

SMLOUVA
o poskytnutí účelové podpory na řešení projektu výzkumu a vývoje
čj.: MSMT-2066/2020-4

podprogramu „INTER-ACTION“, programu INTER-EXCELLENCE
(dále jen „smlouva“)

Smluvní strany

Česká republika – Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy

IČO: 00022985

se sídlem Karmelitská 529/5, 118 12 Praha 1

zastoupená vedoucí oddělení řízení mezinárodních programů VaVal

(dále jen „poskytovatel“)

a

Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i.

IČO: 61389030

právní forma: veřejná výzkumná instituce

se sídlem: Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 - Lysolaje

číslo účtu:

zastoupená: , ředitelem

(dále jen „příjemce“)

(společně dále také jako „smluvní strany“)

uzavírají

podle ustanovení § 9 odst. 1, 2 a 3 zákona č. 130/2002 Sb., o podpoře výzkumu, experimentálního vývoje a inovací z veřejných prostředků a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o podpoře výzkumu, experimentálního vývoje a inovací) ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon č. 130/2002 Sb.“), podle ustanovení § 17 zákona č. 218/2000 Sb., o rozpočtových pravidlech (dále jen „zákon č. 218/2000 Sb.“) a o změně některých souvisejících zákonů (rozpočtová pravidla) ve znění pozdějších předpisů a v souladu s Nařízením Komise (EU) č. 651/2014 ze dne 17. června 2014, kterým se v souladu s články 107 a 108 Smlouvy o fungování EU prohlašují určité kategorie podpory za slučitelné s vnitřním trhem (dále jen „nařízení“), tuto **smlouvu**:

Článek 1

Předmět smlouvy

- 1) Předmětem této smlouvy je úprava práv a povinností poskytovatele a příjemce v souvislosti s účelovou podporou, poskytnutou podle § 4 odst. 1 písm. e) zákona č. 130/2002 Sb. ze státního rozpočtu na řešení projektu výzkumu, vývoje a inovací s identifikačním kódem **LTAIN19030** a s názvem **Studie pylové kompetice mezi hybridy Arabidopsis thaliana** (dále jen „Projekt“), jak plyne z Přílohy I této smlouvy (dále jen „Příloha I“) a Přílohy II této smlouvy (dále jen „Příloha II“), realizovaného v rámci podprogramu INTER-ACTION (LTAIN), programu INTER-EXCELLENCE (dále jen „Podprogram“). Příloha I obsahuje schválený návrh Projektu specifikovaný mj. rozsahem a cíli řešení Projektu, indikátory jejich plnění a jejich cílovými hodnotami (tj. očekávané výsledky řešení, způsob a harmonogram jejich dosažení a ověření). Příloha II obsahuje rozpočet Projektu, zahrnující celkovou výši uznaných nákladů Projektu, jejich výši v jednotlivých kalendářních letech podle jejich dalšího položkového členění podle článku 2 odst. 1 této smlouvy, a dále celkovou výši finančních prostředků určených ke krytí schválených způsobilých nákladů (tj. uznaných nákladů) Projektu v jednotlivých kalendářních letech, výši krytí těchto finančních prostředků v kategoriích:

schválená podpora podle této smlouvy, další veřejné zdroje a neveřejné zdroje. Příloha III této smlouvy (dále jen „Příloha III“) obsahuje plán hodnocení Projektu. Příloha IV specifikuje odvody při porušení smlouvy nebo ustanovení obecně závazných předpisů (dále jen „Příloha IV“).

- 2) Účelem podpory je dosažení stanovených cílů Projektu uvedených v Příloze I smlouvy, Rámec projektu.
- 3) Příjemce je povinen realizovat Projekt za podmínek a v rozsahu této smlouvy.
- 4) Osobou, odpovědnou příjemci za odbornou úroveň Projektu (tj. řešitelem Projektu) a současně určenou pro komunikaci mezi příjemcem a poskytovatelem, je

Článek 2 Způsobilé a uznané náklady Projektu

- 1) Způsobilými náklady Projektu ve smyslu článku 25 odst. 3 nařízení, § 2 odst. 2 písm. k) zákona č. 130/2002 Sb. mohou být pouze takové náklady, které jsou hrazeny výlučně v souvislosti s Projektem a jsou zařazeny do jedné z následujících kategorií:
 - a) osobní náklady/výdaje včetně povinných zákonných odvodů a přidělu do fondu kulturních a sociálních potřeb (nebo jiného obdobného fondu);
 - b) odpisy dlouhodobého majetku (hmotný a nehmotný);
 - c) ostatní zboží a služby;
 - d) subdodávky;
 - e) cestovné;
 - f) nepřímé náklady/výdaje, maximálně do výše 25% z přímých nákladů Projektu.

Způsobilé náklady musejí být vynaloženy v období řešení Projektu stanoveném v článku 3 této smlouvy.

- 2) Uznanými náklady¹ Projektu ve smyslu § 2 odst. 2 písm. l) zákona č. 130/2002 Sb. jsou způsobilé náklady schválené poskytovatelem.
- 3) Poskytovatel stanovuje celkovou výši uznaných nákladů na celé období řešení Projektu podle odstavce 2 tohoto článku na **5 632 000 Kč** (slovy pět milionů šest set třicet dva tisíc korun českých), a to v členění na jednotlivé kalendářní roky a v položkovém členění podle Přílohy II smlouvy.
- 4) Při úhradě uznaných nákladů z podpory je příjemce povinen dodržet intenzitu podpory (tj. podíl účelové podpory na celkových uznaných nákladech) podle Přílohy II. Současně je příjemce povinen jednoznačně a průkazně doložit úhradu zbývajících uznaných nákladů z ostatních zdrojů.
- 5) Příjemce, který je účetní jednotkou, je v rámci účetnictví podle zákona č. 563/1991 Sb., o účetnictví ve znění pozdějších předpisů pro Projekt povinen vést oddělenou evidenci o vynaložených výdajích nebo nákladech Projektu a v rámci této evidence sledovat náklady nebo výdaje hrazené z podpory. Příjemce, který není účetní jednotkou, vede tuto oddělenou evidenci v rámci daňové evidence v souladu se zvláštním právním předpisem² a interními účetními postupy, a to tak, aby jeho vnitřní účetní a kontrolní postupy dovozovaly přímé srovnání položek deklarovaných jako součást Projektu (aktiv a pasiv, nákladů a výnosů) s položkami obsaženými v odpovídajících finančních výkazech a ostatních podkladových účetních dokumentech.

1) pokud příjemce podpory neúčtuje o „nákladech“ ale o „výdajích“, lze termínem „náklady“ rozumět i tyto výdaje. Pro účely výpočtu podpory a vykazování v Projektu je však nutné tyto výdaje časově rozlišovat ve vztahu k období řešení Projektu (a to i mimoúčetně)

2) zákon č. 586/1992 Sb., o daních z příjmů, ve znění pozdějších předpisů

- 6) Příjemce je povinen vynakládat finanční prostředky Projektu správně, efektivně, hospodárně, účelně a přiměřeně k cenám v místě a čase obvyklým v souladu se zvláštními právními předpisy³. Příjemce je povinen postupovat při vynakládání prostředků z podpory podle zákona č. 134/2016 Sb., o zadávání veřejných zakázek ve znění pozdějších předpisů. Příjemce současně nese plnou odpovědnost za to, že v průběhu řešení Projektu nedojde k dvojímu financování a vykazování týchž uznaných nákladů (téže výzkumné aktivity) Projektu z veřejných nebo neveřejných prostředků.

Článek 3 Zahájení a ukončení Projektu

Příjemce je povinen:

- 1) zahájit řešení Projektu v souladu s Přílohou I, nejdříve však 1. 1. 2020 a nejdéle do **60 kalendářních dnů** ode dne nabytí účinnosti této smlouvy,
- 2) ukončit řešení Projektu tj. ukončit věcně zaměřené projektové aktivity a čerpání poskytnuté podpory podle Přílohy I a Přílohy II nejpozději do 31. 12. 2022.

Článek 4 Poskytnutí podpory, její výše a podmínky jejího čerpání

- 1) Poskytovatel poskytne příjemci účelovou podporu na řešení Projektu formou dotace ve výši podle odstavce 2 tohoto článku (dále jen „podpora“) na účet příjemce, který je uvedený v této smlouvě.
- 2) Poskytovatel stanovuje celkovou výši podpory přidělenou na celé období řešení Projektu podle odstavce 1 tohoto článku na **5 632 000 Kč** (slovy pět milionů šest set třicet dva tisíc korun českých), a to v členění na jednotlivé kalendářní roky a v položkovém členění podle Přílohy II smlouvy.
- 3) Nedojde-li v důsledku rozpočtového provizoria podle zákona č. 218/2000 Sb. k regulaci čerpání rozpočtu, je povinností poskytovatele poskytnout příslušnou výši podpory do 60 kalendářních dnů ode dne nabytí účinnosti smlouvy o poskytnutí podpory. U víceletých projektů ve druhém roce řešení a dalších letech řešení je povinností poskytovatele poskytnout příslušnou výši podpory do 60 kalendářních dnů od začátku kalendářního roku v případě, že jsou splněny závazky příjemce vyplývající ze smlouvy o poskytnutí podpory a že jsou zařazeny údaje do informačního systému výzkumu, vývoje a inovací v souladu se zákonem č. 130/2002 Sb., a se zákonem č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím ve znění pozdějších předpisů.
- 4) Příjemce je povinen použít podporu výlučně na úhradu uznaných nákladů Projektu vymezených Přílohou II hrazených z podpory.

Článek 5 Změny uznaných nákladů a výše poskytnuté podpory

- 1) Podle § 9 odst. 7 zákona č. 130/2002 Sb. nesmí být v průběhu řešení Projektu změněna výše uznaných nákladů o více než **50 %** výše uznaných nákladů stanovené v článku 2 odst. 3 této smlouvy a výše podpory o více než **50 %** výše podpory stanovené v článku 4 odst. 2 této smlouvy.

3) § 2 zákona č. 320/2001 Sb., o finanční kontrole ve veřejné správě a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů

- 2) Změnu celkové výše uznaných nákladů Projektu nebo celkové výše poskytnuté podpory lze provést pouze uzavřením písemného dodatku ke smlouvě na základě předchozí písemné žádosti příjemce a je účinná nabytím účinnosti tohoto dodatku, k němuž dochází dnem jeho zveřejnění v registru smluv podle zákona č. 340/2015 Sb., o zvláštních podmínkách účinnosti některých smluv, uveřejňování těchto smluv a o registru smluv ve znění pozdějších předpisů (zákon o registru smluv). Změny výše uznaných nákladů Projektu, navrhované v žádosti, a s tím související výše podpory musí být zdůvodněné, podložené schválenými činnostmi a musí být odsouhlasené poskytovatelem.
- 3) Změny finančních objemů v položkovém členění podle věcné specifikace uznaných nákladů Projektu podle Přílohy II, které nemají vliv ani na celkovou výši uznaných nákladů Projektu, ani na celkovou výši podpory, poskytovatel schvaluje na žádost příjemce svým písemným souhlasem. Předchozí souhlas poskytovatele není vyžadován pouze v případě, kdy přesuny mezi položkami nepřesáhnou v daném kalendářním roce v souhrnu sumu rovnající se 10 % z poskytnuté podpory v daném roce, přičemž do tohoto souhrnu se započítávají pouze přesuny mezi položkami ve smyslu jejich navýšení. To se nevztahuje na změny finančních objemů nebo položkové přesuny v rámci osobních nákladů, kdy je vyžadován předchozí souhlas poskytovatele bez výjimky. Nepřímé náklady/výdaje nelze navyšovat nad rámec stanovený v článku 2 odst. 1.
- 4) Příjemce má možnost podat žádost o souhlas se změnou v položkovém členění podle věcné specifikace uznaných nákladů Projektu podle odst. 3 tohoto článku nejpozději do **15. listopadu** daného kalendářního roku, nejméně však **60 kalendářních dnů** před datem ukončení řešení Projektu podle článku 3 odst. 2 této smlouvy. O souhlas se změnou výše uznaných nákladů nebo poskytnuté podpory Projektu podle odst. 2 tohoto článku, s následným uzavřením dodatku k této smlouvě, může příjemce požádat do **31. října** daného kalendářního roku, nejméně však **60 kalendářních dnů** před datem ukončení řešení Projektu podle článku 3 odst. 2 této smlouvy.
- 5) Na souhlas poskytovatele se změnou uznaných nákladů Projektu nebo změnou výše podpory podle tohoto článku nemá příjemce právní nárok.

Článek 6

- 1) Příjemce je povinen vracet zpět nevyčerpané finanční prostředky na:
 - a) výdajový účet ministerstva č. , pokud příjemce vrací nevyčerpané prostředky v průběhu kalendářního roku, na který byla podpora poskytnuta,
 - b) účet cizích prostředků ministerstva č. , pokud příjemce vrací nevyčerpané prostředky v rámci finančního vypořádání vztahů se státním rozpočtem.
- 2) Příjemce při vrácení finančních prostředků může postupovat obdobně dle odstavce 1 před dokončením Projektu, pokud je mu zřejmé, že finanční prostředky nebudou využity.
- 3) Příjemce je povinen vyzoomět o vrácení finančních prostředků, souvisejících s poskytnutou podporou avízem, poskytovatele, a to formou datové zprávy nebo zprávou opatřenou zaručeným elektronickým podpisem na e-mailovou adresu aviza@msmt.cz, a ovněž je povinen o této skutečnosti informovat ve stejné lhůtě a stejným způsobem oddělení řízení mezinárodních programů VaVal, a to na kontaktní e-mailovou adresu uvedenou v zadávací dokumentaci k předmětné soutěži na internetových stránkách poskytovatele. Poskytovatel musí avízo obdržet nejpozději v den připsání vratky na účet.

- 4) Příjemce je povinen vypořádat dotaci se státním rozpočtem podle § 75 zákona č. 218/2000 Sb. a vyhlášky č. 367/2015 Sb., o zásadách a lhůtách finančního vypořádání vztahů se státním rozpočtem, státními finančními aktivy a Národním fondem (vyhláška o finančním vypořádání) ve znění pozdějších předpisů.
- 5) Souhrnné vyúčtování podpory a celkových uznaných nákladů Projektů, které je také součástí průběžné zprávy podle odst. 6 Přílohy III, příjemce předkládá za jednotlivé kalendářní roky vždy do **30. ledna** následujícího kalendářního roku, souhrnné vyúčtování uznaných nákladů Projektů, které je součástí závěrečné zprávy podle odst. 6 Přílohy III, příjemce předkládá do **30 kalendářních dnů** po ukončení Projektů. V případě ukončení řešení Projektů před termínem uvedeným v článku 3 odst. 2 této smlouvy příjemce předloží poskytovateli souhrnné vyúčtování uznaných nákladů nejpozději do **60 kalendářních dnů** po tomto mimořádném ukončení řešení Projektů.

Článek 7 Další povinnosti příjemce

Příjemce je dále povinen:

- 1) uvádět v souvislosti s Projektem ve všech zveřejňovaných informacích identifikační kód Projektů podle článku 1 odst. 1 této smlouvy a skutečnost, že na řešení Projektů byla poskytnuta podpora v rámci programu INTER-EXCELLENCE, včetně správného oficiálního názvu nebo oficiální zkratky poskytovatele a oficiálního loga poskytovatele v souladu s pravidly, která jsou zveřejněna na adrese www.msmt.cz,
- 2) písemně informovat poskytovatele o všech změnách, které nastaly v době účinnosti této smlouvy a které se dotýkají právní osobnosti příjemce, údajů požadovaných pro prokázání způsobilosti příjemce nebo údajů, které by mohly mít vliv na řešení Projektů, respektive na dosahování jeho cílů nebo jeho rozpočet, a to nejdéle do **7 kalendářních dnů** ode dne, kdy se o takové skutečnosti dozvěděl,
- 3) o případnou změnu v osobě řešitele požádat písemně poskytovatele. V případě souhlasu poskytovatele se změnou dojde k uzavření dodatku k této smlouvě,
- 4) v případě změn ostatních členů řešitelského týmu, které neovlivní předmět, cíl a rozpočet Projektů, poskytovatele informovat prostřednictvím průběžné nebo závěrečné zprávy,
- 5) umožnit řešiteli a ostatním členům řešitelského týmu uvedeným v Příloze I řešení Projektů v plném rozsahu pracovních úvazků podle Přílohy I v rámci jejich pracovněprávního vztahu uzavřeného s příjemcem,
- 6) neprodleně informovat poskytovatele o podezření na nesrovnalosti zjištěné při řešení Projektů. Nesrovnalostí se rozumí porušení některého z ustanovení:
 - a) práva Evropské unie,
 - b) právních předpisů České republiky,
 - c) této smlouvy.
- 7) předávat poskytovateli zprávy o řešení Projektů podle Přílohy III,
- 8) řádně uchovávat originály všech rozhodnutí, smluv a dalších dokumentů týkajících se řešení Projektů v souladu s obecně závaznými předpisy po dobu **10 let** od data posledního poskytnutí podpory nebo její části,

- 9) po celou dobu řešení Projektu nakládat s veškerým majetkem získaným z prostředků na Projekt hospodárně, efektivně a účelně, zejména jej zabezpečit proti poškození, ztrátě nebo odcizení,
- 10) vyvinout veškeré nezbytné úsilí k dosažení cílů uvedených v Projektu a splnění veškerých závazků vůči poskytovateli.

Článek 8 Kontrola řešení Projektu

- 1) Veřejnosprávní kontrola použití podpory probíhá u příjemce na základě § 39 zákona č. 218/2000 Sb. § 8 odst. 2 zákona č. 320/2001 Sb., o finanční kontrole ve znění pozdějších předpisů § 4 a ostatních příslušných ustanovení zákona č. 255/2012 Sb., o kontrole (kontrolní řád) ve znění pozdějších předpisů a § 13 zákona č. 130/2002 Sb.
- 2) Kontrola plnění cílů Projektu je poskytovatelem prováděna v souladu s § 13 zákona č. 130/2002 Sb. podle pokynů poskytovatele v termínech a způsobem, které jsou uvedeny v Příloze III.
- 3) Poskytovatel je oprávněn v průběhu řešení Projektu a následně až po dobu **10 let** po ukončení jeho řešení provádět kontroly čerpání a využívání podpory a účelnosti vynaložených nákladů Projektu podle této smlouvy.
- 4) Příjemce je povinen umožnit pověřeným zaměstnancům poskytovatele kontrolu realizace Projektu, hospodaření s poskytnutou podporou a zpřístupnit jim k tomu veškeré potřebné doklady.
- 5) Pokud zaměstnanci poskytovatele na základě provedené kontroly dojdou k závěru, že na straně příjemce podpory mohlo dojít k porušení rozpočtové kázně, je vedoucí kontrolní skupiny povinen po případném vypořádání námitek k protokolu o kontrole dát podnět příslušnému finančnímu úřadu, který je oprávněn o porušení rozpočtové kázně rozhodnout.
- 6) Příjemce je povinen informovat poskytovatele o kontrolách, které u něj byly v souvislosti s poskytnutou podporou provedeny externími kontrolními orgány, včetně závěrů těchto kontrol, a to bezprostředně po jejich ukončení.

Článek 9 Porušení rozpočtové kázně

- 1) Porušení povinností uvedených v této smlouvě nebo stanovených právními předpisy představuje porušení rozpočtové kázně podle ustanovení § 44 odst. 1 písm. b) nebo j) zákona č. 218/2000 Sb.
- 2) Odvodem za porušení rozpočtové kázně se podle § 44a zákona č. 218/2000 Sb. rozumí povinnost provést na základě rozhodnutí místně příslušného finančního úřadu odvod za porušení rozpočtové kázně, případně penále z prodlení s jeho provedením. V příloze IV jsou specifikována rozpětí hodnot snížených odvodů u vybraných porušení smluvních ujednání vyplývajících pro příjemce z této smlouvy.
- 3) Správu odvodů za porušení rozpočtové kázně a penále vykonávají místně příslušné finanční úřady podle zákona č. 280/2009 Sb., daňový řád ve znění pozdějších předpisů.

Článek 10

Odvod, odnětí nebo zastavení podpory

- 1) Dle § 44a zákona č. 218/2000 Sb. se za porušení rozpočtové kázně vyměřuje odvod a v případě prodlení i penále. Seznam je uveden v příloze IV této smlouvy.
- 2) Neoprávněným použitím nebo zadržením peněžních prostředků poskytnutých ze státního rozpočtu a použitím podpory příjemcem na jiný účel, než na jaký mu byla podle této smlouvy podpora poskytnuta, nebo v rozporu s jejich časovým určením, i jakékoliv jiné použití podpory v rozporu s podmínkami stanovenými právními předpisy nebo touto smlouvou, které přímo souvisí s účelem, na který byla podpora poskytnuta, je porušením rozpočtové kázně ve smyslu § 44 odst. 1 zákona č. 218/2000 Sb.
- 3) Smluvní strana může podat písemný návrh na zrušení smlouvy v případech uvedených v § 167 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, ve znění pozdějších předpisů.
- 4) Návrh na zrušení smlouvy může smluvní strana podat také v případě, došlo-li po uzavření této smlouvy
 - a) k vázání prostředků státního rozpočtu,
 - b) ke zjištění, že údaje, na jejichž základě byla podpora poskytnuta, byly neúplné nebo nepravdivé,
 - c) ke zjištění, že smlouva je v rozporu se zákonem nebo právem Evropské unie,
 - d) ke zjištění, že nemůže být splněn řádně nebo včas účel, na který byla podpora poskytnuta,
 - e) vydání rozhodnutí Evropské komise o navrácení nebo prozatímní navrácení veřejné podpory.
- 5) Poskytovatel může na základě zjištění, že příjemce porušil povinnosti stanovené právním předpisem nebo smlouvou, a to zejména nedodržel-li účel poskytnuté podpory nebo porušil jinou podmínku, za které byla podpora poskytnuta, postupovat podle § 14e a § 14f zákona č. 218/2000 Sb.
- 6) Jsou-li do informačního systému výzkumu, vývoje a inovací ve smyslu § 30 odst. 1 zákona 130/2002 Sb. (IS VaVal) předány údaje, které neodpovídají definici datových prvků a které ovlivní výši poskytnuté podpory a Rada pro výzkum, vývoj a inovace proto v návrhu výdajů na výzkum, vývoj a inovace příslušnému poskytovateli výši výdajů na následující pětileté období sníží podle § 14 odst. 5 zákona č. 130/2002 Sb., poskytovatel obdobným způsobem sníží podporu příjemci, který mu nesprávné údaje předal.
- 7) V případě, kdy byl příjemce pravomocně odsouzen pro trestný čin uvedený v § 7 odst. 3 písm. a) až c) zákona č. 130/2002 Sb. může poskytovatel ve smyslu § 14a zákona č. 130/2002 Sb. od této smlouvy zcela nebo zčásti odstoupit. Odstoupením z tohoto důvodu se tato smlouva od počátku zcela nebo zčásti ruší a příjemce je povinen vrátit veškerou podporu nebo její část.
- 8) Příjemce podpory je povinen vrátit poskytovateli poskytnutou podporu nebo její část, pokud je příjemci známo, že Projekt nedokončí. Příjemce je povinen tento svůj záměr oznámit poskytovateli bezprostředně poté, co bude mít objektivní možnost zjistit, že Projekt nebude možné realizovat.

