí statisticky průkazné snížení obsahu P_i či aktivity fytasy oproti předcházejícímu dnu (P < 0,05).

5.2.1 Obsah P_i v průběhu klíčení

Změny obsahu P_i v průběhu klíčení viz graf 4. Počáteční hladina fosfátu byla vyšší u transgenní linie 1015-7 9,97 mg/g než kontrolní odrůdy 3,61 mg/g. U transgenní linie došlo v první den k snížení obsahu P_i o pětinu ($P < 0,05$) na 7,99 mg/g. Mírný pokles byl pozorován i druhý den 7,67 mg/g. Naopak u kontrolní odrůdy bylo pozorováno mírné snížení obsahu P_i pouze první den na 3,13 mg/g, ale rozdíl v hladinách nebyl významný. Druhý den bylo u kontroly zaznamenáno zvýšení obsahu P_i na 3,8 mg/g. Třetí den klíčení bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení obsahu P_i ($P < 0,05$) jak u transgenní linie 12 mg/g tak i kontrolní odrůdy 8,42 mg/g. Avšak zatímco v případě transgenní linie se zvýšil obsah P_i o 56%, v případě kontrolní odrůdy bylo zvýšení 2,2násobné. Obsah P_i se následující dny kumulativně zvyšoval. U netransgenního ječmene došlo z 5. na 6. den k viditelnému snížení tempa uvolňování P_i z 21 mg/g na 23,35 mg/g. V případě transgenního ječmene nastalo naopak nejvýraznější zvýšení obsahu P_i z 27,15 mg/g na 39,84 mg/g. Statisticky neprůkazné zvýšení obsahu P_i bylo pro obě linie pozorováno až 7. den klíčení. Transgenní linie ve srovnání s kontrolou vykazovala v průběhu celé doby klíčení prokazatelně vyšší obsah P_i ($P < 0,05$).

Graf 4. Obsah P_i v průběhu klíčení

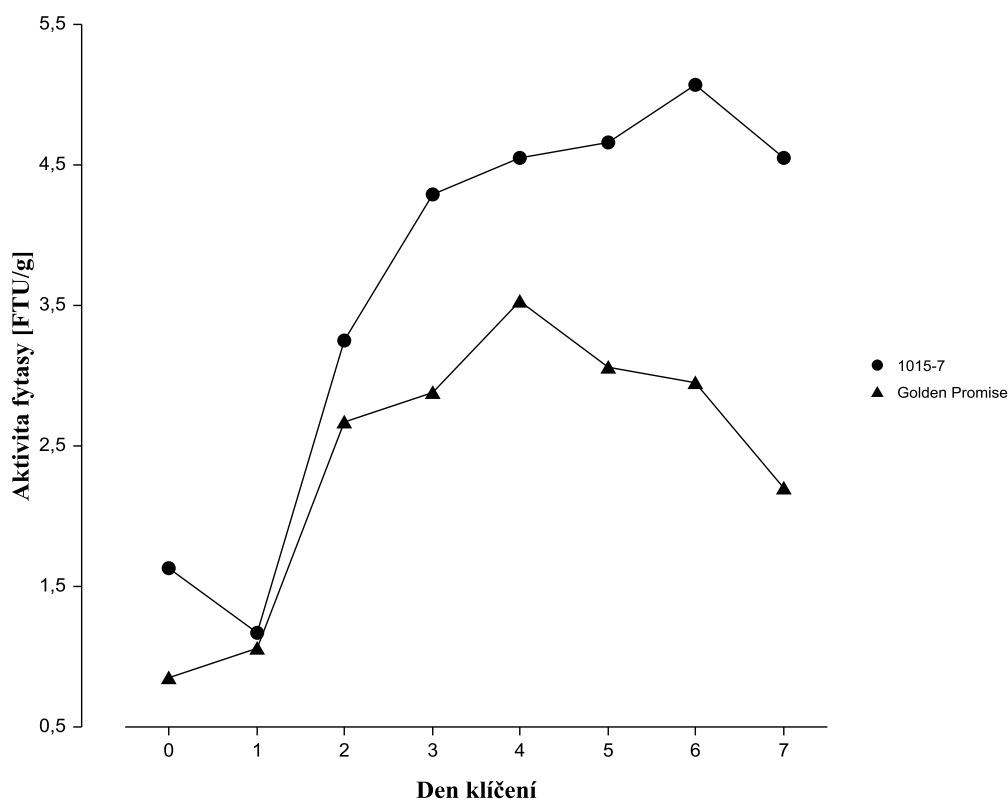


5.2.2 Aktivita fytasy v průběhu klíčení

Změny v aktivitě fytasy v průběhu klíčení viz graf 5. Aktivita fytasy se taktéž signifikantně lišila mezi transgenní a kontrolní linií u zralých obilek. Počáteční aktivita fytasy transgenní linie 1,63 FTU/g byla vyšší než aktivita u kontrolní odrůdy 0,85 FTU/g. Na začátku klíčení došlo u transgenní linie první den k výraznému poklesu aktivity fytasy 1,17 FTU/g, zatímco u kontrolní odrůdy nastalo mírné zvýšení aktivity 1,06 FTU/g. Druhý den klíčení byl pozorován vysoký nárůst aktivity fytasy u kontroly 2,66 FTU/g i transgenní linie 3,25 FTU/g. Třetí den klíčení bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení aktivity fytasy pouze u transgenní linie 4,29 FTU/g. U kontrolní odrůdy nastalo zvýšení aktivity fytasy 2,87 FTU/g, nebylo ovšem tak výrazné.

Čtvrtý den klíčení byla zaznamenána nejvyšší aktivita fytasy u kontrolní odrůdy 3,53 FTU/g, v následujících dnech došlo k poklesu aktivity fytasy až pod úroveň aktivity z druhého dne. U transgenní linie se aktivita fytasy s přibývajícím dnem klíčení naopak zvyšovala a dosáhla vrcholu 6. den klíčení 5,07 FTU/g. Sedmý den klíčení poklesla aktivita fytasy u transgenní linie 4,55 FTU/g i kontrolní odrůdy 2,19 FTU/g. Propad aktivity byl více patrný v případě kontroly.

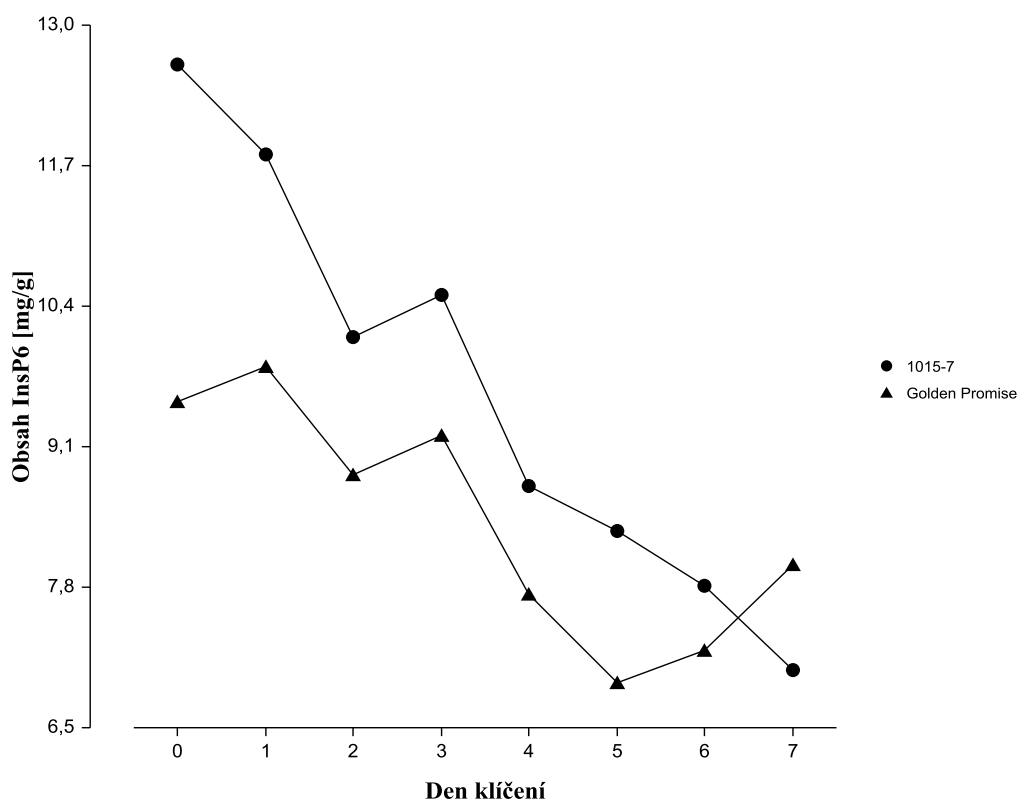
Graf 5. Aktivita fytasy v průběhu klíčení



