

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava transgenních linií vojtěšky (*Medicago sativa*) exprimujících markery cytoskeletu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Adamecyková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Lucie AdamecZyková

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Olze Šamajové, Dr., za odborné vedení a vstřícnost při zpracování této práce. Velké poděkování patří také Mgr. Michaele Škoríkové za pomoc a čas, který mi věnovala při řešení experimentální části bakalářské práce. Poděkování patří také všem zaměstnancům Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná, kteří mi neváhali pomoci kdykoli bylo potřeba.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Adamczyková
Název práce	Příprava transgenních linií vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>) exprimujících markery cytoskeletu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Rostlinný cytoskelet plní v buňce rostliny nezastupitelnou úlohu. Tvoří oporu buňky, účastní se buněčného dělení, svou roli hraje při transportu vesikul nebo organel. Rostlinný cytoskelet reaguje na vnější podmínky, kdy při biotickém a abiotickém stresu dochází ke změnám v uspořádání aktinových filament a mikrotubulů. Ke změnám v uspořádání cytoskeletu dochází také během symbiotických procesů. *Medicago sativa* je rostlina spadající do čeledi bobovitých rostlin a vyznačuje se mimo jiné symbiózou s bakteriemi fixujícími vzdušný dusík. Aby bylo možné tyto procesy detailně studovat v živých rostlinných buňkách, je nutné rostlinný cytoskelet vizualizovat, a to nejlépe tak, aby nedošlo k narušení jeho dynamiky. Pro vizualizaci cytoskeletu pomocí fluorescenční nebo konfokální laserové mikroskopie se využívají fúzní fluorescenční proteiny, které slouží jako markery cytoskeletu.

Cílem této bakalářské práce byla příprava *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí konstrukty pro jednotlivé markery cytoskeletu jako *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6*, *mRFPL:TUB6* a *MAP4:GFP*, a následně jimi stabilně transformovat listové explantáty *M. sativa*. Transformované rostliny byly regenerovány procesem somatické embryogeneze. V případě konstruktů *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6* a *MAP4:GFP* byla ověřena jejich účinnost v *M. sativa*.

Dále byla indukována somatická embryogeneze z listových explantátů transgenní rostliny, která již stabilně exprimovala konstrukt *tagRFP:TUA6*. V kořenech regenerovaných rostlin byla pozorována organizace kortikálních a mitotických mikrotubulů.

Klíčová slova	Transformace, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Medicago sativa</i> , cytoskelet, markery cytoskeletu, aktin, mikrotubuly
Počet stran	83
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lucie Adamczyková
Title	Preparation of alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) transgenic lines expressing cytoskeletal markers
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cellular biology CRH
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2019

Abstract

The plant cytoskeleton plays an irreplaceable role in the plant cell. It forms the backbone of the cell, participates in cell division and in the transport of vesicles or organelles. The plant cytoskeleton reacts on environmental conditions. Biotic and abiotic stresses are responsible for rearrangement of actin filaments and microtubules. Changes in cytoskeleton organization can be also observed during symbiotic processes. *Medicago sativa* belongs to *Leguminosae* family and it is characterised by a symbiosis with nitrogen fixing bacteria. Visualization of the plant cytoskeleton without affecting its dynamics during *in vivo* observation is necessary for detail study of symbiotic processes. Cytoskeletal markers as a fusion proteins are used for visualization of the cytoskeleton by fluorescence or confocal laser microscopy.

The aim of this thesis was to prepare *A. tumefaciens* carring construct for cytoskeleton markers: *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6*, *mRFPL:TUB6*, *MAP4:GFP* for stably transformation of *M. sativa* leaf explants. Transformed plants were regenerated by the process of somatic embryogenesis. In the case of constructs *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6* and *MAP4:GFP* their efficacy in *M. sativa* was verified.

Furthermore, somatic embryogenesis was induced from leaf explants of transgenic plant stably expressing *tagRFP:TUA6* construct. An organization of cortical and mitotic microtubules was observed in the roots of regenerated transgenic plants.

Keywords	Transformation, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Medicago sativa</i> , cytoskeleton, cytoskeletal markers, actin, microtubules
----------	---

Number of pages	83
-----------------	----

Number of appendices	0
----------------------	---

Language

Czech

OBSAH

1 ÚVOD.....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	12
2.1 Charakterizace vojtěšky seté.....	12
2.2 Cytoskelet rostlin.....	12
2.2.1 Mikrotubuly.....	13
2.2.2 Aktinová filamenta.....	14
2.2.3 Transport vesikul a organel v rostlinné buňce pomocí cytoskeletu.....	15
2.2.4 Cytoskelet během buněčného dělení.....	16
2.2.5 Markery cytoskeletu.....	17
2.3 Transformační techniky <i>M. sativa</i>	18
2.3.1 Transformace pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.3.2 Elektroporace.....	23
2.3.3 Biolistická metoda.....	23
2.3.4 Transformace <i>in planta</i>	25
2.4 Kultivace <i>Medicago sativa</i> v <i>in vitro</i> podmínkách.....	26
2.4.1 Somatická embryogeneze u <i>Medicago sativa</i>	26
2.4.2 Růstové regulátory, hormony a selekční reagenty v kultivačních médiích.	27
2.4.3 Transgenní <i>Medicago sativa</i>	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1 Materiál.....	30
3.1.1 Použité Chemikálie.....	30
3.1.2 Přístroje.....	30
3.1.3 Software.....	31
3.1.4 Roztoky a média.....	31
3.1.5 Rostlinný materiál a jeho kultivace.....	37
3.1.6 Bakteriální materiál.....	38
3.1.7 Použité plasmidy.....	38
3.2 Metody.....	40
3.2.1 Příprava kultivačních médií.....	40

3.2.2	Příprava chemokompetentních buněk <i>E. coli</i>	40
3.2.3	Transformace chemokompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10.....	41
3.2.4	Příprava noční kultury z bakteriálních kolonií a příprava konzerv	41
3.2.5	Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kit.....	41
3.2.6	Izolace plasmidové DNA (za použití pufrů P1, P2, P3).....	42
3.2.7	Restrikční štěpení a agarosová elektroforéza	42
3.2.8	Transformace chemokompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i> kmen GV3101	44
3.2.9	Tranzientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	44
3.2.10	Sterilizace listů <i>Medicago sativa</i>	45
3.2.11	Stabilní transformace listových explantátů <i>Medicago sativa</i>	45
3.2.12	Somatická embryogeneze	46
3.2.13	Příprava mikroskopických preparátů a mikroskopické pozorování	47
3.2.14	Podmínky snímání	47
4	VÝSLEDKY	48
4.1	Ověření konstruktů nesoucích markery cytoskeletu restrikční analýzou	48
4.2	Ověření transformace <i>A. tumefaciens</i> restrikční analýzou.....	54
4.3	Ověření funkčnosti konstruktů pomocí agroinfiltrace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	56
4.4	Stabilní transformace listů <i>Medicago sativa</i> a regenerace transgenních rostlin	59
4.4.1	Selekce rostlin exprimujících markery cytoskeletu.....	61
4.4.2	Mikroskopická analýza kořenů rostlin stabilně exprimujících cytoskeletární markery	63
4.5	Somatická embryogeneze <i>M. sativa</i> stabilně exprimující konstrukt <i>p35S::tagRFP-TUA6</i>	68
5	DISKUZE	71
6	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	82

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma cytoskeletu a transformačních technik u vojtěšky.
2. Příprava *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty fluorescenčně značených cytoskeletálních markerů.
3. Transformace vojtěšky s *Agrobacterium tumefaciens* nesoucím konstrukty fluorescenčně značených cytoskeletálních markerů.
4. Somatická embryogeneze rostliny stabilně exprimující konstrukt *p35S::tagRFP:TUA6*.
5. Odvození transgenních linií stabilně exprimujících fluorescenčně značené cytoskeletální markery.

1 ÚVOD

Medicago sativa je dvouděložná rostlina, která má vysokou nutriční hodnotu. Díky tomu se v zemědělství využívá jako krmivo, například ve formě siláže. Protože je *M. sativa* důležitá zemědělská plodina, je u ní snaha o tvorbu účinného transformačního a regeneračního protokolu, aby bylo možné co nejefektivněji a nejrychleji vyvinout transgenní linie nesoucí požadované geny zájmu.

Pod pojmem transformace se rozumí přenos cizí genetické informace do genomu hostitele. V případě *M. sativa* je nejpoužívanější transformační metodou právě transformace zprostředkovaná gramnegativní bakterií *A. tumefaciens*. Tato bakterie obývá půdní stanoviště a je přirozeně schopná přenést část genetické informace ze svého Ti plasmidu do jádra rostlinných buněk. Geny zabudované do rostlinného genomu pak pomáhají bakteriím zajistit vhodné podmínky pro jejich přežití a množení.

Schopnosti přenosu genetické informace u této bakterie se využívá v oblasti genetického inženýrství při tvorbě geneticky modifikovaných rostlin. Bakterie *A. tumefaciens* je schopná přijmout geneticky upravený plasmid s genem zájmu. Mezi geny zájmu nejčastěji patří geny rezistence vůči chorobám a škůdcům nebo geny zvyšující odolnost vůči abiotickému stresu.

Pro studium rostlinného cytoskeletu, například během mitózy a cytokineze se využívají cytoskeletální markery, což jsou nejčastěji fúzní proteiny aktinu nebo tubulinu značené fluorescenčním proteinem. Pro vizualizaci cytoskeletu mohou být využity i proteinové domény z aktin nebo tubulin vázících proteinů, jako je například aktin-vázící doména z proteinu FIMBRIN1 pocházející z rostliny *Arabidopsis thaliana* nebo tubulin-vázící doména ze savčího proteinu MAP4 (Ivanov *et* Harrison, 2014).

Mezi nejčastěji používané fluorescenční proteiny patří GFP (green fluorescent protein) a RFP (red fluorescent protein). Modifikací několika aminokyselin těchto proteinů vznikají různé barevné varianty, například BFP (blue fluorescent protein), CFP (cyan fluorescent protein) nebo tagRFP a mCherry, což jsou červené fluorescenční proteiny (Day *et* Davidson, 2009). Vyvinutím více barevných variant je možné kolokalizovat několik buněčných struktur najednou, což je žádoucí při studiu vzájemných interakcí jednotlivých buněčných komponent.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Charakterizace vojtěšky seté

Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.), také známá jako „alfalfa“ patří do čeledi bobovitých rostlin a je důležitou zemědělskou plodinou. Jedná se o cizosprašnou dvouděložnou rostlinu. Využívá se především jako krmivo pro hospodářská zvířata, protože obsahuje velké množství vitamínů a proteinů (Monteiro *et al.*, 2003). *M. sativa* má poměrně hluboký kořenový systém, který v druhém roce života dosahuje hloubky 3,6 m (Johnson *et al.*, 1998). Díky tomu je odolná vůči suchu a snese vysoké teploty až do 45 °C (Rashmi *et al.*, 1997).

Vojtěška a obecně luštěniny žijí v symbióze s bakteriemi, které jsou schopné vázat vzdušný dusík. *M. sativa* stejně jako *M. truncatula* žije v symbióze s bakterií *Sinorhizobium meliloti*. Bakterie interagují s rostlinou poté, co zachytí flavonoidy uvolněné rostlinou. Jako odpověď bakterie produkují Nod faktor. Bakterie pronikají přes kořenové vlásky do kořenů, ve kterých se následně začne formovat struktura zvaná nodul. Bakterie začnou exprimovat geny pro tvorbu nitrogenasy, které jsou zodpovědné za fixaci dusíku. Rostliny, které žijí v symbióze s bakteriemi fixujícími dusík získávají v půdách s nízkým obsahem dusíku výhodu (Checcucci *et al.*, 2016).

Vojtěška setá má složitý genom, je tetraploidní ($4n=32$) (Hawkins *et al.*, 2018). Genom *M. sativa* nebyl do dnešní doby plně osekvenován, ale jako modelový organismus pro bobovité rostliny se využívá *M. truncatula*, která je s *M. sativa* blízce příbuzná. Využívá se jako model pro studium fixace vzdušného dusíku především proto, že má oproti *M. sativa* diploidní genom. Další výhody jsou například krátký životní cyklus nebo možnost poměrně snadné transformace (Krishnakumar *et al.*, 2015).

2.2 Cytoskelet rostlin

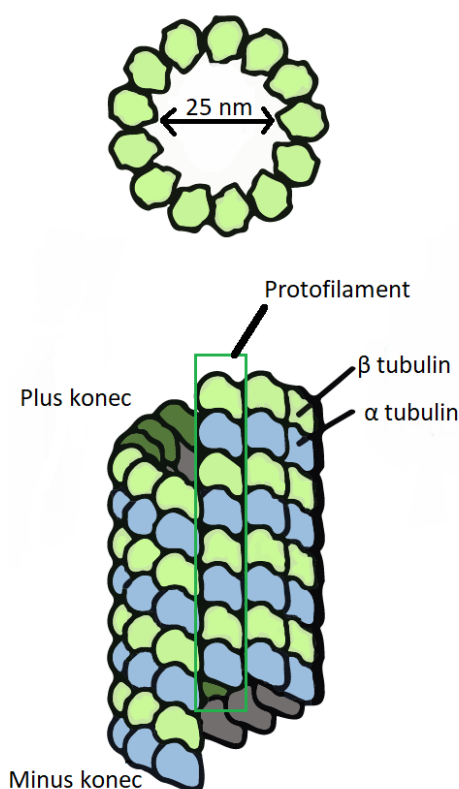
Cytoskelet rostlinných buněk představuje komplexní vnitrobuněčnou strukturu, která je složena z aktinových filament a mikrotubulů. Mikrotubuly a aktinová filamenta navzájem spolupracují a tvoří spolu dynamický systém. Cytoskelet se účastní buněčného dělení, morfogeneze, intracelulárního transportu, signalizace a také odpovědi na rozličné stresy. (Komis *et al.*, 2015; Seagull, 2016).

2.2.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly se skládají z heterodimerů, které obsahují alfa-tubulin a beta-tubulin (Obr. 1). Alfa a beta tubulin mají aminokyselinovou sekvenci shodnou ze 40 % a oba proteiny existují v několika isoformách (Nogales *et al.*, 1998). Genom *A. thaliana* kóduje v případě alfa tubulinu 6 isoform: TUA1 – TUA6 (Kopczak *et al.*, 1992). Isoform beta tubulinu v *A. thaliana* existuje celkem 9: TUB1 – TUB9 (Snustad *et al.*, 1992). Většina těchto tubulinových isoform je nepřetržitě exprimována. Existují ale výjimky, a to isoformy TUA1 a TUB9, které jsou exprimovány převážně v reprodukčních orgánech (Cheng *et al.*, 2001). Mimo isoformy alfa a beta existují také dvě isoformy gama (Liu *et al.*, 1994).

Heterodimery se k sobě připojují a tvoří tak lineární protofilamenty, kterých je většinou 13. Protofilamenty lineárně asociují a tvoří tak duté vlákno, které má v průměru 24 nm (Seagull, 2016).

Na mikrotubulovém vlákně rozlišujeme plus a minus konec, kde minus konec je tvořen alfa-tubulinem, zatímco plus konec je tvořen beta-tubulinem. Nové heterodimery se přednostně připojují na plus konec, kde se na beta-tubulinu nachází navázané GTP. Když dojde ke kontaktu alfa-tubulinu nového heterodimeru se stávajícím vláknem, GTP hydrolyzuje na GDP. Hydrolyza GTP je pomalejší než přikládání nových heterodimerů,



Obr. 1 Struktura mikrotubulu (upraveno podle Hashimoto, 2015).

a proto na plus konci vzniká GTP čepička. GTP čepička pomáhá mikrotubulům růst díky silným laterálním interakcím mezi GTP jednotkami (Margolin *et al.*, 2012; Hashimoto, 2015).