Článek 11

Závazek mlčenlivosti

- 1) Příjemce je povinen zachovávat mlčenlivost o údajích, podkladech a vnesených právech, které mu byly poskytnuty jako důvěrné a jejichž předání dalším subjektům by mohlo být pro toho, kdo je poskytl, nevýhodné. Vnesenými právy se pro účely této smlouvy rozumí poznatky a informace, které jsou vlastnictvím příjemce Projektu před uzavřením této smlouvy, nebo které příjemce získá

paralelně, avšak mimo naplňování této smlouvy, a které jsou nezbytné pro řešení Projektu. K vneseným právům patří autorská práva a práva k výsledkům na základě návrhu patentu nebo jeho udělení, zlepšovacích návrhů, užitečných vzorů, průmyslových vzorů, chráněných druhů a dalších rozhodnutí nebo jinak srovnatelných ochranných opatření.

- 2) Závazek mlčenlivosti zaniká:
 - a) pokud se obsah těchto údajů, podkladů a vnesených práv stane veřejně přístupným, a to na základě jiných prací prováděných mimo rámec Projektu nebo na základě opatření, která nesouvisejí s těmito pracemi,
 - b) sdělením těchto údajů, podkladů a vnesených práv bez požadavku mlčenlivosti nebo pozdějším odvoláním požadavku mlčenlivosti těmi, kteří požadavek stanovili.
- 3) Pokud je příjemce na základě této smlouvy oprávněn předávat údaje, podklady a vnesená práva dalším osobám, je povinen zajistit, aby tyto osoby zachovávaly mlčenlivost a veškeré údaje používaly jen k účelům, k nimž jim byly předány.

Článek 12

Poskytování informací a údajů o Projektu a jeho výsledcích

- 1) Příjemce je povinen předávat poskytovateli úplné, pravdivé a včasné informace o Projektu a získaných poznacích a jiných výsledcích Projektu. Za tímto účelem je Příjemce povinen postupovat podle pokynů poskytovatele a v souladu s § 31 odst. 3 zákona č. 130/2002 Sb. předávat poskytovateli požadované údaje. Současně příjemce souhlasí se zveřejňováním těchto požadovaných údajů a se zpřístupněním redakčně upravené závěrečné zprávy Projektu veřejnosti poskytovatelem. Poskytovatel předává údaje o Projektu do IS VaVal a evropských informačních systémů.
- 2) Příjemce souhlasí, že v případě, kdy jako další zdroj financování Projektu jsou finanční prostředky státního rozpočtu České republiky poskytnuté některým jiným poskytovatelem, mohou být poskytovatelem tomuto jinému poskytovateli (pokud o to požádá) sděleny údaje o Projektu, které jsou jinak považovány za důvěrné ve smyslu čl. 11 odst. 1 této smlouvy.
- 3) Pokud je předmět řešení Projektu předmětem obchodního tajemství, je příjemce povinen poskytnout konkrétní informace o Projektu a poznacích a jiných výsledcích Projektu v takovém rozsahu a formě, aby byly zveřejnitelné. Pokud předmět řešení Projektu nebo jiné aktivity výzkumu a vývoje podléhají mlčenlivosti, stanovené příslušným zvláštním právním předpisem, poskytovatel a příjemce poskytují informace o prováděném výzkumu, vývoji a jejich výsledcích s vyloučením těch informací, o nichž to stanoví příslušný zvláštní právní předpis.

Článek 13

Výsledky a jejich využití

- 1) Práva k výsledkům a jejich využití se řídí ustanovením § 16 zákona 130/2002 Sb.
- 2) Příjemce je povinen zajistit, aby výsledky, k nimž má vlastnická práva a které mohou být využity, byly přiměřeně a účinně chráněny a využít je nebo umožnit jejich využití při respektování nezbytné ochrany vlastnických a uživatelských práv k výsledkům a mlčenlivosti podle zvláštních právních předpisů.
- 3) Výsledky, které nelze chránit podle zvláštních právních předpisů nebo nejsou předmětem obchodního tajemství, jiného tajemství nebo utajovanou informací podle zvláštního právního

předpisu nebo mezivládních právních aktů týkajících se Programu, a současně mají publikační charakter, je příjemce podpory povinen aktivně veřejně šířit.

- 4) Příjemce je oprávněn postoupit majetková práva k výsledkům Projektu třetím osobám pouze s předchozím písemným souhlasem poskytovatele. Poskytovatel je oprávněn tento souhlas odmítnout, pokud by postoupení mělo dopad na plnění účelu smlouvy. Postoupí-li příjemce majetková práva k výsledkům Projektu třetím osobám, zajistí odpovídajícími opatřeními nebo smlouvami, aby jeho závazky přešly na nového nositele majetkových práv k výsledkům Projektu tak, aby byly zajištěny zájmy poskytovatele vyplývající z této smlouvy.

Článek 14 Práva k majetku

Práva k majetku pořízenému nebo částečně pořízenému z podpory poskytnuté na řešení Projektu se řídí § 15 zákona č. 130/2002 Sb. Příjemce, který je vlastníkem tohoto majetku, není oprávněn bez souhlasu poskytovatele s tímto majetkem disponovat⁴ ve prospěch třetí osoby po celé období řešení Projektu.

Článek 15 Odpovědnost za škodu

Poskytovatel nenes odpovědnost za jednání nebo naopak nečinnost příjemce. Poskytovatel žádným způsobem neodpovídá za nedostatky výrobků nebo služeb, které spočívají na poznacích dosažených v rámci Projektu.

Článek 16 Spory smluvních stran

Spory smluvních stran vznikající z této smlouvy a v souvislosti s ní budou řešeny podle obecně závazných právních předpisů.

Článek 17 Závěrečná ustanovení

- 1) Tato smlouva se uzavírá na dobu řešení Projektu a následující období potřebné pro vyhodnocení výsledků řešení Projektu, včetně vypořádání poskytnuté podpory podle zákona č. 218/2000 Sb., ne však na dobu delší než 180 dnů ode dne ukončení řešení Projektu.
- 2) Tato smlouva nabývá platnosti dnem podpisu poslední ze smluvních stran a účinnosti dnem jejího zveřejnění v registru smluv podle zákona o registru smluv. Změny této smlouvy mohou být prováděny pouze dohodou smluvních stran formou písemných vzestupně číslovaných dodatků, podepsanými oprávněnými zástupci smluvních stran.
- 3) Právní vztahy, které nejsou touto smlouvou přímo upravené, se řídí rozpočtovými pravidly, zákonem č. 130/2002 Sb., zákonem č. 500/2004 Sb., zákonem č. 89/2012 Sb., občanský zákoník ve znění pozdějších předpisů a dalšími souvisejícími zvláštními právními předpisy.
- 4) Nedílnou součástí této smlouvy je:

4) tj. nejsou oprávněni bez souhlasu poskytovatele tento majetek zcizit, pronajmout, půjčit, zapůjčit či zastavit.

- a) Příloha I – Schválený návrh Projektů,
 - b) Příloha II – Uznané náklady a finanční zdroje Projektů,
 - c) Příloha III – Plán hodnocení Projektů,
 - d) Příloha IV – Tabulka snížených odvodů za porušení rozpočtové kázně
- 5) Poskytovatel zajistí uveřejnění smlouvy a metadat smlouvy v registru smluv včetně případných oprav uveřejnění s tím, že nezajistí-li poskytovatel uveřejnění smlouvy nebo metadat smlouvy v registru smluv ve lhůtě 30 dnů ode dne uzavření smlouvy, pak je oprávněn zajistit jejich uveřejnění příjemce ve lhůtě 3 měsíců ode dne uzavření smlouvy.
- 6) Příjemce souhlasí s uveřejněním celého obsahu smlouvy vyjma informací, které nelze poskytnout při postupu podle předpisů upravujících svobodný přístup k informacím.
- 7) Smluvní strany souhlasně prohlašují, že si tuto smlouvu řádně přečetly, jejímu obsahu porozuměly, nejsou jim známy žádné důvody, pro které by tato smlouva nemohla být řádně plněna nebo které by způsobovaly její neplatnost, a že tato smlouva je projevem jejich vážné vůle, což stvrzují svými podpisy.

Za poskytovatele:

V Praze dne:

vedoucí oddělení řízení
mezinárodních programů VaVal

Razítko:

Za příjemce:

V dne:

ředitel

Razítko:

Příloha I smlouvy
Schválený návrh projektu

Návrh projektu

Podprogram:	INTER-ACTION	Identifikační kód projektu:	2019LTAIN
--------------------	---------------------	------------------------------------	------------------

Název projektu
Studie pylové kompetice mezi hybridy <i>Arabidopsis thaliana</i>

Doba řešení projektu:	<i>1.1.2020-31.12.2022</i>
------------------------------	----------------------------

Příjemce	Razítko:
Název organizace:	Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i.
Jméno řešitele:	
Statutární zástupci:	Datum: 18.7.2019 Podpisy: <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> _____ Jméno a funkce statut. orgánu/ů </div>
Motivační účinek:	<i>Statutární zástupce výše uvedeného subjektu dále prohlašuje, že nebyly zahájeny příslušné činnosti v oblasti VaVal na projektu (s výjimkou studie proveditelnosti) před podáním návrhu projektu (žádosti o podporu). Statutární zástupce dále souhlasí, že data obsažená v dokumentaci k projektu budou předmětem hodnocení podle kap. 4 zadávací dokumentace.</i>

Další účastník projektu	Razítko:
Název organizace:	
Jméno dalšího řešitele:	
Statutární zástupci:	Datum: Podpisy: <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> _____ Jméno a funkce statut. orgánu/ů </div>

Motivační účinek:	<i>Statutární zástupce výše uvedeného subjektu dále prohlašuje, že nebyly zahájeny příslušné činnosti v oblasti VaVal na projektu (s výjimkou studie proveditelnosti) před podáním návrhu projektu (žádosti o podporu). Statutární zástupce dále souhlasí, že data obsažená v dokumentaci k projektu budou předmětem hodnocení podle kap. 4 zadávací dokumentace.</i>
--------------------------	---

Další účastník projektu		Razítko:
Název organizace:		
Jméno dalšího řešitele:		
Statutární zástupci:	Datum: Podpisy: <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border-top: 1px solid black; width: 20%;"></div> <div style="border-top: 1px solid black; width: 20%;"></div> <div style="border-top: 1px solid black; width: 20%;"></div> </div> <p style="text-align: center;">Jméno a funkce statut. orgánu/ů</p>	
Motivační účinek:	<i>Statutární zástupce výše uvedeného subjektu dále prohlašuje, že nebyly zahájeny příslušné činnosti v oblasti VaVal na projektu (s výjimkou studie proveditelnosti) před podáním návrhu projektu (žádosti o podporu). Statutární zástupce dále souhlasí, že data obsažená v dokumentaci k projektu budou předmětem hodnocení podle kap. 4 zadávací dokumentace.</i>	

Další účastník projektu		Razítko:
Název organizace:		
Jméno dalšího řešitele:		
Statutární zástupci:	Datum: Podpisy: <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border-top: 1px solid black; width: 20%;"></div> <div style="border-top: 1px solid black; width: 20%;"></div> <div style="border-top: 1px solid black; width: 20%;"></div> </div> <p style="text-align: center;">Jméno a funkce statut. orgánu/ů</p>	
Motivační účinek:	<i>Statutární zástupce výše uvedeného subjektu dále prohlašuje, že nebyly zahájeny příslušné činnosti v oblasti VaVal na projektu (s výjimkou studie proveditelnosti) před podáním návrhu projektu (žádosti o podporu). Statutární zástupce dále souhlasí, že data obsažená v dokumentaci k projektu budou předmětem hodnocení podle kap. 4 zadávací dokumentace.</i>	

1 Identifikační údaje

1.1 Název projektu

Studie pylové kompetice mezi hybridy *Arabidopsis thaliana*

1.2 Anotace projektu

Předpokládá se, že pylová kompetice představuje důležitou evoluční sílu ve vývoji rostlinné variability prostřednictvím exprese a pozitivní selekce příslušných genů v samčích gametofytech, které jsou pak předávány do další generace. Kompetice pylových zrn byla zkoumána u řady rostlinných druhů, zůstává však řada nejasností ve vztahu ke konkurenceschopnosti vnitrodruhových hybridů, samčích i samičích, zejména u hybridů recipročních. Pylovou kompetici navíc ovlivňuje řada faktorů jako je rychlost klíčení pylu, rychlost růstu pylových láček, jejich interakce s bliznou a životaschopností a kvalitou či fitness pylu a v neposlední řadě i genotyp rodičovských rostlin. Na základě těchto znalostí plánujeme popsat reprodukční zdatnost pylu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), ekotypů Landsberg erecta (Ler-0) a Columbia (Col-0) a jejich hybridů. Budeme provádět experimenty zaměřené na pylovou kompetici *in vivo* mezi ekotypy *Arabidopsis*. Různé kombinace samčích a samičích rodičovských rostlin budou hybridizovány a bude porovnána reprodukční zdatnost jednotlivých ekotypů i jejich F1 hybridů. Tento přístup povede ke zhodnocení sporofytických a v pozdějších fázích i gametofytických faktorů ovlivňujících hybridizační potenciál také ve spojitosti s podmínkami vnějšího prostředí. Dále budeme zkoumat vliv hybridizace na přednostní oplození semi-*in vivo* (SIV). Kombinace ekotypů huseníčku a jejich hybridů vybrané na základě předchozích výsledků budou studovány semi-*in vivo*, konkrétně selektivní či přednostní navigace pylových láček k různým kombinacím vajíček k jejich následnému oplození. Tento přístup pomůže ozřejmit vliv gametofytických naváděcích signálů mezi různými ekotypy a jejich hybridy. Konečně plánujeme identifikovat geny a proteiny odlišně exprimované v jednotlivých ekotypech a jejich hybridech po opylení semi-*in vivo*. Z pylových láček různých ekotypů a jejich hybridů kultivovaných SIV za přítomnosti vajíček různých ekotypů budou izolovány RNA a celkové i sekretované proteiny, jež budou použity pro transkriptomické, proteomické a sekretomické analýzy. Vybrané kandidátské geny budou dále funkčně charakterizovány a bude zjišťována jejich důležitost pro reprodukční a hybridizační zdatnost.

1.3 Soutěž

VES19_{INDIE}

1.4 Program

INTER-EXCELLENCE

1.5 Podprogram

INTER-A(CTION)

1.6 Převažující kategorie výzkumu

Základní výzkum

2 Představení projektu

2.1 Představení řešení projektu

Pohlavní rozmnožování krytosemenných rostlin se vyznačuje výraznou nadprodukcí samčích gametofytů, pylových zrn, ale tvorbou jen velmi malého počtu vajíček obsahujících samičí gametofyt, zárodečný vak. Důsledkem této nevyváženosti je výrazné konkurenční prostředí mezi samčími gametofyty, jež navzájem tvrdě soutěží o oplození omezeného počtu vajíček (Tejasini et al 2001). Blizna navíc bývá obvykle opylena pylem z většího počtu rostlin, což zvyšuje pravděpodobnost diferenciálního oplození a zvýšení genetické variability potomstva (Willson 1979; Andersson 1994), díky čemuž se navíc tvoří semena určitých genotypů nerovnoměrně (Charlesworth 1988). Vysoký stupeň genetické příbuznosti mezi semeny také podporuje kin selekci a pomáhá potlačit konkurenci sourozenců (viz Bawa 2016).

Opylení blizny kompatibilním pylovým zrnem je následováno jeho silnou adhezí, rychlou hydratací a vyklíčením pylové láčky (Hafidh et al 2016a). Pylová láčka vyrůstající z jedné a apertur pylového zrna proniká pod povrch blizny, roste pletivy čnělky, naváděna působením samičích reprodukčních pletiv, až nakonec vrůstá otvorem klovým (mikropyle) do vajíčka k zárodečnému vaku, kde dojde k dvojitému oplození (Chapman a Goring 2010; Lora et al 2016).

Kompetici pylových zrn (pylovou kompetici) ovlivňuje řada faktorů jako je rychlost klíčení pylu, rychlost růstu pylových láček, jejich interakce s bliznou a životaschopností a kvalitou či fitness pylu (Epperson a Clegg 1987; Spira et al 1992; Johnston 1993; Herrero a Hormaza 1996; Tejaswini 2002). Například rychlejší pylové láčky vykazují ve srovnání s těmi pomaleji rostoucími vyšší úspěšnost oplození (Snow et al 2000). Na pylovou kompetici dále působí další vlivy. Kromě genotypu rostlin produkujících pyl (Walsh a Charlesworth 1992) a vlastních samčích gametofytů (Arthur et al., 2003) to jsou i specifické interakce mezi pylem a pletivou čnělky (Dresselhaus a Franklin-Tong 2013) a podmínky prostředí, v němž rostou samčí a samičí rodičovské rostliny (Stephenson et al 1992; Tejaswini 2002). Konečným výsledkem je, že úspěšnost oplození spermatickými buňkami nesenými k vajíčkům konkurenčními pylovými láčkami není v důsledku pylové kompetice náhodná (Marshall a Folsom 1991; Swanson et al 2016). Genotyp pestíku také výrazně ovlivňuje konkurenční prostředí, protože může upřednostňovat určité genotypy pylových láček (Noyszewski et al 2017). U řady druhů krytosemenných rostlin závisí úspěch oplození výrazně na velikosti pylu, protože větší pylová zrna jsou ve srovnání s menšími pyly úspěšnější při oplozování (McCallum a Chang 2016). Podmínky prostředí, zejména teplota během kvetení, ovlivňují mimo jiné velikost pylu a vyšší teplota vede u řady druhů k produkci většího pylu (Ejmond et al 2015). Bylo však také popsáno, že vysoká teplota ovlivňuje životnost a fitness pylu *Nicotiana tabacum*, *Agave* sp., *Tradescantia virginiana* a *Iris* sp. (Shivanna et al. 1991) a dokonce zvyšuje podíl trojjaderných pylových zrn v populaci pylu stejné rostliny *Annona cherimola* (Lora et al 2009). Rovněž je známo, že hladina ploidie ovlivňuje rychlost růstu pylových láček (Reese a Williams 2019) a jejich úspěšnost při oplození, kdy pyl s vyšší ploidií (diploidní) překonává ostatní při oplození vajíček *Rosa hybrida* (Gao et al 2019).

Kvalita potomstva bývá vyšší, když pylové láčky rostou na delší vzdálenosti nebo po aplikaci většího množství pylu na bliznu (viz v Mulcahy a Mulcahy 1987). U některých kultivarů cuket vyklíčila semena pocházející z květů opylených větším množstvím pylu ve srovnání s menšími kvanty v dceřinné rostlině, jež byly v několika ohledech kvalitnější (Winsor et al 1987). Vysoká hustota pylu *Pyrus pyrifolia* zvýšila ve srovnání s hustotou nízkou i rychlost klíčení pylu a vedla i k rychlejšímu růstu pylových láček *in vivo* i *in vitro* (Zhang et al 2010). Brzy po klíčení pylu mnohokrát vzrůstají endogenní hladiny gibberelinů (GA) a jejich koncentrace pozitivně koreluje s rychlostí růstu pylových láček a velikostí plodů (Zhang et al 2010).

Opylování F1 hybridů kukuřice pylem stejného a odlišného hybridu vyústilo ve vyšší úspěšnost pyly pocházejících z odlišných hybridů (Pfahler 1965). Naproti tomu, zygoty několika druhů rodu *Brassica* přežil výrazně nižší podíl hybridních zygot než zygot konspicifických (Hauser a kol. 1997). Nicméně podíl přeživších hybridních semen v šešulích *B. napus* byl vyšší než u *B. campestris*. Byliny *Ipomopsis aggregata* a *I. tenuituba* v přírodě často hybridizují. Opylení *I. aggregata* pylem z F1 nebo F2 hybridů vedlo k produkci stejného množství semen jako po ručním opylení konspicifickým pylem, což ukazuje na stejnou životaschopnost pylu (Campbell et al 2003). Když však byly na bliznu *I. aggregata* aplikovány směsné dávky 50% konspicifického a 50% hybridního pylu, méně než polovina semen byla potomky hybridního pylu. Zcela opačné výsledky měly podobné pokusy u *Brassica oleracea*. Po současné aplikaci stejného množství vlastního a cizího pylu na bliznu pocházelo jen 12%-

40% potomstva ze samoopylení (Ockendon a Currah 1978). Současné opylování ibišku (*Hibiscus* sp.) inbredním a hybridním pylem mělo za následek nižší podíl hybridního potomstva (Klips 1999). U těchto druhů ibišků se zdá, že pylová kompetice funguje jako hybridizační bariéra. U dvou druhů silenek (*Silene dioica* a *S. latifolia*) opylení ekvální směsí konspicivického a heterospicivického pylu významně neovlivnilo poměr semen ani hmotnost osiva (Rahme et al 2009). Po smíšeném opylení však bylo u *S. latifolia* přítomno méně hybridů než bylo očekáváno (18%). To však nebyl případ *S. dioica*, kde byl podíl hybridních semen nezměněn (51%). To ukazuje na asymetrickou post-fertilizační reprodukční bariéru a ta pravděpodobně přispívá k vzácnému výskytu hybridů časně generace. Tato studie také ukazuje, že konkurence pylu může představovat účinnou překážku pro hybridizaci mezi blízkými příbuznými druhy, jež pravděpodobně působí koordinovaně s jinými reprodukčními překážkami.

V každé vývojové fázi od pylové hydratace až po oplození byla identifikována řada genů, které zahrnují i řadu kandidátů či potvrzených genů účastnících se navádění pylu (Chapman a Goring 2010). Například aktivita genu pro pyrovát dekarboxylázu hraje poskytuje pylu konkurenční výhody a mutace v tomto genu způsobuje špatný růst pylových láček vodícím pletivem (Gass et al 2005). Konkurenční schopnost pylových zrn kukuřice vyžaduje přítomnost aktivní paralogní serinové/threoninové proteinové kinázy STK1 a STK2 a mutace v těchto dvou genech výrazně snižují konkurenceschopnost pylových láček ve srovnání s láčkami divokého typu (Huang et al 2017). Podobně, u *Arabidopsis* je konkurenceschopnost pylových láček mimo jiné podmíněna přítomností K⁺ kanálu rodiny Shaker (Mouline et al 2002).

Dosud bylo popsáno několik signálních molekul, které hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci mezi buňkami vajíčka a pylovou láčkou (viz Mizuta a Higashiyama 2018; viz Johnson et al. 2019). Jich aktivita podporovala teorii o klíčové roli samičího gametofytu při navádění a recepci pylových láček (Kessler a Grossniklaus 2011). Některé z těchto molekul zahrnují i defensin-like polypeptid LURE u *Torenia fournieri* či u *Arabidopsis* jeho homolog AtLURE1, transkripční regulační kaskádu CCG/CBP/MYB98, modul FERONIA/LORELEI, stejně jako TURAN a EVAN v *Arabidopsis*, nebo konečně krátký sekretovaný protein ZmEA1, který je exprimován ve vaječném aparátu kukuřice. Sekretomická studie, semi-*in vivo* (SIV) kultivovaných pylových láček rozšířila tuto koncepci navádění o to, že identifikovala i příspěvek pylu ke komplexnímu dialogu mezi oběma pohlavními partnery (Hafidh et al 2016b).

Předpokládá se, že pylová kompetice představuje důležitou evoluční sílu ve vývoji rostlinné rozmanitosti prostřednictvím exprese a pozitivní selekce příznivých genů v samčích gametofytech, které jsou pak předávány do dceřiných rostlin (Mulcahy a Mulcahy 1987). Experimentální ověření pylové kompetice s ohledem na rychlost klíčení semen však tuto hypotézu nepodporuje (Baskin a Baskin 2015).