5.2.3 Obsah InsP₆ v průběhu klíčení

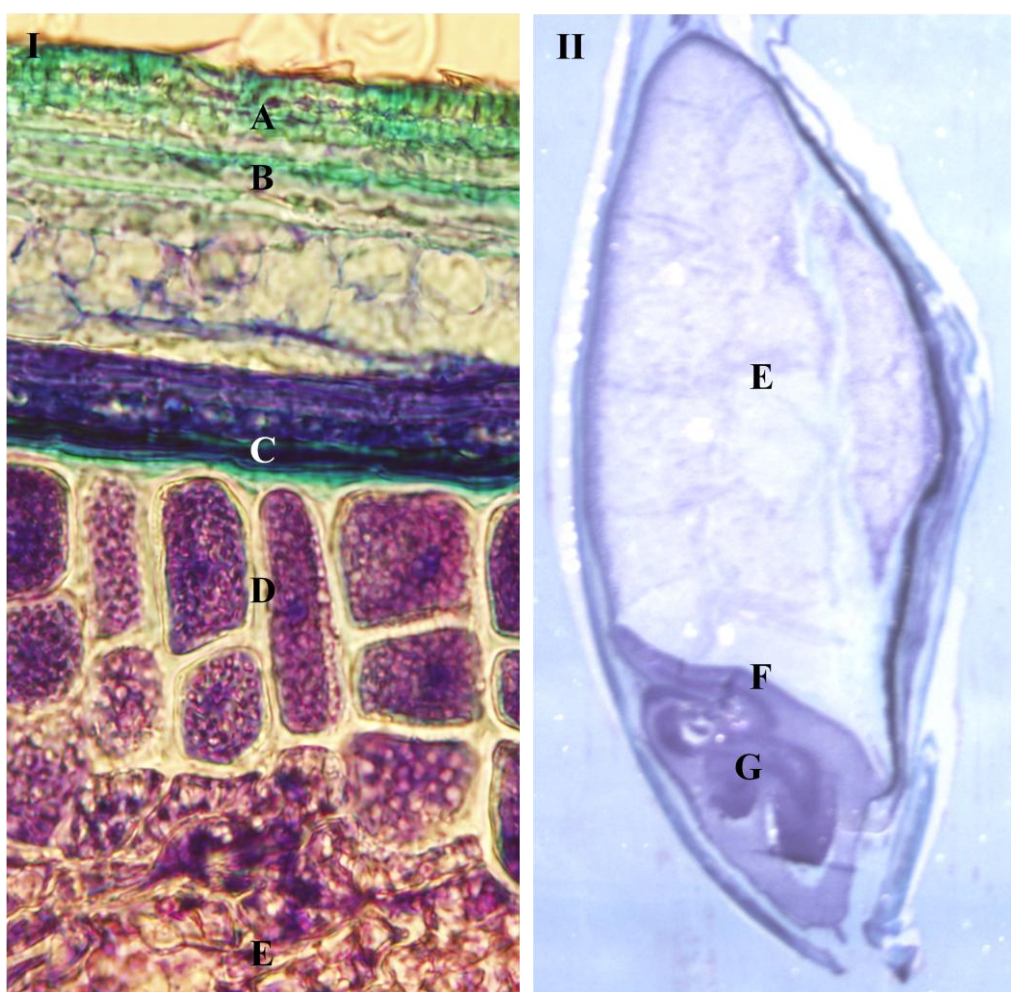
Změny v obsahu InsP₆ v průběhu klíčení viz graf 6. Obsah InsP₆ byl nejvyšší u zralých obilek transgenního 12,63 mg/g i netransgenního ječmene 9,52 mg/g. V průběhu klíčení byl InsP₆ postupně odbouráván. Byla pozorována silná negativní korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem InsP₆ u kontrolní i transgenní linie. Významné snížení obsahu InsP₆ ($P < 0,05$) bylo u transgenní linie zaznamenáno již druhý den klíčení 10,12 mg/g. Třetí den klíčení bylo pozorováno zvýšení obsahu InsP₆ u obou testovaných ječmenů, transgenní 10,51 mg/g a kontrolní 9,21 mg/g. Po následující dny byl u transgenní linie sledován úbytek obsahu InsP₆. Během 7 dnů klíčení bylo v obilce degradováno až 45 % z uloženého InsP₆. U kontrolní linie byl pozorován pokles obsahu InsP₆, čtvrtý den 7,74 mg/g a pátý den 6,92 mg/g. Šestý a sedmý den klíčení bylo naopak zaznamenáno zvýšení obsahu InsP₆. Vycházejíce z hodnoty obsahu InsP₆ v pátý den klíčení, byl v prvních pěti dnech snížen obsah InsP₆ u kontrolní linie o 27 %.

Graf 6. Obsah InsP₆ v průběhu klíčení



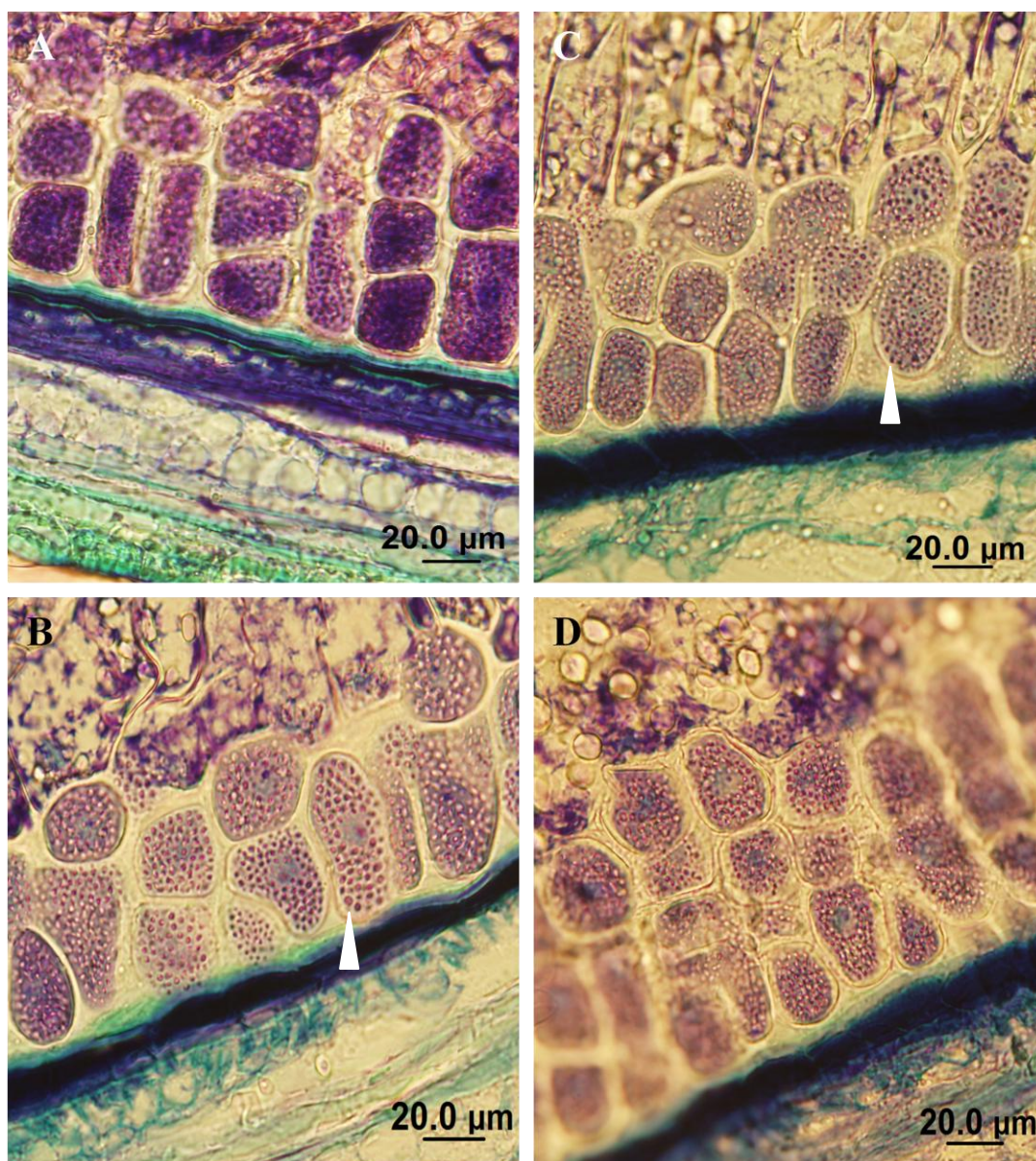
5.3 Anatomická charakteristika obilky

Byly připraveny mikroskopické preparáty řezů klíčících obilek ječmene. Byly pozorovány anatomické řezy obilek transgenního a netransgenního ječmene barvené toluidinovou modří. Příčný řez obilkou a stavba obalových vrstev viz obrázek 1. Azurově zeleně jsou obarveny plucha a svrchní obalová vrstva buněk perikarpu. Parenchymatické buňky, které jsou součástí perikarpu, jsou slabě modře obarveny. Tmavě modře až fialově jsou obarveny spodní vrstvy perikarpu. Pod touto vrstvou je relativně tenká vrstva syté, tmavě modře obarveného osemení - testa. Tmavě fialově jsou obarveny buňky aleuronu. Pod aleuronovou vrstvou jsou uspořádány buňky endospermu.