Polymerizace může někdy přejít do fáze depolymerizace, kdy dojde k hydrolyze GTP čepičky a další heterodimery se na tubulinové vlákno nemohou vázat. Dojde k zakřivení protofilament, protože podjednotky vázající GDP mají přirozeně zakřivenou konformaci, a následuje depolymerizace heterodimerů (Margolin *et al.*, 2012). Po obnovení GTP čepičky může depolymerizace opět přejít do polymerační fáze (Seagull, 2016).

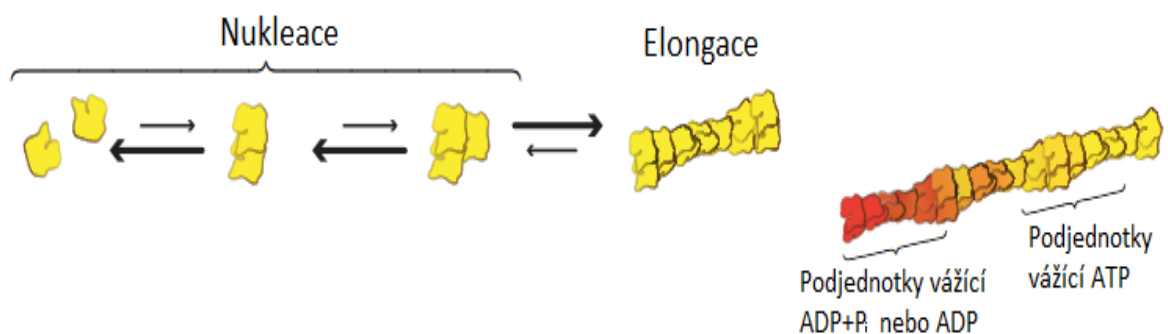
Depolymerizaci a destabilizaci mikrotubulů lze přivodit některými chemickými látkami, jako je oryzalin nebo propyzamid, které se pro své účinky využívají jako herbicidy (Nakamura *et al.*, 2004).

Mikrotubuly jsou také citlivé na některé abiotické stresy, například solný stres. Vlivem zvýšené koncentrace solí dochází ke svazkování a depolymerizaci mikrotubulů (Dou *et al.*, 2018). Zvýšený obsah solí v prostředí také negativně ovlivňuje klíčení, růst a schopnost reprodukce rostlin. Dále ovlivňuje fyziologické procesy, jako fotosyntézu, respiraci nebo enzymatickou aktivitu (Hasanuzzaman *et al.*, 2012).

Depolymerizace mikrotubulů může nastat i při působení nízkých teplot (Nick *et al.*, 2013).

2.2.2 Aktinová filamenta

Filamentární aktin (F-aktin) je tvořen podjednotkami globulárního aktinu (G-aktin), který má velikost 42 kDa. Vzniklý F-aktin tvoří dvouvláknovou helikální strukturu, která má v průměru 5-7 nm (Li *et al.*, 2015). Tvorba nového aktinového vlákna má 2 fáze: nukleaci a elongaci. Při nukleaci se z aktinových monomerů tvoří aktinový dimer a později trimer.



Obr. 2 Schéma tvorby aktinového filamentu (upravené podle Blanchoin *et al.*, 2014) Nukleace je formace dimerů a trimerů z aktinových monomerů. Po nukleaci nastává elongace, kdy se řetězec prodlužuje za hydrolyzy ATP.

Při elongační fázi se na trimer připojují další monomerní jednotky a dochází k prodlužování řetězce (Obr. 2) (Blanchoin *et al.*, 2014). Také na aktinovém vlákně rozlišujeme plus a minus konec. Nové monomery, které mají navázané ATP, se přidávají k rychle rostoucímu (+) konci. Po připojení dojde k hydrolyze nukleotidu a podjednotka tak obsahuje ADP-P_i. Nakonec je P_i uvolněno a navázané podjednotky obsahují ADP. Monomery s navázaným ADP se z pomalu rostoucího (-) konce odpojují a dochází tak ke zkracování řetězce (Li *et al.*, 2015).

Mezi inhibitory aktinového cytoskeletu se řadí sloučeniny jako latrunculin nebo chytochalsin, které působí na F-aktin. Cytochalsiny jsou fungální metabolity, které výrazně zpomalují polymeraci F-aktinu tím, že inhibují fázi elongace (Bonder *et al.*, 1986). Inhibice je způsobena silnou afinitou cytochalsinů k rostoucímu (+) konci, tím pádem se G-aktin nemůže navázat a postupně dochází k depolymerizaci (Hussey *et al.*, 2006).

Příkladem latrunculinu je latrunculin A, který je izolován z mořské červené houby *Latrunculia magnifica* (Spector *et al.*, 1983).

Na druhou stranu existují látky, které F-aktin stabilizují a napomáhají jeho polymeraci. Mezi tyto látky řadíme například jasplakinolidy, které byly původně izolovány z mořské houby *Jaspis johnstoni* (Braekman *et al.*, 1987). Tato chemická látka snadno prostupuje cytoplasmatickou membránou a pozitivně působí na nukleaci aktinového cytoskeletu (Waldmann *et al.*, 2008).

Genom *A. thaliana* obsahuje mnoho isoform aktinu. Ve vegetativních částech rostliny jsou exprimovány isoformy ACT2, ACT7 a ACT8 (Gilliland *et al.*, 2003). V reprodukčních částech se exprimují isoformy ACT1, ACT3, ACT4, ACT11 a ACT12 (Huang *et al.*, 1997).

2.2.3 Transport vesikul a organel v rostlinné buňce pomocí cytoskeletu

Rostlinné buňky, na rozdíl od živočišných, využívají především aktinové filamenty pro transport a pohyb organel. Živočišné buňky pro transport využívají mikrotubuly a s mikrotubuly-asociované motorové proteiny jako je dynein a kinesin (Grebe *et al.*, 2003; Brandizzi *et al.*, 2013).

V rostlinných buňkách se také nacházejí geny kódující kinesiny, například v genomu *A. thaliana* se nachází konkrétně 61 genů kódujících tyto motorové proteiny. Geny pro kinesiny transportující organely na dlouhou vzdálenost se v genomu nevyskytují. Nejvíce zastoupeny jsou rodiny kinesinů 7 a 14 (Zhu *et al.*, 2012). Usuzuje se, že mikrotubuly

a mikrotubuly-asociované motorové proteiny se v rostlinných buňkách specializují na ukotvení a zpomalení organel, aby byly správně nasměrovány na své cílové místo (Cai *et Cresti*, 2012; Zhu *et Dixit*, 2012).

Kinesiny jsou také důležité při cytokinezi a přenosu signálu (Lee *et Liu*, 2004; Li *et al.*, 2012). Cytokineze se mimo jiné účastní kinesin AtPAKRP2, který transportuje vesikuly z Golgiho aparátu do fragmoplastu (Lee *et al.*, 2001).

Mezi další motorové proteiny účastníci se transportu vesikul a organel v rostlinných buňkách řadíme myosiny. Myosiny se pohybují na rozdíl od kinesinů podél aktinového vlákna. V *A. thaliana* se nachází 17 genů kódujících myosin. Tyto geny jsou rozděleny do dvou kategorií – myosin VIII obsahující 4 členy a myosin XI se 13 členy (Reddy *et Day*, 2001). Imunocytochemická analýza klíčích rostlin *A. thaliana* ukázala, že myosin je lokalizovaný v okolí kortikálního ER (Ueda *et al.*, 2011). Aktin-myosinový komplex zajišťuje distribuci vesikul a organel na dlouhou vzdálenost.

Z důvodu jejich blízkého spojení nejsou pro transport vesikul mezi ER a GA bezprostředně nutná aktinová vlákna, což bylo dokázáno inhibitorem transportu brefeldinem A (Brandizzi *et al.*, 2002). Transport vesikul je ovšem v přítomnosti aktinových vláken mnohem efektivnější. Také vesikuly z post-Golgi nemohou být efektivně přesunuty do vakuoly bez přítomnosti aktinových vláken (Kim *et al.*, 2005).

2.2.4 Cytoskelet během buněčného dělení

Mitotické dělení rostlinné buňky je dynamický proces, který zahrnuje reorganizaci cytoskeletu. V interfázni buňce jsou aktinová vlákna náhodně rozmístěna v kortikální cytoplasmě a okolo jádra. Nachází se také v plasmodesmatech, kde se účastní intercelulárního transportu proteinů a jiných makromolekul (Kost *et Chua*, 2002).

Mikrotubuly se také nachází v kortikální cytoplasmě a před dělením buňky formují kolem jádra tzv. preprofázový prstenec (PPB), který určuje rovinu buněčného dělení a polohu fragmoplastu. PPB také obsahuje aktinová vlákna. Když v pozdní profázi dojde k rozpuštění jaderné membrány, mizí i samotné PPB (Seagull, 2016).

V další fázi buněčného dělení (metafáze) mikrotubuly tvoří dělicí vřetenko, které nemá přesně vymezené póly, protože oproti živočišným buňkám rostlinná buňka neobsahuje centrozomy (Kost *et Chua*, 2002). Na centromery spiralizovaných chromosomů se pomocí bílkoviny kinetochoru připojuje dělicí vřetenko. Během anafáze je dělicí vřetenko zodpovědné za rozchod sesterských chromatid na opačný pól buňky.

V průběhu cytokinese se z mikrotubulárního cytoskeletu tvoří fragmoplast. V blízkosti fragmoplastu se nachází Golgiho aparát, od kterého se odpojují vesikuly a ty putují do středu fragmoplastu. Dochází ke splývání vesikul a směrem od středu se tvoří buněčná přepážka, která je tvořená kalózou. Později kalózu nahrazuje pektin a z buněčné přepážky se stává střední lamela. V konečné fázi se na střední lamelu připojuje primární stěna, která obsahuje celulózu a dochází k cytokinesi (Votrubová, 2010).

2.2.5 Markery cytoskeletu

Pro studium cytoskeletu rostlinných buněk se využívá vizualizace pomocí fluorescenčního značení. Fluorescenční proteiny jsou široce využívány, protože jejich expresi můžeme pozorovat *in vivo* nebo *in vitro* pomocí fluorescenční mikroskopie. Můžeme tak pozorovat strukturu a dynamické procesy probíhající v cytoskeletu (Chudakov *et al.*, 2010).

Jako první byl objeven GFP (green fluorescent protein) a to v medúze *Aequorea victoria*. GFP je 27 kDa protein, který emituje zelené světlo (Johnson *et Shimomura*, 1978). Postupně vznikaly různé modifikace GFP, jako například YFP (yellow fluorescent protein), který emituje žluté záření. Dalším fluorescenčním proteinem je RFP, který byl izolován z korálnatců a je znám také pod zkratkou DsRed (Roh *et al.*, 2013). DsRed je tetramerní protein a jeho modifikací na monomer se vyvinul nový fluorescenční protein známý jako mCherry, který je v současné době široce využíván (Shen *et al.*, 2017).

Pro vizualizaci aktinu se využívá fluorescenční protein spojený s aktin vazebnou doménou, která se váže na aktin. Sestrojí se vektor, který musí obsahovat promotor, gen markeru, reportérový gen a terminátor (Ivanov *et Harrison*, 2014). Vektor se transformuje do rostliny nejčastěji pomocí bakterie *Agrobacterium*.

Prvním markerem pro vizualizace F aktinu se stal GFP spojený s aktin vazebnou doménou myšího talinu 1 (Kost *et al.*, 1998), který ovšem nedokázal označit všechna aktinová vlákna v rostlinné buňce (El-Assal *et al.*, 2004). Dalším příkladem aktin vazebného proteinu je Fimbrin 1 z *A. thaliana* a spojením s fluorescenčním proteinem mCherry vzniká konstrukt *FIMI-ABD2-mCherry* (Kijima *et al.*, 2018). Sheahan *et al.* (2004) dokázal, že konstrukt *GFP-fABD2* poskytuje detailní vizualizaci aktinových vláken v různých rostlinných druzích, a to v *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* a *M. truncatula*.

Dnes je pro pozorování aktinových filament využíván LifeAct, což je 17 aminokyselin dlouhý peptid, který byl izolován z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tento peptid se

vyskytuje pouze u příbuzných kvasinky *S. cerevisiae* a vyšší eukaryota ho neobsahují. Spojením LifeActu s fluorescenčním proteinem vzniká spolehlivý marker aktinového cytoskeletu (Riedl *et al.*, 2008).

Mikrotubuly se také značí fúzí fluorescenčního proteinu s vazebnými doménami mikrotubulin-asociovaných proteinů. Často využívaná je tubulin-vážící doména ze savčího proteinu MAP4 (Marc *et al.*, 1998).

Pro vizualizaci a lokalizaci buněčných struktur je také možné využít imunocytochemické metody zahrnující tvorbu tenkých řezů a použití protilátek (Dyachok *et al.*, 2016). Protilátky mohou být značené například fluorescenčně, radioaktivně nebo enzymaticky. Tvorba specifických protilátek je ovšem časově a finančně náročná a v případě přítomnosti blízkce příbuzných genů se může vázat nespecificky (Dangol *et al.*, 2017).

2.3 Transformační techniky *M. sativa*

Transformace genetické informace znamená přenos cizorodé DNA do hostitelské buňky. Průchod transgenu přes buněčnou stěnu rostlinné buňky je umožněn biologickými nebo fyzikálními metodami. Tvoří se tak transgenní organismy, které mají požadované vlastnosti. U rostlin, především zemědělských plodin, se upravují jejich nutriční vlastnosti, zvyšuje se jejich úrodnost a odolnost vůči suchu, UV záření, solnému stresu nebo herbicidům. Také se tvoří rostliny odolné proti hmyzu, bakteriím a virusům (Rivera *et al.*, 2012).

Transformační techniky můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. U přímých metod dochází k fyzikálnímu narušení buněčné stěny buňky. Mezi přímé metody patří například mikroinjekce, elektroporace, nebo biolistická metoda. Do nepřímých technik řadíme transformaci za pomoci plasmidu bakterie *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes* (Rao *et al.*, 2009, Rivera *et al.*, 2012).

Pro transformaci *M. sativa* bylo využito mnoho metod. Nejčastěji se využívá transformace za využití *Agrobacteria* (Samac *et Austin-Phillips*, 2006). Jako zdroj explantátu pro transformaci se mohou využít kotyledony, nody kotyledonů, hypokotyl nebo listy (Zhang *et al.*, 2010). Pro transformaci je nutné použít genotyp, který má dobré regenerační vlastnosti. Takovým genotypem je Regen SY nebo Regen S (Kirti, 2008). Ovšem tyto genotypy nemají v zemědělství široké využití, protože nejsou dostatečně odolné vůči nemocem a hmyzím škůdcům a nemají dostatečný výnos (Weeks *et al.*, 2008).

Dále byla *M. sativa* transformována metodou elektroporace (Harrison *et al.*, 1991), biolistickou metodou (Huang *et Zhang*, 1999) nebo metodou *in planta* (Weeks *et al.*, 2008).

2.3.1 Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens je gram negativní půdní bakterie, která napadá kořenový systém především dvouděložných rostlin (Bourras *et al.*, 2015). Tato bakterie je schopná přirozeně vložit určitou část své DNA z Ti (tumor inducing) plasmidu do genomu hostitele. Onkogeny z Ti plasmidu zapříčiňují neorganizovaný růst infikované rostliny, protože kódují proteiny zapojené do syntézy rostlinných růstových hormonů. Způsobují tak onemocnění zvané Crown gall (Zhu *et al.*, 2000, Valentine, 2003).