Použitá literatura

- Andersson, M. (1994) Sexual selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Arthur, K., Vejlupekova, Z., Meeley, R. and Fowler, J. (2003) Maize ROP2 GTPase provides a competitive advantage to the male gametophyte. *Genetics*. 165: 2137-2151.
- Baskin JM and Baskin C (2015) Pollen (microgametophyte) competition: an assessment of its significance in the evolution of flowering plant diversity, with particular reference to seed germination. *Seed science research*. 25 (1) 1-11.
- Bawa KS (2016) Kin selection and the evolution of plant reproductive traits. *Proc Biol Sci*. 283(1842).
- Campbell, D.R., Alarco, R. and Wu, C. A. (2003) Reproductive isolation and hybrid pollen disadvantage in *Ipomopsis*. *J Evol Biol*. 16(3):536-40.
- Charlesworth, D (1988) Evidence for Pollen Competition in Plants and Its Relationship to Progeny Fitness: The American Naturalist. 132 (2) 298-302
- Chapman LA, Goring DR. (2010) Pollen-pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae. *J Exp Bot*. 61(7):1987-99.
- Dresselhaus, T. and Franklin-Tong, N (2013) Male–female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance and double fertilization. *Molecular Plant*. 6: 1018-1036.
- Ejmond, M. J., Ejmond, A., Banasiak, L., Karpinska-Kolaczek, M., Kozłowski, J and Kolaczek, P (2015) Large pollen at high temperature: an adaptation to increased competition on the stigma? *Plant Ecology*. 216 (10) 1407–141.
- Epperson, B. K. and Clegg, M.T. (1987) First-pollination primacy and pollen selection in the morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Heredity*. 58: 5-14.

- Gao SM, Yang MH, Zhang F, Fan LJ, Zhou Y (2019) The strong competitive role of 2n pollen in several polyploidy hybridizations in *Rosa hybrida*. *BMC Plant Biol.* 19(1):127.
- Gass N, Glagotskaia T, Mellema S, Stuurman J, Barone M, Mandel T, Roessner-Tunali U, Kuhlemeier C (2005) Pyruvate decarboxylase provides growing pollen tubes with a competitive advantage in petunia. *Plant Cell.* 17(8):2355-68.
- Hafidh D, Fila J, Honys D (2016a) Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction* 29: 31-51
- Hafidh S, Potesil D, Fila J, Capkova V, Zdrahal Z, Honys D (2016b) Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization. *Genome Biol* 17: 81
- Hauser T, Jorgensen R, Ostergard H. (1997) Preferential exclusion of hybrids in mixed pollinations between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*). *Am J Bot.* 84(6):756.
- Herrero, H. and Hormaza, J. I. (1996) Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction.* 9: 343-347.
- Huang JT, Wang Q, Park W, Feng Y, Kumar D, Meeley R, Dooner HK. (2017) Competitive Ability of Maize Pollen Grains Requires Paralogous Serine Threonine Protein Kinases STK1 and STK2. *Genetics.* 207(4):1361-1370.
- Johnston, M. O. (1993) Tests of two hypotheses concerning pollen competition in a self-compatible, long-styled species (*Lobelia cardinalis*: *Lobeliaceae*). *American Journal of Botany.* 80: 1400-1406.
- Johnson MA, Harper J, Palanivelu R (2019) A Fruitful Journey: Pollen Tube Navigation from Germination to Fertilization. *Annual Review of Plant Biology* 70: 809-837
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2009) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (*Annonaceae*): Implications for pollen evolution. *Am J Bot* 96: 802-808
- Lora, J. Hormaza, J.I. and Herrero, M. (2016) The Diversity of the Pollen tube Pathway in Plants: Toward an Increasing Control by the Sporophyte. *Front Plant Sci.* 7: 107.
- Kessler SA, Grossniklaus U. (2011) She's the boss: signaling in pollen tube reception. *Curr Opin Plant Biol.* 14(5):622-7.
- Klips RA, (1999) Pollen Competition as a Reproductive Isolating Mechanism between Two Sympatric Hibiscus Species (*Malvaceae*). *American Journal of Botany* 86(2):269-72
- Marshall, D. L. and Folsom, M. W. (1991) Mate choice in plants: An anatomical to population perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 22: 37 – 63.
- McCallum B, Chang SM. (2016) Pollen competition in style: Effects of pollen size on siring success in the hermaphroditic common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Am J Bot.* 103(3):460-70.
- Mizuta Y, Higashiyama T. (2018) Chemical signaling for pollen tube guidance at a glance. *J Cell Sci.* 131(2).
- Mouline K, Véry AA, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud JB, Sentenac H. (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16(3):339-50.
- Mulcahy, D. L., and Mulcahy, G. B. (1987) The effects of pollen competition. *Am. Sci.* 75: 44-50.
- Noyszewski AK, Liu YC, Tamura K, Smith AG (2017) Polymorphism and structure of style-specific arabinogalactan proteins as determinants of pollen tube growth in *Nicotiana*. *BMC Evol Biol.* 17(1):186.
- Ockendon DJ, Currah L.(1978) Time of cross- and self-pollination affects the amount of self-seed set by partially self-incompatible plants of *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet.* 52(5):233-7
- Pfahler, P. L. (1965) Fertilization ability of maize pollen grains. 1. Pollen sources. *Genetics.* 52. 513–520.
- Rahmé J, Widmer A, Karrenberg S. (2009) Pollen competition as an asymmetric reproductive barrier between two closely related *Silene* species. *J Evol Biol.* 22(9):1937-43.
- Reese, J.B. and Williams, J.H. (2019) How does genome size affect the evolution of pollen tube growth rate, a haploid performance trait? *Am J Bot*, doi: 10.1002/ajb2.1326
- Shivanna KR1, Linskens HF, Cresti M. (1991) Pollen viability and pollen vigor. *Theor Appl Genet.* 81(1):38-42.

- Spira, T. A. Snow, D. Whigham and Leak. J. (1992) Flower visitation, pollen deposition, and pollen-tube competition in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany*. 79: 428-433.
- Snow, A. A, Spira, T.P. and Liu, H. (2000) Effects of sequential pollination on the success of “fast” and “slow” pollen donors in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany*. 87: 1656 – 1659.
- Stephenson, A, Lau, T.C. Quesada, M and Winsor. J (1992) Factors that affect pollen performance. In R. Wyatt [ed.], *Ecology and evolution of plant reproduction*, 119–136. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- Swanson RJ, Hammond AT, Carlson AL, Gong H, Donovan TK (2016) Pollen performance traits reveal prezygotic nonrandom mating and interference competition in *Arabidopsis thaliana*. *Am J Bot*. 103(3):498-513.
- Tejasini, Ganeshiah, K. N. and Uma Shaanker, R. (2001) Sexual selection in plants: the process, components and significance. *Proceedings of the Indian National Science Academy - Part B: Biological Sciences*, 67 (6). pp. 423-432.
- Tejaswini, P. (2002) Variability of pollen grain features: A plant strategy to maximize reproductive fitness in two species of *Dianthus*? *Sexual Plant Reproduction*. 14: 347-353 .
- Walsh, N. and Charlesworth, D. (1992) Evolutionary interpretations of differences in pollen tube growth rates. *Quarterly Review of Biology*. 67: 19-37.
- Willson, M. F. (1979) Sexual selection in plants. *American Naturalist*. 113: 777-790.
- Winsor JA, Davis LE, Stephenson AG (1987) The relationship between pollen load on offspring vigor in *Cucurbita pepo*. *Amer Nat* 129:643–656
- Zhang, C., Tateshi, N. and Tanabe, K. (2010) Pollen density on the stigma affects endogenous gibberellin metabolism, seed and fruit set, and fruit quality in *Pyrus pyrifolia*. *Journal of Experimental Botany* 61(15):4291-302.

2.2 Představení zahraničního partnera

2.2.1 *Název instituce/organizace zahraničního partnera*

Indian Institute of Technology - Madras

2.2.2 *Jméno a příjmení odpovědného zahraničního řešitele*

Prof. Ramamurthy Baskar

2.2.3 *Pracoviště zahraničního partnera*

Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology - Madras

2.2.4 *Adresa pracoviště zahraničního partnera*

Department of Biotechnology
IIT Madras,
Sardar Patel Road
Chennai – 600036
Tamil Nadu, India

2.2.5 *Internetová adresa pracoviště/organizace zahraničního partnera*

<https://www.iitm.ac.in>

2.2.6 *Role zahraničního partnera v projektu*

Zahraněním partnerem projektu je Prof. Ramamurthy Baskar, Indian Institute of Technology - Madras. Projekt představuje přímou spolupráci dvou spřízněných laboratoří zabývajících se řešením

společného problému – otázky vnitrodruhové hybridizace huseníčku rolního, reprodukční zdatnosti samčího a samičího gametofytu a v neposlední řadě i vzájemné komunikace mezi samčím a samičím pohlavním partnerem před oplozením na pozadí různých ekotypů.

Obě laboratoře se budou podílet na koordinaci řešení projektu, a plánování a provádění experimentů. Specifickou úlohou zahraničního partnera bude mimo sdílení experimentálního materiálu a již dostupných linií zejména hybridizací a provádění přímých i recipročních křížení včetně přípravy experimentálního materiálu; zde využijí svého již dříve demonstrovaného souboru znalostí a dovedností. Obě laboratoře také budou sdílet své zkušenosti a dojde k jejich přenosu na partnerské pracoviště. Na straně indického partnera se bude jednat zejména o provádění a využití a analýz *in planta*, na české naopak alespoň zpočátku o expertizu v oblasti *semi-in vivo*. Indický partner se v neposlední řadě bude podílet na školení studentů českého partnera formou stáže. Funkce zahraničního partnera je tedy založena na sdílení nejen duševního vlastnictví, ale částečně také hmotného zabezpečení na své straně, což v kombinaci s jedinečností předkládaného projektu odůvodňuje jeho nezastupitelnost. Oba partneři, český i indický, budou profitovat ze synergického výzkumu, který by bez sdílení dosud nepublikovaných dat, unikátního rostlinného materiálu, sdílení materiálního a metodického zázemí a zkušeností nebyl v navrhovaném časovém horizontu reálný.

2.2.7 Zdůvodnění mezinárodní spolupráce

Většina výzkumných cílů v týmu navrhovatele je řešena v mezinárodní spolupráci (viz CV navrhovatele), která je nezbytná pro efektivní dosažení nadprůměrně kvalitních vědeckých výsledků a etablování týmu na mezinárodní vědecké scéně. Nutnost zahraniční spolupráce navíc vyplývá z rostoucích nároků na konkurenceschopnost, které je stále obtížnější dosáhnout na vnitrostátní úrovni. V kontextu vytvoření moderního dynamického vědeckého týmu (jak ostatně ukazuje i personální složení Laboratoře biologie pylu ÚEB) je tedy mezinárodní spolupráce nevyhnutelná, je samou podstatou naší práce.

Mezinárodní spolupráce bude mít pro pracoviště řešitele přínos ve více rovinách. Zjevný okamžitý přínos v řešení předkládaného projektu je dán technickým vybavením obou laboratoří a bohatými praktickými zkušenostmi se specializovanými metodami využívanými pro řešení projektu jak v oblastech *in vivo* a *in planta* (indická strana) tak v oblastech *semi-in vivo* a integrovaných -omik (česká strana). Spolupráce výrazně urychlí a zjednoduší vývoj a implementace potřebných metod a získání požadovaných dat, v porovnání se situací, kdy by se český tým pokoušel bez předchozí zkušenosti příslušné metody zavádět sám. Tento projekt také poskytne mladým vědeckým pracovníkům možnost získat zahraniční zkušenost v oblasti základního výzkumu, rozšířit jazykové znalosti a expertizu. Dalším přínosem pak bude především vzájemná vědecká spolupráce nad rámec projektu, navázání dalších kontaktů se špičkovými vědci pracujícími v oblasti našeho zájmu (prostřednictvím zahraničního partnera, účastí na konferencích, přednáškou či přednáškami na spolupracujícím institutu) a zviditelnění českého výzkumu.

2.2.8 Zdůvodnění potřeby spolupráce s konkrétním zahraničním partnerem

Spojení Laboratoře biologie pylu (ÚEB) a laboratoře prof. R. Baskara (Indian Institute of Technology – Madras, IIT Madras) je pro řešení předkládaného projektu nezbytné a navýsost logické, neboť obě laboratoře se zabývají podobným problémem, avšak nahlízejí na něho z různých stran a v dílčích aspektech plánovaného projektu oběma skupinám náleží prioritní postavení (somatická mutageneze a meiotické rekombinace ve vztahu ke stáří rodičovských rostlin – Bashir et al. 2013, Singh et al. 2015; mezibuněčná komunikace a *semi-in vivo* protoemika v samčím gametofytu – Hafidh et al. 2016). IIT Madras navíc dlouhodobě patří mezi nejprestižnější (a v některých letech je v této vysoce kompetitivní oblasti dokonce považován za nejprestižnější) vědeckovýzkumná pracoviště v Indii v oblasti biotechnologického výzkumu a terciálního vzdělávání, což činí spolupráci na této úrovni výjimečně atraktivní pro eventuelní další rozvoj spolupráce v oblasti indického subkontinentu. V neposlední řadě je a bude pro vyřešení projektu důležité sdílení experimentálního materiálu mezi oběma partnery, k němuž již došlo a nadále průběžně dochází. Během plánovaných pobytů

doktorandů v Indii (viz zdůvodnění finančních prostředků) budou navíc prováděny i konkrétní experimenty (viz kapitoly 2.2.7 a 3.3).

Literatura:

- Bashir, T., Sailer, C., Loganathan, N., Bhoopalan, H., Eichenberger, C., Grossniklaus, U. and Baskar, R. (2013) Hybridization alters spontaneous mutation rates in a parent-of-origin-dependent fashion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 165(1):427-37.
- Hafidh S, Potěšil D, Fila J, Čapková V, Zdráhal Z, Honys D (2016). Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube-secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization. *Genome Biol.* 17:81.
- Singh AK, Bashir T, Sailer C, Gurumoorthy V, Ramakrishnan AM, Dhanapal S, Grossniklaus U, Baskar R. (2015) Parental Age Affects Somatic Mutation Rates in the Progeny of Flowering Plants. *Plant Physiology*. 168(1):247-57.

3 Rámeč projektu

3.1 Účel projektu

3.1.1 Naplnění cílů programu/podprogramu (jakým způsobem projekt přispívá k naplnění cílů programu INTER-EXCELLENCE, podprogramu INTER-ACTION).

Cílem navrhovaného projektu je podpořit a dále rozvíjet dvoustrannou mezinárodní spolupráci mezi Ústavem experimentální botaniky AVČR, v.v.i., Praha a Indian Institute of Technology - Madras, Chennai/Madras, Indie, čímž přispěje k rozvoji mezinárodní vědecké spolupráce ČR s Indií. Obě instituce se zabývají základním a aplikovaným výzkumem, v oblasti našeho zájmu konkrétně aktuální problematikou regulace pohlavního rozmnožování rostlin. Obě partnerské strany projektu poskytnou svou odbornost a zkušenosti ve výzkumu mezibuněčné komunikace pro rozmnožování krytosemenných rostlin. Konkrétní výsledky projektu pak mají potenciál pro budoucí praktické využití ve šlechtitelské praxi. Svým zaměřením projekt plně odpovídá primárnímu cíli programu INTER-EXCELLENCE a podprogramu INTER-ACTION, neboť umožňuje efektivní spolupráci mezi českým a indickým partnerem při získávání a využívání nejnovějších poznatků a studijního materiálu. Projekt dále naplňuje také další z cílů programu - zlepšení kompetitivnosti českých výzkumných pracovišť prostřednictvím zintenzivnění mezinárodní spolupráce se zeměmi mimo Evropskou unii. Projekt konečně přispěje k propagaci českého výzkumu reprodukční biologie na mezinárodní scéně a poukáže na význam studia rozmnožovacích mechanismů rostlin. Řešení projektu je podmínkou pokračování spolupráce partnerských pracovišť a hlubšího zhodnocení dosud dosažených výsledků. Projekt navazuje na předchozí neformální spolupráci obou partnerů a významně ji posunuje zaměřením na studium obecnější platnosti zkoumaných vztahů.

3.1.2 Potřebnost a aktuálnost projektu (popis řešeného problému, jeho současného stavu, navrhovaného výzkumu a jeho inovativnosti a potřebnosti včetně způsobu řešení a předpokládaných dosažených vědeckých a socioekonomických výsledků určených k využití).

Očekávané přínosy projektu lze shrnout především do tří oblastí: (i) integrace intelektuálního a technologického potenciálu spolupracujících pracovišť povede k systémovému zvýšení úrovně výzkumu vnitrodruhové hybridizace a reprodukční zdatnosti včetně příslušných molekulárních mechanismů obtížně studovatelných mezibuněčných interakcí u modelových rostlin a následně i zemědělských plodin mimo jiné vytvořením podmínek pro rychlejší odborný růst mladých vědeckých pracovníků, (ii) zjištění a potvrzení funkce molekulárních mechanismů specifických procesů komunikace obou pohlavních partnerů prohloubí naše obecné znalosti způsobu kontroly hybridizace jako takové a pohlavního rozmnožování jako funkční platformy podmiňující zvyšování genetické variability a rozmanitosti a v obecnější rovině i fenoménu reprodukční kompatibility rostlin a (iii) kvalitativní a kvantitativní progres v daném vědním oboru povede k zásadně vyššímu stupni integrace do mezinárodních projektů.

3.1.3 Možnosti uplatnění výsledků projektu (včetně jejich vědeckotechnických a socioekonomických přínosů).

Jelikož náplň předkládaného grantu spadá do oblasti základního výzkumu, jehož cílem je porozumět dané problematice, není logicky možné očekávat bezprostřední konkrétní uplatnění a materializaci výsledků dosažených při řešení projektu. To ani není předmětem základního výzkumu. V našem případě je cílem studium (mezi)buněčných procesů, které ovlivňují specifickou formu kontroly pohlavního rozmnožování a účinnosti a specifčnosti hybridizace u krytosemenných rostlin. Získané poznatky týkající se těch nejintimnějších fází pohlavní reprodukce rostlin a rozpoznávání pohlavních partnerů mohou být následně aplikovány do biotechnologií a zemědělských postupů, což ve svém důsledku povede k možné manipulaci reprodukčních struktur a tím ke zvýšení účinnosti šlechtitelských

postupů a následně i k intenzifikaci kvality a výnosů u zemědělských plodin. To je také plně v souladu s deklarovanými cíli programu INTER-ACTION.

3.1.4 Relevantní okruh uživatelů (trh) pro uplatnění výsledků

Předkládaný projekt s označením "ARAHYBRID" spadá do oblasti základního výzkumu a nebude mít konkrétního odběratele. Potenciálními uživateli všech výsledků dosažených při řešení navrhovaného projektu bude vědecká veřejnost.

3.1.5 Předpokládané krátkodobé přínosy projektu

Přínosy projektu (definujte a kvantifikujte níže):			
	počet	Impaktovaný časopis, ve kterém se předpokládá publikace výsledků	Impakt faktor časopisu
publikační výsledky v impaktovaných časopisech s kódem J _{imp} nebo v databázi Scopus s kódem J _{sc}	3-4	Např. The Plant Journal, New Phytologist, Frontiers in Plant Science, BMC Plant Biology	Nejnižší 3.4
z toho publikační výsledky v impaktovaných časopisech s kódem J _{imp} nebo v databázi Scopus s kódem J _{sc} ve spoluautorství se zahraničním autorem, s významným podílem autorství zaměstnance uchazeče/dalšího účastníka projektu	2	Např. The Plant Journal, New Phytologist, Frontiers in Plant Science, BMC Plant Biology	Nejnižší 3.4
	počet	Popis / charakterizace	
výsledky aplikovaného výzkumu s kódem P, F, G, R nebo Z			
.....			
.....			
.....			

3.1.6 Zdůvodnění předpokládaných přínosů včetně kritických předpokladů (rizik) k jejich dosažení

Projekt má ambici vyústit ve tři až čtyři impaktované publikace, jež by měly vzniknout ve spolupráci se zahraničním partnerem. Předpokládáme, že nejméně dvě publikace pak budou společné i z autorského hlediska. Zde se jedná o velice konzervativní odhad, s ohledem na povahu a rozložení aktivit v předkládaném projektu bude společných publikací pravděpodobně více. Detailní náplň publikací bude odpovídat příslušným etapám, v rámci jejichž řešení vzniknou a je popsána v kapitole týkající se popisu etap projektu.

Hlavním předpokladem ke splnění vytčených cílů je zejména vědecké zaměření naší laboratoře a letité zkušenosti v řešení projektů v rámci „pylové“ problematiky. Jsou zde zavedeny metody izolace jednotlivých vývojových stádií pylu a SIV kultivace pylových láček, jejich hromadného fenotypování, standardní a pokročilé metody molekulární a buněčné biologie, typicky klonování, izolace nukleových kyselin a proteinů, křížení a transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*, pokročilá fluorescenční mikroskopie, a konečně dlouhodobá zkušenost s pokročilými -omickými a bioinformatickými analýzami na různých úrovních včetně integrace komplementárních dat z různých zdrojů. Další zárukou úspěšného řešení projektu je také složení řešitelského týmu, stávajícího z mladých, leč erudovaných vědeckých pracovníků, které poskytuje adekvátní intelektuální zázemí potřebné pro řešení předkládané problematiky. Také přístrojové vybavení laboratoře splňuje požadavky, které vyvstanou při provádění jednotlivých experimentů. Kritickým předpokladem tedy zůstává finanční podpora týmu pro zdárný

průběh zkoumání. Bude-li toto zajištěno, nejsou nám známy další okolnosti, které by měly narušit průběh celého projektu a splnění jeho cílů.

3.1.7 Předpokládané dlouhodobé přínosy projektu, jejich popis a kritické předpoklady (rizika) jejich dosažení

Z dlouhodobého pohledu projekt napomůže, mimo očekávaného prohloubení a upevnění mezinárodní spolupráce českých vědeckovýzkumných institucí s indickými partnery, také k objasnění konkrétních a ve svém důsledku i obecných mechanismů mezibuněčné komunikace ve vztahu k pohlavnímu rozmnožování semenných rostlin s možným aplikačním přesahem. Kritickým předpokladem je opět dostatek financí, aby bylo možné pokrýt poplatky na publikaci výsledků, mimo jiné ve formátu *open-access*. Získané Výstupy projektu budou mít potenciál posloužit při objasňování hybridizačních mechanismů zemědělských plodin a následně i při šlechtění nových odrůd konvenčním šlechtěním i metodami genového inženýrství.

3.2 Popis cílů projektu

Hlavním cílem tohoto projektu je popsat reprodukční zdatnost pylu různých ekotypů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a jejich hybridů.

Tohoto hlavního cíle bude dosaženo prostřednictvím **tří dílčích cílů**, jejichž řešení bude rozděleno do **tří etap**.

1) **Pylová kompetice *in vivo*** mezi ekotypy *Arabidopsis*. Různé kombinace samčích a samičích rodičovských rostlin budou hybridizovány a bude porovnána reprodukční zdatnost jednotlivých ekotypů i jejich F1 hybridů. Tento přístup bude povede ke zhodnocení sporofytických a v pozdějších fázích i gametofytických faktorů ovlivňujících hybridizační potenciál (etapa E001) také ve spojitosti s podmínkami vnějšího prostředí (etapa E002).

2) Vliv **hybridizace** na přednostní oplození **semi-*in vivo* (SIV)**. Kombinace ekotypů huseníčku a jejich hybridů vybrané na základě výsledků předchozího cíle budou studovány semi-*in vivo*, konkrétně selektivní či přednostní navigace pylových láček k různým kombinacím vajíček k jejich následnému oplození. Tento přístup pomůže ozřejmit vliv gametofytických naváděcích signálů mezi různými ekotypy a jejich hybridy (etapa E002).