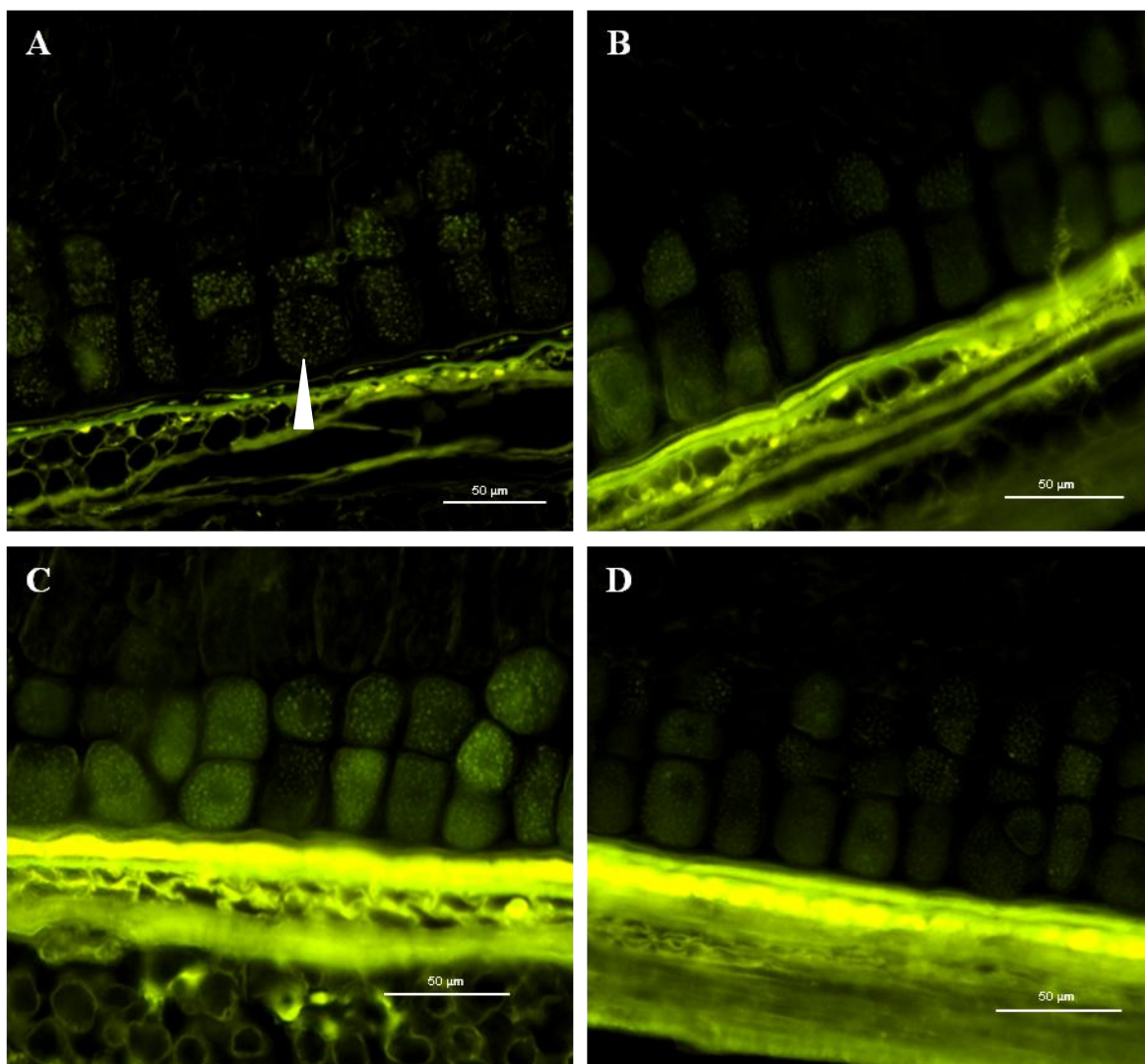


Obrázek 1. Anatomie obilky. I Řez obalovými vrstvami obilky, **II** Anatomická stavba obilky. A - plucha, B – vícevrstevný perikarp, C – testa, D – aleuronová vrstva, E – endosperm, F - skutelum, G - embryo

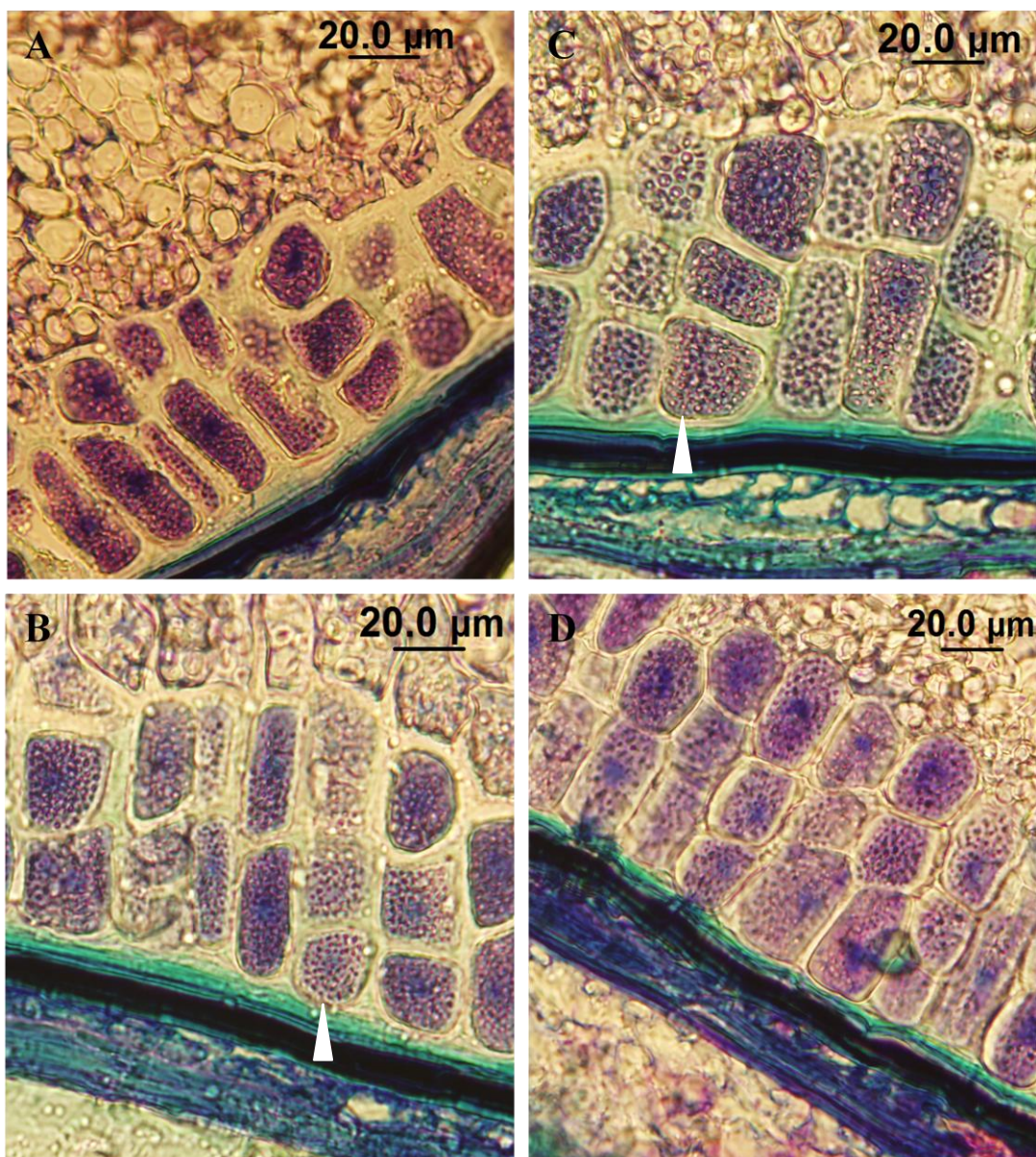
Globoidy obsahující kyselinu fytovou jsou obarveny do růžové až fialové barvy. Globoidy jsou homogenně distribuovány v rámci aleuronových buněk, ve kterých se vyskytují ve velkém počtu. V průběhu tří dnů klíčení nebyl pozorován výrazný úbytek četnosti globoidů v aleuronových buňkách u transgenní linie 1015-7, viz obrázek 2 a 3. Úbytek četnosti globoidů nebyl zaznamenán ani u kontrolní odrůdy, viz obrázek 4 a 5. Globoidy byly s výrazně nižší četností zaznamenány v buňkách embrya, viz obrázek 6.