Různé kmeny *Agrobacterium* mohou infikovat široké spektrum organismů. Kromě transformace dvouděložných rostlin jsou známé případy úspěšné transformace jednoděložných rostlin, kvasinek, askomycet a basidiomycet (Gelvin, 2003).

Díky schopnosti vložit genetickou informaci do rostlinné DNA se tato bakterie stala biotechnologickým nástrojem pro tvorbu geneticky modifikovaných plodin.

2.3.1.1 Mechanismus transformace

Ti plasmid má velikost od 200 do 800 kbp a jsou na něm umístěny geny spojené s replikací plasmidu, virulencí a katabolismem opínů. Také každý Ti plasmid obsahuje T-DNA (transferovou DNA), kterou bakterie integruje do genomu hostitele. T-DNA je od zbytku Ti plasmidu oddělena levou a pravou hraniční sekvencí, které mají velikost 25 bp. T-DNA má velikost od 10 do 30 kbp a tvoří tak méně než 10 % z Ti plasmidu (Gelvin, 2003). T-DNA kóduje geny rostlinných hormonů (auxiny a cytokininy), které jsou zapotřebí ke tvorbě nádorů a také kóduje enzymy zodpovědné za produkci opínů. Opiny jsou deriváty aminokyselin a sacharidů a jsou tvořeny v transformované rostlinné buňce. Tam mohou být katabolyzovány bakteriemi, kterým slouží jako zdroj energie při infekci rostliny (Christie *et Gordon*, 2014).

Celý proces přenosu T-DNA z *A. tumefaciens* do rostlinných buněk závisí na aktivitě vir genů, které se také nachází na Ti plasmidu. Vir region Ti plasmidu octopinového typu se skládá ze sedmi operonů: VirA, VirB, VirC, VirD, VirE, VirF a VirG, které kódují enzymy zodpovědné za přenos transferové DNA do rostlinné buňky (Sheng *et Citovsky*, 1996).

Poraněná rostlina produkuje fenolické látky, jako je acetosyringon, a monosacharidové komponenty z buněčné stěny. Monosacharidy se v bakterii váží na periplasmový

sacharid-vážíci protein ChvE, který poté interaguje s VirA proteinem. VirA také slouží jako receptor fenolických látek. Dochází k autofosforylaci VirA proteinu a následně VirA fosforyluje VirG protein. Nefosforylovaný VirG je nefunkční, fosforylaci tohoto proteinu dochází k aktivaci transkripce vir genů. (Kemner *et al.*, 1997; Gelvin, 2003).

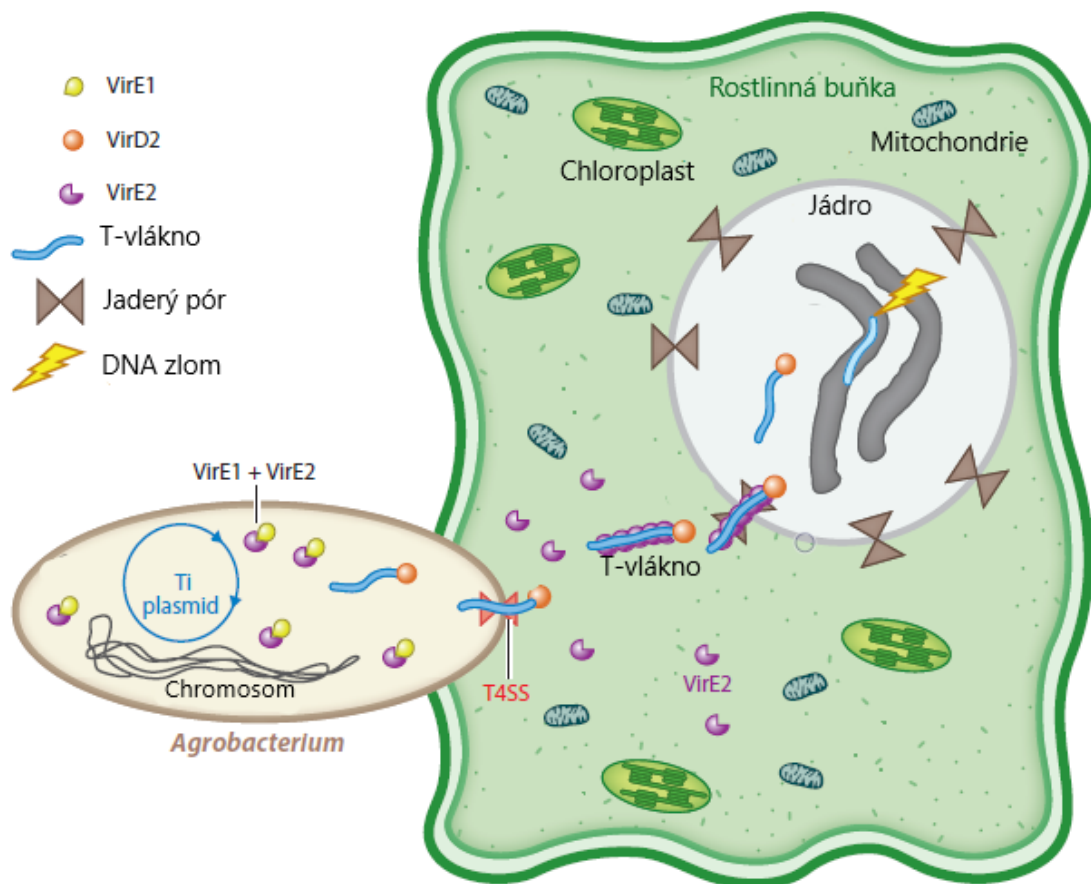
Pro správné vyštěpení T-DNA z Ti plasmidu jsou důležité endonukleasy, jako jsou proteiny VirD1 a VirD2. T-DNA je vyštěpena jako jednovláknová DNA v místech hraničních sekvencí. Protein VirD2 se navíc kovalentně váže pouze na 5' konec pravé hraniční sekvence T-DNA, a tím udává polaritu transferového vlákna. VirD2 je přenášen spolu s T-DNA do rostlinné buňky, protože obsahuje jádro-lokalizující sekvenci, která pomáhá transferové vlákno navádět do jádra rostlinné buňky (Mysore *et al.*, 1998).

Po celé délce je na T-DNA navázaný protein VirE2 (Obr. 3), který se váže pouze na jednovláknovou DNA. Tento protein chrání transferovou DNA před 3' a 5' exonukleasami a také před endonukleasami. Zabraňují tak degradaci T-DNA v rostlinné buňce. Stejně jako VirD2, tak i VirE2 obsahuje jádro-lokalizující sekvenci (Zupan *et al.*, 2000).

T-vlákno a virulentní proteiny se z bakterie do rostlinné buňky přenesou pomocí sekrečního systému typu 4, který je charakteristický pro bakterie rodu *Agrobacterium*. Tento sekreční systém je tvořen především operonem VirB a je nezbytný pro virulenci. Dále se na tvorbě sekrečního systému typu 4 podílí VirD4 protein (Zupan *et al.*, 2000).

Většina VirB proteinů vytváří kanál nebo slouží jako ATPasy, které vytváří energii potřebnou při tvorbě kanálu a pro přenos transferové DNA. Proteiny VirB2, VirB5 a nejspíš i VirB7 tvoří T-pilus, přičemž protein VirB2 je jeho hlavní složkou (Gelvin, 2003). T-pilus je zanořený ve vnitřní membráně bakterie a prochází přes vnější membránu. ATPasovou aktivitu plní proteiny VirB4 a VirB11, které mají hexamerní strukturu a jsou uloženy okolo T-pilusu (Middleton *et al.*, 2005).

Funkce T-pilusu není úplně jasná. Předpokládá se, že T-pilus může sloužit jako přímý kanál, který „injektuje“ T-DNA do cytosolu rostlinné buňky. Nebo T-pilus může sloužit jako „háček“, který zajistí kontakt mezi bakteriální a hostitelskou buňkou. Dojde k vytvoření póru a transferová DNA je přenesena do hostitelské buňky (Kado, 2000).



Obr. 3 Přenos T-DNA do genomu rostlin (upravené podle Gelvin, 2017). T-DNA je pomocí VirD2 proteinu vyštěpena z Ti plasmidu ve formě jednovláknové DNA. Na jednovláknovou T-DNA se vážou VirE1/E2 proteiny zajišťující ochranu před rostlinnými nukleasami. T-DNA prostupuje do rostlinného jádra přes jaderný pór a v místě vzniku jedno/dvouvláknového zlomu je začleněna do genomu rostliny.

Posledním krokem přenosu T-DNA je jeho začlenění do rostlinného chromosomu. Jak již bylo zmíněno výše, T-DNA je translokována z cytoplasmy do jádra buňky pomocí jádro-lokalizující sekvence, která se nachází na proteinech VirD2 a VirE2. T-DNA vniká do jádra přes jaderný pór. V jádře proteiny VirE2 z T-DNA disociují, ovšem není známo, zda disociuje i VirD2, nebo je vložen společně s transferovou DNA do rostlinného genomu. T-DNA se také před integrací přemění z jednovláknové DNA na dvojitěvláknovou (dsDNA) (Gelvin, 2017).

Pro integraci je důležitá aktivita řady bakteriálních a také rostlinných faktorů (Li *et* Pan, 2017). V genomové DNA rostliny vznikne na náhodném místě dvojřetězcový zlom (double strand break), kde se poté včlení T-DNA. Následně dojde k ligaci mezi genomovou DNA rostliny a transferovou DNA pomocí opravných mechanismů dvojřetězcových zlomů. Mezi takové opravné mechanismy patří například nehomologní

spojování volných konců (non-homologous end joining), které může hrát roli v integraci T-DNA (Nicolia *et al.*, 2017).

2.3.1.2 Využití *Agrobacterium tumefaciens* v biotechnologiích

Pojem biotechnologie může být definován jako využití živých organismů a jejich metabolických drah pro potřeby člověka, především v zemědělství, medicíně, potravinářství nebo farmacii. Biotechnologie jsou využívány již velice dlouhou dobu, kdy lidé již v dávné minulosti dokázali vyrobit víno, pivo, sýry a další produkty (Chawla, 2002).

Velkým úspěchem v rostlinných biotechnologiích byl objev a pochopení mechanismu transformace pomocí *Agrobacteria*. Pro využití *Agrobacteria* pro genové inženýrství je třeba upravit Ti plasmid tak, aby neobsahoval geny pro syntézu auxinů a cytokininů a nedocházelo tak při agroinfiltraci k tvorbě nádorů. Do míst mezi hraniční sekvence může být místo genů pro auxiny a cytokininy inkorporován gen zájmu. Takovému plasmidu, který nezpůsobuje tumory, se říká „odzbrojený“ (disarmed) Ti plasmid. Příkladem odzbrojeného plasmidu je pGV3850 (Zambryski *et al.*, 1983, Wood *et al.*, 2001).

Odzbrojené Ti plasmidy se ovšem jako klonovací vektory nepoužívají, a to kvůli jejich nadměrné velikosti, špatné manipulaci *in vitro* a také proto, že se nedokáží replikovat v *E. coli*. Také tyto plasmidy neobsahují dostatek restričních míst, které jsou důležité pro vložení požadovaného genu zájmu při klasickém klonování za využití restričních endonukleáz. Proto byly vyvinuty jiné metody, jako kointegrační klonovací vektory nebo binární vektorový systém. (Lee *et* Gelvin, 2008).

Princip kointegračních klonovacích vektorů spočívá v rekombinaci homologních úseků klonovacího vektoru, který je namnožen v *E. coli* a obsahuje gen zájmu, počátek replikace a selekční markery, a odzbrojeného Ti plasmidu nacházejícího se v *Agrobacteriu*. Dojde ke konjugaci a klonovací vektor je díky homologním úsekům začleněn do Ti plasmidu. Vznikne kointegrační plasmid, který je schopen infikovat rostlinu (Fraley *et al.*, 1985; Lee *et* Gelvin, 2008).

Binární vektorový systém sestává ze dvou oddělených plasmidů – binárního vektoru a pomocného Ti plasmidu. Binární vektor obsahuje požadovaný gen, který se nachází mezi hraničními sekvencemi, počátek replikace pro *E. coli* i *Agrobacterium*, selekční marker pro rostlinou i bakteriální selekci. Pomocný plasmid obsahuje vir oblast potřebnou pro přenos transgenů nacházejícím se na binárním vektoru (Bevan, 1984; Chawla, 2002).

Ve srovnání s kointegračními klonovacími vektory má binární vektorový systém několik výhod (Chawla, 2002, Lee and Gelvin 2008):

1. nedochází k rekombinaci mezi plasmidy,
2. binární plasmid je menší, a proto je vyšší účinnost transformace,
3. transformační proces je při použití binárního vektoru mnohem rychlejší.

2.3.2 Elektroporace

Elektroporace je účinná transformační technika, kdy se pro vnesení cizorodé DNA do rostliny používá vysoké napětí, které vytvoří póry v cytoplasmatické membráně, přes které může DNA proniknout. Využívá se také pro přenos lipidů, proteinů nebo RNA dovnitř buňky. Velice často používaná technika je elektroporace protoplastů, což jsou buňky zbavené buněčné stěny pomocí celuláz a pektináz (Rivera *et al.*, 2012). Délka elektrického impulsu výrazně ovlivňuje účinnost transformace. Pokud je elektrický impuls kratší 100 μs , tak se integrita cytoplasmatické membrány dokáže obnovit (Djuzenova *et al.*, 1996; Tugrut-Kara *et al.*, 2010). Další aspekty, které mohou ovlivnit úspěšnost elektroporace jsou: síla napětí, počet pulsů, složení elektroporačního pufru nebo koncentrace plasmidu (Kosturkova, 1993).

Po elektroporaci protoplastů je nutné regenerovat celou novou rostlinu. To se děje přes somatickou embryogenezi, kdy se složením kultivačního média indukuje tvorba kalusu. Změnou poměru fytohormonů poté dochází k indukci somatických embryí.

Kosturkova (1993) úspěšně transformovala protoplasty získané z hypokotylu *M. sativa* a protoplasty odvozené z meristemického pletiva *M. varia*. Nejvíce stabilně transformovaných rostlin bylo získáno při použití jednoho pulsu o intenzitě elektrického pole 750 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ a délce pulsu 1,5 ms. Konkrétně 34 % rostlin regenerovaných z hypokotylových a meristemických protoplastů bylo stabilně transformovaných.

Mimo *Medicago* je pomocí elektroporace možné transformovat další plodiny, jako je kukuřice (Pescitelli *et al.*, 1995), rýže (Xu *et al.*, 1994) nebo pšenice (He *et al.*, 1994).