3) **Identifikace genů a proteinů odlišně exprimovaných v jednotlivých ekotypech a jejich hybridech** po opylení semi-*in vivo*. Z pylových láček různých ekotypů a jejich hybridů kultivovaných semi-*in vivo* za přítomnosti vajíček různých ekotypů budou izolovány RNA a celkové a sekretované proteiny, jež budou použity pro transkriptomické, proteomické a sekretomické analýzy. Vybrané kandidátské geny budou dále funkčně charakterizovány a bude zjišťována jejich důležitost pro reprodukční a hybridizační zdatnost (etapy E002 a E003).

3.3 Etapy a výsledky projektu (Etapy mohou být roční, ale i víceleté a po dobu řešení

projektu alespoň 2. V prvním a v posledním roce řešení projektu mohou být etapy i kratší než 12 měsíců)

Dílčí etapa	Výsledek	Délka etapy	Název etapy	Popis výsledku
E001	V001	01-2020 – 07-2020	Pylová kompetice <i>in vivo</i> mezi ekotypy huseníčku	Popsání vlivu směru křížení na úspěšnost hybridizace
	V002	02-2020 – 07-2020		Popsání významu morfologie květních orgánů pro přednostní oplození
	V003	03-2020 – 07-2020		Zjištění vlivu rodičovských genotypů na oplození a produkci semen
E002	V004	08-2020 – 02-2021		Popsání hybridizačních preferencí při a po působení abiotických stresů

	V005	10-2020 – 04-2021	Vliv hybridizace na přednostní oplození za změněných podmínek prostředí a v semi- <i>in vivo</i> uspořádání	Zjištění významu gametofytického vedení pylových láček ve vztahu k hybridizaci v semi- <i>in vivo</i> systému
	V006	01-2021 – 06-2021		Detailní posouzení růstových a naváděcích preferencí pylových láček po hybridizaci pomocí třísožkového semi- <i>in vivo</i> systému
	V007	03-2021 – 06-2021		Identifikace rozdílů v semi- <i>in vivo</i> sekretomu pylových láček po samooplenění a po hybridizaci
E003	V008	07-2021 – 02-2022	Identifikace genů a proteinů diferenciallyně exprimovaných v jednotlivých ekotypch a hybridech v důsledku hybridizace a jejich funkční analýza	Popsání semi- <i>in vivo</i> transkriptomu pylových láček ovlivněného hybridizací
	V010	09-2021 – 04-2022		Identifikace semi- <i>in vivo</i> proteomu pylových láček ve vztahu k hybridizaci
	V011	02-2022 – 12-2022		Integrace -omických dat a popsání úlohy klíčových diferenciallyně exprimovaných genů mezi ekotypy v důsledku hybridizace
E004	...			
	...			
	...			

Etapa řešení E001

3.3.1 Identifikační číslo etapy

E001

3.3.2 Název etapy

Pylová kompetice *in vivo* mezi ekotypy huseničku

3.3.3 Popis etapy

V první etapě řešení projektu budeme studovat **pylovou kompetici *in vivo*** mezi různými ekotypy huseničku. Různé kombinace samčích a samičích rodičovských rostlin budou hybridizovány a bude porovnána reprodukční zdatnost jednotlivých ekotypů i jejich F1 hybridů.

1.1. V první řadě budeme zjišťovat, zda **směr křížení při hybridizaci** koreluje s přednostním oplozením pylem jednoho ze dvou rodičovských inbredních linií *Arabidopsis*. Budeme provádět mj. kompetiční testy mezi pylem dvou inbredních rodičů na blížně hybridní rostliny po recipročním křížení. Podobně budeme testovat, zda si pyly pocházející ze dvou recipročních hybridů navzájem konkurují a přednostně opylují a oplozují vajíčka konkrétních inbredních rodičovských rostlin. Konečně provedeme kompetiční testy mezi pyly ze dvou hybridních rodičů na blížnách recipročních hybridů v obou směrech.

Pro vytvoření vzájemných hybridů použijeme v základní podobě projektu ekotypy Col-0 a Ler-0 a pro sledování růstu pylových láček různého původu vodícím pletivem (angl. transmitting tract) jednoho květu použijeme jednak linie nesoucí genetické markery (GFP/RFP a GUS exprimované pod silným pylovým promotorem LAT52 (Twell et al. 1990)) a jednak diferencční barviva (Minnaar a Anderson 2019). Genetické markery jsou k dispozici pro různé ekotypy (například EC3 marker založený na GUS v Ler-0 (Huck et al., 2003)) a LAT52-GFP, LAT52-RFP či LAT52-GUS na pozadí ekotypu Col-0 jsou k dispozici v naší laboratoři.

1.2. Dále budeme zjišťovat **vliv morfologie květních orgánů** u heterostylických květů huseničku na hybridizační potenciál pylu. Budeme zkoumat, zda existují funkční rozdíly mezi pyly z prašníků nesených dlouhými a krátkými nitkami. Budeme také studovat vliv struktury vodícího pletiva na pylovou kompetici u mutantů s narušenou ve strukturou vodícího pletiva (např. *ntt* (Crawford et al. 2007) či *hbb* (Crawford a Yanofski 2011)) ve srovnání s rostlinami divokého typu.

Ačkoli heterostylické květy existují u řady rostlinných druhů, není dosud jasné, zda existují i funkční rozdíly mezi pylem produkovaným v prašnicích na krátkých a dlouhých nitkách, a to z hlediska úspěšnosti oplození. Opět použijeme dva různé markery pylových láček, GFP a RFP (oba na pozadí Columbia). Zralý pyl z obou typů prašníků bude odebrán ze květů stejného stáří a vývojové fáze a kompetiční test bude prováděn na květech divokého typu. Kontroly budou zahrnovat kompetiční testy mezi pyly značenými GFP a RFP z dlouhých prašníků a analogicky, z krátkých prašníků. Pro zjištění, zda struktura vodícího pletiva ovlivňuje různým způsobem růst pylových láček různých ekotypů provedeme kompetiční testy mezi pyly ekotypů Ler-0 a Col-0 na čnělkách mutantů s narušenou ve strukturou vodícího pletiva (např. *ntt* (Crawford et al., 2007) a *hbb* (Crawford a Yanofsky 2011)) a porovnáme je s divokým typem. Za standardních podmínek pyl Col-0 ve směsi s pylem Ler-0 oplodní větší část vajíček a zplodí tak většinu semen (Swanson et al 2016, viz níže), bude zajímavé pozorovat, zda bude stejný poměr zachován i u mutantů.

1.3. Konečně ověříme, **zda je pyl ekotypu Columbia vždy úspěšnější** při opylení blizen jiných ekotypů také v přímé kompetici Col-0/Ler-0 a v dalších kombinacích s ekotypy, jež se od ekotypu Columbia mírně liší na úrovni **velikosti genomu**. Zde budeme posuzovat i **vliv věku rodičovských rostlin**.

Je známo, že po opylení mateřských rostlin ekotypu Col-0 směsí pylu Ler-0:Col-0 (1:1) náleží většina semen ekotypu Col-0 (Swanson et al 2016). Jiné ekotypy však dosud testovány nebyly. Proto použijeme i další kombinace ekotypů mateřských rostlin, nejen ekotyp Ler-0, ale i Kolyvan (Kly-1), Espoo (Es-0) či Wassilewskija (Ws-0). Více mateřských ekotypů použijeme proto, že známo, že nejen pyl s vyššími hladinami ploidie plodí více semen, ale i malé rozdíly ve velikosti genomu mohou rozhodovat o reprodukčním úspěchu. Abychom ověřili, možný vliv malých rozdílů ve velikosti genomu pylu, použijeme výše uvedené ekotypy se známou velikostí genomu (pg) diploidních rostlin. Z nich má Col-0 nejmenší genom (0,403) a Kly-1 má nejvyšší (0,472). Mezi nimi leží ekotypy Es-0 (0,4390) a Ws-0 (0,441) (Schmuths et al., 2004). Za prvé, pylový kompetiční test bude zahrnovat směs pylu Col-0:Kly-1 (1:1) na bliznách rostlin ekotypů Col-0 a Kly-1. Stejná kombinace pylu bude testována na dalších dvou ekotypech Es-0 a Ws-0. Pomocí genotypizace SNP následně zjistíme, který ekotyp je při oplození úspěšnější a zda velikost genomu skutečně hraje podstatnou roli.

Věk rodičovských rostlin má při reprodukci huseníčku velký vliv na rychlost somatických mutací (Singh et al 2015). Proto budeme zjišťovat, zda se pyl produkovaný rodiči různého věku liší se ve své konkurenceschopnosti a reprodukční zdatnosti. Použijeme pyl sklizený z rostlin 38, 43 a 53 dnů po výsevu semen, a to tří linií nesoucích odlišné genetické markery pylových láček na pozadí Col-0. Následné kompetiční testy budou prováděny na bliznách květů divokého. Kontroly budou opět zahrnovat pylové kompetiční testy všech tří linií, ale stejného rodičovského věku.

Tyto tři dílčí cíle také odpovídají jednotlivým výsledkům etapy.

3.3.4 Termíny řešení etapy

- Zahájení řešení etapy: **01/2020**
- Ukončení řešení etapy: **07/2020**

3.3.5 Cíle etapy, výsledky etapy, jejich název a popis (min. ½ A4)

Cílem této první, převážně popisné etapy bude porovnat hybridizační potenciál různých kombinací ekotypů huseníčku a jejich hybridů ve vztahu k dalším individuálně posuzovaným faktorům (viz výše). V této etapě budeme sledovat kombinovaný vliv sporofytických a gametofytických faktorů.

V001 - Popsání vlivu směru křížení na úspěšnost hybridizace u huseníčku

Prvním výsledkem projektu bude popsání a porovnání reprodukční zdatnosti pylových láček produkovaných v inbredních a hybridních liniích a popsání vlivu hybridizace různých ekotypů na úspěšnost hybridizace.

V002 - Popsání významu morfologie květních orgánů pro přednostní oplození

Popíšeme vliv morfologických vlastností květů konkrétně délky tyčinek heterostylických květů nesoucích prašníky (krátké a dlouhé tyčinky) a struktury vodícího pletiva, na růst pylových láček a úspěšnost hybridizace.

V003 - Zjištění vlivu rodičovských genotypů na oplození a produkci semen

Konečně zjistíme, jaký význam pro úspěšnost vnitrodruhové hybridizace má genotyp rodičovských jedinců, velikost genomu vybraných ekotypů a věk rodičovských rostlin v době zrání pylu.

Získané výsledky budou prezentovány na mezinárodních vědeckých konferencích a součástí článku v mezinárodním impaktovaném časopise či formou kapitoly v monografii týkající se tématu projektu. Z tohoto důvodu uvádíme konzervativní odhad J_{rec} a nikoli J_{imp} , byť je tento výsledek pravděpodobný. S ohledem na kolaborativní povahu projektu předpokládáme spoluautorství článku s indickými spolupracovníky.

3.3.6 Formy výsledků podle struktury databáze RIV v etapě řešení E001 (*identifikace výsledků s přihlédnutím ke kritériím splnění cílů programu INTER-EXCELLENCE – kap. 9 – znění textu programu*)

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
J_{rec}	1

Etapa řešení E002

3.3.1 Identifikační číslo etapy

E002

3.3.2 Název etapy

Vliv hybridizace na přednostní oplození za změněných podmínek prostředí a v semi-*in vivo* uspořádání

3.3.3 Popis etapy

Druhá etapa bude věnována studiu hybridizace ve vztahu k podmínkám prostředí a detailnímu zkoumání vlivu gametofytických naváděcích signálů na úspěšnost vnitrodruhové hybridizace huseníčku. Vybrané kombinace ekotypů a jejich hybridů (E001) budou analyzovány semi-*in vivo* za účelem zjištění selektivní přednostní navigace pylových láček před oplozením jednotlivých vajíček. Tento přístup umožní oddělit vliv gametofytických naváděcích signálů od signálů sporofytických napříč různými ekotypy a jejich hybridy.

2.1. V první části rozšíříme záběr etapy E001 i na vlivy prostředí ovlivňující reprodukční fitness rostlin. Konkrétně budeme hodnotit vliv abiotického stresu na opylení a hybridizaci. Porovnáme reprodukční zdatnost pylu získaného z rostlin, na něž bude v době zrání pylu krátce působeno vysokými a nízkými teplotami. Pro zjištění vlivu změněných, ale krátkých teplotních změn na růst pylovou kompetici budou použity rostliny vystavené působení vysokých (32°C) a nízkých (12°C) růstových teplot po dobu jedné hodiny. Pak budou rostliny přemístěny zpět do standardních 22°C, kde bude po dvou dnech sklizen pyl. Tento postup byl aplikován pro studium vlivu teplotního stresu na meiotickou rekombinaci (Saini et al 2017) Použijeme dvě různé linie exprimující různé genetické markery pylových láček, GFP a RFP. Popsaný experiment nám pomůže pochopit, zda vliv změněné teploty, v případě, že dojde ke krátkému působení stresu, přetrvává až do opylování.

2.2. Pro SIV naváděcí test (angl. **SIV ovule targeting assay**) pylových láček budou pestíky ručně opylovány in planta vybranými kombinacemi pylu různých genotypů. Po 3 až 4 hodinách růstu budou pestíky odříznuty nad semeníky a umístěny na agarovou plotnu obsahující půlkruh izolovaných vajíček stejného genotypu jako pestík (Hafidh et al. 2016b). Pylové láčky jednotlivých genotypů budou opět označeny pomocí genetických markerů GFP a RFP (nebo GUS) nebo diferenčním barvivem (Minnaar a Anderson 2019), což umožní identifikaci preferenčního navádění pylových láček různých genotypů k vajíčkům.

2.3. Tříložkový SIV fertilizační test (angl. **3-component SIV fertilization assay**) představuje modifikovanou variantu SIV naváděcího testu (dílejší cíl 2.2., viz výše). S předchozím uspořádáním sdílí SIV růst pylových láček a jejich cílení k izolovaným vajíčkům. V tomto případě však pylové láčky rostou v miniaturizované růstové komoře směrem k jedné ze dvou mikrokomůrek spojených rozvětveným mikrokanálem, což umožňuje, aby každá pylová láčka rostla pouze k jedné mikrokomůrce obsahující vajíčka různých genotypů. V rámci tříložkového SIV fertilizačního testu budou pestíky (složka 2) opylené kombinací pylu porovnávaných genotypů (složka 1) a přenesené do růstové komory umožňující růst pylové láčky pouze směrem k jedné ze dvou mikrokomůrek obsahujících izolovaná vajíčka (složka 3). Tento systém je vysoce flexibilní, neboť má tři stupně volnosti – pestíky, pyl a vajíčka. Flexibilita tohoto uspořádání navíc umožňuje paralelně analyzovat četné kombinace genotypů a následně je podrobit pozorování pomocí fluorescenční mikroskopie.

2.4. Pylové láčky přispívají ke komunikaci se samičími pletivy svými sekretovanými proteiny (Hafidh et al. 2016b). Předpokládáme, že samoopylení a hybridizace s pestíkem jiného genotypu indukují v rostoucích pylových láčkách částečně rozdílné spektrum sekretovaných proteinů. Proto budou izolovány proteiny sekretované z pylových láček rostoucích SIV pestíky různých genotypů. Pestíky emaskulovaných květů budou ručně opylovány s pylem konkrétního genotypu. Po 3 až 4 hodinách růstu budou pestíky odříznuty nad semeníky a umístěny na plovoucí podložku ve skleněné nádobě (Hafidh et al. 2016b), kde budou SIV kultivovány a následně budou z kultivačního média extrahovány proteiny sekretované pylovými láčkami pro analýzu SIV PT sekretomů. Sekretom bude identifikován proteomickou pomocí LC-MS/MS.

3.3.4 Termíny řešení etapy

- Zahájení řešení etapy: **08/2020**
- Ukončení řešení etapy: **06/2021**

3.3.5 Cíle etapy, výsledky etapy, jejich název a popis

Cílem druhé etapy bude popsat vliv teplotního stresu na účinnost hybridizace a vliv hybridizace na přednostní oplození v *semi-in vivo* uspořádání. Kombinace ekotypů huseníčku a jejich hybridů vybrané na základě výsledků předchozí etapy (E001) budou studovány SIV, konkrétně selektivní či přednostní navigace pylových láček k různým kombinacím vajíček k jejich následnému oplození. Tento přístup pomůže ozřejmit vliv gametofytických naváděcích signálů mezi různými ekotypy a jejich hybridy.

V004 - Popsání hybridizačních preferencí při a po působení abiotických stresů

V návaznosti na výsledky etapy E001 zjistíme, jakou roli v hybridizaci huseníčku hraje krátkodobé působení abiotického stresu, konkrétně vysokých a nízkých teplot v době dozrávání pylových zrn.

V005 - Zjištění významu gametofytického vedení pylových láček ve vztahu k hybridizaci v *semi-in vivo* systému

V této fázi budeme sledovat vliv gametofytických naváděcích faktorů na vedení pylových láček v inbredních rostlinách a po hybridizaci. Popíšeme reprodukční zdatnost a hybridizační potenciál pylových láček ve zjednodušeném *semi-in vivo* systému.

V006 - Detailní posouzení růstových a naváděcích preferencí pylových láček po hybridizaci pomocí tříslložkového semi-*in vivo* systému

U různých kombinací genotypů obou pohlavních partnerů odděleně zjistíme přednostní navádění pylových láček k vajíčkům v uzavřeném systému doplněném o třetí složku, interakci s reprodukčními sporofytickými pletivy (blizna a pestík) rostliny nesoucí samičí pohlavní orgány.

V007 - Identifikace rozdílů v semi-*in vivo* sekretomu pylových láček po samoopylení a po hybridizaci

Je důvodné předpokládat, existují rozdíly v partnerské komunikaci pylových láček rozdílně rostoucích v kombinaci s různými genotypy samičích rostlin. Proto pomocí proteomiky popíšeme SIV sekretomy pylových láček po samoopylení a po hybridizaci (na základě výsledků V005 a V006) a zjistíme rozdíly v jejich proteinovém složení.

Získané výsledky budou součástí článku (či článků) v mezinárodním impaktovaném časopise a také budou prezentovány na mezinárodních vědeckých konferencích. U článku předpokládáme spoluautorství s indickými spolupracovníky.

3.3.6 Formy výsledků podle struktury databáze RIV v etapě řešení E002 (identifikace výsledků s přihlédnutím ke kritériím splnění cílů programu INTER-EXCELLENCE – kap. 9 – znění textu programu)

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
J _{imp}	1-2

Etapa řešení E003

3.3.1 Identifikační číslo etapy

E003

3.3.2 Název etapy

Identifikace genů a proteinů diferenciálně exprimovaných v jednotlivých ekotypech a hybridech v důsledku hybridizace a jejich funkční analýza

3.3.3 Popis etapy

Třetí etapa projektu nám umožní identifikovat a popsat geny zodpovědné za rozdílné chování pylových láček různého původu (různých ekotypů či jejich hybridů), jejich různou reprodukční zdatnost a různý hybridizační potenciál.

3.1. a 3.2. Pylové láčky vybraných genotypů budou kultivovány v SIV uspořádání. Pestíky emaskulovaných květů budou ručně opylovány s pylem konkrétního genotypu. Po 3 až 4 hodinách růstu budou pestíky odříznuty nad semeníky a umístěny na plovoucí podložku ve skleněné nádobě (Hafidh et al. 2016b), kde budou SIV kultivovány a následně budou pylové láčky vyrůstající z pestíků odříznuty a bude z nich izolována RNA a proteiny. Po počáteční kontrole kvality (Agilent Bio-Analyzer pro RNA a 1-D SDS-PAGE pro proteiny) budou provedeny transkriptomické a proteomické analýzy. Transkriptomy budou získány pomocí sekvenování RNA nové generace (RNA-seq) s využitím orientovaných knihoven, což umožní nejen diferenciální identifikaci genové exprese (DEG), ale také vyhodnocení alternativního sestřihu v jednotlivých souborech dat. Pro proteomiku použijeme negelovou techniku LC-MS/MS, data budou následně zpracována a analyzována programy MaxQuant a Perseus.

3.3. Transkriptomická, proteomická a sekretomická data budou následně integrována a budou z nich vybrány kandidátské geny specificky či přednostně exprimované v konkrétních ekotypech, hybridech či

jejich kombinacích (Col-0, Ler-0). Tyto analýzy také umožní odhalit geny regulované nejen na transkripční, ale i post-transkripční úrovni (alternativní sestřih, translační regulace), jakož i sekreci specifických souborů proteinů pylovými láčkami v souvislosti s příslušným genotypem pestíku. Vybrané geny budou funkčně charakterizovány. Budou analyzovány inzerční T-DNA mutanty deficientní v příslušných genech, konkrétně budou sledovány reprodukční zdatnost a hybridizační potenciál mutantních pylových láček ve srovnání s láčkami divokého typu hybridizačních experimentech. Podobně bude ve stejných situacích sledována zdatnost pylových láček s indukovanou nadexpresí příslušných sledovaných proteinů řízenou promotorem pLAT52. Konečně bude studována buněčná lokalizace a mechanismus sekrece studovaných proteinů, eventuálně jejich transkripční a post-transkripční regulace.

3.3.4 Termíny řešení etapy

- Zahájení řešení etapy: **07/2021**
- Ukončení řešení etapy: **12/2022**

3.3.5 Cíle etapy, výsledky etapy, jejich název a popis

Cílem etapy E003 bude **identifikace genů a proteinů odlišně exprimovaných v jednotlivých ekotypech a jejich hybridech** po opylování semi-*in vivo*. Výsledky transkriptomických, proteomických (E003) a sekretomických (E002) analýz budou integrovány a na jejich základě budou vybrány kandidátské geny pro detailní funkční analýzu, během níž bude zjišťována jejich důležitost pro reprodukční a hybridizační zdatnost.

V008 - Popsání semi-*in vivo* transkriptomu pylových láček ovlivněného hybridizací

Analogicky k výsledky V007 identifikujeme SIV transkriptom pylových láček po samoopylení a po hybridizaci a popíšeme diferenciallyně exprimované geny (DEG).

V009 - Identifikace semi-*in vivo* proteomu pylových láček ve vztahu k hybridizaci

Analogicky k výsledkům V007 a V008 identifikujeme i SIV proteom pylových láček po samoopylení a po hybridizaci a popíšeme diferenciallyně exprimované proteiny (DEP).

V010 - Integrace -omických dat a popsání úlohy klíčových diferenciallyně exprimovaných genů mezi ekotypy v důsledku hybridizace

Posledním výsledkem projektu budou integrovaná transkriptomická, proteomická a sekretomická data, na jejichž základě vybereme a funkčně charakterizujeme omezený počet kandidátských genů. U nich mimo jiné zjistíme a ověříme jejich důležitost pro reprodukční a hybridizační zdatnost pylu.

Získané výsledky budou součástí dvou článků v mezinárodních impaktovaných časopisech a také budou prezentovány na mezinárodních vědeckých konferencích. Předpokládáme spoluautorství s indickými spolupracovníky přinejmenším u jednoho z článků.

3.3.6 Formy výsledku podle struktury databáze RIV v etapě řešení E003 (*identifikace výsledků s přihlédnutím ke kritériím splnění cílů programu INTER-EXCELLENCE – kap. 9 – znění textu programu*)

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
J_{imp}	2

--	--

Etapa řešení E004

...

Etapa řešení E005

...

4 Strategie a metodika řešení projektu

Detailní popis etap projektu v předchozí sekci představil také celkovou strategii řešení projektu nutnou pro dosažení jeho cílů a nastínil použití příslušných metodických postupů v širším kontextu, a to jak postupů klasických, rutinně využívaných, tak přístupů inovativních. V této kapitole pak budou popsány další relevantní plánované techniky zejména metody funkční charakterizace.