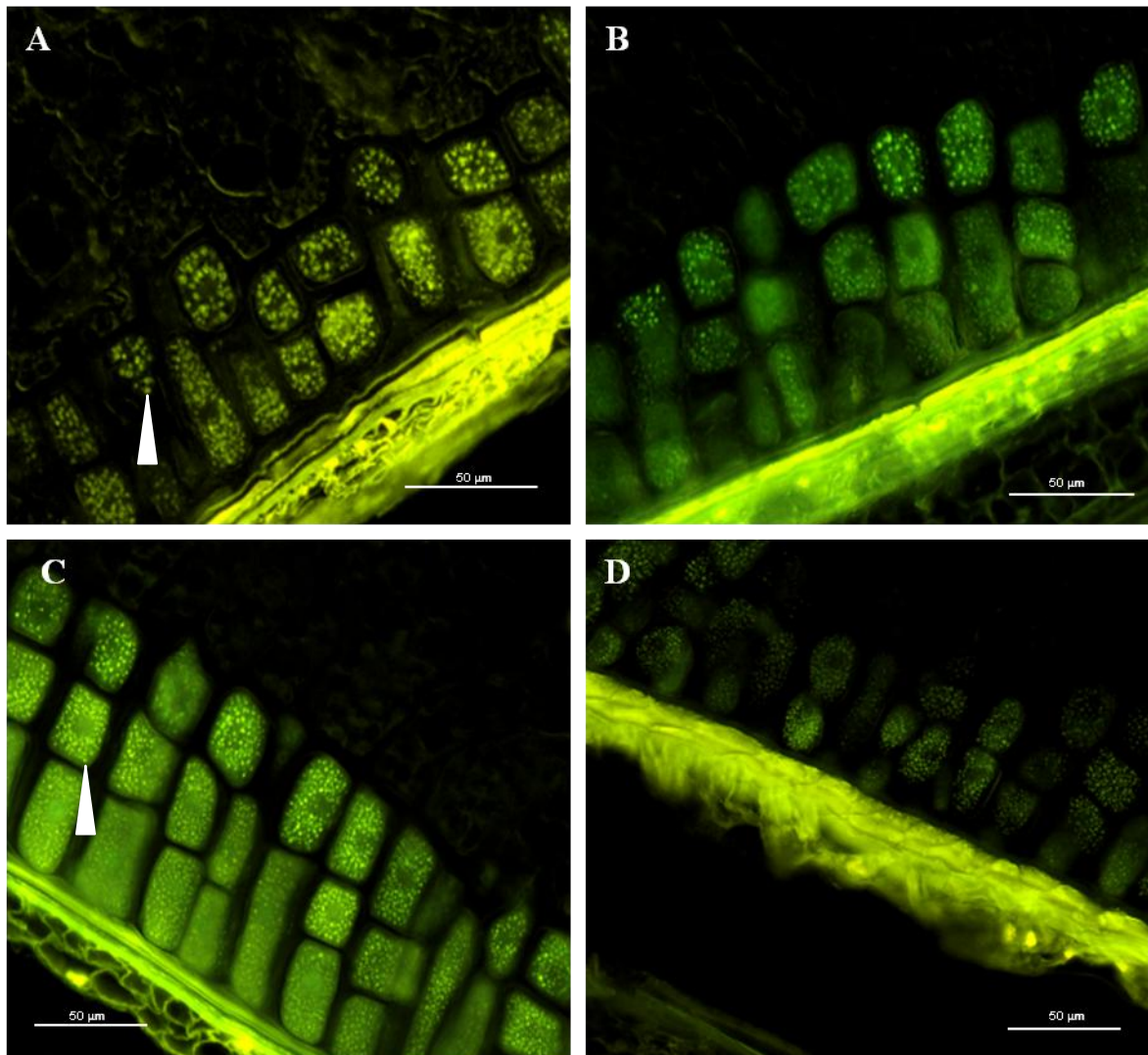
Obrázek 2. Četnost globoidů během klíčení u transgenní linie 1015-7. Světelný mikroskop Olympus BX 40. A – zralá obilka, B – 1 den klíčení, C – 2 dny klíčení, D – 3 dny klíčení. Bílou šipkou vyznačeny globoidy.



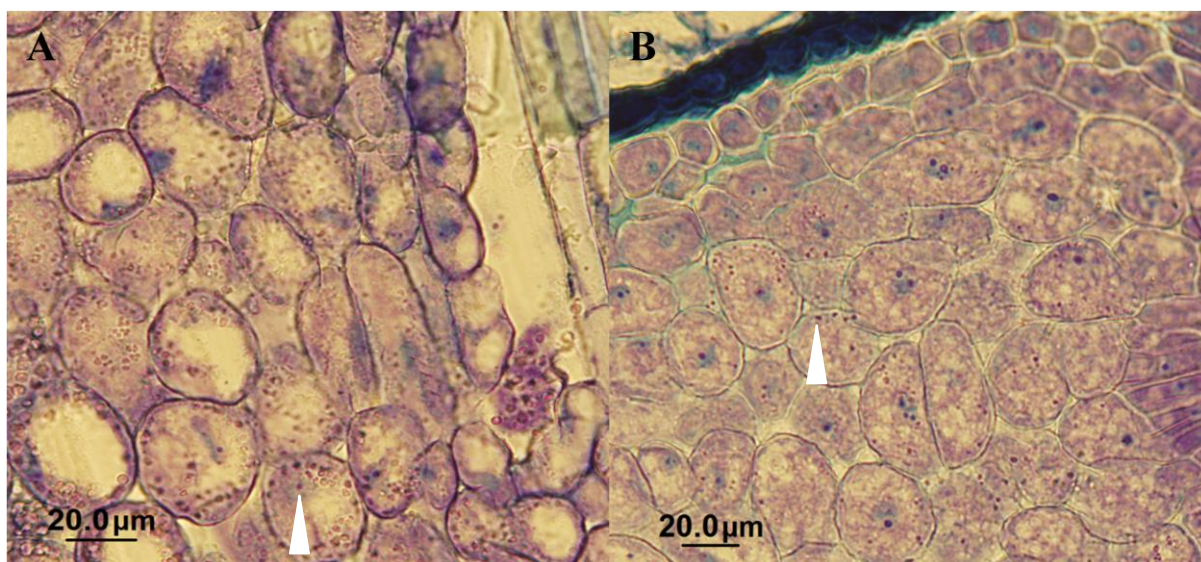
Obrázek 3. Četnost globoidů během klíčení u transgenní linie 1015-7. A – zralá obilka, B - 1 den klíčení, C – 2 dny klíčení, D – 3 dny klíčení. Bílou šipkou vyznačeny proteinové tělíška a fytátové globoidy. Snímky pořídil doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.



Obrázek 4. Četnost globoidů během klíčení u kontrolní odrůdy Golden Promise. Světelný mikroskop Olympus BX 40. A – zralá obilka, B – 1 den klíčení, C – 2 dny klíčení, D – 3 dny klíčení. Bílou šipkou vyznačeny globoidy.



Obrázek 5. Četnost globoidů během klíčení u transgenní linie 1015-7. A – zralá obilka, B - 1 den klíčení, C – 2 dny klíčení, D – 3 dny klíčení. Bílou šipkou vyznačeny proteinová tělíska a fytátové globoidy. Snímky pořídil doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.



Obrázek 6. Četnost globoidů v embryu. A – transgenní linie 1015-7, B – kontrolní odrůda Golden Promise. Bílou šipkou označeny globoidy.

6. Diskuze

Linie pěstované na lokalitě Olomouc vykazují ve srovnání s liniemi pěstovanými na lokalitě Lukavec vyšší obsah fosfátů ve zralých obilkách. Současně ale linie z lokality Olomouc vykazují nižší aktivitu fytasy oproti stejným liniím pěstovaným na lokalitě Lukavec. Pro obě lokality platí, že mezi aktivitou fytasy a obsahem fosfátů ve zralých obilkách byla pozorována slabá korelace. Tyto výsledky jsou ve shodě s již dříve prezentovanými daty z roku 2012 (Vlčko, 2013). Podobně Liu *et al.* (2006) zaznamenal jen slabou pozitivní korelaci mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i . Nebylo prokázáno, že by transgenní linie sklizené na lokalitě Olomouc a tedy prezentující se vyšším obsahem P_i a nižší aktivitou fytasy ve zralých obilkách, tyto charakteristiky vykazovaly v následující generaci při pěstování na lokalitě Lukavec. Podobně linie z lokality Lukavec vyšetřené na lokalitě Olomouc nevykazovaly vyšší aktivitu fytasy a nižší obsah P_i ve zralých obilkách. Z výsledků lze odvodit, že lokalita pěstování má zásadní vliv na aktivitu fytasy a obsah P_i jako jedny z důležitých agronomických charakteristik.

Byly naklíčeny obilky transgenního a kontrolního ječmene s cílem charakterizace forem fosforu a dynamických změn v jejich obsahu, které nastávají v průběhu klíčení. Byl stanoven vyšší počáteční obsah P_i a aktivita fytasy u transgenní linie v porovnání s kontrolní odrůdou v důsledku akumulace heterologní fytasy v obilkách během jejich vývoje. Na základě dříve provedených studií (Brinch-Pedersen *et al.*, 2006) lze předpokládat, že se heterologní fytasy ukládají do PSV, kam jsou přirozeně ukládány i zásobní proteiny. Za snížením obsahu $InsP_6$ během prvního dne klíčení jsou tedy odpovědné fytasy přítomné ve zralých obilkách.