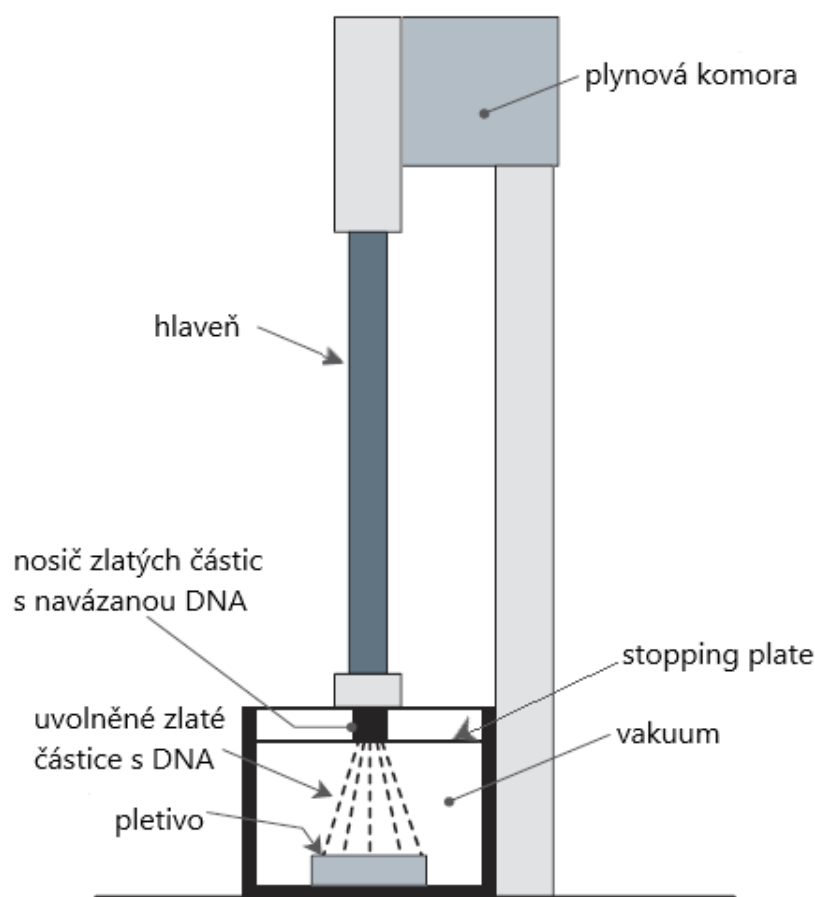
2.3.3 Biolistická metoda

Biolistická metoda je také známá pod názvem mikropojektilové bombardování. Princip této metody spočívá v urychlení nosné částice, která je na povrchu pokrytá požadovanou DNA. Částice s DNA jsou nastřelovány do rostlinné buňky a DNA tak může být zabudováno do genomu rostlin (Castellanos-Hernández *et al.*, 2009; Sood *et al.*, 2011). Nosná částice je tvořená nejčastěji kovem, a to zlatem, wolframem nebo platinou, a je menší než rostlinná buňka. V průměru má okolo 0,45-1,5 μm . Přes cytoplasmatickou membránu rostlin pronikají díky urychlení plynným heliem (Fang *et al.*, 2012).

Helium se upřednostňuje před dusíkem, protože je lehčí, inertní a expanduje rychleji, čímž umožňuje rychlejší pohyb částic (Carlson *et al.*, 2001).

Zařízení, které se využívá při biolisticke metodě se nazývá genová pistole (Obr. 4). Skládá se z komory, která je naplněná plynem, a z hlavě, ve které je plyn urychlován. Plyn narazí na membránu (rupture disc), která praskne a dojde tak k urychlení nosiče (macrocarrier), který nese zlaté částice s navázanou DNA. Nosič narazí na pórovitou destičku (stopping plate) a dojde k uvolnění jednotlivých mikročástic, které zasáhnou cílené pletivo. Pletivo se během transformace nachází ve vakuu (Sanford *et al.*, 1993).

Biolisticke metodou mohou být transformovány jednotlivé buňky, protoplasty, meristémy, embrya nebo kalusy (Sanford *et al.*, 1993). Původně byla tato metoda vyvinuta pro transformaci jednoděložných rostlin, především obilnin, protože jednoděložné rostliny je náročné transformovat s využitím *Agrobacteria*. Nicméně s využitím této metody je možné transformovat i dvouděložné rostliny, bakterie, houby, a dokonce živočišné buňky (Rakoczy-Trojanowka, 2002, Rivera *et al.*, 2012).



Obr. 4 Schéma genové pistole (upraveno podle Rivera *et al.*, 2012).

Mezi výhody biolistické metody také patří krátký čas transformace, není nutné tvořit protoplasty, protože urychlené částice zlata s navázanou DNA snadno prostupují přes buněčnou stěnu a úspěšnost transformace nezávisí na elektrofyzilogických vlastnostech buněk (Sanford *et al.*, 1993).

Nevýhodou této metody je, že na povrchu nosné částice se požadovaná DNA vyskytuje v mnoha kopiích, což v buňce může způsobit umlčení genu nebo změnu genové exprese (Kohli *et al.*, 2003).

Úspěšnost transformace může ovlivnit několik faktorů, například cílová tkáň, teplota při transformaci, množství nosných částic s navázanou DNA a také množství navázané DNA na jednom nosiči (Christou, 1992; Altpeter *et al.*, 2005).

Periera a Erickson (1992) úspěšně provedli biolistickou metodou transformaci kalusů *M. sativa*. Vnášená DNA obsahovala *NTPII* gen zajišťující rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu. Podařilo se jim vypěstovat několik transgenních rostlin, které byly vůči tomuto antibiotiku rezistentní.

2.3.4 Transformace *in planta*

Tradiční metoda transformace *M. sativa*, jako je transformace explantátů pomocí *Agrobacteria*, zahrnuje využití pouze snadno regenerujících genotypů a kultivaci přes tkáňové kultury. Tato kultivace je zdoluhavá a na materiál finančně náročná. Do kultivačních médií je nutné přidávat fytohormony a také selekční agenty, nejčastěji antibiotika. Selekční agenty jsou důležité v raných fázích vývoje transgenních rostlin pro jejich identifikaci. Ovšem pro využití v zemědělství není žádoucí, aby rostliny obsahovaly geny na rezistenci vůči antibiotiku, kvůli jejich možnému environmentálnímu dopadu (Koning, 2003; Weeks *et al.*, 2008).

Termín *in planta* znamená v překladu v rostlině. Jedná se o transformaci, u které není třeba využívat tkáňové kultury (Jan *et al.*, 2016). Transformace *in planta* má mnoho výhod oproti tradičním transformačním metodám, například není třeba využívat jen genotypy, které mají dobrou regeneraci a je časově a materiálně méně náročná. K tvorbě transformovaných semen dochází již po 5 měsících od počátku transformace, což je o 2 měsíce méně oproti tradiční metodě (Samac *et Austin-Philips*, 2006; Weeks *et al.*, 2008). Protože nedochází k indukci kalusu, snižuje se tak i riziko somaklonální variability (Cheng *et al.*, 1992). Při transformaci není potřebná přítomnost selekčního antibiotika v transgenní DNA. Tím je tento typ transformační metody bezpečnější pro životní prostředí a schvalování případné GMO odrůdy je právně jednodušší (Weeks *et al.*, 2008).

Princip metody *in planta* transformace v případě *M. sativa* spočívá v naříznutí třídních semenáčků v oblasti apikálního meristému a jejich inkubací v roztoku *A. tumefaciens* při současném vortexování za vysokých otáček s přidavkem sterilního písku. Ošetřené semenáčky se přenesou na kokultivační médium s přidavkem DMSO a následně na médium podporující růst semenáčků. Přibližně u 7 % ošetřených semenáčků je sledován výskyt transgenu i v generaci T1 (Weeks *et al.*, 2008).

U *M. truncatula* byl také vyvinut *in planta* transformační protokol. Semenáčky nebo květy byly infiltrovány v roztoku *A. tumefaciens* a semena získaná z těchto rostlin byla poté testována na přítomnost transgenu (Trieu *et al.*, 2000).

Mezi *in planta* metodu transformace se řadí i technika floral dip, která se používá pro transformaci *A. thaliana* a její blízké příbuzné druhy (Liu *et al.*, 1998; Inan *et al.*, 2004). Při transformaci floral dip se v roztoku *Agrobacteria* namáčí nezralé pupeny a cílem je vyvíjející se gynoecium (Desfeux *et al.*, 2000). Naopak *in planta* metoda vyvinutá pro *M. sativa* cílí na infiltraci *Agrobacteria* do meristemických buněk mladých semenáčků (Weeks *et al.*, 2008).

Mezi nevýhody této metody se řadí především nedostatek stabilně transformovaných rostlin v T1 a následujících generacích a také častá tvorba chimérických rostlin (Jan *et al.*, 2016).

2.4 Kultivace *Medicago sativa* v *in vitro* podmínkách

Kultivace v *in vitro* podmínkách se používá pro vědecké účely, kdy je potřebné mít kontrolované podmínky prostředí, ve kterých se rostliny vyvíjí. V *in vitro* podmínkách je možné zajistit sterilní prostředí a kontrolovat složení kultivačních médií, fotoperiodu nebo teplotu.

Pro *M. sativa* bylo vyvinuto několik účinných regeneračních protokolů v *in vitro* podmínkách (Bingham *et al.*, 1975; Mitten *et al.*, 1984; Shetty *et al.*, 1993). Praktická část této bakalářské práce je založena především na transformačním a regeneračním protokolu podle Samac *et al.* (2006).

2.4.1 Somatická embryogeneze u *Medicago sativa*

Navození nepřímé somatické embryogeneze je jednou z hlavních technik, která se využívá pro regeneraci transformovaných rostlin. Jinak tomu není ani u transformace *M. sativa* zprostředkované bakterií *A. tumefaciens*. Je nezbytné, aby z explantátů došlo k indukci kalusu a z něj následně ke vzniku somatických embryí, ze kterých při vhodných podmínkách regeneruje celá nová rostlina. První zmínka o úspěšné regeneraci *M. sativa*

přes proces somatické embryogeneze pochází z počátku 70. let 20. století (Saunders *et al.*, 1972). Výhodou je, že z kalusu je možné získat velký počet somatických embryí a při pravidelném překládání na čerstvé selekční médium kalus vydrží v *in vitro* podmínkách delší dobu (Tian *et al.*, 2002).

Somatická embrya nejsou spojena cévními svazky s pletivem, na kterém se vytvářejí. Také somatická embrya oproti zygotickým akumulují méně zásobních látek, které jsou důležité pro jejich maturaci (Krochko *et al.*, 1992). Dalším rozdílem je nepřítomnost endospermu, který zygotickému embryu dodává všechny potřebné živiny. Nedostatečný vývoj somatických embryí je častý problém při regeneraci *M. sativa* po transformaci. Proto je nutné do kultivačních médií přidat různé organické nutrienty a růstové regulátory (Massoume *et al.*, 2016).

Živné médium se může obohatit organickým extraktem, který obsahuje vitamíny a aminokyseliny. Zlepšit účinnost somatické embryogeneze lze například přidáním kokosové vody (Ahmed *et al.*, 2011), kvasničným extraktem nebo kaseinovým hydrolyzátem do kultivačního média (Joshee *et al.*, 2007).

Bylo dokázáno, že extrakt z *Cuscuta campestris* urychluje dozrávání somatických embryí *M. sativa*, přičemž důležitou roli hraje použitá koncentrace extraktu. Podle Amini *et al.* (2016), je neoptimálnější koncentrace tohoto extraktu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Na druhou stranu, příliš vysoká koncentrace extraktu regeneraci inhibuje. Velikost somatických embryí je také ovlivněna koncentrací extraktu. Při již zmíněné koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ dochází k tvorbě největších embryí.

Do živných médií se přidávají aminokyseliny i samostatně. Množství přidaných aminokyselin má vliv na tvorbu a velikost somatických embryí. Nejpozitivnější vliv na tvorbu somatických embryí u *M. sativa* mají aminokyseliny L-prolin, L-alanin, L-glutamin, L-serin a L-asparagin. L-glutamin bývá ze všech aminokyselin v živných médiích nejvíce zastoupen a slouží rostlině především jako organický zdroj dusíku (Franklin *et al.*, 1994). Přídavek 50 mM L-glutaminu do embryogenního média zvyšuje počet embryí na kalusu, velikost embryí a také se zvyšuje konverze embryí na semenáčky (Lai *et al.*, 1993). Optimální koncentrace L-prolinu je 100 mM, kdy se při této koncentraci tvoří nejvíce somatických embryí (Stuart *et al.*, 1984).

2.4.2 Růstové regulátory, hormony a selekční reagenty v kultivačních médiích

Je známo, že exogenní přídavek fytohormonů do kultivačních médií a jejich vzájemný poměr výrazně ovlivňuje organogenezi. Somatická embryogeneze je ovlivněná

především množstvím auxinů a cytokininů. Pro tvorbu kalusu z explantátů je nutné zvolit vhodné koncentrace těchto fytohormonů v závislosti na pěstovaném druhu a kultivaru rostliny (Litz, 1993).

V případě *M. sativa* je pro navození tvorby kalusu na explantátech nutná přítomnost jak auxinů, tak i cytokininů v kultivačním médiu. Bylo dokázáno, že přítomnost pouze auxinů, konkrétně IAA, není dostačující pro indukci tvorby kalusu (Nolan *et al.*, 1998). Pro indukci kalusu je možné použít například kombinaci 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny (2,4-D, syntetický auxin) a kinetinu (syntetický cytokinin), 2,4-D a zeatinu (přírodní cytokinin) nebo kombinací 2,4-D, kinetinu a zeatinu (Zhang *et al.*, 2010).

Tvorba somatických embryí u *M. sativa* je indukována přenosem na médium, které je bez obsahu růstových regulátorů (Cao *et al.*, 1992; Charest *et al.*, 1996, Samac *et al.*, 2006).

Dalším fytohormonem, který ovlivňuje průběh somatické embryogeneze je kyselina abcisová (ABA), která reguluje dozrávání somatických embryí, zvyšuje ukládání zásobních látek a zabraňuje předčasnému klíčení. V případě kultivace *M. sativa* zvyšuje přídavek ABA hladinu škrobu a mastných kyselin v somatických embryích, čímž zvyšuje jejich vitalitu a schopnost klíčení (Fujii *et al.*, 1990).

Při transformačních technikách se často využívají antibiotika jako selekční markery. Často používaným selekčním antibiotikem je kanamycin, který má ovšem při vyšších koncentracích negativní vliv na indukci a vývoj kalusu, tvorbu somatických embryí a také na růst kořenů. Z tohoto důvodu je nutné zralá embrya kultivovat na médiích bez obsahu kanamycinu. Obecně koncentrace kanamycinu $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ nemá výrazný vliv na růst a vývin rostlin (Zhang *et al.*, 2001).

Pro selekci transformovaného rostlinného materiálu se může také použít systém na bázi toxinu gabaculinu, což je inhibitor glutamát 1-semialdehyd aminotransferasy (GSA) a je pro většinu rostlin toxický. Z *M. sativa* byl izolován gen pro GSA obsahující bodovou mutaci zajišťující rezistenci vůči tomuto toxinu (Ferradini *et al.*, 2011). Protože gen pro GSA je přítomen ve všech rostlinách, předpokládá se, že může být použit pro selekci ve více rostlinných druzích, jako například při transformaci pšenice nebo tabáku (Giancaspro *et al.*, 2012; Ferradini *et al.*, 2016).

2.4.3 Transgenní *Medicago sativa*

Bylo vytvořeno několik transgenních linií *M. sativa*, které jsou odolné vůči různým typům biotického nebo abiotického stresu. Do *M. sativa* byl transformován gen pro fytocestatin.

Jedná se polypeptidy, které fungují jako inhibitory proteas a mají protifungální aktivitu. Působí především proti fytopatogenním houbám rodu *Claviceps*, *Alternaria* nebo *Fusarium* (Joshi *et al.*, 1998). Jsou aktivní také proti nematodům (Samac *et Smigocki*, 2003). Fytocystatiny působí na patogeny tím, že inhibují jejich trávicí enzymy, především amylasu nebo trypsin (Heřmanová *et al.*, 2006).

U *M. sativa* byly dále vyvinuty transgenní linie odolné vůči solnému stresu. Transkripční faktor DREB1 z rostliny *Glycine max* nebo gen NHX2 kódující Na⁺/H⁺ vakuolární antiportér pocházející z rostliny *Triticum aestivum* byl transformován do *M. sativa* (Jin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Pro toleranci na sucho byly vyvinuty transgenní linie nadexprimující transkripční faktor WXP1 (Jiang *et al.*, 2009). Tento transkripční faktor spouští několik genů, které souvisí s tvorbou kutikuly. Rostliny nadexprimující transkripční faktor WXP1 mají posílenou kutikulu a tím pádem jsou odolnější ke stresu suchem. Listy s posílenou kutikulou dokáží zadržet více vody (Zhang *et al.*, 2005).