K realizaci projektu budou využity následující metody, z nichž naprostá většina je v naší laboratoři rutinně používána, některé u nás byly dokonce zavedeny:

Práce s rostlinným materiálem - huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

V naší laboratoři jsou k dispozici kultivační místnosti a kultivační boxy (Conviron) umožňující pěstování huseníčku rolního za kontrolovaných podmínek. Budou použity ekotypy Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler-0), Kolyvan (Kly-1), Espoo (Es-0) a Wassilewskija (Ws-0). T-DNA inzerční linie a jejich kříženci jsou plánovány na pozadí ekotypu Col-0. Transformované rostliny v řádu (menších) desítek kusů budou do půdního substrátu přesazeny i po selekci pomocí antibiotik na agarovém živném médiu, popř. rostliny selektované pod fluorescenčním mikroskopem na přítomnost červeného fluorescenčního signálu. Rostliny pěstujeme na JIFFY tabletách v režimu 16 hodin světla / 8 hodin tmy. Genotyp rostlin náležících k jednotlivým T-DNA inzerčním liniím je určován konvenčním způsobem pomocí PCR s dvěma páry primerů – jedním párem detekujícím insert a druhou dvojicí detekující divokou alelu. T-DNA inzerční linie huseníčku jsou v naší laboratoři dlouhodobě rutinně používány.

Kromě pěstování rostlin na klasickém půdním substrátu budou rostliny pěstovány také na živných médiích *in vitro*, což bude potřebné při hledání transformovaných rostlin selekcí antibiotiky na agarovém substrátu. Několikadenní rostliny v řádech desítek kusů budou následně převedeny do podmínek *ex vitro* na konvenční půdní substrát a dále dopěstovány do dospělosti (viz odstavec výše). K pěstování rostlin *in vitro* jsou k dispozici flowboxy a kultivační místnosti a opět se můžeme opřít o dlouholeté zkušenosti našeho týmu s tímto typem pěstování pokusných rostlin. Z pokusných rostlin bude izolován pyl pro další analýzy (viz Dupl'áková et al. 2016).

Fenotypová analýza a kompetiční testy *in vivo* a *semi-in vivo*

Ověřené stabilní mutantní a overexpresní linie budou funkčně analyzovány pomocí sady nástrojů a metodických postupů rutinně používaných v naší laboratoři. Budeme a) charakterizovat fenotypové projevy a sledovat případné defekty vývoje pylu pod světelným a fluorescenčním mikroskopem (Reňák et al. 2012), b) sledovat růst pylové láčky *in vitro* a *in vivo* (kompetiční testy, Reňák et al. 2014), c) testovat vedení pylových láček exprimujících genetické markery (GFP/RFP) či značené diferenční barvivem (Minnaar a Anderson 2019) kultivovaných *semi-in vivo* k vajíčkům divokého typu (Hafidh et al. 2014; 2016b), d) sledovat schopnost pylových láček oplodnit cílová vajíčka *in vivo* modrý pomocí testu „blue-dot assay“ (po křížení homozygotní linie s markerovou linií exprimující v pylových láčkách β -glukuronidázu kódovanou konstruktem proLAT52:GUS; Hafidh et al., 2016), e) kvantifikovat založení semen v šešulích vzniklých po opylení rostlin divokého typu mutantním pylem (Hafidh et al., 2016b) a f) počítat účinnost přenosu mutantních alel přes samčí a samičí gametofyt po samosprašení heterozygotních rostlin a po zpětném křížení oběma směry (Reňák et al. 2012).

Kvantitativní RT-PCR

Expresní profily kandidátských genů budou ověřovány pomocí kvantitativní PCR. Nejprve bude vyzolována celková RNA a mRNA bude přepsána reverzní transkriptázou (Promega) do cDNA. Ta bude využita pro kvantitativní RT-PCR. Práce s RNA je v naší laboratoři zavedená a máme k dispozici příslušné vybavení včetně cyklerů k provedení kvantitativní RT-PCR (Roche Diagnostics).

Klonování

Pro studium fenotypové komplementace, promotorové aktivity, subcelulární lokalizace proteinů a jejich kolokalizace bude vytvořena řada vektorů. Jako templát bude užita cDNA nebo genomová DNA a potřebné fragmenty budou namnoženy pomocí PCR za užití termostabilní DNA polymerázy s proofreadingovou aktivitou (Phusion Taq, Thermo Scientific). Získaná sekvence bude technologií Gateway vložena do příslušných vektorů. Příslušné vektory pro promotorovou analýzu, buněčnou lokalizaci, komplementační analýzu a nadexpresi budou izolovány a použity k transformaci květů huseníčku (angl. *floral dip*; Clough and Bent 1998). V některých případech (klonování složitějších kombinací fragmentů zejména pro deleční a mutační analýzy) je klonování příliš rigidní neumožňující

jednoduché modifikace klonovací strategie. V těchto případech použijeme klonovací postup GoldenBraid (Sarrion-Perdigones et al. 2011) či komerčně využívanou metodu InFusion (TaKaRa/Clontech). Oba postupy jsou v laboratoři také zavedeny; máme k dispozici rozsáhlou knihovnu jednotlivých fragmentů a domestikovaných klonů pro GoldenBraid.

Promotorová aktivita a lokalizace proteinů

Vložením konstruktů nesoucím sekvenci promotoru fúzovanou s GFP či YFP nebo genem pro glukuronidázu bude odhaleno, ve kterých orgánech je promotor aktivní. Podobně bude lokalizace proteinů na nitrobuňkové úrovni determinována za pomoci konstruktů obsahujících promotorovou sekvenci genu společně s kódující sekvencí proteinu. Budou získány dvě verze konstruktů, jedna se sekvencí GFP na 5' konci a druhá na 3' konci kódující sekvence, aby byly vyloučeny případné nežádoucí vlivy GFP sekvence v maskování lokalizačního signálu. Lokalizace proteinu bude pozorována opět v několika nezávislých liniích pod epifluorescenčním a následně pod konfokálním fluorescenčním mikroskopem (Zeiss). Fotografie z konfokálního mikroskopu budou podrobeny obrazové analýze.

Transkriptomická, proteomická a sekretomická analýza

Pylové láčky vybraných genotypů budou kultivovány v SIV uspořádání. Pestíky emaskulovaných květů budou ručně opylovány s pylem konkrétního genotypu. Po 3 až 4 hodinách růstu budou pestíky odříznuty nad semeníky a umístěny na plovoucí podložku ve skleněné nádobě (Hafidh et al. 2016b), kde budou SIV kultivovány a následně budou pylové láčky vyrůstající z pestíků odříznuty a bude z nich izolována RNA a proteiny. Pro sekretomickou analýzu budou pylové láčky taktéž SIV kultivovány a následně budou z kultivačního média extrahovány proteiny sekretované pylovými láčkami. Po počáteční kontrole kvality (Agilent Bio-Analyzer pro RNA a 1-D SDS-PAGE pro proteiny) budou provedeny transkriptomické a proteomické analýzy. Transkriptomy budou získány pomocí sekvenování RNA nové generace (RNA-seq, Macrogen, Soul, Korejská republika) s využitím orientovaných knihoven, což umožní nejen diferenciální identifikaci genové exprese (DEG), ale také vyhodnocení alternativního sestřihu v jednotlivých souborech dat. Pro proteomiku (proteom a sekretom) použijeme negelovou techniku LC-MS/MS (Orbitrap – spolupracující laboratoř doc. Z. Zdráhala – CEITEC-MU, Brno, core facility), data budou následně zpracována a analyzována programy MaxQuant a Perseus.

Z uvedeného je patrné, že většina experimentálního materiálu používaného pro experimenty v ČR vznikne v laboratoři navrhovatele, nicméně je zjevné a pro úspěch projektu i klíčové, že jak zkušenosti, tak experimentální materiál, alespoň jeho část, budou oběma partnery sdíleny, mimo jiné během cest na spolupracující pracoviště. Během plánovaných pobytů doktorandů v Indii (viz zdůvodnění finančních prostředků) budou prováděny i konkrétní experimenty, zejména v oblasti specifických křížení a kompetičních testů. K výměnám experimentálního materiálu s indickým partnerem bude docházet během celého trvání projektu, a to vždy v souladu s platnou legislativou obou zemí.

Role českých a indických partnerů, jejich společná odpovědnost:

Předložený návrh projektu je plně závislý na úzké spolupráci obou týmů v Indii a České republice a jednotlivé úkoly budou alespoň na počátku rozděleny mezi oba partnery podle jejich zkušeností a materiálního vybavení. Jako jeden z výstupů projektu pak očekáváme, techniky zvládnuté ve spolupracující laboratoři budou implementovány v obou týmech, aby se zvýšila flexibilita společného projektového týmu.

Cíl 1: Pylová kompetice *in vivo* mezi ekotypy *Arabidopsis*. Přímá i reciproční křížení budou prováděna převážně v indické laboratoři a *in vivo* kompetitivní testy budou následně prováděny *in planta* v obou laboratořích.

Cíl 2: Vliv hybridizace na přednostní oplození *semi-in vivo*. SIV naváděcí test (angl. SIV ovule targeting assay) i tříložkový SIV fertilizační test (angl. 3-component SIV fertilization assay) budou prováděny především v české laboratoři, která má s touto prací dlouhodobé zkušenosti. Metodika bude opět částečně implementována v indické laboratoři, kde budou prováděny komplementární analýzy *in planta*.

Cíl 3: Identifikace genů a proteinů odlišně exprimovaných v jednotlivých ekotypech a jejich hybridech po opylení SIV. SIV kultivační a extrakční části studie budou prováděny společně v laboratořích českého a indického řešitele, a to i jako výsledek implementace SIV metodiky v indické laboratoři (Cíl 2). „Omická“ část studie bude realizována v české laboratoři, která má v tomto směru neoddiskutovatelné zkušenosti a y řadu použitých technik patřila mezi průkopníky jejich využití v oblasti pohlavního rozmnožování rostlin. Konečně detailní funkční

charakterizace vybraných kandidátských genů bude koordinovaně prováděna v obou laboratořích, které jsou v dané oblasti plně kompetentní.

Metodické postupy, výsledky a údaje získané ve všech třech cílech budou koordinovaně implementovány v obou laboratořích a společně publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech.

Časový plán

Časový rozpis uvádí plán práce na jednotlivých výsledcích, nikoli jen datum jejich dosažení; proto mohou být jednotlivé intervaly mírně delší, nežli v rozpisu etap a výsledků (kapitola 3.3).

Etapa/výsledek	2020	2021	2022
E001 Pylová kompetice <i>in vivo</i> mezi ekotypy huseníčku			
V001 Popsání vlivu směru křížení na úspěšnost hybridizace u huseníčku	XX		
V002 Popsání významu morfologie květních orgánů pro přednostní oplození	XX		
V003 Zjištění vlivu rodičovských genotypů na oplození a produkci semen	XX		
E002 Vliv hybridizace na přednostní oplození za změněných podmínek prostředí a v <i>semi-in vivo</i> uspořádání			
V004 Popsání hybridizačních preferencí při a po působení abiotických stresů	XX	X	
V005 Zjištění významu gametofytického vedení pylových láček ve vztahu k hybridizaci v <i>semi-in vivo</i> systému	XX	XX	
V006 Detailní posouzení růstových a naváděcích preferencí pylových láček po hybridizaci pomocí tříložkového <i>semi-in vivo</i> systému		XX	
V007 Identifikace rozdílů v <i>semi-in vivo</i> sekretomu pylových láček po samoopylení a po hybridizaci		XX	
E003 Identifikace genů a proteinů diferencially exprimovaných v jednotlivých ekotypech a hybridech v důsledku hybridizace a jejich funkční analýza			
V008 Popsání <i>semi-in vivo</i> transkriptomu pylových láček ovlivněného hybridizací		XX	X
V009 Identifikace <i>semi-in vivo</i> proteomu pylových láček ve vztahu k hybridizaci		XX	XX
V010 Integrace -omických dat a popsání úlohy klíčových diferencially exprimovaných genů mezi ekotypy v důsledku hybridizace			XXXX

Použitá literatura

- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735-743
- Crawford BC, Ditta G, Yanofsky MF. (2007) The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Bi-ol.* 17(13):1101-8
- Crawford BC, Yanofsky MF. (2011) HALF FILLED promotes reproductive tract development and fertilization efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 138(14):2999-3009

- Hafidh S, Potesil D, Fila J, Capkova V, Zdrahal Z, Honys D (2016b) Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization. *Genome Biol* 17: 81
- Huck N, Moore JM, Federer M, Grossniklaus U. (2003) The Arabidopsis mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development*. 130(10):2149-59.
- Minaar C and Anderson, B. (2019) Using quantum dots as pollen labels to track the fates of individual pollen grains. *Methods Ecol Evol* 10(5): 604-614
- Reňák D, Gibalová A, Solcová K, Honys D (2014) A new link between stress response and nucleolar function during pollen development in Arabidopsis mediated by AtREN1 protein. *Plant Cell and Environment* 37: 670-683
- Saini R, Singh AK, Dhanapal S, Saeed TH, Hyde GJ, Baskar R. (2017) Brief temperature stress during reproductive stages alters meiotic recombination and somatic mutation rates in the progeny of Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 17 (1):103
- Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juárez P, Fernández-del-Carmen A, Granell A, Orzaez D (2011) GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLoS ONE* 6: e21622
- Schmuthus, H., Meister, A., Horres, R. and Bachmann, K (2004) Genome Size Variation among Accessions of Arabidopsis thaliana. *Ann Bot* 93(3): 317–321
- Singh AK, Bashir T, Sailer C, Gurumoorthy V, Ramakrishnan AM, Dhanapal S, Grossniklaus U, Baskar. R. (2015) Parental Age Affects Somatic Mutation Rates in the Progeny of Flowering Plants. *Plant Physiology*. 168(1):247-57
- Swanson RJ, Hammond AT, Carlson AL, Gong H, Donovan TK (2016) Pollen performance traits reveal prezygotic nonrandom mating and interference competition in Arabidopsis thaliana. *Am J Bot.* 103(3):498-513
- Twell D, Yamaguchi J, McCormick S (1990) Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109: 705-713

4.1 Analýza rizik ohrožujících dosažení výsledků projektu

Všechny metodiky potřebné k realizaci projektu jsou na našem pracovišti (buď přímo v naší laboratoři nebo na Ústavu experimentální botaniky AVČR, v.v.i.) rutinně užívány a máme s nimi bohaté zkušenosti. Podobně zabezpečený je projekt i z hlediska personálního obsazení.

Rizikem projektu může být narušení synchronizace realizace cílů projektu oběma partnery. Toto riziko je však malé, neboť oba řešitelské týmy jsou ve svých oblastech zkušené a v určitých oblastech i zastupitelné. Koordinace projektu navíc umožňuje dostatečnou míru flexibility, aby bylo možné takovému nebezpečí včas předejít.

Dalším rizikem mohou být objektivní potíže při plnění některého z dílčích cílů. I toto riziko je minimální, neboť je silně nepravděpodobné, že by se nedařilo více analýz v řadě, přičemž i při potížích se splněním jednoho dílčího cíle bude stále možné publikovat ostatní výsledky. Navíc existuje dostatečné množství předběžných výsledků, které vedly k identifikaci charakterizovaného regulačního komplexu i k odhalení defektů v obou gametofytech, jež se stanou součástí první publikace. Dále rizika nezdaru jednotlivých metodik snižují bohaté

zkušenosti obou spolupracujících pracovišť, které mohou napomoci vyřešit případné obtíže s experimenty v průběhu celého řešení projektu a nalézt alternativní experimentální přístup.

4.2 Navržená opatření k maximalizaci přínosu projektu (popište efektivitu

navrhovaných alokovaných zdrojů a kapacit ve vztahu k předpokládaným dosaženým výsledkům)

Výsledkem navrhovaného projektu budou nové poznatky v oblasti hybridizace a reprodukční zdatnosti huseníčku a nová data týkající se mechanismu mezibuněčné komunikace a signalizace po, opylení v různých fázích prefertilizačního procesu, a to v závislosti na genotypech rodičovských rostlin. Vzhledem k tomu, že se jedná o základní výzkum, budou přínosem tyto nové informace, které bude potřeba zveřejnit a šířit ve vědecké komunitě. K tomu poslouží publikace v mezinárodních impaktovaných časopisech, u níž bude potřeba zaplatit licenci k volnému šíření článku (*open access*), aby byl on-line dostupný vědecké komunitě, pro níž budou výsledky primárně určeny. Také budou výsledky prezentovány na mezinárodních vědeckých konferencích, aby tak byly přiblíženy výzkumníkům, kteří se danou problematikou zabývají.

Dalším přínosem projektu bude zvyšování kvalifikace mladých vědeckých pracovníků a výchova studentů jak magisterského tak postgraduálního studijního programu Univerzity Karlovy i Indian Institute of Technology - Madras, součástí jejichž kvalifikační prací se stanou výsledky získané v rámci předkládaného projektu. Kromě toho využijeme získaná data při výuce studentů na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Všechny zmiňované aktivity se výraznou měrou budou podílet na maximalizaci přínosů projektu.

5 Projektový a řešitelský tým

5.1 Představení týmu

5.1.1 Popis týmu

Laboratoř biologie pylu (LBP) Ústavu experimentální botaniky, AVČR, v.v.i. v Praze 6 - Lysolajích (ÚEB) se zabývá studiem regulačních mechanismů uplatňujících se při kontrole genové exprese, a to na třech úrovních: 1) organizace a stability genomu, 2) transkripční a translační regulace vývoje a funkce samčího gametofytu a 3) komunikace pylové láčky se samičími reprodukčními orgány před oplozením. (1) První úroveň regulace (Angelis et al. 2000) je představována studiem, procesů vedoucích k indukci mutací, reparaci a rekombinaci DNA vlivem působení chemických a fyzikálních genotoxinů. (2) Druhou oblastí výzkumu je transkripční a translační regulace během vývoje samčího gametofytu. Předmětem našeho zájmu bylo vytvoření databáze transkriptomických dat huseníčku (Dupl'áková et al. 2007) a následně i databáze transkripčních faktorů účastnících se vývoje samčího gametofytu (Reňák et al. 2012), z nichž vybrané geny byly a jsou následně detailně funkčně analyzovány, příkladně *AtbZIP34* (Gibalová et al., 2009), *AtbZIP18* (Gibalová et al. 2017) či *HSFA5-like* (Reňák et al. 2014). Kromě toho se naše laboratoř významným podílem podílela na popsání a analýze vývojové dynamiky transkriptomu samčího gametofytu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Honys and Twell 2003, 2004) a tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) (Hafidh et al. 2012a; Hafidh et al. 2012b). Na translační úrovni se zabýváme zejména studiem fenoménu skladování mRNA v samčím gametofytu, kdy jsme jako první popsali velké dlouhodobě skladované částice (EDTA/puromycine-resistant particles; Honys et al. 2000; Honys et al. 2009) a nově jsme také popsali a detailně transkriptomicky a proteomicky analyzovali translačně neaktivní monosomy jako formu skladování mRNA v pylu a rostoucích pylových láčkách (Hafidh et al. 2018). V této oblasti jsme se navíc věnovali pionýrské práci na charakterizaci dynamiky fosforylace proteinů na počátku progamické fáze vývoje samčího gametofytu – během aktivace pylového zrna, jež přinesla prioritní výsledky (Fila et al. 2012; Fila et al. 2016). (3) Komunikace pylové láčky s okolím představuje nejnovější a nejrychleji se rozvíjející směr našeho zájmu. Zde jsme jednak vypracovali detailní protokol izolace nezralých vývojových stádií samčího gametofytu (Dupl'áková et al. 2016) a semi-*in vivo* kultivace pylových láček (Hafidh et al. 2014, 2016) a jednak se podíleli na studiu významu intracelulární homeostáze auxinu pro růst pylových láček (Ding et al. 2012). Zcela recentně jsme popsali proteiny, jež jsou sekretované z pylové láčky pod vlivem kontaktu se samičími pletivy pestíku, jako první jsme popsali nekonvenční mechanismus jejich sekrece a některé z těchto proteinů jsme částečně funkčně charakterizovali (Hafidh et al. 2016b).

Použitá literatura

- Angelis KJ, McGuffie M, Menke M, Schubert I (2000) Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 36: 146-150
- Ding Z, Wang B, Moreno I, Duplakova N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pencik A, Chen X, Tejos R, Skupa P, Pollmann S, Mravec J, Petrasek J, Zazimalova E, **Honys D**, Rolcik J, Murphy A, Orellana A, Geisler M, Friml J (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 3
- Dupl'áková N, Reňák D, Hovanec P, Honysová B, Twell D, **Honys D** (2007) *Arabidopsis* Gene Family Profiler (aGFP) - user-oriented transcriptomic database with easy-to-use graphic interface. *Bmc Plant Biology* 7: 8
- Dupl'áková N, Dobrev PI, Renak D, **Honys D** (2016) Rapid separation of *Arabidopsis* male gametophyte developmental stages using a Percoll gradient. *Nat Protoc* 11 (10):1817-1832.
- Fila J, Matros A, Radau S, Zahedi RP, Capkova V, Mock HP, **Honys D** (2012) Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated in vitro. *Proteomics* 12: 3229-3250
- Fila J, Radau S, Matros A, Hartmann A, Scholz U, Feciková J, Mock HP, Čapková V, Zahedi RP, **Honys D** (2016) Phosphoproteomics profiling of tobacco mature pollen and pollen activated in vitro. *Molecular & Cellular Proteomics* 15: 1338-1350
- Gibalová A, Reňák D, Mateczuk K, Dupl'áková N, Cháb D, Twell D, **Honys D** (2009) *AtbZIP34* is required for *Arabidopsis* pollen wall patterning and the control of several metabolic pathways in developing pollen. *Plant Molecular Biology* 70: 581-601

- Gibalova A, Steinbachova L, Hafidh S, Blahova V, Gadiou Z, Michailidis C, Muller K, Pleskot R, Duplakova N, **Honys D** (2017) Characterization of pollen-expressed bZIP protein interactions and the role of ATbZIP18 in the male gametophyte. *Plant Reprod* 30: 1-17
- Hafidh S, Breznenová K, **Honys D** (2012a) De novo post-pollen mitosis II tobacco pollen tube transcriptome. *Plant Signaling and Behavior* 7: 918–921
- Hafidh S, Breznenová K, Růžička P, Feciková J, Čapková V, **Honys D** (2012b) Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in polar cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis. *BMC Plant Biol* 12: 24
- Hafidh S, Potesil D, Fila J, Fecikova J, Capkova V, Zdrahal Z, **Honys D** (2014) In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. *Biochem Soc Trans* 42 (2):388-394.
- Hafidh S, Potěšil D, Fila J, Čapková V, Zdrahal Z, **Honys D** (2016b). Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube-secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization. *Genome Biol.* 17:81.
- Hafidh SS, Potěšil D, Müller K, Fila J, Michailidis C, Herrmannová A, Feciková J, Ischebeck T, Valášek LS, Zdrahal Z, **Honys D** (2018) Dynamics of *Nicotiana tabacum* pollen sequestrone defined by subcellular coupled omics. *Plant Physiology* 178: 258-282
- Honys D**, Combe JP, Twell D, Čapková V (2000) The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sexual Plant Reproduction* 13: 135-144
- Honys D**, Reňák D, Feciková J, Jedelský PL, Nebesářová J, Dobrev P, Čapková V (2009) Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametophyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing, and localization. *Journal of Proteome Research* 8: 2015-2031
- Honys D**, Twell D (2003) Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. *Plant Physiology* 132: 640-652
- Honys D**, Twell D (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome Biology* 5
- Reňák D, Dupl'áková N, **Honys D** (2012) Wide-scale screening of T-DNA lines for transcription factor genes affecting male gametophyte development in Arabidopsis. *Sexual Plant Reproduction* 25: 39-60
- Zaveska Drabkova L, **Honys D** (2017) Evolutionary history of callose synthases in terrestrial plants with emphasis on proteins involved in male gametophyte development. *PLoS One* 12: e0187331

Z výše uvedeného je zřejmé, že navrhovaný projekt představuje přímé pokračování problematiky regulace pohlavního rozmnožování aktivně řešené v Laboratoře biologie pylu, navazuje na její dlouholetý výzkum a spolupráce s laboratoří Prof. Baskara z Indian Institute of Technology - Madras (IIT Madras) představuje v této souvislosti jasný a logický krok rozvíjející ho dalším směrem. Řešení projektu se budou účastnit následující členové laboratoře; jedná se o dva vědecké pracovníky, dva doktorandy a jedné techničky v úvazcích, jež budou odpovídat jejich podílu na řešení projektu.

doc. RNDr. David Honys, Ph.D. (*3.12.1971, Praha, státní příslušnost ČR) – vědecký pracovník, řešitel

1995 - Titul Mgr., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra fyziologie rostlin; magisterská práce „Subcelulární distribuce mRNA v pylu a pylových láčkách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)“

2001 - Titul Ph.D., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra fyziologie rostlin; disertační práce „Translační regulace během vývoje a zrání pylu *Nicotiana tabacum*“

2015 - Habilitační řízení, titul doc., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra experimentální biologie rostlin; habilitační práce „Vývoj a funkce samčího gametofytu; příspěvní transkriptomiky a proteomiky“

od roku 1994 – zaměstnanec ÚEB AVČR, v.v.i., Laboratoř biologie pylu, Praha 6

Said Hafidh, Ph.D. (*22.5.1980, Kismayo, Somálsko, státní příslušnost Spojené Království) – vědecký pracovník

1995 - Titul BSc., University of Leicester, Leicester, United Kingdom. Genetics and Biochemistry

2001 - Titul Ph.D., University of Leicester, Leicester, United Kingdom; disertační práce „Mechanisms of cell cycle control during sperm cell production in the male gametophyte of *Arabidopsis thaliana*“

od roku 2009 – zaměstnanec ÚEB AVČR, v.v.i., Laboratoř biologie pylu, Praha 6

od roku 2015 – zaměstnanec ÚEB AVČR, v.v.i., Laboratoř biologie pylu, Praha 6

Vinod Kumar, M.Sc. (*29.3.1993, Delhi, Indie, státní příslušnost Indie) – postgraduální student

2013 - Titul B.Sc., University of Delhi, Swami Shraddhanad College.