Jelikož nebyla u transgenní linie SCLW-GP-PHYA cíleně pozměněna kapacita ukládání zásobních proteinů, je pravděpodobné, že heterologní fytasa je metabolismem v první hodiny klíčení obdobně jako zásobní proteiny využita za zdroj aminokyselin. Je proto důvodné se domnívat, že pokles aktivity fytasy sledovaný u transgenní linie 1015-7 prvního dne klíčení, je způsoben činností proteas jako důsledek poptávky metabolismu po aminokyselinách.

Nicméně biochemické procesy metabolismu vyžadují P_i , který je získáván odbouráváním $InsP_6$. To je podporováno mírným zvýšením aktivity fytasy u netransgenní odrůdy a současně poklesem aktivity fytasy u transgenní linie pouze na úroveň netransgenní kontroly v první den klíčení. Snížení obsahu P_i u transgenní linie i kontrolní

odrůdy první den klíčení lze vysvětlit zvyšující se činností metabolismu, jehož požadavky na P_i jsou vyšší, než jsou fyty schopné zajistit degradací $InsP_6$.

Nedostačující aktivita fyty u zralých obilok kontrolní odrůdy vyústila v nutnost biosyntézy fyty. Výsledkem bylo zvýšení aktivity fyty již první den následované mírným zvýšením obsahu P_i následujícího dne. Naopak obilky transgenní linie nesyntetizovaly fyty, jelikož vykazovaly dostatečné zásoby P_i a taky aktivní fyty. Výsledkem bylo spotřebovávání P_i a degradace fyty jako zdroje aminokyselin v průběhu prvního dne klíčení.

I přes výrazné snížení obsahu $InsP_6$ klesal obsah P_i u transgenní linie i druhý den klíčení. Pravděpodobně byl uvolněný fosfát z fyty ihned metabolizován. Druhý den pak byla spolu se začínající sekrecí α -amylasy syntetizována i heterologní fyta *PhyA*, která přispěla k průkaznému ($P < 0,05$) rozdílu aktivity fyty. Až 70 % syntetizovaných a sekretovaných enzymů z aleuronu do endospermu během klíčení jsou α -amylasy. Jejich sekrece je zahájena 2. dne klíčení (Ritchie *et al.*, 2000). Je-li heterologní fyta pod amylasovým promotorem, je možné, že se podíl sekretovaných amylas sníží ve prospěch heterologního enzymu.

Signifikantní rozdíl v aktivitě fyty od druhého dne klíčení je u transgenní linie zapříčiněn aktivitou heterologního enzymu. Průkazné snížení obsahu $InsP_6$ ($P < 0,05$) v průběhu klíčení, které nastalo u transgenní linie již 2. den, koinciduje s významným zvýšením aktivity fyty ($P < 0,05$) a následující den ke zvýšení obsahu P_i ($P < 0,05$). Rozdíl ve zvýšení obsahu P_i třetí den byl u transgenní linie jen 57%, zatímco u kontrolní odrůdy byl rozdíl 121%. Příčinou byl nejspíše nižší obsah P_i u kontrolní linie, což vedlo k markantnějšímu zvýšení obsahu P_i v důsledku aktivity syntetizovaných fyty.

Nejvyšší aktivita fyty byla u kontrolní netransgenní odrůdy zaznamenána 4. den klíčení. Ke stejnému výsledku dospěl i Sung *et al.* (2005). Signifikantně významné ($P < 0,05$) snížení obsahu $InsP_6$ u kontrolní odrůdy, které bylo pozorováno 5. den klíčení, koincidovalo s nejvyšší pozorovanou aktivitou fyty. Greiner *et al.* (1998) pozoroval výrazné snížení obsahu $InsP_6$ už druhý den klíčení. Druhý den klíčení bylo pozorováno u netransgenní odrůdy viditelné snížení, nicméně nebylo statisticky průkazné při $P < 0,05$.

Transgenní linie 1015-7 dosáhla úrovně aktivity fyty, srovnatelné s nejvyšší naměřenou aktivitou fyty u kontrolní linie, přibližně o dva dny dříve. Současně se aktivita fyty nadále zvyšovala v následujících dnech. Pokles v aktivitě byl zaznamenán až v poslední den klíčení. K poklesu aktivity u transgenní linie poslední den

klíčení, mohlo dojít v důsledku snížení aktivity amylasového promotoru, neboť 6. a 7. den klíčení už nebyl v obilce přítomen téměř žádný škrobový endosperm.

Zvýšení obsahu InsP_6 6. a 7. den klíčení u kontrolní odrůdy je přirozeně nepravděpodobné z důvodu neaktivní syntetické dráhy InsP_6 . Vysvětlením může být skutečnost, že během klíčení jsou spotřebovány škrobové zásoby, které u vzorků z dřívějších dnů klíčení přispívají k objemu matrice, jež je použita pro analýzu. Je-li pro každé měření použito stejné množství homogenizovaného vzorku, je zřejmé, že ve vzorcích z posledních dvou dnů klíčení je InsP_6 více koncentrován. V případě transgenní linie nárůst v obsahu InsP_6 , nemusel být rozpoznán, protože aktivita fytasy snížila obsah InsP_6 natolik, že efekt zkoncentrování nebyl odhalen, resp. snížení obsahu InsP_6 mohlo teoreticky být mnohem výraznější než naměřené. Nicméně ve vzorcích kontrolní odrůdy se tento efekt zkoncentrování projevil zvýšením obsahu InsP_6 . Obdobnému zkreslení mohou být vystaveny i hodnoty obsahu P_i a aktivity fytasy.

Přítomnost globoidů v obilkách i třetí den klíčení nasvědčuje, že k jejich úplnému odbourání pravděpodobně dochází až po třetím dnu klíčení. Skutečnost, že je detekován InsP_6 v sedmý den klíčení podporují tezi, že nutně nemusí být veškerý uložený InsP_6 během klíčení defosforylován.

7. Závěr

Polní pokusy naznačují, že genotyp má pouze částečný vliv na obsah P_i a aktivitu fytasy ve zralých obilkách. Podle našich zjištění mají půdní typ, hnojení a ošetření během vegetační doby mají podstatný vliv na aktivitu fytasy a obsah P_i ve zralých obilkách ječmene. Což koresponduje s výsledky ostatních autorů u jiných jednoděložných rostlin. Na základě porovnání s netransgenní odrůdou Golden Promise lze konstatovat, že exprese heterologní fytasy PhyA u transgenní linie 1015-7 vede k významným změnám v obsahu P_i a celkové aktivitě fytasy v průběhu klíčení. U transgenní linie 1015-7 bylo prokázáno, že na naměřené celkové aktivitě fytasy se již od druhého dne klíčení významně podílí heterologní fytasa. Výrazné zvýšení obsahu P_i nastává třetí den klíčení, do té doby je mobilizovaný fosfát spotřebováván metabolismem. Obsah P_i reaguje na zvýšení aktivity fytasy v počátku klíčení s jednodenním zpožděním. Postupné zvyšování obsahu P_i v obilkách během klíčení je výsledkem defosforylace $InsP_6$ fytasami. Předpokládáme, že zásoby $InsP_6$ nemusí být zcela spotřebovány před dokončením fáze klíčení. Přítomnost heterologní fytasy v buňkách obilek transgenního ječmene způsobuje abnormální dynamické změny v obsahu zásobní a aktivní formy P v průběhu klíčení.

8. Literatura

Azeke M.A., Egielewa S.J., Eigbogbo M.U., Ihimire I.G.: Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Science and Technology*, 48, 6, 724-729, 2011

Bergman E.L., Autio K., Sandberg A.S.: Optimal Conditions for Phytate Degradation, Estimation of Phytase Activity, and Localization of Phytate in Barley (Cv. Blenheim). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48, 4647-4655, 2000

Bethke P.C., Libourel I.G.L., Aoyama N., Chung Y.-Y., Still D.W., Jones R.L.: The Arabidopsis Aleurone Layer Responds to Nitric Oxide, Gibberellin, and Abscisic Acid and Is Sufficient and Necessary for Seed Dormancy. *Plant Physiology*, 143, 1173-1188, 2007

Bhati K.K., Aggarwal S., Sharma S., Mantri S., Singh S.P., Bhalla S., Kaur J., Tiwari S., Roy J.K., Tuli R., Pandey A.K.: Differential expression of structural genes for the late phase of phytic acid biosynthesis in developing seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 224, 74-85, 2014

Bohn L., Josefsen L., Meyer A.S., Rasmussen S.K.: Quantitative Analysis of Phytate Globoids Isolated from Wheat Bran and Characterization of Their Sequential Dephosphorylation by Wheat Phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7547-7552, 2007

Bolte S., Lanquar V., Soler M.-N., Beebo A., Satiat-Jeunemaitre B., Bouhidel K., Thomine S.: Distinct Lytic Vacuolar Compartments are Embedded Inside the Protein Storage Vacuole of Dry and Germinating Arabidopsis thaliana Seeds. *Plant Cell Physiology*, 52, 7, 1142-1152, 2011