V dnešní době je činností člověka produkováno nadměrné množství těžkých kovů, které unikají do životního prostředí. Při vysoké koncentraci těžkých kovů v prostředí dochází v rostlině k narušení funkce některých enzymů a dochází k tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů. Pro zvýšení tolerance *M. sativa* k těžkým kovům byla díky Zhang *et Liu* (2011) vyvinuta linie exprimující současně gen GST kódující enzym glutathion-S-transferasu a gen CYP2E1, který kóduje cytochrom P450 2E1. Tento cytochrom se vysktuje v lidském organismu, kde hraje důležitou roli při metabolismu léčiv a xenobiotik (Zhang *et al.*, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Alfa Aesar: Phytigel

Duchefa Biochemie: 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D), fosfinitricin, Gamborg B5 médium základní směs solí, Gamborg B5 směs vitamínů (1000x), glutamin, kanamycin, kinetin, Murashige & Skoog (MS) základní směs solí, Nitsch & Nitsch směs vitamínů (1000x), rifampicin, Shenk & Hildebrant směs vitamínů (100x), Shenk & Hildebrant základní směs solí, spectinomycin, ticarcillin disodný

Fermentas: RNasa A

Honeywell Fluka: chlornan sodný (NaClO)

Nippon Genetics: Midori Green

Penta: 70% a 96% ethanol, absolutní ethanol

Qiagen: QIAprep® Spin Miniprep Kit

Sigma-Aldrich: 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina monohydrát (MES), 4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenonadenin (Acetosyringon), agarosa, D-glukosa, dusičnan draselný (KNO₃), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), glycerol, heptahydrát síranu horečnatého (MgSO₄ · 7H₂O), hydroxid draselný (KOH), hydroxid sodný (NaOH), chlorid hořečnatý (MgCl₂), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl₂), kvasničný extrakt, kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová, L-glutation, L-prolin, L-serin, Luria Bertani (LB) broth médium, LB broth médium s agarem, myo-inositol, sacharóza, síran hořečnatý (MgSO₄), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris báze), trypton, Tween 20, octan draselný (CH₃COOK)

Thermo Scientific: 6x DNA loading dye, Bsp119I, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, HindIII, NdeI, NheI, PvuII, XbaI, XhoI

3.1.2 Přístroje

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)

Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)

Centrifuga ROTANA 460R (Schoeller Instruments)
Centrifuga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific)
Elektromagnetická míchačka MSH-420 (Boeco)
Fluorescenční binokulární stereomikroskop Leica M165FC (operační program LAS V 4.0, Leica)
Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
Laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering)
Mikrocentrifuga Microfuge16 (Beckman Coulter)
NanoDrop Lite (Thermo Scientific)
pH metr stolní PC 2700 (Eutech instruments)
Skener Image Scanner III (Epson)
Spektrofotometr Smart Spec™ plus (Bio-Rad)
Sterilní laminární box (Merci)
Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)
Třepačka Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan)
Třepačka s nastavitelnou teplotou a časem ES-20 (Biosan)
Vizualizátor Gel Doc™ EZ Imager (operační program Image Lab 4.0.1., Bio-Rad)
Vortex Microspin FV2400 (Biosan)
Konfokální laserový mikroskop LSM 710 (operační program Zen Black 2012, Zeiss)
Zoomovací fluorescenční stereomikroskop Axio Zoom.V16 (operační program Zen Blue 2011, Zeiss)

3.1.3 Software

ApE - A plasmid editor v2.0.37, EPSON scan, LAS V 4.0, Image Lab 4.0.1 a 6.0.1, Microsoft Office PowerPoint 365, Zeiss Zen 2012 Black software, Zeiss Zen 2011 Blue software.

3.1.4 Roztoky a média

LB tuhé médium

40 g·l⁻¹ LB médium s agarem
 milliQ H₂O
 sterilizace autoklávováním

LB tekuté médium

25 g·l⁻¹ LB médium
milliQ H₂O
pH 7,2 (úprava pomocí 1 mol·l⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním

SOC médium

20% (w/v) trypton
0,5% (w/v) kvasničný extrakt
10 mmol·l⁻¹ NaCl
2,5 mmol·l⁻¹ KCl
milliQ H₂O
pH 7,5 (3 mol·l⁻¹ a 1 mol·l⁻¹ NaOH), sterilizace autoklávováním, po
vychlazení přidání:
20 mmol·l⁻¹ D-glukosa
10 mmol·l⁻¹ MgCl₂
sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 μm)

Roztoky pro sterilizaci listů *M. sativa*

Roztok 1

70% (v/v) ethanol

Roztok 2

0,1% (w/v) Tween 20
milliQ H₂O
sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 μm)

Roztok 3

0,05% (w/v) Tween 20
1% (v/v) hypochlorid sodný
milliQ H₂O
sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 μm)

SH médium

3,2 g·l ⁻¹	Shenk & Hildebrant základní směs solí
30 g·l ⁻¹	sacharosa
0,5 g·l ⁻¹	MES
	milliQ H ₂ O
	pH 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním a po vychlazení média (55 °C) přidání:
10 ml·l ⁻¹	100x Schenk and Hildebrant směs vitamínů

Zásobní roztok kinetinu (0,1 mg/ml)

4 mg	kinetin
80 µl	1 mol·l ⁻¹ NaOH
39,92 ml	milliQ H ₂ O
	sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 µm)

Zásobní roztok 2,4-D (1 mg/ml)

40 mg	2,4-D
300 µl	1 mol·l ⁻¹ NaOH
39,7 ml	milliQ H ₂ O
	sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 µm)

Roztok aminokyselin (250 ml)

6,65 g	L-glutamin
0,83 g	L-serin
0,004 g	adenin
0,083 g	L-glutation
	milliQ H ₂ O
	sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 µm)

B5H médium k indukci tvorby kalusů

3,1 g·l ⁻¹	Gamborg B5 základní směs solí
0,5 g·l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g·l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0,5 g·l ⁻¹	prolin

30 g·l ⁻¹	sacharosa
4,5 g·l ⁻¹	phytagel
	milliQ H ₂ O
	pH 5,7 (1 mol l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním, po vychlazení přidání:
1,0 mg·l ⁻¹	2,4-D (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 2,4-D 1,0 mg·ml ⁻¹)
0,1 mg·l ⁻¹	kinetin (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku kinetinu 0,1 mg·ml ⁻¹)
1,0 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg B5 směs vitamínů
30 ml·l ⁻¹	zásobní roztok aminokyselin

B5H médium k selekci transformovaných rostlinných pletiv

3,1 g·l ⁻¹	Gamborg B5 základní směs solí
0,5 g·l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g·l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0,5 g·l ⁻¹	prolin
30 g·l ⁻¹	sacharosa
4,5 g·l ⁻¹	phytagel
	milliQ H ₂ O
	pH 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním, po vychlazení přidání:
1,0 mg·l ⁻¹	2,4-D (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 1,0 mg·ml ⁻¹)
0,1 mg·l ⁻¹	kinetin (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 0,1 mg·l ⁻¹)
500 µg·ml ⁻¹	ticarcillin disodný (1 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 500 mg·ml ⁻¹) selekční antibiotikum v požadované koncentraci
1,0 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg B5 směs vitamínů
30 ml·l ⁻¹	zásobní roztok aminokyselin

B50 embryogenní médium

3,1 g·l ⁻¹	Gamborg B5 základní směs solí
0,5 g·l ⁻¹	KNO ₃
0,25g·l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0,5 g·l ⁻¹	prolin
30 g·l ⁻¹	sacharosa

4,5 g·l ⁻¹	phytagel milliQ H ₂ O pH 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním, po vychlazení přidání:
500 µg·ml ⁻¹	ticarcillin disodný (1 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 500 mg·ml ⁻¹) selekční antibiotikum v požadované koncentraci
30 ml·l ⁻¹	zásobní roztok aminokyselin
1,0 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg B5 směs vitamínů

MMS pevné kultivační médium

4,3 g·l ⁻¹	MS základní směs solí
30 g·l ⁻¹	sacharóza
0,1 g·l ⁻¹	myoinositol
4,5 g·l ⁻¹	phytagel milliQ H ₂ O pH 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním, po vychlazení přidání:
1 ml·l ⁻¹	1000x Nitsch & Nitsch směs vitamínů

MS pevné kultivační médium

4,3 g·l ⁻¹	MS základní směs solí
30 g·l ⁻¹	sacharosa
4,5 g·l ⁻¹	phytagel milliQ H ₂ O pH 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace autoklávováním

Kokultivační roztok pro tranzientní transformaci

10 mmol·l ⁻¹	MES (pH 5,6)
10 mmol·l ⁻¹	MgCl ₂
150 µmol·l ⁻¹	acetosyringon milliQ H ₂ O sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 µm)

1 mol·l⁻¹ Tris-HCl

12,1 g Tris báze
100 ml milliQ H₂O
pH 7,6 (1 mol·l⁻¹ a 0,1 mol·l⁻¹ HCl)
sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 μm)

10 mol·l⁻¹ Tris-HCl

1 ml 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl
99 ml milliQ H₂O
sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 μm)

Roztoky pro přípravu chemokompetentních buněk *E. coli*

Roztok A

20 ml 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6)
0,19 g MgCl₂

Roztok B

20 ml 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6)
0,22 g CaCl₂

Roztok C

17 ml 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6)
0,22 g CaCl₂
3 ml 100% (v/v) glycerol
sterilizace roztoků A,B a C filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22 μm)

Tris-acetátový pufr (TAE, 50x koncentrovaný zásobní roztok)

121 g Tris báze
28,55 ml kyselina octová
50 ml EDTA
421,45 ml milliQ H₂O
pH 7,8

1% (w/v) agarosový gel

0,8 g agarosa

80 ml	1x TAE pufr
3 μ l	Midori Green

P1 pufr

2 ml	0,5 mol·l ⁻¹ EDTA
5 ml	1 mol·l ⁻¹ Tris-HCl pH 8
1 ml	10 mg·ml ⁻¹ RNasa
92 ml	milliQ H ₂ O

P2 pufr

5 ml	20% (w/v) SDS
2 ml	10 mol·l ⁻¹ NaOH
93 ml	milliQ H ₂ O

P3 pufr

3 mol·l ⁻¹	octan draselný
3 mol·l ⁻¹	kyselina octová

3.1.5 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Medicago sativa L. divoký typ Regen SY (RSY): kultivar s vysokou schopností regenerace, využit pro stabilní transformaci pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí markery cytoskeletu.

Medicago sativa L. transgenní linie nesoucí konstrukt *p35S::tagRFP-AtTUA6* (dále *tagRFP:TUA6*): linie byla připravena transformací listů divého typu RSY pomocí bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *tagRFP:TUA6*. Procesem somatické embryogeneze byly z transformovaných listových explantátů regenerovány transgenní rostliny, které stabilně exprimovaly tento konstrukt. Jejich listy byly použity pro indukci somatické embryogeneze pro získání dalších transgenních rostlin.

Nicotiana benthamiana L.: tranzientní transformace epidermálních buněk listů pomocí *A. tumefaciens* pro ověření funkčnosti markerů cytoskeletu.

Rostlinný materiál byl kultivován v kultivační místnosti, kde byla nastavena konstantní teplota 21 °C, 71 % vlhkost a fotoperioda 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Rostliny v *in vitro* podmínkách byly kultivovány na živných médiích v Petriho miskách. Rostliny v *ex vitro* podmínkách byly pěstovány v květináčích obsahující půdní substrát s perlitem.

3.1.6 Bakteriální materiál

Escherichia coli TOP10: tento kmen je využíván pro propagaci vektorů (pDNOR, pDEST pro Gateway® systém) s přerušným genem *ccdB*, jehož produkt je toxický pro standardní kmeny. Připravené konstrukty byly namnožené v chemicky kompetentních buňkách *E. coli* a následně ověřené. Expresní klony byly potom použity pro transformaci *A. tumefaciens*.

A. tumefaciens kmen GV3101 (pMP90): nese pomocný plasmid pMP90 s rezistencí k antibiotiku gentamycinu. V genomové DNA obsahuje gen pro rezistenci k antibiotiku rifampicinu. Tento kmen byl použit pro tranzientní a stabilní transformaci.

A. tumefaciens kmen GV3101 (pMP90) nesoucí marker cytoskeletu *p35S::GFP-MBD* (dále jen *MAP4::GFP*), funkčnost kterého již byla ověřena (Vyplelová *et al.*, 2018). Sloužil jako kontrola tranzientní a stabilní transformace.

3.1.7 Použité plasmidy

Pro shrnutí je seznam všech plasmidů a jejich resistance uveden v Tab. 1. Plasmid pCMU-ACTLr (*pAtUBQ10::LifeAct-mCherry*) byl připraven v laboratoři Maria Harrison více-komponentovým Gateway® klonováním (Invitrogen) a pořízen od firmy Addgene (Ivanov *et al.*, 2014).

Další plasmidy použity v této práci již byly připraveny klasickým (restrikčním) klonováním (dostupné na OBB, CRH): *tagRFP:TUA6* v binárním vektoru pBI121Hm, *p35S::mRFPL-TUB6* (dále *mRFPL:TUB6*) v binárním vektoru pCAMBIA 1300.

Jako pozitivní kontrola tranzientní transformace se ve všech případech použil ověřený konstrukt *MAP4::GFP* naklonovaný v binárním vektoru pCB302.

Tab. 1 Seznam použitých plasmidů (expresních klonů) a jejich antibiotické rezistence.

Název konstruktů	Rezistence (bakterie)	Koncentrace antibiotik (μg/ml)	Rezistence (rostliny)	Koncentrace antibiotik (μg/ml)
<i>lifeact:mCherry</i>	Spe	100	Kan	50
<i>tagRFP:TUA6</i>	Kan/Hyg	50/30	Kan/Hyg	25/30
<i>mRFPL:TUB6</i>	Kan/Hyg	50/30	Hyg	30
<i>MAP4:GFP</i>	Kan	50	Fos	10

Legenda: Fos – fosfomicin, Hyg – hygromycin, Kan – kanamycin, Spe – spectinomycin.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava kultivačních médií

- Přibližně $\frac{3}{4}$ výsledného objemu milliQ H₂O bylo umístěno na elektromagnetickou míchačku.
- Příslušné navážené chemikálie byly postupně rozpuštěny za stálého míchání v milliQ H₂O.
- Následně bylo upraveno pH roztoku, a to nejdříve na hodnotu asi o 2 desetiny nižší, než je požadovaná hodnota.
- Po přidání milliQ H₂O na požadovaný objem se pH roztoku se upravilo na konečnou hodnotu.
- Médium bylo rozlito do skleněných lahví a bylo sterilizováno autoklávováním.
- Antibiotika, vitamíny, fytohormony a aminokyseliny byly přidávány do médií až po autoklávování a vychlazení na 55 °C, aby se zamezilo jejich degradaci.