2016 - Titul M.Sc., University of Delhi, Department of Plant Molecular Biology; magisterská práce „Analysis of stress-responsive HD-ZIPs in wheat“

Od 2018 – Postgraduální studium, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra experimentální biologie rostlin.

od roku 2018 – zaměstnanec ÚEB AVČR, v.v.i., Laboratoř biologie pylu, Praha 6

Bc. Božena Klodová (*2.3.1995, Praha, státní příslušnost ČR) – PhD student – Obhajoba diplomové práce a získání titulu Mgr. v září 2019, PhD studentka od října 2019

2017 – Titul Bc., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra experimentální biologie rostlin; bakalářská práce „Význam dlouhých nekódujících RNA v rostlinách“

2019 – obhajoba diplomové práce „Searching for interaction preferences between nascent polypeptide associated complex subunits and revealing genes influenced by knock-down of both beta subunits in *Arabidopsis thaliana* flower buds“, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra experimentální biologie rostlin

od roku 2018 – zaměstnanec ÚEB AVČR, v.v.i., Laboratoř biologie pylu, Praha 6

Ing. Jana Feciková (*22.5.1975, Ostrava, státní příslušnost SR) - technik

1998 – Titul Ing., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Slovensko; diplomová práce „The quality of gluten commensurate with quantity of granulation“

od roku 2001 – zaměstnanec ÚEB AVČR, v.v.i., Laboratoř biologie pylu, Praha 6

5.1.2 Prokázání schopnosti řešit danou problematiku

Navrhovaný projekt navazuje na dlouholeté výzkumné zaměření Laboratoře biologie pylu, tudíž při řešení projektu budou moci být využity poznatky a zkušenosti pracovníky laboratoře nahromaděné. Mnohé z navrhovaných metodik se už v laboratoři rutinně používají, například pěstování rostlin v půdním substrátu i na agarovém médiu *in vitro*, genotypování rostlin pomocí PCR, Gateway a GoldenBraid klonování, kvantitativní RT-PCR, světelná a fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie v kombinaci s pokročilými metodami buněčné biologie samčího a samičího gametofytu.

Po technické stránce je LBP na projekt dobře připravena, v Ústavu experimentální botaniky AVČR, v.v.i. je dostatečná kapacita kulturačních místností a klimakomor pro pěstování pokusných rostlin. Genotypování usnadní automatický pipetovací robot (Eppendorf). Mimo to disponujeme cyklery (Bio-rad, Eppendorf, Biometra) a vybavením pro provádění agarózové a polyakrylamidové gelové elektroforézy nukleových kyselin i bílkovin (Bio-rad, Biometra, Cole Parmer, Hoefer) včetně fotodokumentačního boxu na gely (Syngene). Sterilní práci můžeme provádět v různých digestořích a flow-boxech (Thermo Scientific). Neopomeňme centrifugy různých typů od stolních (Eppendorf) přes větší chlazené centrifugy (Sigma, Eppendorf) po ultracentrifugu (Beckman). Za zmínku stojí taktéž různé typy mikroskopů. V areálu ústavu jsou lokalizovány konvenční epifluorescenční mikroskopy, ale také kvalitní konfokální mikroskopy (Zeiss LSM 5 Duo, Zeiss LSM 880 a Nikon spinning disc mikroskop) a transmisní elektronový mikroskop. Za účelem obarvení několika mikroskopických preparátů

současně může být využit barvicí robot. V neposlední řadě připomeňme biolistický přístroj Gene Gun PDS1000/He (Bio-Rad), který může být využit k nastřelení úseků DNA za účelem transienční transformace.

Odborné kvality laboratoře dokládá celá řada úspěšně vyřešených projektů (také viz výše), jmenujme například odhalení transkriptomů samčích gametofytů huseničku rolního a tabáku virginského a jejich následnou analýzu (Honys and Twell 2003, 2004; Hafidh et al. 2012a; 2012b), charakterizace sekretomy pylových láček tabáku aktivovaných samičími pletivly (Hafidh et al. 2014; 2016) nalezení a popis skladovaných a translačně neaktivních monosomů v samčím gametofytu tabáku (Honys et al. 2000; 2009; Hafidh et al. 2018), analýzu dynamiky fosfoproteomu v krátkém okamžiku aktivace pylových zrn (Fila et al. 2012; 2016), vytvoření a správu databáze transkriptomických dat (Dupřáková et al. 2007), rozsáhlou analýzu transkripčních faktorů ovlivňujících vývoj samčího gametofytu (Reňák et al. 2012) a v neposlední řadě funkční analýzu vybraných transkripčních faktorů AtbZIP34 (Gibalová et al. 2009, 2017; Reňák et al. 2014) i ve vztahu k syntéze buněčné stěny (Záveská-Drábková a Honys 2017) nebo auxinového výtokového přenašeče PIN8 (Ding et al. 2012).

Ze životopisů členů týmu je zřejmé, že se všichni již účastnili podobných projektů a většina z nich má dlouholetou zkušenost s výzkumem v relevantní oblasti i s realizací předpokládaných výstupů, oba vědečtí pracovníci navíc mají bohaté zkušenosti s vedením výzkumných projektů. Složení týmu je navíc vyvážené i stran zkušeností s vedením projektů, plánováním experimentů, plánovanými experimentálními aktivitami stejně jako po věkové a genderové stránce, setkávají se zde zkušenější i mladí vědečtí pracovníci a studenti a studentky několika věkových úrovní.

Doc. David Honys je vedoucím vědeckým pracovníkem ÚEB AVČR, několik let působil ve vedoucím managementu ústavu. Doc. Honys dosud byl řešitelem či koordinátorem 20 domácích a 3 zahraničních projektů, jež byly všechny úspěšně splněny. Mimo své výzkumné práce se aktivně podílí i na výuce studentů na PřF UK a je aktivním členem několika profesních organizací.

Dr. Said Hafidh se přes svůj stále ještě spíše nevysoký věk podílel a podílí na řešení a koordinaci řady projektů naší laboratoře, i jako řešitel, a díky tomu vykazuje velice kvalitní publikační aktivitu. Právě téma komunikace samčích a samičích pletiv patří mezi oblasti, kterými se v poslední době intenzivně zabývá.

Mgr. Vinod Kumar je zaměstnancem ÚEB a od roku 2018 postgraduálním studentem LBP a Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK. Ve své práci se věnuje studiu progamické fáze samčího gametofytu ve spojitosti s oplozením a postfertilizačními procesy. Proto ovládá většinu experimentálních přístupů, jež budou při řešení projektu využity.

Bc. Božena Klodová je zaměstnankyní ÚEB a od roku 2019 bude postgraduální studentkou LBP. Má proto zkušenosti se základními technikami molekulární biologie a práce s rostlinným materiálem, zejména však s bioinformatikou a s -omickými experimenty – transkriptomikou i proteomikou, což také bude souviset s její úlohou při řešení projektu. Projekt proto pro ni navíc bude představovat ideální příležitost seznámit se se špičkovými postupy aplikovatelnými v naší oblasti výzkumu, což využije při řešení své disertační práce.

Ing. Jana Feciková je zkušenou techničkou LBP a jejím úkolem bude zabezpečení projektu po technické stránce včetně rutinních molekulárních a buněčných technik.

Na straně spolupracující laboratoře z Indie je řešitelem projektu prof. Ramamurthy Baskar (Indian Institute of Technology - Madras), jenž je uznávaným odborníkem v oblasti reprodukční zdatnosti a hybridizace u krytosemenných rostlin, konkrétně na otázky týkající se somatické mutagenese a meiotické rekombinace ve vztahu ke stáří rodičovských rostlin. Ve svých publikacích nejednou dokázal navrhnout neotřelé postupy řešení zkoumaných otázek, což se ukázalo i při přípravě tohoto projektu. Zkušenosti prof. Baskara budou pro splnění cílů projektu nepopíratelným přínosem.

5.2 Projektový tým – účastníci projektu

Role	Obchodní jméno - název	IČO	Typ organizace	Organizace v projektu vystupuje jako (nehodící se škrtněte)
Příjemce	Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.	61389030	VO - výzkumná instituce	Neplátce DPH

Další účastník projektu				Plátce/neplátce DPH
Další účastník projektu				Plátce/neplátce DPH

Identifikační údaje účastníka – „Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.“

Role účastníka při řešení projektu	Příjemce
Daňové identifikační číslo - DIČ	CZ61389030
IČO	61389030
Obchodní jméno - Název	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.
Právní forma subjektu	VVI – Veřejná výzkumná instituce
Typ organizace	VO – Výzkumná organizace
Adresa sídla	
Ulice, číslo popisné / orientační	Rozvojová 263
Obec	Praha 6 - Lysolaje
PSČ	16502
Stát	Česká republika
Telefonické spojení	225 106 453
Bankovní spojení organizace	
Název banky	Česká národní banka
Číslo účtu pro příjem dotace	
Zkratka názvu organizace	ÚEB AV ČR, v.v.i.
WWW adresa	http://www.ueb.cas.cz/
Pověřená organizační jednotka (např. u VVŠ fakulta)	Společnost je zapsána v Rejstříku veřejných výzkumných institucí u Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, Praha, spisová značka 17113-2006-34/ÚEB

Statutární orgán účastníka – „Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.“

Jméno, příjmení, tituly	Funkce v organizaci	Tel. č.	e- mail
	ředitel	+420 225 106 453	

Identifikační údaje účastníka – „.....název dalšího účastníka1.....“

Role účastníka při řešení projektu	Další účastník projektu
Daňové identifikační číslo - DIČ	
IČO	
Obchodní jméno - Název	
Právní forma subjektu	viz nápověda
Typ organizace	
Adresa sídla	
Ulice, číslo popisné / orientační	
Obec	
PSČ	
Stát	
Telefonické spojení	
Zkratka názvu organizace	
WWW adresa	
Pověřená organizační jednotka (např. u VVŠ fakulta)	

Statutární orgán účastníka – „.....název dalšího účastníka1.....“

Jméno, příjmení, tituly	Funkce v organizaci	Tel. č.	e- mail

Identifikační údaje účastníka – „.....název dalšího účastníka2.....“

...

...

...

5.3 Řešitelský tým

Název příjemce: Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i.

	Jméno, příjmení, tituly	Tel. č.	e-mail
Řešitel		225 106 450	
Člen řešitelského týmu		225 106 452	
Člen řešitelského týmu		225 106 451	
Člen řešitelského týmu		225 106 451	
Člen řešitelského týmu		225 106 451	

Název dalšího účastníka1: ...

	Jméno, příjmení, tituly	Tel. č.	e-mail
Další řešitel
Člen řešitelského týmu

Název dalšího účastníka2: ...

	Jméno, příjmení, tituly	Tel. č.	e-mail
Další řešitel
Člen řešitelského týmu

5.3.1 Členové řešitelského týmu – ... (název příjemce)

Role osoby při řešení projektu	Řešitel
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	1971
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	0,2
Organizace, pracoviště	Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i. Laboratoř biologie pylu
Telefon	+420 225 106 450
E-mail	

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

Koordinace projektu, plánování a vyhodnocování experimentů, vedení studentů
 Pylové kompetiční testy
 In silico analýzy transkriptomických a proteomických dat
 Integrace -omických dat
 Psaní rukopisů publikací

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

Hafidh SS, Potěšil D, Müller K, Fíla J, Michailidis C, Herrmannová A, Feciková J, Ischebeck T, Valášek LS, Zdráhal Z, **Honys D** (2018) Dynamics of *Nicotiana tabacum* pollen sequestrome defined by subcellular coupled omics. *Plant Physiology* 178: 258-282. **IF = 5,949**

Hafidh D, Potěšil D, Fíla J, Čapková V, Zdráhal Z, **Honys D*** (2016) Quantitative Proteomics of the Tobacco Pollen tube-Secretome Identifies Novel Pollen Tube Guidance Proteins Important for Fertilization. *Genome Biology* 17:81. doi:10.1186/s13059-016-0928-x. **IF₂₀₁₅ = 11,313**

Duplákova N, Dobrev PI, Reňák D, **Honys D*** (2016) Rapid separation of Arabidopsis male gametophyte developmental stages using a Percoll gradient. *Nature Protocols*, 11(10), 1817-1832. **IF₂₀₁₅ = 9,646**

Ding Z, Wang B, Moreno I, Duplákova N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pěňčík A, Chen X, Tejos R, Skůpa P, Pollmann S, Mravec J, Petrášek J, Zažímalová E, **Honys D**, Rolčík J, Murphy A, Orellana A, Geisler M, Friml J (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis. *Nature Communications* 3:941, doi: 10.1038/ncomms1941. **IF₂₀₁₁ = 10,015**

Honys D, Twell D (2004) Transcriptome analysis of developing haploid male gametophytes in Arabidopsis thaliana. *Genome Biology* 5: R85. **IF₂₀₁₁ = 9,036**

Odborný životopis řešitele – vložen jako příloha 8.1.7a

Role osoby při řešení projektu	Člen řešitelského týmu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	1980
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	0,2
Organizace, pracoviště	Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i. Laboratoř biologie pylu

Telefon	+420 225 106 452
E-mail	

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

Plánování a vyhodnocování experimentů, vedení studentů

Pylové kompetiční testy

Semi-*in vivo* techniky

Funkční a fenotypová analýza mutantních linií

Světelná a fluorescenční mikroskopie – růstové testy a lokalizace a kolokalizace proteinů

Práce na rukopisech publikací

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

Hafidh SS, Potěšil D, Müller K, Fila J, Michailidis C, Herrmannová A, Feciková J, Ischebeck T, Valášek LS, Zdráhal Z, Honys D (2018) Dynamics of *Nicotiana tabacum* pollen sequestrome defined by subcellular coupled omics. *Plant Physiology* 178: 258-282. **IF = 5,949**

Hafidh S, Potěšil D, Fila J, Capkova V, Zdráhal Z, Honys D (2016) Quantitative Proteomics of the Tobacco Pollen tube-Secretome Identifies Novel Pollen Tube Guidance Proteins Important for Fertilization. *Genome Biology*, doi 10.1186/s13059-016-0928-x. **IF = 11,313**

Hafidh S, Potěšil D, Fila J, Capkova V, Fecikova J, Zdráhal Z, Honys D (2014) In search of ligands and receptors of the pollen tube, the missing link in pollen tube perception. *Biochemical Society Transaction*, 42: 388-394. **IF = 3.19**

Brownfield L, **Hafidh S**, Borg M, Sidorova A, Mori T, Twell D (2009). A Plant Germline-Specific Integrator of Sperm Specification and Cell Cycle Progression. *PLOS GENETICS*, e1000430, **IF = 8.17**

Chen Z, **Hafidh S**, Poh SH, Twell D, Berger F (2009). Proliferation and cell fate establishment during Arabidopsis male gametogenesis depends on the Retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106;17, 7257-7262. **IF = 9.67**

Role osoby při řešení projektu	Člen řešitelského týmu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	1993
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	0,5
Organizace, pracoviště	Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i. Laboratoř biologie pylu
Telefon	+420 225 106 451
E-mail	

Pozice v řešitelském týmu: člen řešitelského týmu, postgraduální student

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

Příprava rostlinného materiálu

Pylové kompetiční testy

Semi-*in vivo* techniky

Genotypování, funkční a fenotypová analýza mutantních linií
Světelná a fluorescenční mikroskopie

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

Vinod Kumar v roce 2016 úspěšně dokončil magisterské studium na University of Delhi, Indie, s diplomovou prací na téma „Analysis of Stress Responsive HD-ZIPs in Wheat (*Triticum aestivum*)“. Zde získal pokročilé zkušenosti s molekulární biologii, řadou mikroskopických a mikrobiologických technik a základní bioinformatikou. Během svého studia se účastnil několika konferencí.

V rámci svého postgraduálního studia je spoluautorem publikace PRP8A and PRP8B Spliceosome Subunits Facilitate male-female communication in *Arabidopsis*, jež byla odeslána do redakce časopisu *Development*.

Role osoby při řešení projektu	Člen řešitelského týmu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	1995
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	0,1 (0,6 od roku 2021)
Organizace, pracoviště	Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i. Laboratoř biologie pylu
Telefon	+420 225 106 451
E-mail	

Pozice v řešitelském týmu: člen řešitelského týmu, pregraduální student

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

Semi-*in vivo* techniky

Zpracování a *in silico* analýzy transkriptomických a proteomických dat

Genotypování, funkční a fenotypová analýza mutantních linií

Světelná a fluorescenční mikroskopie

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

Božena Klodová v září roku 2017 úspěšně dokončila bakalářské studium na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK. V září roku 2019 tamtéž ukončí magisterské studium obhajobou diplomové práce „Searching for interaction preferences between nascent polypeptide associated complex subunits and revealing genes influenced by knock-down of both beta subunits in *Arabidopsis thaliana* flower buds“ a v současné době je již přijata na studium postgraduální, jež bude vykonávat od října 2019 v rámci LBP ÚEB AVČR. Zde získala pokročilé zkušenosti s molekulární biologii, řadou mikroskopických a mikrobiologických technik a pokročilou bioinformatikou. Během svého studia se již aktivně účastnila několika konferencí a workshopů.

V rámci svého pregraduálního studia je spoluautorkou aktuálně dokončované publikace „The beta subunit of nascent polypeptide associated complex plays a role in flowers and siliques development of *Arabidopsis thaliana*“.

Role osoby při řešení projektu	Člen řešitelského týmu
--------------------------------	------------------------

Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	1975
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	0,5
Organizace, pracoviště	Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i. Laboratoř biologie pylu
Telefon	+420 225 106 451
E-mail	

Pozice v řešitelském týmu: člen řešitelského týmu, technik

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

Technické zabezpečení projektu

Příprava rostlinného materiálu

Fenotypování rostlin

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

Ing. Jana Feciková je zkušenou techničkou LBP a jejím úkolem bude zabezpečení projektu po technické stránce včetně rutinních molekulárních a buněčných technik.

5.3.2 Členové řešitelského týmu - ... (název dalšího účastníka1)

Role osoby při řešení projektu	Další řešitel projektu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	
Organizace, pracoviště	
Telefon	
E-mail	

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

...

Odborný životopis dalšího řešitele (vlozte jako přílohu)

...

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

Role osoby při řešení projektu	Člen řešitelského týmu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	
Organizace, pracoviště	
Telefon	
E-mail	

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

...

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

...

5.3.3 Členové řešitelského týmu - ... (název dalšího účastníka2)

Role osoby při řešení projektu	Další řešitel projektu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	
Organizace, pracoviště	
Telefon	
E-mail	

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

...

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

...

Odborný životopis dalšího řešitele (vložte jako přílohu)

Role osoby při řešení projektu	Člen řešitelského týmu
Jméno, příjmení, tituly	
Ročník narození	
Pracovní kapacita vymezená na projekt (část úvazku např. 0,4)	
Organizace, pracoviště	
Telefon	
E-mail	

Stěžejní vykonávané činnosti při řešení projektu

...

Prokázání odborné způsobilosti (5 nejlepších dosažených výsledků)

...

6 Náklady projektu

Podíly kategorií výzkumu příjemce podpory - Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i.