Brinch-Pedersen H., Hatzack F., Stöger E., Arcalis E., Pontopidan K., Holm P.B.: Heat-Stable Phytases in Transgenic Wheat (*Triticum aestivum* L.): Deposition Pattern, Thermostability, and Phytate Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4624-4632, 2006

Briggs D.E.: α -amylase in germinating decorticated barley-I. *Phytochemistry*, 7, 513-529, 1968

Brown L.K., George T.S., Thompson J.A., Wright G., Lyon J., Dupuy L., Hubbard S.F., White P.J.: What are the implications of variation in root hair length on tolerance to phosphorus deficiency in combination with water stress in barley (*Hordeum vulgare*)? *Annals of Botany*, 110, 319-328, 2012

Brown L.K., George T.S., Dupuy L.X., White P.J.: A conceptual model of root hair ideotypes for future agricultural environments: what combination of traits should be targeted to cope with limited P availability? *Annals of Botany*, 112, 317-330, 2013

- Bucher M.: Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173, 11-26, 2007
- Bünemann E.K., Smernik R.J., Marschner P., McNeill A.M.: Microbial synthesis of organic and condensed forms of phosphorus in acid and calcareous soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 932-946, 2008
- Coelho C.M.M., Tsai S.M., Vitorello V.A.: Dynamics of inositol phosphate pools (tris-, tetrakis- and pentakisphosphate) in relation to the rate of phytate synthesis during seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Plant Physiology*, 162, 1-9, 2005
- Dionisio G., Madsen C.K., Holm P.B., Welinder K.G., Jørgensen M., Stoger E., Arcalis E., Brinch-Pedersen H.: Cloning and Characterization of Purple Acid Phosphatase Phytases from Wheat, Barley, Maize, and Rice. *Plant Physiology*, 156, 1087-1100, 2011
- Fransson A.M., Jones D.L.: Phosphatase activity does not limit the microbial use of low molecular weight organic-P substrates in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 1213-1217, 2007
- Feng G., Song Y.C., Li X.L., Christie P.: Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. *Applied Soil Ecology*, 22, 139-148, 2003
- George T.S., Simpson R.J., Hadobas P.A., Richardson A.E.: Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnology Journal*, 3, 129-140, 2005
- George T.S., Gregory P.J., Hocking P., Richardson A.E.: Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilization of organic P substrates in vitro, but does not explain differences in the P-nutrition of plants when grown in soils. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 239-249, 2008
- Giles C.D., Hsu P.CH., Richardson A.E., Hurst M.R.H., Hill J.E.: Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp. *Soil Biology & Biochemistry*, 68, 263-269, 2014
- Glassop D., Smith S.E., Smith F.W.: Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta*, 222, 688-698, 2005
- Goyoaga C., Burbano C., Cuadrado C, Romero C., Guillamón E., Varela A., Pedrosa M.M., Muzquiz M.: Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 391-397, 2011

- Grace E.J., Cotsaftis O., Tester M., Smith F.A., Smith S.E.: Arbuscular mycorrhizal inhibition of growth in barley cannot be attributed to extent of colonization, fungal phosphorus uptake or effects on expression of plant phosphate transporter genes. *New Phytologist*, 181, 938-949, 2009
- Greiner R., Konietzny U., Jany K.-D.: Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 143-161, 1998
- Hanáková M.: Využití transgenních linií ječmene SCLW-GP-PHYA ve šlechtění. Diplomová práce, Mendelova univerzita v Brně, 2014
- Hatzack F., Johansen K.S., Rasmussen S.K.: Nutritionally Relevant Parameters in Low-Phytate Barley (*Hordeum vulgare* L.) Grain Mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6074-6080, 2000
- Hatzack F., Hübel F., Zhang W., Hansen P.E., Rasmussen S.K.: Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR. *Biochemical Journal*, 354, 473-480, 2001
- Jiang L., Phillips T.E., Hamm Ch.A., Drozdowicz Y.M., Rea P.A., Maeshima M., Rogers S.W., Rogers J.C.: The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *The Journal of Cell Biology*, 155, 6, 991-1002, 2001
- Jorquera M., Martinez O., Maruyama F., Marschner P., Mora M.L.: Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. *Microbes and Environments*, 23, 3, 182-191, 2008
- Jorquera M.A., Crowley D.E., Marschner P., Greiner R., Fernández M.T., Romero D., menezes-Blackburn D., Mora M.L.: Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75, 163-172, 2011
- Josefsen L., Bohn L., Sorensen M.B., Rasmussen S.K.: Characterization of a multifunctional inositol phosphate kinase from rice and barley belonging to the ATP-grasp superfamily. *Gene*, 397, 114-125, 2007
- Kaur G., Reddy S.: Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. *European Journal of Soil Biology*, 61, 35-40, 2014
- Keerthisinghe G., Hocking P.J., Ryan P.R., Delhaize E.: What are the implications of variation in root hair length on tolerance to phosphorus deficiency in combination with water stress in barley (*Hordeum vulgare*)? *Plant, Cell and Environment*, 21, 467-478, 1998
- Krey T., Vassilev N., Baum C., Eichler-Löbermann B.: Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. *European Journal of Soil Biology*, 55, 124-130, 2013

- Li H., Zhu Y.G., Marschner P., Smith F.A., Smith S.E.: Wheat responses to arbuscular mycorrhizal fungi in a highly calcareous soil differ from those of clover, and change with plant development and P supply. *Plant and Soil*, 277, 221-232, 2005
- Li H., Smith E.S., Holloway R.E., Zhu Y., Smith F.A.: Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*, 172, 536-543, 2006
- Liu J.C., Ockenden I., Truax M., Lott J.N.A.: Phytic acid-phosphorus and other nutritionally important mineral nutrient elements in grains of wild-type and low phytic acid (*lpa1-1*) rice. *Seed Science Research*, 14, 109-116, 2004
- Liu Z., Cheng F., Zhang G.: Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. *Food Chemistry*, 89, 49-52, 2005
- Lott J.N.A., Greenwood J.S., Vollmer C.M.: Energy-dispersive x-Ray Analysis of Phosphorus, Potassium, Magnesium, and Calcium in Globoid Crystals in Protein Bodies from Different Regions of *Cucurbita maxima* Embryos. *Plant Physiology*, 61, 984-988, 1978
- Lott J.N.A., Ockenden I., Raboy V., Batten G.D.: Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research*, 10, 11-33, 2000
- Lung S.CH., Chan W.L., Yip W., Wang L., Yeung E.C., Lim B.L.: Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization. *Plant Science*, 169, 341-349, 2005
- Lung S.CH., Lim B.L.: Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant and Soil*, 279, 187-199, 2006
- Lung S.Ch., Leung A., Kuang R., Wang Y., Leung P., Lim B.L.: Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry*, 69, 365-373, 2008
- Ma X.-F., Wright E., Ge Y., Bell J., Xi Y., Bouton J.H., Wang Z.-Y.: Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Science*, 176, 479-488, 2009
- Ma D., Zuo Y., Sun D., Wang Ch., Guo T.: Characterization of the TaMIPS gene from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and changes in its expression pattern with phytic acid accumulation in seeds during grain filling. *Journal of Cereal Science*, 57, 437-443, 2013
- Madsen C.K., Dionisio G., Holme I.B., Holm P.B., Brinch-Pedersen H.: High mature grain phytase activity in the Triticeae has evolved by duplication followed by

neofunctionalization of the purple acid phosphatase phytase (*PAPhy*) gene. *Journal of Experimental Botany*, 64, 11, 3111-3123, 2013

Mahmoud S.A.Z., Ahdel-Hafez A.M., Sawy M. El., Hanafy E.A.: Phytin Hydrolyzing Bacteria in Soil and Rhizosphere of Wheat and Broad Bean in Soils of Egypt. *Zbl. Bakt. Abt. II, Bd. 128*, 528-531, 1973

Maougal R.T., Brauman A., Plassard C., Abadie J., Djekoun A., Drevon J.-J.: Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European Journal of Soil Biology*, 62, 8-14, 2014
Matsushima R.: Thin Sections of Technovit 7100 Resin of Rice Endosperm and Staining. *Bio-protocol*, 4, 18, e1239, 2014

Mudge S.R., Rae A.L., Diatloff E., Smith F.W.: Expression analysis suggest novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31(3), 341-353, 2002

Muchhal U.S., Pardo J.M., Raghothama K.G.: Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 10519-10523, 1996

Natr L.: Mineral nutrients - an ubiquitous stress factor for photosynthesis. *Photosynthetica* 27:271-94, 1992

Nishizawa K., Maruyama N., Satoh R., Fuchikami Y., Higasa T., Utsumi S.: A C-terminal sequence of soybean β -conglycinin α' subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells. *The Plant Journal*, 34, 647-659, 2003

Ockenden I., West M., Domingues J., Lott J.N.A.: Changes in the element composition of globoids and whole embryos in developing seeds of *Cucurbita maxima*. *Seed Science Research*, 11, 35-44, 2001