3.2.2 Příprava chemokompetentních buněk *E. coli*

- Do 3 ml tekutého LB média bylo přidáno 15 µl bakteriální kultury *E. coli* TOP10. Startovní kultura se nechala kultivovat přes noc na třepačce (200 RPM, 37 °C).
- Do 100 ml LB média bylo inokulováno 1,5 ml noční kultury. Kultivace probíhala na třepačce (200 RPM, 2 h, 37 °C).
- Bakteriální kultura s OD₆₀₀ v rozmezí od 0,3 do 0,5 se rozlila do 50 ml kónických zkumavek (falkon) a nechala inkubovat na ledu 10 min.
- Poté se kultura centrifugovala (3220 RCF, 20 min, 4 °C).
- Supernatant byl odstraněn, pelet následně resuspendován v 1250 µl vychlazeného roztoku A. Směs se nechala inkubovat na ledě 30 min a následně byla centrifugována (3220 RCF, 20 min, 4 °C).
- Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 1250 µl vychlazeného roztoku B, inkubován 30 min na ledě a centrifugován (3220 RCF, 20 min, 4 °C).
- Pelet byl resuspendován v 2 ml vychlazeného roztoku C.
- Do vychlazených (-80 °C) mikrozkušavek bylo pipetováno po 50 µl chemokompetentních buněk, které byly zmrazeny v tekutém dusíku a poté uloženy v hluboko mrazícím boxu (-80 °C).

3.2.3 Transformace chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10

- 50 µl chemokompetentních buněk *E. coli* bylo ponecháno rozmraznout na ledu.
- K bakteriím bylo přidáno 3 µl plasmidu, směs se opatrně promíchala a inkubovala 30 min na ledě.
- Následovala inkubace vzorků v termobloku při 42 °C po dobu 60 s.
- Vzorky byly schlazeny na ledu 2 min, a potom jemně resuspendovány s 300 µl SOC média.
- Směs byla inkubována na třepačce (180 RPM, 1 h, 37 °C).
- Bakteriální kultury byly rozetřeny na LB agarové plotny s obsahem příslušného antibiotika pomocí sterilních hokejek.
- Plotny byly kultivovány přes noc při 37 °C.

3.2.4 Příprava noční kultury z bakteriálních kolonií a příprava konzerv

- Po 24 (*E. coli*) nebo 48 hod kultivace (*A. tumefaciens*) byly pomocí sterilního párátko přeneseny jednotlivé kolonie do 6 ml tekutého LB se selekčním antibiotikem. V případě kultivace *A. tumefaciens* se vždy přidávalo i antibiotikum rifampicin s výslednou koncentrací 100 µg·ml⁻¹.
- Bakteriální kultury byly kultivovány přes noc na třepačce při 37 °C (*E. coli*) nebo 28 °C (*A. tumefaciens*) a při 180 – 200 RPM.
- Další den bylo 500 µl noční kultury smícháno s 500 µl 50% (v/v) sterilního glycerolu.
- Směs byla opatrně promíchána pipetou a zamražena v tekutém dusíku.
- Bakteriální konzervy se uchovávají v hluboko mrazícím boxu.

3.2.5 Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kit

- Návod a chemikálie potřebné pro izolaci plasmidové DNA jsou součástí QIAprep® Spin Miniprep Kitu.
- Koncentrace plasmidové DNA byla změřena na nanodropu a byla ověřena restričním štěpením.
- Izolovaná plasmidová DNA je uchovávána při -20 °C.

3.2.6 Izolace plasmidové DNA (za použití pufrů P1, P2, P3)

- Celý objem noční kultury byl postupně po 2 ml centrifugován (16000 RCF, 2 min, 21 °C). Supernatant byl po každé centrifugaci odstraněn.
- K peletu bylo přidáno 250 µl P1 pufru s obsahem RNasy A a směs byla resuspendována. V tomto kroku došlo ke štěpení RNA a k narušení struktury buněčné stěny chelatací dvojmocných kationtů.
- Ke směsi bylo přidáno 250 µl lyzačního P2 pufru a vzorky se kývavým pohybem promíchaly a byly inkubovány 5 min při 21 °C.
- Následně bylo přidáno 250 µl P3 pufru a kývavým pohybem byla směs promíchána. Došlo k vysrážení genomické DNA a proteinů ve vzorcích.
- Vzorky byly po dobu 5 min inkubovány na ledu a poté byly centrifugovány (16000 RCF, 15 min, 4 °C).
- Supernatant byl pipetován do nových 1,5 ml eppendorfek a došlo k vysrážení plasmidové DNA smícháním s vymraženým absolutním ethanolem. Směs byla jemně promíchána.
- Vzorky byly inkubovány 30 min – 12 h při -20 °C.
- Proběhla centrifugace (16000 RCF, 20 min, 20 °C), supernatant byl odstraněn.
- Vzorky byly centrifugovány (16000 RCF, 10 min, 20 °C) a ethanol byl odpipetován.
- Pelety byly sušeny ve flowboxu 10 – 20 min a následně byly resuspendovány ve 30 µl sterilní milliQ H₂O.
- Koncentrace plasmidové DNA byla změřena na nanodropu.
- Izolovaná plasmidová DNA byla ověřena restričním štěpením.

3.2.7 Restriční štěpení a agarosová elektroforéza

- Restriční štěpení bylo navrženo v programu ApE v2.0.37 podle příslušné nukleotidové sekvence použitých plasmidů.
- Jednotlivé složky restričního štěpení (Tab. 2 – 3) byly smíchány v mikrozkuhavce.
- Restriční štěpení probíhalo 2 hod (*E. coli*) nebo přes noc (*A. tumefaciens*) při 37 °C.
- Přítomnost správných velikostí fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou.

- 1% agarosový gel byl rozpuštěn v mikrovlnné troubě a po jeho zchladnutí bylo přidáno barvivo Midori Green pro zviditelnění DNA.
- Po promíchání byl roztok agarosy nalit do elektroforetické formy a nechal ztuhnout při 21 °C.
- Forma s gelem byla poté přenesena do elektroforetické vany a gel byl zalit 1x TAE pufrem.
- Do první a poslední jamky byl nanesen marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.
- Do ostatních jamek byly pipetovány vzorky (10 µl) s nanášecím pufrem 6x DNA loading dye (2 µl) .
- Elektroforéza probíhala při konstantním elektrickém napětí 80 V po dobu 60 – 90 min.
- Gel se poté vizualizoval každých 30 min pomocí transluminátoru Gel Doc™ EZ Imager a vyhodnocoval za použití softwaru Image Lab.

Tab. 2 Složení reakční směsi restričního štěpení plasmidové DNA izolované z *E. coli*

Složka	Množství (µl)
pDNA	1
10x pufr	2,5
enzym	0,5
dH₂O	21
celkem	25

Tab. 3 Složení reakční směsi restričního štěpení plasmidové DNA izolované z *A. tumefaciens*

Složka	Množství (µl)
pDNA	6
10x pufr	1
enzym	0,4
dH₂O	2,6
celkem	10

3.2.8 Transformace chemokompetentních buněk *A. tumefaciens* kmen GV3101

- 200 µl chemokompetentních buněk bylo rozpuštěno na ledu.
- Bylo přidáno 15 µl plasmidové DNA a směs byla opatrně promíchána pipetou.
- Následovalo vymrazování v tekutém dusíku po dobu 5 min.
- Vzorky byly z tekutého dusíku vytaženy a ponechány 15 min při pokojové teplotě.
- Bylo přidáno po 400 µl SOC média a vzorky byly inkubovány na třepačce (200 RPM, 2 hod, 28 °C).
- K agarovému LB médiu byl přidán rifampicin 100 µg/ml (zásobní roztok 50 mg/ml) a požadované množství selekčního antibiotika. Médium bylo nalito po 20 ml do sterilních Petriho misek.
- Bakteriální suspenze byla rozetřena sterilní hokejkou na plotny.
- Petriho misky byly kultivovány 48 hodin při 28°C.
- Jednotlivé kolonie byly přeneseny do tekutého LB média s rifampicinem a selekčním antibiotikem a byly kultivovány na třepačce při 28 °C přes noc.

3.2.9 Tranzientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*

- Rostliny *N. benthamiana* byly několik hodin před plánovanou transformací zality vodou, aby se otevřely průduchy v listech.
- U noční kultury obsahující *A. tumefaciens* s požadovaným konstruktem byla změřena optická hustota při vlnové délce 600 nm.
- Noční kultura byla naředěna, aby OD₆₀₀ bylo rovno 0,5. Výsledný objem byl centrifugován (2000 RCF, 10 min, 4 °C) a poté byl resuspendován v 2 ml kokultivačního média.
- Bakteriální suspenze byla nasáta do injekční stříkačky bez jehly a byla opatrně vtlačena do spodní strany listů.
- Jako negativní kontrola se do listů jedné rostliny vpravilo kokultivační médium bez bakterií.
- Rostliny byly po dobu jednoho dne uchovávány ve tmě, poté byly přemístěny do fytotronu.
- Druhý a třetí den po infiltraci *A. tumefaciens* byly listy (abaxiální strana) pozorovány konfokálním mikroskopem ZEISS LSM 710.

3.2.10 Sterilizace listů *Medicago sativa*

- Z nekvetoucích rostlin byly opatrně uštířeny listy a byly uchovávány ve sterilní vodě.
- Listy z *ex vitro* podmínek byly promyty v 70% (v/v) ethanolu po dobu maximálně 10 s.
- Následně byly listy přeneseny do 0,1% (w/v) roztoku Tween 20.
- Poté byly listy sterilizovány v roztoku 1% (v/v) chlornanu sodného s 0,05% (w/v) Tween 20, kde byly promývány 1,5 min.
- Listy byly třikrát promyty ve sterilní destilované vodě a poté byly opatrně osušeny na sterilním filtračním papíru.
- Z vysušených listů byly odřezány řapíky a každý list byl rozřezán na polovinu. V případě transformace byly ještě nařezány zlehka po povrchu, aby do nich mohly vstoupit bakterie.

3.2.11 Stabilní transformace listových explantátů *Medicago sativa*

- Do tekutého LB média s rifampicinem a příslušným selekčním antibiotikem bylo přidáno 30 μ l z různých hluboce zmrazených glycerolových inokulů *A. tumefaciens* GV3101 nesoucích geny pro markery cytoskeletu.
- Kultury se nechaly přes noc inkubovat (200 RPM, 28 °C).
- Pomocí spektrofotometru byla změřena optická densita při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Bakteriální suspenze byly naředěny tak, aby v celkových 15 ml SH roztoku bylo OD_{600} v rozmezí 0,6 – 0,8. Naředěné kultury byly centrifugovány (1811 RCF, 5 min, 20 °C).
- Supernatanty byly odebrány a k peletům byly přidány 3 ml LB média, následně byly pelety jemně resuspendovány pipetou.
- Každá bakteriální suspenze byla smíchaná s 12 ml SH média.
- V případě negativní kontroly bylo namísto bakterií přidáno čisté LB médium.
- Vysterilizované a nařezané listy *M. sativa* RSY byly přeneseny do SH média s obsahem bakterií a inkubované ve tmě 30 min, při 21 °C, ve vodorovné poloze a za stálého kývání na třepačce (20 RPM).
- Listy z SH média byly zlehka osušeny a uloženy na B5H médium bez přídavku antibiotik pro indukci tvorby kalusů a kokultivaci s bakteriemi. Petriho misky byly zakryty filtračním papírem, aby nebyly vystaveny přímému světlu.

- Po 6 dnech byly explantáty několikrát promyty ve sterilní dH₂O, poté byly osušeny na sterilním filtračním papíru a následná kultivace probíhala na B5H médiu s příslušnými selekčními antibiotiky a ticarcillinem pro eliminaci růstu *A. tumefaciens*.
- Vytvořené kalusy (po 3 – 4 týdnech kultivace) byly přesunuty na embryogenní B50 médium, které také obsahovalo selekční antibiotikum a ticarcillin.
- Zralá embrya, která se vytvořila na kalusech zhruba po 3 a více týdnech kultivace, se přenesla na MMS médium a následně na MS médium.
- Embrya se postupně vyvinula v semenáček a následně v celou rostlinu. Přenášení na čerstvé MS médium probíhalo přibližně každé 2 – 3 týdny.
- Všechny Petriho misky byly kultivovány v kultivační místnosti, kde byla nastavena konstantní teplota 21 °C, 71 % vlhkost a fotoperioda 16 hodin světlo, 8 hodin tma.
- Transformované rostliny byly selektovány pomocí mikroskopu ZEIS Axio Zoom.V16.
- Konfokálním mikroskopem ZEISS LSM 710 byla pozorována lokalizace a organizace cytoskeletu v kořenech transformovaných rostlin.
- Rostliny stabilně exprimující markery cytoskeletu byly přeneseny do *ex vitro* podmínek.

3.2.12 Somatická embryogeneze

- U rostlin stabilně exprimujících konstrukt *tagRFP:TUA6* byla provedena somatická embryogeneze.
- Listy byly sterilizovány a nařezány stejným způsobem, jako je zmíněno v kapitole 3.2.10.
- Explantáty byly uloženy na kalus-indukující B5H médium bez antibiotik. Vytvořený kalus byl kultivován na embryogenní B50 médium a zralá embrya na MMS a následně na MS médium.
- Po selekci byly vzorky pozorovány konfokálním mikroskopem ZEISS LSM 710.

3.2.13 Příprava mikroskopických preparátů a mikroskopické pozorování

- Pro pozorování tranzientně transformovaných listů *N. benthamiana* byla infikovaná část listu ustřižena a uložena do pár kapek sterilní vody na podložní sklíčko a zakryta krycím sklíčkem.
- Pro pozorování cytoskeletu v stabilně transformované *M. sativa* byly připraveny preparáty z kořenů.
- Ve flowboxu byla část kořene sterilními nůžkami ustřižena a přenesena sterilní pinzetou do mikroskopické komůrky do pár kapek sterilní vody a překryta krycím sklíčkem.
- Okraje krycího sklíčka byly zafixovány pomocí parafilmu.

3.2.14 Podmínky snímání

- Při mikroskopování preparátů na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu (CLSM) byly použity následující lasery – laser pro mRFP: 561 nm, GFP: 488 nm, Chlorofyl a: 633 nm.
- Byly použity následující filtry – filtr pro mRFP: 581 – 639 nm, GFP: 493 – 549 nm, Chlorofyl a: 653 – 729 nm, dsRED: 558 – 583.

4 VÝSLEDKY

V následující kapitole jsou prezentovány výsledky dosaženy experimentální prací. Kapitola pozůstává ze čtyř na sebe navazujících částí. První část se zabývá ověřením přítomnosti a správnosti plasmidů nesoucích tubulinové geny značeny červenými fluorescenčními proteiny mRFPL (*mRFPL:TUB6*) a tagRFP (*tagRFP:TUA6*) a takéž konstrukt *lifeact:mCherry*. Všechny tubulinové markery byly již připraveny restričním klonováním, a to pod konstitutivním promotorem 35S odvozeným z viru tabákové mozaiky. Fluorescenční reportér aktinu *lifeact:mCherry* pod kontrolou ubiquitinového promotoru 10 z *A. thaliana* byl pořízen od firmy Addgene. V následující části experimentální práce byla ověřena funkčnost všech konstruktů pomocí tranzientní transformace listů *N. benthamiana*. Třetí část popisuje stabilní transformaci listů *M. sativa* a následně proces somatické embryogeneze vedoucí k regeneraci stabilně transformovaných rostlin ze somatických embryí. Posléze byly transgenní rostliny vyselektovány a další podkapitola je věnována analýze cytoskeletu v kořenech pomocí CLSM. Na závěr je popsán proces somatické embryogeneze vojtěšky už stabilně exprimující 35S::*tagRFP-TUA6* a opět mikroskopická analýza cytoskeletu.