PODÍL KATEGORIÍ VÝZKUMU		2020	2021	2022
ZV	Základní výzkum	100%	100%	100%
PV	Průmyslový výzkum	0%	0%	0%
EV	Experimentální vývoj	0%	0%	0%

Podíly kategorií výzkumu dalšího účastníka1 projektu - ... (název dalšího účastníka1)

PODÍL KATEGORIÍ VÝZKUMU		2020	2021	2022
ZV	Základní výzkum	...%	...%	...%
PV	Průmyslový výzkum	...%	...%	...%
EV	Experimentální vývoj	...%	...%	...%

Podíly kategorií výzkumu dalšího účastníka2 projektu - ... (název dalšího účastníka2)

PODÍL KATEGORIÍ VÝZKUMU		2020	2021	2022
ZV	Základní výzkum	...%	...%	...%
PV	Průmyslový výzkum	...%	...%	...%
EV	Experimentální vývoj	...%	...%	...%

6.1 Náklady příjemce podpory – slovní zdůvodnění - Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i.

Náklady v tis. Kč	2020		2021		2022	
	Uznané náklady	Podpora MŠMT	Uznané náklady	Podpora MŠMT	Uznané náklady	Podpora MŠMT
Osobní náklady	<p>871 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 871 tis. Kč), částka bude sestávat z následujících položek: 611 tis. Kč na mzdy v celkové výši 1,5 úvazku rozděleného mezi členy řešitelského týmu, odborné pracovníky i technika (včetně pohyblivé složky mzdy); proporčně dle úvazku věnovaného řešení projektu (Honys – 0,2/116 tis. Kč; Hafidh – 0,2/96 tis. Kč; Kumar – 0,5/192 tis. Kč; Klodová – 0,1/39 tis. Kč; Feciková – 0,5/168 tis. Kč). 220 tis. Kč na zákonné odvody ve výši 36% mzdových nákladů, 40 tis. Na dohody o provedení práce za provedení analýzy dat a za jazykovou korekturu rukopisů.</p>	<p>871 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 871 tis. Kč), částka bude sestávat z následujících položek: 611 tis. Kč na mzdy v celkové výši 1,5 úvazku rozděleného mezi členy řešitelského týmu, odborné pracovníky i technika (včetně pohyblivé složky mzdy); proporčně dle úvazku věnovaného řešení projektu (Honys – 0,2/116 tis. Kč; Hafidh – 0,2/96 tis. Kč; Kumar – 0,5/192 tis. Kč; Klodová – 0,1/39 tis. Kč; Feciková – 0,5/168 tis. Kč). 220 tis. Kč na zákonné odvody ve výši 36% mzdových nákladů, 40 tis. Na dohody o provedení práce za provedení analýzy dat a za jazykovou korekturu rukopisů.</p>	<p>1 133 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 1 133 tis. Kč), částka bude sestávat z následujících položek: 803 tis. Kč na mzdy v celkové výši 2,0 úvazku rozděleného mezi členy řešitelského týmu, odborné pracovníky i technika (včetně pohyblivé složky mzdy); proporčně dle úvazku věnovaného řešení projektu (Honys – 0,2/116 tis. Kč; Hafidh – 0,2/96 tis. Kč; Kumar – 0,5/192 tis. Kč; Klodová – 0,6/231 tis. Kč; Feciková – 0,5/168 tis. Kč). 290 tis. Kč na zákonné odvody ve výši 36% mzdových nákladů, 40 tis. Na dohody o provedení práce za provedení analýzy dat a za jazykovou korekturu rukopisů.</p>	<p>1 133 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 1 133 tis. Kč), částka bude sestávat z následujících položek: 803 tis. Kč na mzdy v celkové výši 2,0 úvazku rozděleného mezi členy řešitelského týmu, odborné pracovníky i technika (včetně pohyblivé složky mzdy); proporčně dle úvazku věnovaného řešení projektu (Honys – 0,2/116 tis. Kč; Hafidh – 0,2/96 tis. Kč; Kumar – 0,5/192 tis. Kč; Klodová – 0,6/231 tis. Kč; Feciková – 0,5/168 tis. Kč). 290 tis. Kč na zákonné odvody ve výši 36% mzdových nákladů, 40 tis. Na dohody o provedení práce za provedení analýzy dat a za jazykovou korekturu rukopisů.</p>	<p>1 133 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 1 133 tis. Kč), částka bude sestávat z následujících položek: 803 tis. Kč na mzdy v celkové výši 2,0 úvazku rozděleného mezi členy řešitelského týmu, odborné pracovníky i technika (včetně pohyblivé složky mzdy); proporčně dle úvazku věnovaného řešení projektu (Honys – 0,2/116 tis. Kč; Hafidh – 0,2/96 tis. Kč; Kumar – 0,5/192 tis. Kč; Klodová – 0,6/231 tis. Kč; Feciková – 0,5/168 tis. Kč). 290 tis. Kč na zákonné odvody ve výši 36% mzdových nákladů, 40 tis. Na dohody o provedení práce za provedení analýzy dat a za jazykovou korekturu rukopisů.</p>	<p>1 133 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 1 133 tis. Kč), částka bude sestávat z následujících položek: 803 tis. Kč na mzdy v celkové výši 2,0 úvazku rozděleného mezi členy řešitelského týmu, odborné pracovníky i technika (včetně pohyblivé složky mzdy); proporčně dle úvazku věnovaného řešení projektu (Honys – 0,2/116 tis. Kč; Hafidh – 0,2/96 tis. Kč; Kumar – 0,5/192 tis. Kč; Klodová – 0,6/231 tis. Kč; Feciková – 0,5/168 tis. Kč). 290 tis. Kč na zákonné odvody ve výši 36% mzdových nákladů, 40 tis. Na dohody o provedení práce za provedení analýzy dat a za jazykovou korekturu rukopisů.</p>

<p>Ostatní zboží a služby</p>	<p>200 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 200 tis. Kč). Pro realizaci plánovaných experimentů bude třeba nakoupit specializované kity kity pro izolaci a plasmidové DNA (Qiagen), kity pro purifikaci DNA (Qiagen), enzymy a další chemikálie pro PCR, RT-PCR a klonování DNA; Taq polymeráza (New England Biolabs), Phusion DNA polymerasa pro PCR fragmentů určených ke klonování (New England Biolabs), restriční endonukleázy, ligáza, nukleotidy a další (různí výrobci) a konečně laboratorní chemikálie a spotřební materiál k přípravě živných médií. Mimo to bude zapotřebí JIFFY tablet a táců na pěstování rostlin. Kromě toho plánujeme nákup odborné literatury a výpočetní techniky. Nezanedbatelnou položku činí primery pro PCR. Z této položky budou dále hrazeny zejména náklady na sekvenování DNA, náklady spojené se zajištěním provozu, opravy a</p>	<p>200 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 200 tis. Kč). Pro realizaci plánovaných experimentů bude třeba nakoupit specializované kity kity pro izolaci a plasmidové DNA (Qiagen), kity pro purifikaci DNA (Qiagen), enzymy a další chemikálie pro PCR, RT-PCR a klonování DNA; Taq polymeráza (New England Biolabs), Phusion DNA polymerasa pro PCR fragmentů určených ke klonování (New England Biolabs), restriční endonukleázy, ligáza, nukleotidy a další (různí výrobci) a konečně laboratorní chemikálie a spotřební materiál k přípravě živných médií. Mimo to bude zapotřebí JIFFY tablet a táců na pěstování rostlin. Kromě toho plánujeme nákup odborné literatury a výpočetní techniky. Nezanedbatelnou položku činí primery pro PCR. Z této položky budou dále hrazeny zejména náklady na sekvenování DNA, náklady spojené se zajištěním provozu, opravy a</p>	<p>420 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 420 tis. Kč). Pro realizaci plánovaných experimentů bude třeba nakoupit specializované kity kity pro izolaci a plasmidové DNA (Qiagen), kity pro purifikaci DNA (Qiagen), kit pro overexpresi a purifikaci bílkovin (New England Biolabs), systém pro klonování GATEWAY (Invitrogen) a InFusion (TaKaRa/Clontech), enzymy a další chemikálie pro PCR, RT-PCR a klonování DNA; Reverzní transkriptáza (Promega), Taq polymeráza (New England Biolabs), Phusion DNA polymerasa pro PCR fragmentů určených ke klonování (New England Biolabs), restriční endonukleázy, ligáza, nukleotidy a další (různí výrobci) a konečně laboratorní chemikálie a spotřební materiál k přípravě živných médií. Mimo to bude zapotřebí JIFFY tablet a táců na pěstování rostlin. Z této položky budou hrazeny zejména náklady na sekvenování DNA a syntézu primerů, náklady spojené se zajištěním provozu, opravy a údržba přístrojů používaných pro řešení projektu, konferenční poplatky a další náklady spojené se zveřejněním výsledků. Navýšení nákladů v kapitole služby je způsobeno provedením tran skriptomického experimentu – RNA-seq (Macrogen). Plánovaná cena služby odpovídá</p>	<p>420 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 420 tis. Kč). Pro realizaci plánovaných experimentů bude třeba nakoupit specializované kity kity pro izolaci a plasmidové DNA (Qiagen), kity pro purifikaci DNA (Qiagen), kit pro overexpresi a purifikaci bílkovin (New England Biolabs), systém pro klonování GATEWAY (Invitrogen) a InFusion (TaKaRa/Clontech), enzymy a další chemikálie pro PCR, RT-PCR a klonování DNA; Reverzní transkriptáza (Promega), Taq polymeráza (New England Biolabs), Phusion DNA polymerasa pro PCR fragmentů určených ke klonování (New England Biolabs), restriční endonukleázy, ligáza, nukleotidy a další (různí výrobci) a konečně laboratorní chemikálie a spotřební materiál k přípravě živných médií. Mimo to bude zapotřebí JIFFY tablet a táců na pěstování rostlin. Z této položky budou hrazeny zejména náklady na sekvenování DNA a syntézu primerů, náklady spojené se zajištěním provozu, opravy a údržba přístrojů používaných pro řešení projektu, konferenční poplatky a další náklady spojené se zveřejněním výsledků. Navýšení nákladů v kapitole služby je způsobeno provedením tran skriptomického experimentu – RNA-seq (Macrogen). Plánovaná cena služby odpovídá</p>	<p>420 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 420 tis. Kč). Pro realizaci plánovaných experimentů bude třeba nakoupit specializované kity kity pro izolaci a plasmidové DNA (Qiagen), kity pro purifikaci DNA (Qiagen), kit pro overexpresi a purifikaci bílkovin (New England Biolabs), systém pro klonování GATEWAY (Invitrogen) a InFusion (TaKaRa/Clontech), enzymy a další chemikálie pro PCR, RT-PCR a klonování DNA; Reverzní transkriptáza (Promega), Taq polymeráza (New England Biolabs), Phusion DNA polymerasa pro PCR fragmentů určených ke klonování (New England Biolabs), restriční endonukleázy, ligáza, nukleotidy a další (různí výrobci) a konečně laboratorní chemikálie a spotřební materiál k přípravě živných médií. Mimo to bude zapotřebí JIFFY tablet a táců na pěstování rostlin. Z této položky budou hrazeny zejména náklady na sekvenování DNA a syntézu primerů, náklady spojené se zajištěním provozu, opravy a údržba přístrojů používaných pro řešení projektu, konferenční poplatky a další náklady spojené se zveřejněním výsledků. V souhnu tedy plánujeme nákup specializovaných kitů pro molekulárně biologickou práci (80 tis. Kč), chemikálií (30 tis. Kč), spotřebního materiálu (40 tis. Kč),</p>	<p>420 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 420 tis. Kč). Pro realizaci plánovaných experimentů bude třeba nakoupit specializované kity kity pro izolaci a plasmidové DNA (Qiagen), kity pro purifikaci DNA (Qiagen), kit pro overexpresi a purifikaci bílkovin (New England Biolabs), systém pro klonování GATEWAY (Invitrogen) a InFusion (TaKaRa/Clontech), enzymy a další chemikálie pro PCR, RT-PCR a klonování DNA; Reverzní transkriptáza (Promega), Taq polymeráza (New England Biolabs), Phusion DNA polymerasa pro PCR fragmentů určených ke klonování (New England Biolabs), restriční endonukleázy, ligáza, nukleotidy a další (různí výrobci) a konečně laboratorní chemikálie a spotřební materiál k přípravě živných médií. Mimo to bude zapotřebí JIFFY tablet a táců na pěstování rostlin. Z této položky budou hrazeny zejména náklady na sekvenování DNA a syntézu primerů, náklady spojené se zajištěním provozu, opravy a údržba přístrojů používaných pro řešení projektu, konferenční poplatky a další náklady spojené se zveřejněním výsledků. V souhnu tedy plánujeme nákup specializovaných kitů pro molekulárně biologickou práci (80 tis. Kč), chemikálií (30 tis. Kč), spotřebního materiálu (40 tis. Kč),</p>
-------------------------------	---	---	---	---	--	--

	údržba přístrojů používaných pro řešení projektu, konferenční poplatky a další náklady spojené se zveřejněním výsledků. V souhrnu tedy plánujeme nákup specializovaných kitů pro molekulárně biologickou práci (60 tis. Kč), chemikálií (20 tis. Kč), spotřebního materiálu (20 tis. Kč), odborné literatury (10 tis. Kč), drobného hmotného materiálu (40 tis. Kč), sekvenování a syntézu primerů a další služby a údržbu (50 tis. Kč).	údržba přístrojů používaných pro řešení projektu, konferenční poplatky a další náklady spojené se zveřejněním výsledků. V souhrnu tedy plánujeme nákup specializovaných kitů pro molekulárně biologickou práci (60 tis. Kč), chemikálií (20 tis. Kč), spotřebního materiálu (20 tis. Kč), odborné literatury (10 tis. Kč), drobného hmotného materiálu (40 tis. Kč), sekvenování a syntézu primerů a další služby a údržbu (50 tis. Kč).	cenám, které jsme tomuto dodavateli platili v minulosti. V souhrnu tedy plánujeme nákup specializovaných kitů pro molekulárně biologickou práci (90 tis. Kč), chemikálií (30 tis. Kč), spotřebního materiálu (30 tis. Kč), drobného hmotného materiálu (50 tis. Kč), RNA-seq, sekvenování a syntézu primerů (200 tis. Kč) a další služby a údržbu (20 tis. Kč).	cenám, které jsme tomuto dodavateli platili v minulosti. V souhrnu tedy plánujeme nákup specializovaných kitů pro molekulárně biologickou práci (90 tis. Kč), chemikálií (30 tis. Kč), spotřebního materiálu (30 tis. Kč), drobného hmotného materiálu (50 tis. Kč), RNA-seq, sekvenování a syntézu primerů (200 tis. Kč) a další služby a údržbu (20 tis. Kč).	drobného hmotného materiálu (50 tis. Kč), RNA-seq, sekvenování a syntézu primerů (180 tis. Kč) a další služby a údržbu (40 tis. Kč).	drobného hmotného materiálu (50 tis. Kč), RNA-seq, sekvenování a syntézu primerů (180 tis. Kč) a další služby a údržbu (40 tis. Kč).
Subdodávky	0 Kč, v projektu se nepočítá se subdodávkami.	0 Kč, v projektu se nepočítá se subdodávkami.	0 Kč, v projektu se nepočítá se subdodávkami.	0 Kč, v projektu se nepočítá se subdodávkami.	0 Kč, v projektu se nepočítá se subdodávkami.	0 Kč, v projektu se nepočítá se subdodávkami.
Odpisy DHM a DNM	0 Kč, v projektu se nepočítá s odpisy DHM a DNM.	0 Kč, z podpory 0 Kč, v projektu se nepočítá s odpisy DHM a DNM.	0 Kč, v projektu se nepočítá s odpisy DHM a DNM.	0 Kč, v projektu se nepočítá s odpisy DHM a DNM.	0 Kč, v projektu se nepočítá s odpisy DHM a DNM.	0 Kč, v projektu se nepočítá s odpisy DHM a DNM.
Cestovné	150 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 150 tis. Kč). Částka bude užitá k pokrytí části nákladů na aktivní účast řešitele na mezinárodní vědeckou konferenci (60 tis. Kč; např. Plant Biology 2020, July 25-26 2020, Washington D.C., USA or 31th International Conference on Arabidopsis	150 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 150 tis. Kč). Částka bude užitá k pokrytí části nákladů na aktivní účast řešitele na mezinárodní vědeckou konferenci (60 tis. Kč; např. Plant Biology 2020, July 25-26 2020, Washington D.C., USA or 31th International Conference on Arabidopsis	90 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 90 tis. Kč). Částka bude užitá k pokrytí části nákladů na aktivní účast člena týmu na mezinárodní vědecké konferenci a dále k pokrytí nákladů na cestu doktoranda/doktorandky na spolupracující pracoviště v Indii (3 týdny). Cílem cesty bude sdílení Semi-in vivo technik studia reprodukční zdatnosti pylu na různém genetickém pozadí.	90 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 90 tis. Kč). Částka bude užitá k pokrytí části nákladů na aktivní účast člena týmu na mezinárodní vědecké konferenci a dále k pokrytí nákladů na cestu doktoranda/doktorandky na spolupracující pracoviště v Indii (3 týdny). Cílem cesty bude sdílení Semi-in vivo technik studia reprodukční zdatnosti pylu na různém genetickém pozadí.	90 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 90 tis. Kč). Částka bude užitá k pokrytí části nákladů na aktivní účast člena týmu na mezinárodní vědecké konferenci a dále k pokrytí nákladů na cestu doktoranda/doktorandky na spolupracující pracoviště v Indii (3 týdny). Cílem cesty bude sdílení Semi-in vivo technik studia reprodukční zdatnosti pylu na různém genetickém pozadí a práce na publikacích.	90 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 90 tis. Kč). Částka bude užitá k pokrytí části nákladů na aktivní účast člena týmu na mezinárodní vědecké konferenci a dále k pokrytí nákladů na cestu doktoranda/doktorandky na spolupracující pracoviště v Indii (3 týdny). Cílem cesty bude sdílení Semi-in vivo technik studia reprodukční zdatnosti pylu na různém genetickém pozadí a práce na publikacích.

Chybějící nebo neúplné slovní zdůvodnění nákladů je důvodem k vyřazení návrhu projektu z VES19.
 Ve slovním zdůvodnění jednotlivých položek uznaných nákladů projektu VaVaI podrobně specifikujte a kvantifikujte náklady hrazené z poskytnuté podpory i náklady hrazené z jiných zdrojů. Vždy nejprve ve vyplňované buňce uveďte částku, zda je hrazena z podpory, či jiných zdrojů a pak teprve podrobně slovně specifikujte položku. **Pozor! Nutná shoda s excelovskou tabulkou návrhu rozpočtu (bude posuzováno v rámci formální správnosti návrhu projektu)**

	Research (ICAR 2020), July 6-10, 2020, Seattle, USA) a dále k pokrytí nákladů na cestu řešitele (1 týden) a postgraduálního studenta (4 týdny) na spolupracující pracoviště v Indii (90 tis. Kč). Cílem cesty bude koordinace projektu a pylové kompetiční testy.	Research (ICAR 2020), July 6-10, 2020, Seattle, USA) a dále k pokrytí nákladů na cestu řešitele (1 týden) a postgraduálního studenta (4 týdny) na spolupracující pracoviště v Indii (90 tis. Kč). Cílem cesty bude koordinace projektu a pylové kompetiční testy.				
Nepřímé náklady	305 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 305 tis. Kč). Nepřímé náklady jsou počítány jako 25% přímých nákladů.	305 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 305 tis. Kč). Nepřímé náklady jsou počítány jako 25% přímých nákladů.	410 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 410 tis. Kč). Nepřímé náklady jsou počítány jako 25% přímých nákladů.	410 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 410 tis. Kč). Nepřímé náklady jsou počítány jako 25% přímých nákladů.	410 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 410 tis. Kč). Nepřímé náklady jsou počítány jako 25% přímých nákladů.	410 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 410 tis. Kč). Nepřímé náklady jsou počítány jako 25% přímých nákladů.
Podpora MŠMT	1 526 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 1 526 tis. Kč). Součet všech výše uvedených položek.	1 526 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 1 526 tis. Kč). Součet všech výše uvedených položek.	2 053 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 2 053 tis. Kč). Součet všech výše uvedených položek..	2 053 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 2 053 tis. Kč). Součet všech výše uvedených položek..	2 053 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 2 053 tis. Kč). Součet všech výše uvedených položek.	2 053 tis. Kč (z podpory MŠMT hrazeno 2 053 tis. Kč). Součet všech výše uvedených položek..
Ostatní veřejné zdroje	0 Kč, s ostatními veřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními veřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními veřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními veřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními veřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními veřejnými zdroji se nepočítá.
Neveřejné zdroje	0 Kč, s ostatními neveřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními neveřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními neveřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními neveřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními neveřejnými zdroji se nepočítá.	0 Kč, s ostatními neveřejnými zdroji se nepočítá.

6.2 Náklady dalšího účastníka 1 projektu – slovní zdůvodnění... (název dalšího účastníka projektu)

Chybějící nebo neúplné slovní zdůvodnění nákladů je důvodem k vyřazení návrhu projektu z VES19.

jednotlivých položek uznaných nákladů projektu VaVaI podrobně specifikujte a kvantifikujte náklady hrazené z poskytnuté podpory i náklady hrazené z jiných zdrojů. Vždy nejprve ve vyplňované buňce uveďte částku, zda je hrazena z podpory, či jiných zdrojů a pak teprve podrobně slovně specifikujte položku. **Pozor! Nutná číselná shoda s excelovskou tabulkou návrhu rozpočtu (bude posuzováno v rámci formální správnosti návrhu projektu)**

Ve slovním zdůvodnění

Náklady v tis. Kč	2020		2021		2022	
	Uznané náklady	Podpora MŠMT	Uznané náklady	Podpora MŠMT	Uznané náklady	Podpora MŠMT
Osobní náklady						
Ostatní zboží a služby						
Subdodávky						
Odpisy DHM a DNM						
Cestovné						
Nepřímé náklady						
Podpora MŠMT						
Ostatní veřejné zdroje						
Neveřejné zdroje						

6.3 Náklady dalšího účastníka 2 – slovní zdůvodnění ...(název dalšího účastníka projektu)

Chybějící nebo neúplné slovní zdůvodnění nákladů je důvodem k vyřazení návrhu projektu z VES19.

jednotlivých položek uznaných nákladů projektu VaVaI podrobně specifikujte a kvantifikujte náklady hrazené z poskytnuté podpory i náklady hrazené z jiných zdrojů. Vždy nejprve ve vyplňované buňce uveďte částku, zda je hrazena z podpory, či jiných zdrojů a pak teprve podrobně slovně specifikujte položku. **Pozor! Nutná číselná shoda s excelovskou tabulkou návrhu rozpočtu (bude posuzováno v rámci formální správnosti návrhu projektu)**

Ve slovním zdůvodnění

Náklady v tis. Kč	2020		2021		2022	
	Uznané náklady	Podpora MŠMT	Uznané náklady	Podpora MŠMT	Uznané náklady	Podpora MŠMT
Osobní náklady						
Ostatní zboží a služby						
Subdodávky						
Odpisy DHM a DNM						
Cestovné						
Nepřímé náklady						
Podpora MŠMT						
Ostatní veřejné zdroje						
Neveřejné zdroje						

7 Doplnující informace

7.1 Název projektu anglicky

A study on pollen competition in *Arabidopsis thaliana* hybrids

7.2 Cíl projektu anglicky

The principal objective of the proposal is to **evaluate the pollen reproductive fitness among cross-hybridized *Arabidopsis thaliana* ecotypes**.

This principal objective will be achieved through three secondary objectives:

1. Reproductive **competition *in vivo*** between *Arabidopsis* ecotypes. Combinations of male and female parent plants will be hybridized and the reproductive fitness of individual accessions as well as F1 reciprocal hybrids will be evaluated. This approach will combine the effects of sporophytic and, in later stages, gametophytic guidance cues on hybridization competence.
2. The effect of **hybridization** on the preferential fertilization **semi-*in vivo* (SIV)**. Selected combinations of ecotypes and their hybrids will be analyzed semi-*in vivo* to investigate the preferences of pollen tubes to navigate to and fertilize particular ovules. This approach will emphasize the effect of gametophytic guidance signals across various accessions and their hybrids.
3. Identification of **genes** and proteins **differentially expressed** in individual accessions and their hybrids following SIV pollination. Pollen tubes of various accessions and their hybrids will be cultivated SIV and the isolated pollen tube RNA and proteins as well as secreted proteins will be used for transcriptomic, proteomic and secretomic analyses and this exercise will contribute to the identification of genes conferring reproductive fitness.

7.3 Klíčová slova česky

Pylová kompetice, hybridizace, oplození, *Arabidopsis thaliana*, rostliny

7.4 Klíčová slova anglicky

Pollen competition, hybridization, fertilization, *Arabidopsis thaliana*, plants

7.5 Klasifikace hlavního vědního oboru řešení – viz nápověda

EB Genetika a molekulární biologie

7.6 Klasifikace vedlejšího vědního oboru řešení – viz nápověda

ED Fyziologie

7.7 Klasifikace dalšího vedlejšího vědního oboru řešení – viz nápověda

EF Botanika

7.8 Stupeň důvěrnosti údajů

S	Úplné a pravdivé údaje o projektu nepodléhají ochraně podle zvláštních právních předpisů.
---	---

7.9 NACE kód

M72.1.9 (Other research and experimental development on natural sciences and engineering)

8 Seznam příloh

8.1 Povinné přílohy za navrhovaného příjemce a každého navrhovaného účastníka projektu

8.1.1 Doklady prokazující oprávnění k činnosti

Příložením prosté kopie dokladu o oprávnění k podnikání nebo jiného průkazného oprávnění k návrhu projektu, dokládající, že předmětem činnosti je mj. výzkum a vývoj (dokumenty dokládající, že předmětem činnosti je mj. výzkum a vývoj nedokládají subjekty zřízené zvláštním právním předpisem a jmenovitě uvedené v tomto předpisu- např. veřejné a státní vysoké školy nebo veřejné výzkumné instituce)

8.1.2 Čestné prohlášení o způsobilosti k řešení projektu

Čestné prohlášení musí obsahovat razítko a podpisy všech členů statutárního orgánu uchazeče/dalšího účastníka projektu

8.1.3 Návrh smlouvy o účasti na řešení projektu

Pokud se na řešení projektu účastní více subjektů na české straně, tak součástí návrhu projektu musí být návrh smlouvy o spolupráci mezi příjemcem a dalším účastníkem, který mj. řeší úpravu vlastnických vztahů k poznatkům a výsledkům projektu a práv na jejich využití.