Ockenden I., Dorsch J.A., Reid M.M., Lin L., Grant L.K., Raboy V., Lott J.N.A.: Characterization of the storage of phosphorus, inositol phosphate and cations in grain tissues of four barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid genotypes. *Plant Science*, 167, 1131-1142, 2004

Otegui M.S., Capp R., Staehelin L.A.: Developing Seeds of *Arabidopsis* Store Different Minerals in Two Types of Vacuoles and in the Endoplasmic Reticulum. *The Plant Cell*, 14, 1311-1327, 2002

Raiesi F., Ghollarata M.: Interactions between phosphorus availability and an AM fungus (*Glomus intraradices*) and their effects on soil microbial respiration, biomass and enzyme activities in a calcareous soil. *Pedobiologia*, 50, 413-425, 2006

Ram S., Verma A., Sharma S.: Large variability exists in phytase levels among Indian wheat varieties and synthetic hexaploids. *Journal of Cereal Science*, 52, 486-490, 2010

Regvar M., Eichert D., Kaulich B., Gianoncelli A., Pongrac P., Vogel-Mikuš K., reft I.: New insights into globoids of protein storage vacuoles in wheat aleurone using synchrotron soft X-ray microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3929-3939, 2011

Reyes F.C., Chung T., Holding D., Jung R., Vierstra R., Otegui M.S.: Delivery of Prolamins to the Protein Storage Vacuole in Maize Aleurone Cells. *The Plant Cell*, 23, 769-784, 2011

Ritchie S., Swanson S.J., Gilroy S.: Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research*, 10, 193-212, 2000

Rubio R., Borie F., Schalchli C., Castillo C., Azcón R.: Occurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Applied Soil Ecology*, 23, 245-255, 2003

Pauk A.: Expres genu *phyA* a studium aktivity fytázy a transgenních rostlinách ječmene. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomuci, 2011

Shang C., Stewart J.W.B., Huang P.M.: pH effect on kinetics of absorption of organic and inorganic phosphates by short-range ordered aluminium and iron precipitates. *Geoderma* 53:1-14, 1992

Shi J., Wang H., Schellin K., Li B., Faller M., Stroop J.M., Meeley R.B., Ertl D.S., Ranch J.P., Glassman K.: Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology*, 25(8), 930-937, 2007

Shünmann P.H.D., Richardson A.E., Smith F.W., Delhaize E.: Characterization of promoter expression patterns derived from the *Pht1* phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55, 398, 855-865, 2004

Smith F.W., Ealing P.M., Dong B., Delhaize E.: The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *The Plant Journal*, 11(1), 83-92, 1997

Smith F.W., Rae A.L., Hawkesford M.J.: Molecular mechanism of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 236-245, 2000

Sun J., Wu D., Xu J., Rasmussen S.K., Shu X.: Characterisation of starch during germination and seedling development of a rice mutant with a high content of resistant starch. *Journal of Cereal Science*, 62, 94-101, 2015

Tang J., Leung A., Leung C., Lim L.B.: Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 1316-1324, 2006

The International Barley Genome Sequencing Consortium: A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491, 711-717, 2012

Tisserant E., Kohler A., dozolme-Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., Colard A., Croll D., Da Silva C., Gomez S.K., Koul R., Ferrol N., Fiorilli V., Formey D., Franken Ph., Helber N., Hijri M., Lanfranco L., Lindquist E., Liu Y., Malbreil M., Morin E., Poulain J., Shapiro H., van Tuinen D., Waschke A., Azcón-Aguilar C., Bécard G., Bonfante P., Harrison M.J., Küster H., Lammers P., Paszkowski U., Requena N., Rensing S.A., Roux C., Sanders I.R., Shachar-Hill Y., Tuskan G., Young J.P.W., Gianiazzi-Pearson V., Martin F.: The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist*, 193, 755-769, 2012

Veiga N., Torres J., Domínguez S., Mederos A., Irvine R.F., Díaz A., Kremer C.: The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium(II): Protein-free soluble InsP_6 is limited to 49 μM under cytosolic/nuclear conditions. *Journal of Inorganic Chemistry*, 100, 11, 1800-1810, 2006

Vlčko T., Vašková J., Ohnoutková L.: Phytase activity and content of digestible phosphorus in transgenic lines of spring barley SCLW-GP-PHYA. *Plant Biotechnology: Green for Good II Conference*, Olomouc, Czech Republic, June 17-21, 2013

Wang F., Jiang R., Kertesz M.A., Zhang F., Feng G.: Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae mediating acidification can promote phytate mineralization in the hyphosphere of maize (*Zea mays* L.). *Soil Biology & Biochemistry*, 65, 69-74, 2013

Wu W., Cheng F.-m., Liu Z.-h., Wei K.-s.: Difference of Phytic Acid Content and its Relation to Four Protein Composition Contents in Grains of Twenty-nine japonica Rice Varieties from Jiangsu and Zhejiang Provinces, China. *Rice Science*, 14, 4, 311-314, 2007

Zhang L. Fan J., Ding X., He X., Zhang F., Feng G.: Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. *Soil & Biochemistry*, 74, 177-183, 2014

9. Seznam použitých zkratk a symbolů

InsP₆ - *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát

InsP- *myo*-inositol mono-hexakis fosfáty

P_i - fosfát, fosforečnan H₂PO₄⁻

Pht1 – skupina fosfátových transportérů 1

HvPht1;1 – fosfátový transportér 1 u *Hordeum vulgare*

HvPht1;2 – fosfátový transportér 2 u *Hordeum vulgare*

HvPht1;4 – fosfátový transportér 4 u *Hordeum vulgare*

HvPht1;5 – fosfátový transportér 5 u *Hordeum vulgare*

Pht1;5 – fosfátový transportér 5

Pht1;8 – fosfátový transportér 8

dTTP – deoxythymidin trifosfát

dCTP – deoxycytidin trifosfát

AM – arbuskulární-mykorhizální (houby)

MIPS - 1-*L*-*myo*-Inositolfosfátsyntasa

HvIpk – *Hordeum vulgare* Inositolfosfát kinasa

PSV – z anglického Protein storage vacuole, zásobní vakuoly

MRP – multidrug resistance-associated protein

ABC - ATP-binding cassette

TaMRP3 – *Triticum aestivum* multidrug resistance-associated protein

ZmMRP4 – *Zea mays* multidrug resistance-associated protein

lpa – low phytic acid

MRP4 – multidrug resistance-associated protein 4

Mg-fytát – sůl kyseliny fytové vytvořená precipitací InsP₆ s hořečnatými kationty

γ-TIP – gama-tonoplast intrinsic protein

ER – endoplazmatické retikulum

OEC – z anglického oxygen evolving complex, kyslík uvolňující komplex

PAP - purple acid phosphatase

HvPAPhy_a – *Hordeum vulgare* purple acid phytase typ a

HvPAPhy_b1 (b2) – *Hordeum vulgare* purple acid phytase typ b1 (b2)

DH – dihaploidní

FTU - fixed treatment unit

CE-ESI-MS – capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spektrometry

10. Seznam příloh

Příloha 1. Výsledky statistických testů

Příloha 2. Abstrakt k plakátovému sdělení

11. Přílohy

Příloha 1.

Polní pokusy

Dvou-výběrový t-test pro vyhodnocení rozdílu v obsahu P_i u vzorků ječmene ze dvou lokalit.

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah P_i mezi vzorky ze dvou lokalit se neliší.)

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Locations=Lukavec) - (Locations=Olomouc)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-1,318293	0,3330664	-3,9580	19	0,00084	Yes

Dvou-výběrový t-test pro vyhodnocení rozdílu v aktivitě fytasy u vzorků ječmene ze dvou lokalit.

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah P_i mezi vzorky ze dvou lokalit se neliší.)

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Locations=Lukavec) - (Locations=Olomouc)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,150367	0,05878788	2,5578	19	0,01924	Yes

Korelace mezi aktivitou fytasy a obsahem P_i

Linear Regression Report

Dataset C:\...\UPOL mgr\AA Fytáza\Výsledky\2015\Untitled.NCSS
Y = P_i _content2 X = Phytase_Activity2

Run Summary Section

Parameter	Value	Parameter	Value
Dependent Variable	P_i _content2	Rows Processed	21
Independent Variable	Phytase_Activity2	Rows Used in Estimation	21
Frequency Variable	None	Rows with X Missing	0
Weight Variable	None	Rows with Freq Missing	0
Intercept	3,2353	Rows Prediction Only	0
Slope	0,0508	Sum of Frequencies	21
R-Squared	0,0001	Sum of Weights	21,0000
Correlation	0,0077	Coefficient of Variation	0,3150
Mean Square Error	1,060136	Square Root of MSE	1,029629

Summary Statement

The equation of the straight line relating P_i _content2 and Phytase_Activity2 is estimated as:
 P_i _content2 = (3,2353) + (0,0508) Phytase_Activity2 using the 21 observations in this dataset.
The y-intercept, the estimated value of P_i _content2 when Phytase_Activity2 is zero, is 3,2353 with a standard error of 1,0138. The slope, the estimated change in P_i _content2 per unit change

in Phytase_Activity2, is 0,0508 with a standard error of 1,5142. The value of R-Squared, the proportion of the variation in Pi_content2 that can be accounted for by variation in Phytase_Activity2, is 0,0001. The correlation between Pi_content2 and Phytase_Activity2 is 0,0077.