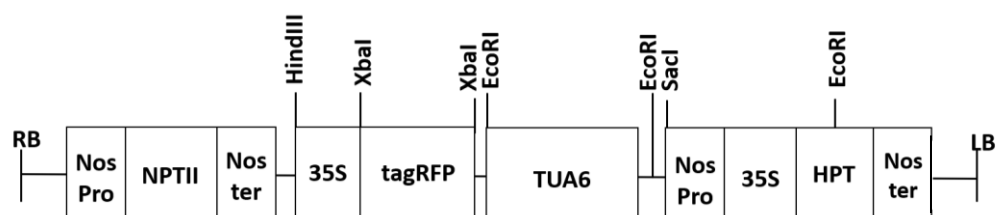
4.1 Ověření konstruktů nesoucích markery cytoskeletu restriční analýzou

Jednotlivé plasmidy nesoucí konstrukty 35S::*tagRFP-TUA6*, 35S::*mRFPL-TUB6* a *UBQ10::lifeact-mCherry* byly transformovány tepelným šokem do chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10. Po hodinové inkubaci při 37 °C a třepání byly bakteriální suspenze roztírány na plotny s tuhým LB médiem s obsahem příslušného selekčního antibiotika vzhledem na rezistenci kódované v daném konstruktu (Tab. 1). Po 24 hodinách kultivace při stejné teplotě se vytvořily bakteriální kolonie. Pozitivní selekce vedla k růstu hlavně rekombinantních transformantů, které byly tak separovány od nerekombinantních. Individuální kolonie byly přeneseny do tekutého LB média se selekčním antibiotikem a opět inkubovány na třepačce při 37 °C přes noc. Následně byla izolovaná plasmidová DNA pomocí komerčního kitu.

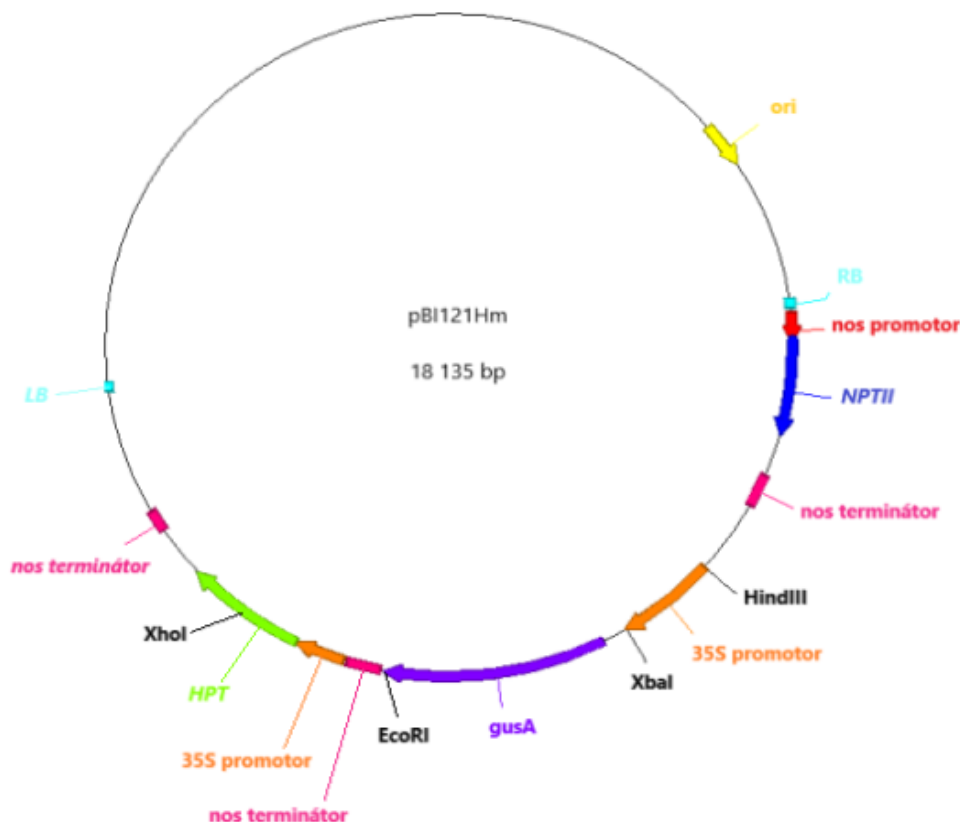
Na základě dostupných schémat (Obr. 5, 8) a map prázdných vektorů (Obr. 6, 9) byly v programu ApE navrženy kompletní mapy jednotlivých konstruktů *in silico*. Kompletní mapa *lifeact:mCherry* je k dispozici na webových stránkách dodavatele:

<https://www.addgene.org/61193/sequences/>. Finální mapy byly využity pro navrhování restriční štěpení pro určení přítomnosti a správnosti požadovaných konstruktů.

Dle schémata (Obr. 5) konstrukt *tagRFP:TUA6* pozůstává z genu kódujícího alfa tubulin izoformu 6 (*TUA6*) a genu pro červený fluorescenční protein tagRFP. Konstrukt byl vložen do binárního plasmidu pBI121Hm přes restriční místa XbaI a EcoRI. Před místem XbaI je součástí vektoru 35S promoter, který zajistil konstitutivní expresi genu. V transferové DNA je gen *NPTII* kódující neomycin fosfotransferázu a *HPT*, jehož expresí vzniká hygromycin fosfotransferáza. Tyto enzymy zajišťují rezistenci k antibiotikům kanamycinu a hygromycinu, a tak je možné odlišit transformované bakterie a rostliny od netransformovaných.

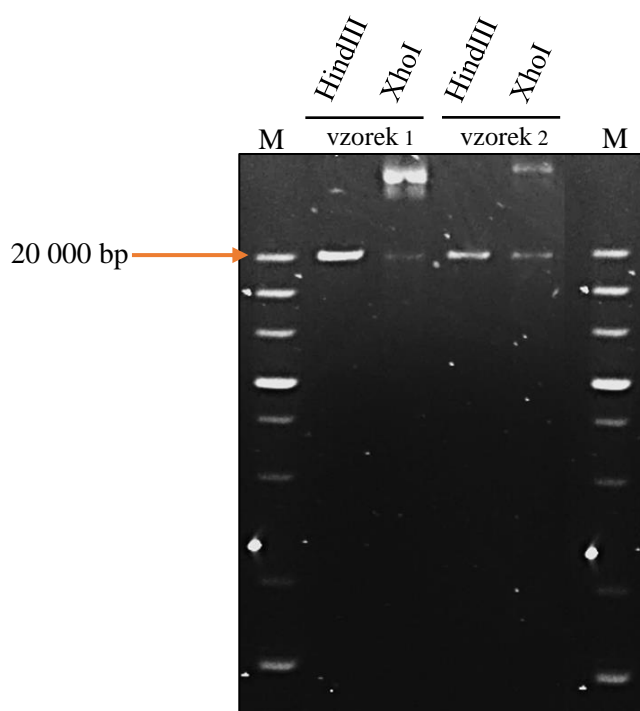


Obr. 5 Schéma konstruktů *35S::tagRFP-TUA6* v binárním vektoru pBI121Hm.



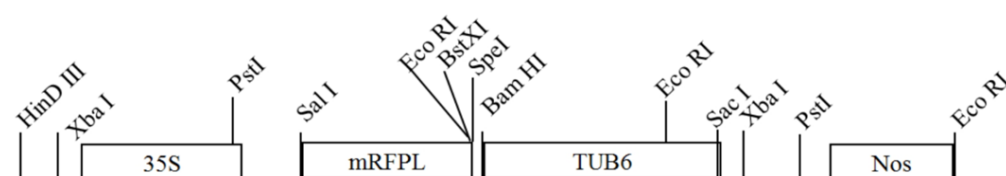
Obr. 6 Mapa prázdného binárního vektoru pBI121Hm o velikosti 18 135 bp. Gen *gusA* byl během klonování nahrazen konstruktem *tagRFP:TUA6*.

Pro ověření přítomnosti konstruktů *tagRFP:TUA6* v pBI121Hm v plasmidech izolovaných z *E. coli* byly zvoleny restriční enzymy HindIII a XhoI (Obr. 7). Vektor s konstruktem obsahuje ve své sekvenci po jednom restričním místě pro oba enzymy. Ve výsledku by měl být na agarosovém gelu viditelný jeden fragment o velikosti odpovídající predikci *in silico* (~18 800 bp). Působením enzymu HindIII došlo k linearizaci konstruktů a velikost vizualizovaného fragmentu odpovídala. V případě enzymu XhoI nedošlo k úplnému štěpení v obou vzorcích a to i v případě prodloužení času restričního štěpení a navýšení množství enzymu.

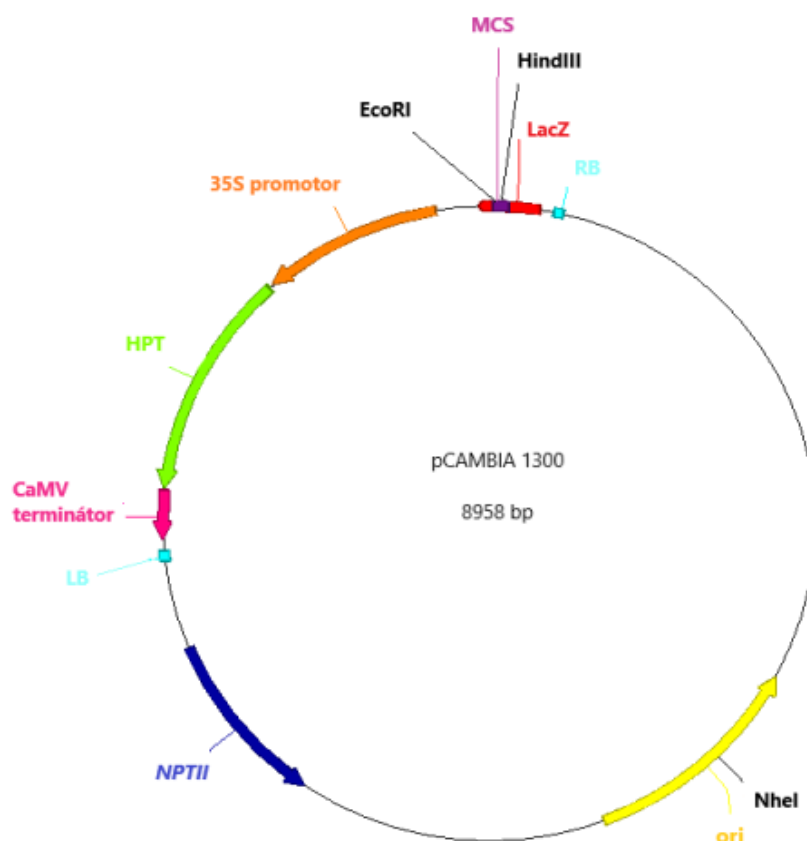


Obr. 7 Elektroforetogram na ověření přítomnosti konstruktů *tagRFP:TUA6* ve vektoru pBI121Hm plasmidové DNA izolované z *E. coli*. Ověřeny byly dva nezávislé vzorky (vzorek 1 a 2). M – marker, restrikce enzymem HindIII odpovídala předpokládané velikosti linearizovaného plasmidu (~18 800 bp), restrikce enzymem XhoI nebyla dostatečná.

Na základě schémata (Obr. 8) bylo usuzeno, že konstrukt *mRFPL:TUB6* byl klonován do binárního plasmidu pCAMBIA 1300 přes restrikční místa EcoRI a HindIII v multiklonovacím místě. V tomto případě plasmid obsahoval gen, kódující β tubulin izoformu 6, gen kódující fluorescenční monomerní protein mRFPL, silný promotor 35S a silný transkripční terminátor Nos. Součástí plasmidu jsou také geny zodpovědné za rezistenci vůči hygromycinu a kanamycinu. Pro selekci v bakteriích bylo využito antibiotikum kanamycin, pro selekci transgeních rostlin hygromycin.

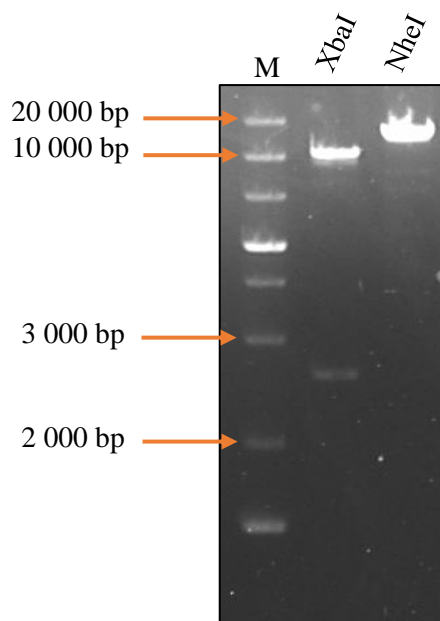


Obr. 8 Schéma konstrukt *mRFPL:TUB6* po jeho naklonování do binárního vektoru pCAMBIA 1300.



Obr. 9 Mapa prázdného binárního vektoru pCAMBIA 1300. Konstrukt *mRFPL:TUB6* byl včetně promotoru i terminátoru klonován do MCS místa.

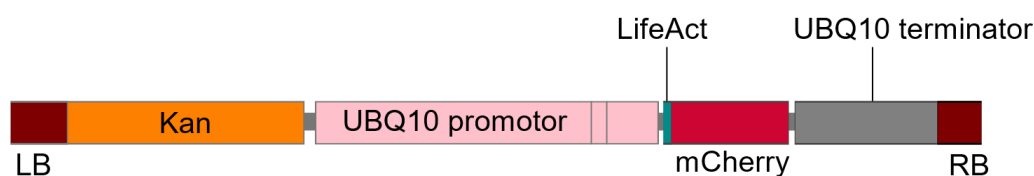
Pro ověření přítomnosti konstrukt *mRFPL:TUB6* v plasmidové DNA pomocí restričního štěpení byly použity enzymy *Xba*I a *Nhe*I (Obr. 10). Ve vektoru s konstruktem se nachází dvě štepná místa pro endonukleasu *Xba*I. Po digesci byly na agarosovém gelu viditelné dva fragmenty jejichž velikost odpovídala predikci *in silico* (~10 091 bp a 2 809 bp). Enzym *Nhe*I štěpil v jednom místě, velikost fragmentu odpovídala (~12 900 bp).



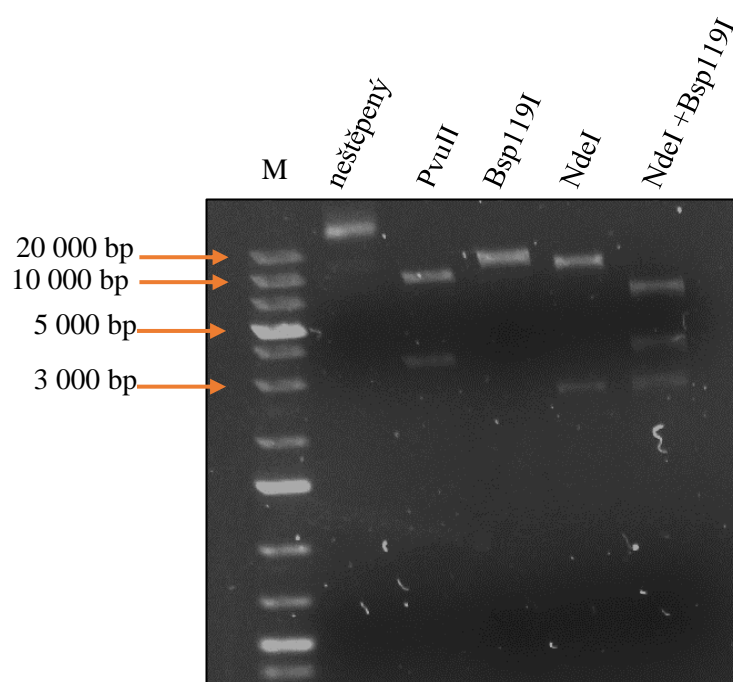
Obr. 10 Elektroforetogram na ověření přítomnosti konstrukt *mRFPL:TUB6* v plasmidové DNA izolované z *E. coli*. M – marker, restrikce enzymem *Xba*I (~10 091 bp, 2 809 bp), restrikce enzymem *Nhe*I (~12 900 bp).