8.1.4 Souhlas se zpracováním osobních údajů

Týká se řešitele, dalších řešitelů a všech členů řešitelského týmu.

8.1.5 Dokumenty prokazující spolupráci s indickým partnerem „Letter of Intent“

8.1.6 Anotace projektu pro oponenta

Zde obecně popište Váš projekt. Tato část bude zaslána možným oponentům, aby se vyjádřili, zda jsou schopni a ochotni projekt oponovat. Anotace bude zaslána možným oponentům, kteří se ještě nezavázali mlčenlivostí, proto zvažte, jaké informace v této části uvedete.
Doporučený rozsah ½ - 1 strana A4

8.1.7 Životopis hlavního řešitele a klíčových osob

...

8.1.8 Vyplněný excelovský soubor finanční tabulky návrhu projektu

...

8.1.9 Další povinné přílohy

kopie plné moci/vnitřní předpis, podepisuje-li na jejím základě pověřená osoba dokument, ze kterého jasně vyplývá podpisová pravomoc (viz Zadávací dokumentace)

8.2 Ostatní přílohy

V případě potřeby přiložte další dokumenty, které považujete za podstatné.

9 Nápořěda

9.1 Právní forma subjektu

<http://www.vyzkum.cz/FrontClanek.aspx?idsekce=1376>

9.2 Státní příslušnost

<http://www.vyzkum.cz/FrontClanek.aspx?idsekce=1371>

9.3 Klasifikace hlavního vědního oboru řešení

<http://www.vyzkum.cz/FrontClanek.aspx?idsekce=1374>

9.4 Klasifikace vedlejšího vědního oboru řešení

<http://www.vyzkum.cz/FrontClanek.aspx?idsekce=1374>

9.5 Klasifikace dalšího vedlejšího vědního oboru řešení

<http://www.vyzkum.cz/FrontClanek.aspx?idsekce=1374>

Příloha II smlouvy
Uznané náklady a finanční zdroje Projektu

Tabulka uznaných nákladů ÚEB AVČR, v.v.i.

 Program: **INTER-EXCELLENCE** podprogram: ACTION

 Název projektu: **Studie pylové kompetice mezi hybridy Arabidopsis thaliana**

Náklady	Roky						Celkem		
	2020		2021		2022		Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)	
	Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)	Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)	Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)			
Osobní náklady	871	871	1 133	1 133	1 133	1 133	3 137	3 137	
Ostatní zboží a služby	200	200	420	420	420	420	1 040	1 040	
Subdodávky (max. 10%)*	0	0	0	0	0	0	0	0	
Odpisy DHM a DNM	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cestovné	150	150	90	90	90	90	330	330	
Nepřímé náklady	25,0%	305	305	410	410	410	410	1 125	1 125
Náklady celkem	1 526	1 526	2 053	2 053	2 053	2 053	5 632	5 632	
Zdroje	Roky						Celkem		
	2020		2021		2022		Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)	
Podpora MŠMT	1 526	1 526	2 053	2 053	2 053	2 053			5 632
Ostatní veřejné zdroje	0	0	0	0	0	0	0	0	
Neveřejné zdroje	0	0	0	0	0	0	0	0	
Zdroje celkem	1 526	1 526	2 053	2 053	2 053	2 053	5 632	5 632	

U nepřímých nákladů je možné využít předdefinovanou hodnotu (lze vepsat i vlastní hodnoty, které se automaticky přepočítají)

* z položky "Subdodávky" nelze počítat nepřímé náklady

Poznámka: tabulka nesmí obsahovat žádné červené pole.

Finanční položky nesmí obsahovat DPH u příjemce/dalšího účastníka projektu, který se chová jako plátce DPH

Tabulka uznaných nákladů za projekt

Program: INTER-EXCELLENCE podprogram: ACTION

Název projektu: Studie pylové kompetice mezi hybridy Arabidopsis thaliana



Náklady							Celkem	
	2020		2021		2022		Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)
	Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)	Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)	Uznané náklady (v tis. Kč)	z toho podpora MŠMT (v tis. Kč)		
Osobní náklady	871	871	1 133	1 133	1 133	1 133	3 137	3 137
Ostatní zboží a služby	200	200	420	420	420	420	1 040	1 040
Subdodávky (max. 10%)*	0	0	0	0	0	0	0	0
Odpisy DHM a DNM	0	0	0	0	0	0	0	0
Cestovné	150	150	90	90	90	90	330	330
Nepřímé náklady	305	305	410	410	410	410	1 125	1 125
Náklady celkem	1 526	1 526	2 053	2 053	2 053	2 053	5 632	5 632
Zdroje							Celkem	
Podpora MŠMT	1 526		2 053		2 053		5 632	
Ostatní veřejné zdroje	0		0		0		0	
Neveřejné zdroje	0		0		0		0	
Zdroje celkem	1 526		2 053		2 053		5 632	

U nepřímých nákladů je možné využít předdefinovanou hodnotu (lze vepsat i vlastní hodnoty, které se automaticky přepočítají)

* z položky "Subdodávky" nelze počítat nepřímé náklady

Poznámka: tabulka nesmí obsahovat žádné červené pole.

Finanční položky nesmí obsahovat DPH u příjemce/dalšího účastníka projektu, který se chová jako plátce DPH

**Příloha III ke smlouvě
Plán hodnocení Projektů**

- 1) Poskytovatel provádí kontrolu a hodnocení Projektů (dále jen „kontrola“) podle tohoto plánu hodnocení Projektů v souladu s § 13 zákona č. 130/2002 Sb.
- 2) Poskytovatel, pokud nerozhodne jinak, provádí kontrolu u projektů, jejichž řešení trvá více než 2 roky, zpravidla dvakrát – jednou přibližně v polovině řešení Projektů a jednou po ukončení řešení Projektů. U projektů, jejichž řešení trvá kratší dobu, se kontrola provádí zpravidla jednou až po ukončení řešení Projektů.
- 3) Poskytovatel provádí kontrolu ve dvou stupních:
 - I. Monitoring: kontrola I. stupně se provádí zpravidla v polovině délky řešení Projektů, a to u projektů, u nichž je podpora poskytována na dobu delší než 2 roky. U projektů, u nichž je podpora poskytována na dobu řešení 2 roky a kratší, se zpravidla kontrola I. stupně provádí až po ukončení řešení projektu a stává se tak součástí kontroly II. stupně. Kontrola probíhá vždy za účasti člena/členů odborného poradního orgánu poskytovatele nebo poskytovatelem určeného odborníka/určených odborníků, a to na základě příjemcem předložené průběžné zprávy. Průběžná zpráva obsahuje informace a přílohu podle odst. 6 písm. a) této přílohy. Závěrečná zpráva obsahuje informace a přílohu podle odst. 6 písm. b) této přílohy. Poskytovatel si však vyhrazuje právo uskutečnit kontrolu I. stupně i v jiných časových úsecích řešení Projektů.
 - II. Evaluační: kontrola II. stupně navazuje vždy až na kontrolu I. stupně a je realizována za účasti člena/členů odborného poradního orgánu poskytovatele nebo poskytovatelem určeného odborníka/určených odborníků, a to na základě příjemcem předložené průběžné zprávy či závěrečné zprávy. Závěrečná zpráva obsahuje informace a přílohu podle odst. 6 písm. b) této přílohy. Evaluační může být navázána na provedení finanční nebo veřejnosprávní finanční kontroly, kterou provádí rovněž poskytovatel. Poskytovatel provádí hodnocení II. stupně (evaluační) vždy při zjištění nesouladu v I. stupni hodnocení (monitoringu) a vždy po ukončení řešení Projektů.
- 4) Podle výsledku hodnocení ve II. stupni bude Projekt zařazen do jedné z následujících kategorií:

V	Projekt úspěšně plní/splnil stanovené cíle v souladu se smlouvou; bylo dosaženo vynikajících výsledků ve výzkumu a vývoji mezinárodního významu. Výsledek hodnocení Projektů v této kategorii je třeba podrobně odůvodnit popisem skutečností, které prokazatelně ovlivňují nebo ovlivnily aktuální světové trendy výzkumu a vývoje.
U	Projekt plní/splnil stanovené cíle v rozsahu stanoveném ve smlouvě („uspěl podle zadání“) a byly získány kvalitní výsledky ve výzkumu a vývoji na národní úrovni.
O	Projekt neplní/nesplnil stanovené cíle z důvodů, které nemohl poskytovatel ani příjemce předvídat. Ostatní podmínky stanovené ve smlouvě byly ale dodrženy. Výsledek hodnocení Projektů v této kategorii je třeba podrobně odůvodnit popisem a vysvětlením skutečností, které příjemce objektivně nemohl předvídat a které mu z prokazatelně

	objektivních důvodů znemožnily splnit všechny cíle stanovené v Příloze II. Nesplněné cíle jsou kategorizovány na cíle, které nebyly naplněny vůbec a cíle, které byly naplněny zčásti. V druhém případě je třeba specifikovat, do jaké míry byly cíle naplněny. Protože výsledek hodnocení Projektu v kategorii „O“ znamená nesplnění některých závazků příjemce stanovených ve smlouvě, případné uplatnění sankcí je třeba posuzovat v souladu s článkem 9 smlouvy.
S	Projekt neplní/nesplnil stanovené cíle, podmínky stanovené smlouvou nebyly ze strany příjemce dodrženy. Výsledek hodnocení Projektu v této kategorii znamená neplnění podmínek smlouvy a uplatnění sankcí je třeba posuzovat v souladu s články 9 a 10 smlouvy.

- 5) V souvislosti s vyhodnocením Programu může poskytovatel požadovat, aby příjemce předložil další podklady pro závěrečné zhodnocení výsledků Projektu, případných přínosů Projektu a jejich socioekonomických dopadů v návaznosti na vyčerpanou podporu v období až do 180 dnů ode dne ukončení poskytování podpory v rámci Programu.
- 6) Pro účely kontroly Projektu v průběhu a na konci jeho řešení má příjemce povinnost předložit poskytovateli ke schválení následující dokumenty:
- a) průběžnou zprávu o řešení Projektu, je-li podle ustanovení odst. 3) této přílohy vyžadována. Průběžná zpráva musí obsahovat:
- informace o postupu prací na Projektu,
 - zhodnocení dosažených dílčích cílů Projektu,
 - porovnání skutečně provedených prací na Projektu s plánovaným harmonogramem,
 - přehled a zdůvodnění případných změn, které během řešení Projektu nastaly oproti původním plánům v harmonogramu a rozpočtu, včetně uvedení stanoviska poskytovatele,
 - porovnání výše skutečně vynaložených uznaných nákladů a výše skutečně čerpané podpory s plánovaným rozpočtem,
 - porovnání skutečných výstupů Projektu s daty zveřejněnými příjemcem,
 - roční vyúčtování uznaných nákladů Projektu, včetně souhrnného a položkového výpisu nákladů z účetní evidence, za monitorovací období.

V rámci průběžného hodnocení je rovněž posuzováno plnění informační povinnosti příjemce a předávání informací do IS VaVal. Povinnou přílohou průběžné zprávy jsou dva oponentní posudky dvou nezávislých oponentů a zápis z oponentního řízení. Průběžné oponentní řízení se provádí podle pokynů poskytovatele⁵⁾;

b) závěrečnou zprávu o řešení Projektu, která obsahuje:

- veškeré informace o průběhu řešení Projektu v posledním kalendářním roce a za celé období řešení Projektu (tj. ode dne oznámeného zahájení Projektu do dne jeho ukončení),

⁵⁾ Poskytovatel zveřejní pokyny k oponentnímu řízení na internetových stránkách Programu. Podle pokynů poskytovatele si tento zpravidla vyhrazuje právo určit oponenty a členy oponentní rady nebo členy kontrolní komise, termín, místo konání a způsob provedení oponentního řízení nebo kontrolního dne. Příjemce má právo se k návrhu poskytovatele vyjádřit, a to nejdéle **7 kalendářních dnů od jeho doručení**. Pokud tak neučiní, má se za to, že s návrhem poskytovatele souhlasí. Případné námitky příjemce však poskytovatel není povinen akceptovat.

- souhrnné zhodnocení a přehled dosažených výsledků a výstupů s ohledem na všechny stanovené cíle,
- plnění předepsaných indikátorů,
- vyúčtování celkových uznaných nákladů Projektu a přehled vynaložených nákladů včetně specifikace jejich položek a souhrnného a položkového výpisu z účetní evidence,
- výpis o čerpání přidělené podpory Projektu,
- přehled a zdůvodnění případných změn, které během řešení Projektu nastaly oproti původním plánům v harmonogramu a rozpočtu, včetně uvedení stanoviska poskytovatele.

Součástí závěrečné zprávy je redakčně upravená závěrečná zpráva, tj. závěrečná zpráva upravená k publikování tak, aby poskytla třetím stranám natolik dostatečnou informaci o dosažených výsledcích, že mohou požádat příjemce o licenci na výsledky, aniž by byla ohrožena priorita příjemce výsledky publikovat, autorsky nebo jinak právně chránit, komerčně využít či jiným způsobem zveřejnit. (Redakčně upravená závěrečná zpráva se nepředkládá v případě, kdy lze závěrečnou zprávu zveřejnit v plném znění). Povinnou přílohou závěrečné zprávy jsou dva oponentní posudky dvou nezávislých oponentů a zápis z oponentního řízení. Závěrečné oponentní řízení se provádí podle pokynů poskytovatele¹;

c) dodatečné zprávy, tj. jakékoliv další zprávy vyžádané poskytovatelem za účelem kontroly.

- 7) Příjemce zpracuje dokumenty podle odst. 6 této přílohy v rozsahu a formátech podle pokynů poskytovatele, a předkládá je poskytovateli pouze v digitální podobě jako datovou zprávu do datové schránky poskytovatele s ID vidaawt.
- 8) Příjemce předkládá průběžnou zprávu poskytovateli (je-li podle odst. 3) vyžadována), podle odst. 6 písm. a) této přílohy, bez zbytečného prodlení do 60 kalendářních dnů od výzvy učiněné poskytovatelem, nejdéle však do **30. ledna** následujícího kalendářního roku. Poskytovatel si může vyžádat mimořádné předložení průběžné zprávy o řešení Projektu i mimo výše uvedené termíny.
- 9) Příjemce předkládá závěrečnou zprávu podle odst. 6 písm. b) této přílohy poskytovateli nejdéle do **30 kalendářních dnů** po ukončení Projektu podle článku 3 odst. 2 smlouvy.
- 10) Poskytovatel je oprávněn nařídit příjemci uspořádat kontrolní den kdykoli v průběhu řešení Projektu a předložené zprávy podle odst. 6 této přílohy nechat v rámci kontrolního dne posoudit kontrolní komisí. Kontrolní den se provádí podle pokynů poskytovatele.
- 11) Oponentní řízení nebo kontrolní den organizačně a finančně zajišťuje příjemce a konají se zpravidla v místě řešení Projektu, pokud poskytovatel po předchozí dohodě s příjemcem nestanoví jinak. Příjemce je povinen osobám, které se účastní oponentního řízení nebo kontrolního dne nebo jsou jmenovitě určeny poskytovatelem, poskytnout v předem dohodnuté době přístup na pracoviště, kde je Projekt řešen, k osobám podílejícím se na řešení Projektu, ke všem dokumentům, počítačovým záznamům a zařízením, které přísluší k Projektu. Od osob účastnících se oponentního řízení nebo kontrolního dne se požaduje slib mlčenlivosti ve vztahu k obchodnímu či jinému typu tajemství definovaného podle zvláštních právních předpisů.
- 12) Oponentní rada při oponentním řízení a kontrolní komise při kontrolním dnu a jednáních souvisejících s průběhem řešení a ukončením Projektu postupují zejména v souladu se zákonem č. 130/2002 Sb., pokyny poskytovatele a Metodikou hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení výsledků ukončených programů schvalovanou vládou ČR a platnou pro hodnocení uplynulého kalendářního roku.

- 13) Z kontrolního dne je pořizován zápis, který je vyhotoven vždy na místě ve dvou vyhotoveních, přičemž jeden z nich náleží poskytovateli a druhý příjemci. Příjemce je povinen doručit poskytovateli zprávu z kontrolního dne do **7 kalendářních dnů** ode dne jeho konání.

Příloha IV
Tabulka snížených odvodů za porušení rozpočtové kázně

Pořadové číslo	Typ porušení rozpočtové kázně	Sankce
I. Porušení rozpočtové kázně v souvislosti s povinnostmi vyplývajícími ze ZVZ⁶		
1.	<ul style="list-style-type: none"> Neprovedení zadávacího řízení na výběr dodavatele/zhotovitele Neuveřejnění oznámení o zahájení zadávacího řízení pokud je oznámení o zahájení požadováno zákonem 	100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky
2.	Rozdělení předmětu veřejné zakázky s důsledkem snížení předpokládané hodnoty pod finanční limity stanovené v ZVZ	100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky v případě, že tento postup vede až k zadání veřejné zakázky bez jakéhokoli výběrového řízení
3.	Neuveřejnění oznámení o zakázce v souladu s příslušnými pravidly (např. zveřejnění v Úředním věstníku Evropské unie (OJEU), pokud to vyžadují směrnice)	50 - 80 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky, podle závažnosti porušení pravidel
4.	<ul style="list-style-type: none"> Nedostatečné definování předmětu zakázky v oznámení/výzvě o zahájení zadávacího řízení, nebo v zadávací dokumentaci Nastavení kvalifikačních předpokladů a/nebo hodnotících kritérií v rozporu se ZVZ (např. nastavení kvalifikačních předpokladů, jež nesouvisí s předmětem veřejné zakázky nebo nejsou přiměřené vzhledem k předmětu zakázky nebo stanovení diskriminačních technických podmínek) 	10 - 100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky
5.	<ul style="list-style-type: none"> Neposkytnutí zadávací dokumentace případným uchazečům/zájemcům v dostatečném časovém předstihu (před koncem lhůty pro podání nabídek) Nedodržení lhůt pro podání nabídek nebo lhůt pro doručení žádosti o účast nebo nezveřejnění jejich prodloužení 	80 - 90 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky
6.	<ul style="list-style-type: none"> Úprava kvalifikačních kritérií po otevření nabídek, mající za následek neoprávněné přijetí uchazečů Nedostatek transparentnosti/nerovné zacházení během hodnocení nabídek nebo změna nabídky během hodnocení Nezákonné vyjednávání o nabídkách 	100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky

⁶ ZVZ = zákon č. 134/2016 Sb., o zadávání veřejných zakázek.

	<ul style="list-style-type: none"> Odmítnutí nabídky obsahující mimořádně nízkou nabídkovou cenu ve vztahu k předmětu veřejné zakázky bez vyzvání uchazeče k písemnému zdůvodnění částí nabídky, jež jsou pro výši nabídkové ceny podstatné 	
7.	<ul style="list-style-type: none"> Uzavření smlouvy s dodavatelem/zhotovitelem, který se neúčastnil zadávacího řízení Uzavření smlouvy s uchazečem, který měl být dle zákona obligatorně vyloučen ze zadávacího řízení Nezákonné vyloučení zájemce/uchazeče ze zadávacího řízení mimo případ, kdy tato skutečnost nemá vliv na výběr nejhodnější nabídky, respektive vliv na pořadí uchazečů, s nimiž je možné uzavřít smlouvu (první 3 v pořadí) 	<p>100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky</p>
8.	<ul style="list-style-type: none"> Nezákonné použití jednacího řízení bez uveřejnění nebo podstatná změna původních zadávacích podmínek v jednacím řízení s uveřejněním Zadání dodatečných zakázek na služby/dodávky (pokud toto zadání představuje podstatnou změnu původních podmínek zakázky) bez soutěže, a to pokud neplatí jedna z následujících podmínek: <ul style="list-style-type: none"> mimořádná naléhavost způsobena nepředvídatelnými událostmi nepředvídatelná okolnost pro doplňkové služby, dodávky 	<p>100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky</p> <p>100 % hodnoty dodatečných zakázek</p>
9.	Nezveřejnění hodnotících a kvalifikačních kritérií veřejné zakázky v IS CEDR ⁷ před plánovaným vyhlášením	<p>0 - 60 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky, podle závažnosti porušení povinností</p>
10.	Jiné závažné porušení pravidel pro zadávání veřejných zakázek, jestliže mělo či mohlo mít vliv na výběr na nejhodnější nabídky	<p>60 - 100 % částky dotace, použité na financování předmětné zakázky, podle závažnosti porušení pravidel</p>
11.	Ostatní méně závažná porušení zde výslovně neuvedených povinností vyplývajících ze ZVZ	<p>0 - 50 %</p>

⁷ IS CEDR = informační systém centrální registr dotací

		částky dotace, použité na financování předmětné zakázky
II. Porušení rozpočtové kázně v souvislosti s ostatními povinnostmi vyplývajícími ze smlouvy		
1.	Nearchivování veškeré dokumentace spojené s implementací projektu minimálně po dobu deseti let od data posledního poskytnutí podpory nebo její části	60 - 100 % celkové částky dotace 0 - 50 % celkové částky dotace, v méně závažných případech
2.	<ul style="list-style-type: none"> • Neoznámení podstatné změny v projektu • Neoznámení nepodstatné změny v projektu 	100 % celkové částky dotace, použité na financování předmětné aktivity 0 - 50 % částky dotace, použité na financování předmětné aktivity, v méně závažných případech
3.	Nevytvoření podmínek k provedení kontroly vztahující se k realizaci projektu a/nebo neposkytnutí součinnosti při prováděné kontrole	80 - 90 % Celkové částky dotace
4.	<ul style="list-style-type: none"> • Předkládání nepravdivých a/nebo neúplných informací poskytovateli v závažných případech • Předkládání nepravdivých a/nebo neúplných informací poskytovateli v méně závažných případech 	100 % částky dotace, použité na financování konkrétní aktivity, v případě úmyslného jednání, vážně poškozujícího realizaci/udržitelnost projektu 0 - 40 % částky dotace, použité na financování konkrétní aktivity, v méně závažných případech
5.	Nezacházení s majetkem spolufinancovaným z prostředků na financování projektu s péčí řádného hospodáře. Zejména nepojištění, nezabezpečení proti poškození, odcizení nebo ztrátě	60 - 90 % celkové částky dotace
6.	<ul style="list-style-type: none"> • Neposkytnutí informací o kontrolách provedených jinými subjekty, podezřeních na nesrovnalosti zjištěných v průběhu realizace projektu 	40 - 90 % celkové částky dotace 0 - 30%

	• Neposkytnutí informací o přijetí a splnění uložených opatření k nápravě	celkové částky dotace, v méně závažných případech
7.	Neplnění/porušení jiných ve smlouvě o poskytnutí podpory příjemci stanovených povinností	30 - 100 % celkové částky dotace, týkající se porušení povinností v závažných případech 0 - 20 % celkové částky dotace, týkající se porušení povinností v méně závažných případech