A significance test that the slope is zero resulted in a t-value of 0,0335. The significance level of this t-test is 0,9736. Since $0,9736 > 0,0500$, the hypothesis that the slope is zero is not rejected.

The estimated slope is 0,0508. The lower limit of the 95,0% confidence interval for the slope is -3,1184 and the upper limit is 3,2200. The estimated intercept is 3,2353. The lower limit of the 95,0% confidence interval for the intercept is 1,1135 and the upper limit is 5,3572.

Descriptive Statistics Section

Parameter	Dependent	Independent
Variable	Pi_content2	Phytase_Activity2
Count	21	21
Mean	3,2685	0,6529
Standard Deviation	1,0036	0,1521
Minimum	1,6563	0,4470
Maximum	6,2149	1,0969

Klíčení obilek

Dvou-výběrový t-test pro srovnání obsahu P_i

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah P_i mezi sledovaným dnem klíčení a předchozím dnem se neliší.)

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 1

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (\text{Day}_{0x}) - (\text{Day}_{1x})$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	1,982619	0,4043339	4,9034	4	0,00802	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 2

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (\text{Day}_{1x}) - (\text{Day}_{2x})$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,3139471	0,6167402	0,5090	4	0,63752	No

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 3

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_2x) - (Day_3x)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-4,335456	0,9544909	-4,5422	4	0,01048	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 4

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_3x) - (Day_4x)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-9,067715	1,421754	-6,3778	4	0,00310	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 5

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_4x) - (Day_5x)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-6,079102	1,767841	-3,4387	4	0,02633	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 6

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_5x) - (Day_6x)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-12,68861	1,786144	-7,1039	4	0,00207	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu v den 7

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_6x) - (Day_7x)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-4,887451	3,213041	-1,5211	4	0,20287	No

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 1

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_0) - (Day_1)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,4793967	0,3759517	1,2752	4	0,27128	No

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 2

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_1) - (Day_2)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,6672513	0,423803	-1,5744	4	0,19050	No

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 3

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_2) - (Day_3)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-4,623111	0,6914092	-6,6865	4	0,00260	Yes

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 4

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_3) - (Day_4)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-5,806694	0,7380287	-7,8678	4	0,00141	Yes

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 5

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_4) - (Day_5)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-6,78153	0,6907514	-9,8176	4	0,00060	Yes

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 6

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_5) - (Day_6)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-2,339355	0,7709517	-3,0344	4	0,03862	Yes

Kontrolní linie Golden Promise změna v obsahu P_i v den 7

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_6) - (Day_7)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-1,276874	0,7522334	-1,6974	4	0,16485	No

Dvou-výběrový t-test pro srovnání obsahu P_i mezi transgenní a netransgenní linií v jednotlivé dny klíčení.

H_0 : $\mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah P_i mezi transgenní linií a kontrolou se neliší.)

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 0.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	6,35754	0,38422	16,5466	4	0,00008	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 1.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	4,854318	0,3964852	12,2434	4	0,00026	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 2.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	3,873119	0,6346471	6,1028	4	0,00365	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 3.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	3,585464	0,9931378	3,6102	4	0,02255	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 4.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	6,846485	1,256881	5,4472	4	0,00552	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 5.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	6,144056	1,422199	4,3201	4	0,01245	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 6.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	16,49331	1,327413	12,4252	4	0,00024	Yes

Rozdíl v obsahu P_i v den klíčení 7.

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (C28=1015-7) - (C28=Golden Promise)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	20,10389	3,021169	6,6543	4	0,00265	Yes

Dvou-výběrový t-test pro srovnání aktivity fytasy

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (Aktivita fytasy mezi sledovaným dnem klíčení a předchozím dnem se neliší.)

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 1

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (D0) - (D1)$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,4584026	0,189032	2,4250	4	0,07237	No

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 2

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (D1) - (D2)$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-2,073268	0,2617112	-7,9220	4	0,00137	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 3

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (D2) - (D3)$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-1,038609	0,2452921	-4,2342	4	0,01333	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 4

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (D3) - (D4)$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,2670706	0,1439878	-1,8548	4	0,13722	No

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 5

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2: (D4) - (D5)$

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,1069441	0,1373447	-0,7787	4	0,47968	No

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 6

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (D5) - (D6)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,4076553	0,1089271	-3,7425	4	0,02008	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v aktivitě v den 7

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (D6) - (D7)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,5134025	0,06460163	7,9472	4	0,00136	Yes

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 1

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_0xx) - (Day_1xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,2103284	0,01811139	-11,6130	4	0,00031	Yes

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 2

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_1xx) - (Day_2xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-1,606668	0,07881591	-20,3851	4	0,00003	Yes

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 3

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_2xx) - (Day_3xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,2100409	0,093608	-2,2438	4	0,08825	No

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 4

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_3xx) - (Day_4xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,6520113	0,1963394	-3,3208	4	0,02936	Yes

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 5

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_4xx) - (Day_5xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,4637319	0,1894117	2,4483	4	0,07058	No

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 6

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_5xx) - (Day_6xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,1122686	0,03512935	3,1959	4	0,03303	Yes

Kontrolní linie změna v aktivitě v den 7

Equal-Variance T-Test

$\mu_1 - \mu_2$: (Day_6xx) - (Day_7xx)

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,7563592	0,03951897	19,1391	4	0,00004	Yes

T-test průměru a směrodatných odchylek pro srovnání obsahu InsP₆

H₀: $\mu_1 - \mu_2 = 0$ (Obsah InsP₆ mezi sledovaným dnem klíčení a počátečním dnem se neliší.)

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 1

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,82	0,8438997	0,9717	4	0,38623	No

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 2

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	2,51	0,7967643	3,1502	4	0,03451	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 3

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	2,12	0,8971808	2,3630	4	0,07741	No

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 4

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	3,89	0,8534831	4,5578	4	0,01036	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 5

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	4,31	0,810761	5,3160	4	0,00602	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 6

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	4,82	0,8582929	5,6158	4	0,00494	Yes

Transgenní linie 1015-7 změna v obsahu InsP₆ v den 7

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	5,6	0,9467136	5,9152	4	0,00409	Yes

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 1

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	-0,32	0,8012074	-0,3994	4	0,71001	No

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 2

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,68	0,7158445	0,9499	4	0,39594	No

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 3

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	0,31	0,8404959	0,3688	4	0,73095	No

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 4

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	1,78	0,8494115	2,0956	4	0,10417	No

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 5

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	2,6	0,8449457	3,0771	4	0,03704	Yes

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 6

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	2,3	0,8404959	2,7365	4	0,05209	No

Kontrolní linie změna v obsahu InsP_6 v den 7

Equal-Variance T-Test

Alternative Hypothesis	Mean Difference	Standard Error of Difference	T-Statistic	d.f.	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0,050$
$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	1,51	0,8360622	1,8061	4	0,14521	No

Příloha 2.

Abstrakt vydaný ve sborníku k mezinárodní konferenci 16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh 2014, publikovaném ve vědeckém periodiku New Biotechnology, Volume 31S, July 2014.

Quantitative Determination of Phytase Activity and Inorganic Phosphorus in Transgenic Barley and Dihaploid Lines

Tomáš Vlčko^{1,*}, Marie Hanáková², Jana Vašková³, Ludmila Ohnoutková³

¹Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Czech Republic.

²Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Czech Republic

³Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i. Ad Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Czech Republic

Barley is one of the most prominent crops in the world with thousands of square kilometers of sown fields. Harvested barley grains are commonly utilized as livestock feeding and in the brewing industry. Phytic acid (about 70%) is the main storage form of phosphorus in plant seeds. Owing to the acidic nature of the phytic acid molecule it binds with cations forming an insoluble complex. This is considered the main antinutritional factor for the availability of minerals (calcium, zinc and iron principally), because the salts of phytic acid are unfortunately indigestible for monogastric species such as swine, fish and fowl. Phosphorus in feces ultimately leads to environmental pollution. Phytase is an enzyme which catalyzes the degradation of phytate complexes thus providing necessary phosphate and cations during germination. This enzyme converts the indigestible form of phosphorus into a fully exploitable form. Transgenic barley line SCLW-GP-PHYA developed using biolistic transformation of immature embryos exhibits stable expression of the microbial [*Aspergillus niger*] phytase enzyme. This line was used for a hybrid programme, crossing with Czech barley cultivar Azit. The activity of phytase and content of digestible phosphorus in obtained lines were analyzed. The original transgenic line was also assessed in brewing trials.

Acknowledgement: This work was supported by project OP

VaVPI CZ.1.05/3.1.00/14.0327 – New biotechnological products of IEB ASCR.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.05.918>