Plasmid pCMU-ACTLr (Ivanov *et al.*, 2014) je tvořen binárním plasmidem pKm43GW, do kterého byl více-komponentovým Gateway® klonováním zrekombinován gen kódující proteinovou doménu lifeact a reportérový gen pro *mCherry*. Konstitutivní expresi transgenů zajišťuje promotor AtUBQ10 (Obr. 11). Na základě selekčního markeru v destinačním vektoru (rezistence na spectinomycin) byly selektovány bakterie nesoucí rekombinantní DNA. Součástí transferové DNA je i gen *NPTII* zajišťující rezistenci k antibiotiku kanamycinu, které slouží k selekci transformovaných rostlin.

Při restričním štěpení byly použity enzymy PvuII, Bsp119I, NdeI a kombinace enzymů Bsp119I a NdeI (Obr. 12). Výsledky se shodovaly s designem restričního štěpení v programu ApE.



Obr. 11 Upravené schéma konstruktů *lifeact:mCherry* rekombinovaného v destinačním vektoru pKm43GW (<https://www.addgene.org/61193/sequences/>).

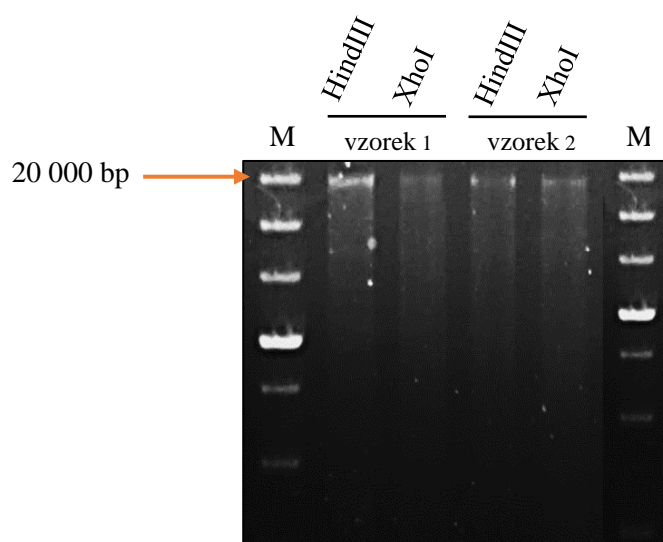


Obr. 12 Elektroforetogram na ověření přítomnosti konstruktů *lifeact:mCherry* v plasmidové DNA izolované z *E. coli*. M – marker, restrikce enzymem PvuII (8 636 bp, 3 284 bp), Bsp119I (11 920 bp), NdeI (9 431 bp, 2 489 bp), dvojité štěpení endonukleázami NdeI a Bsp119I (6 040 bp, 3 391 bp, 2 489 bp).

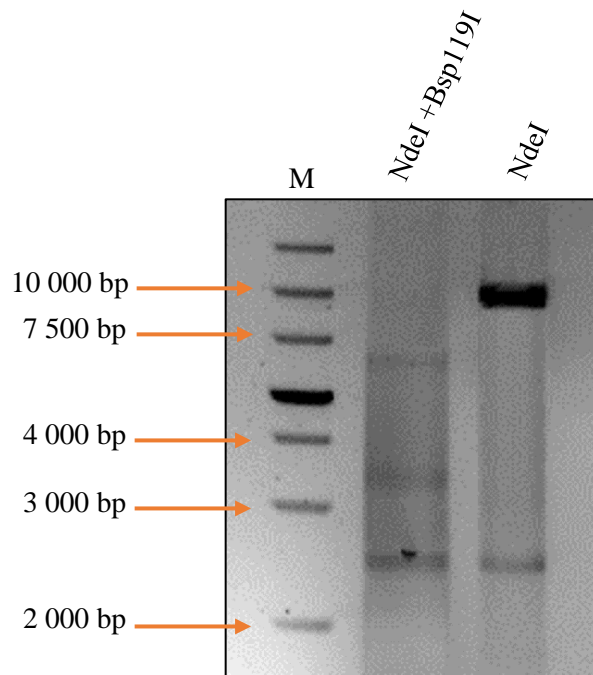
4.2 Ověření transformace *A. tumefaciens* restrikční analýzou

Po transformaci kompetentních buněk *A. tumefaciens* GV3101 plasmidovou DNA izolovanou z *E. coli* bylo provedeno ověření přítomnosti plasmidů s požadovanými konstrukty použitím restrikčního štěpení plasmidové DNA, která byla izolována P1, P2, P3 pufrů. Protože je bakterie *A. tumefaciens* nízkokopiová, izolovaná plasmidová DNA neměla vysokou koncentraci a z tohoto důvodu jsou fragmenty na gelu hůř viditelné.

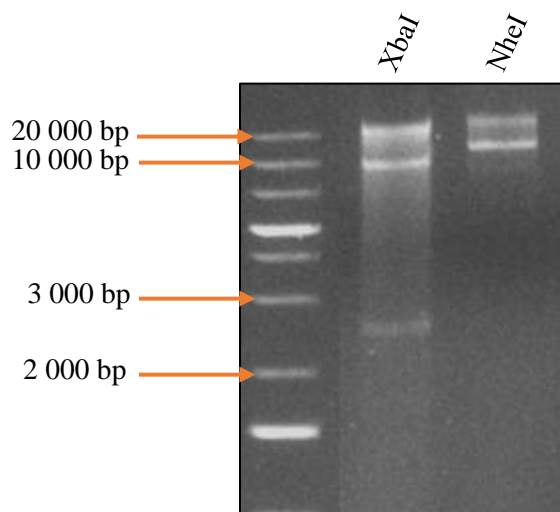
Pro ověření přítomnosti konstruktu *tagRFP:TUA6* byly použity enzymy HindIII a XhoI (Obr. 13) a pro konstrukt *lifeact:mCherry* byly použity restrikční enzymy Bsp119I a NdeI (Obr. 14). V případě ověření konstruktu *mRFPL:TUB6* byly použity endonukleázy XbaI a NheI. Na gelu bylo možné vidět fragmenty v oblasti 20 000 bp, které odpovídají velikosti pomocného plasmidu pMP90 (Obr. 15). Výsledky všech restrikčních štěpení se shodovaly s návrhy *in silico*.



Obr. 13 Elektroforetogram na ověření přítomnosti konstruktu *tagRFP:TUA6* v plasmidové DNA izolované z *A. tumefaciens* ve dvou nezávislých vzorcích (vzorek 1 a 2). M – marker, restrikce enzymem HindIII (~18 800 bp), restrikce enzymem XhoI (~18 800 bp).



Obr. 14 Elektroforetogram na ověření přítomnosti konstruktů *lifeact:mCherry* v plasmidové DNA izolované z *A. tumefaciens*. M – marker, dvojitě štěpení endonukleázami NdeI a Bsp119I (6 040 bp, 3 391 bp, 2 489 bp), NdeI (9 431 bp, 2 489 bp).



Obr. 15 Elektroforetogram na ověření přítomnosti konstruktů *mRFPL:TUB6* v plasmidové DNA izolované z *A. tumefaciens*. M – marker, restrikce enzymem XbaI (~10 091 bp, 2 809 bp), restrikce enzymem NheI (~12 900 bp). V oblasti 20 000 bp se nachází fragment odpovídající pomocnému plasmidu pMP90.

Jako pozitivní kontrola pro tranzientní a stabilní transformace byl použit konstrukt *MAP4:GFP*, jehož funkčnost již byla v *M. sativa* ověřena (Vyplelová *et al.*, 2017). Fúzní protein pozůstává z mikrotubuly vážící domény (MBD) savčího proteinu MAP4 a také z zeleného fluorescenčního proteinu GFP. Pro selekci transformovaných bakterií bylo použito antibiotikum kanamycin a pro selekci transformovaných rostlin herbicid fosfinitricin, jehož gen rezistence (*bar*) se nachází mezi levou a pravou hraniční sekvencí transferové DNA.

4.3 Ověření funkčnosti konstruktů pomocí agroinfiltrace listů *Nicotiana benthamiana*

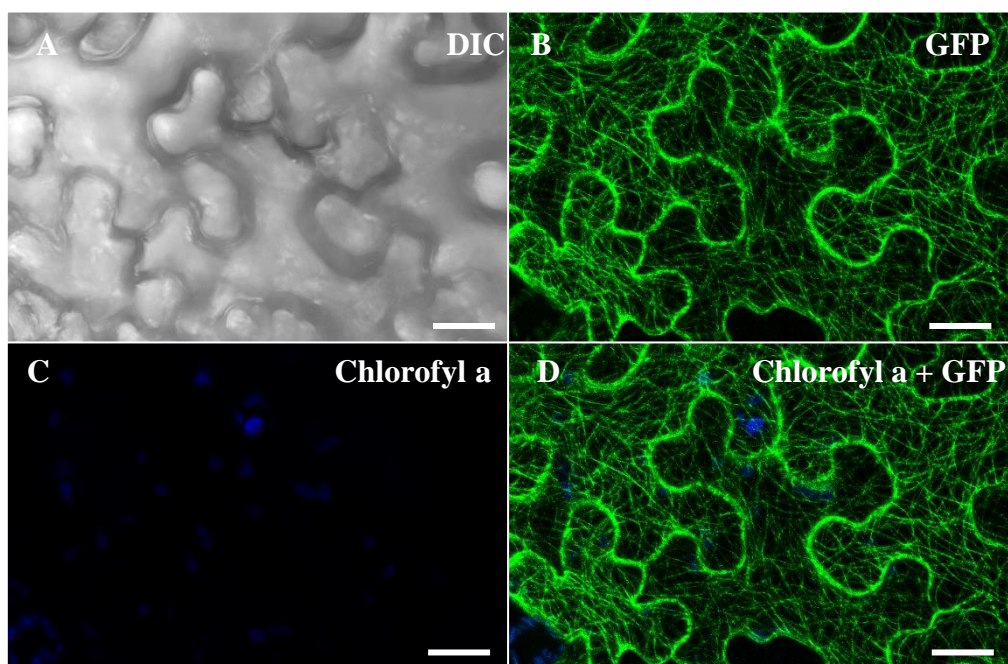
Ověřené kultury *A. tumefaciens* nesoucí výše zmíněné konstrukty pro markery cytoskeletu byly použity pro tranzientní transformaci listů *N. benthamiana*, která se používá pro předběžné otestování funkčnosti transgenu v rostlinných buňkách.

Všechny použité konstrukty byly v transformovaných listech exprimovány a vykazovaly fluorescenční signál, který byl pozorován pomocí CLSM 2. a 3. den po transformaci. Tím byla funkčnost jednotlivých konstruktů v rostlinných buňkách potvrzena. V epidermálních buňkách listů *N. benthamiana* byly v případě pozitivní kontroly (konstrukt *MAP4:GFP*) pozorovány mikrotubuly pomocí fúzního proteinu MBD-GFP (Obr. 16).

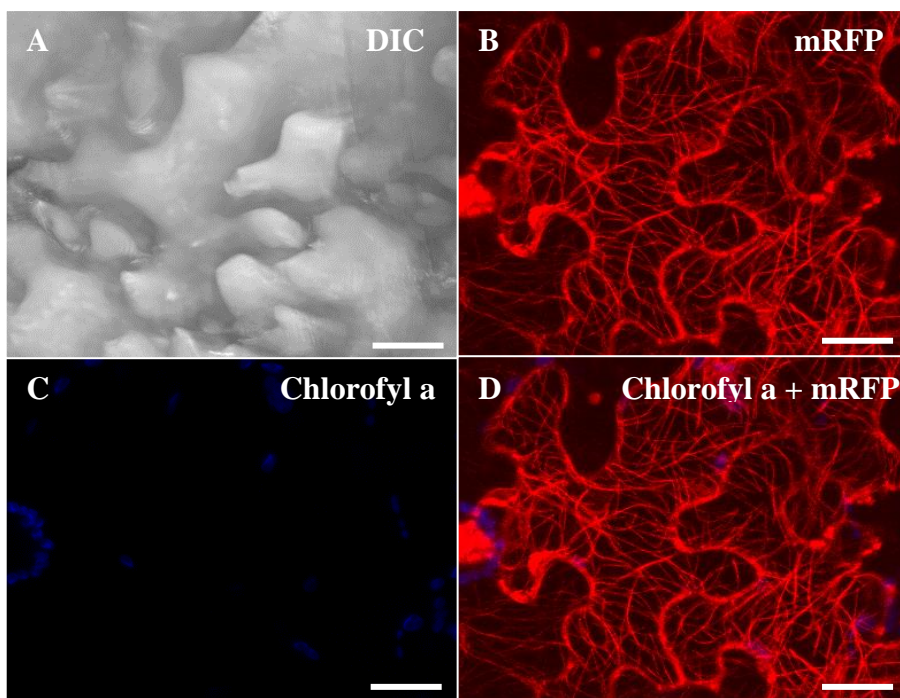
Při pozorování epidermálních buněk listů transformovaných konstruktem *tagRFP:TUA6* byly pozorovány alfa mikrotubuly značené červeným fluorescenčním proteinem tagRFP (Obr. 17) a v případě konstruktu *mRFPL:TUB6* vlákna beta tubulinu značená fluorescenčním proteinem mRFPL (Obr. 18).

V transformovaných epidermálních buňkách, které byly transformovány bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *lifeact:mCherry* bylo možné pozorovat aktinové filamenty značené červeným fluorescenčním proteinem mCherry (Obr. 19).

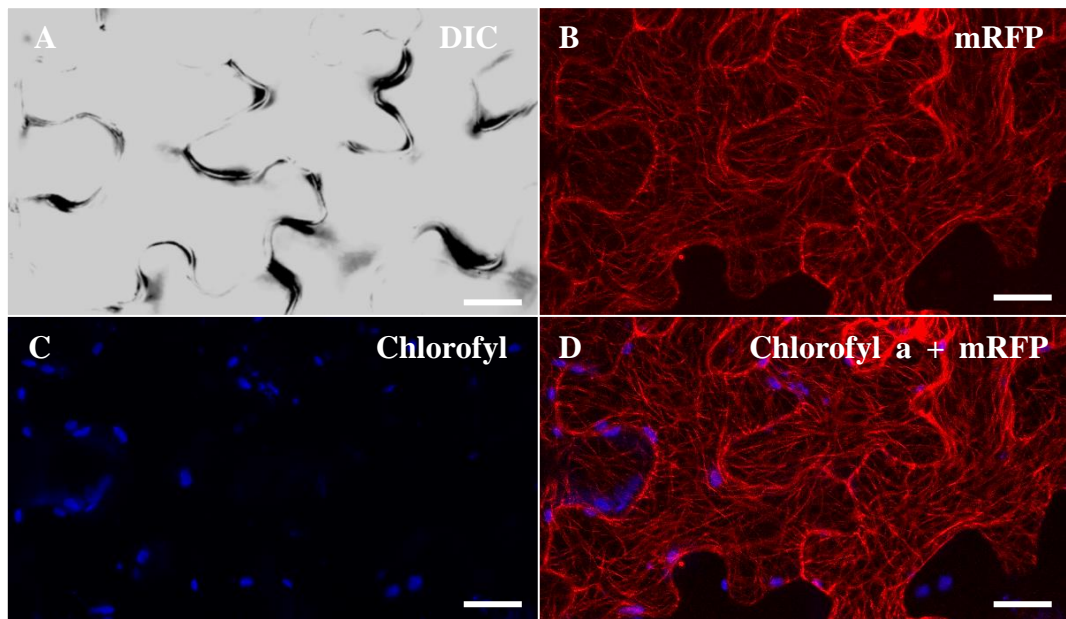
Pro kontrolu autofluorescence byl nastaven kanál pro chlorofyl a.



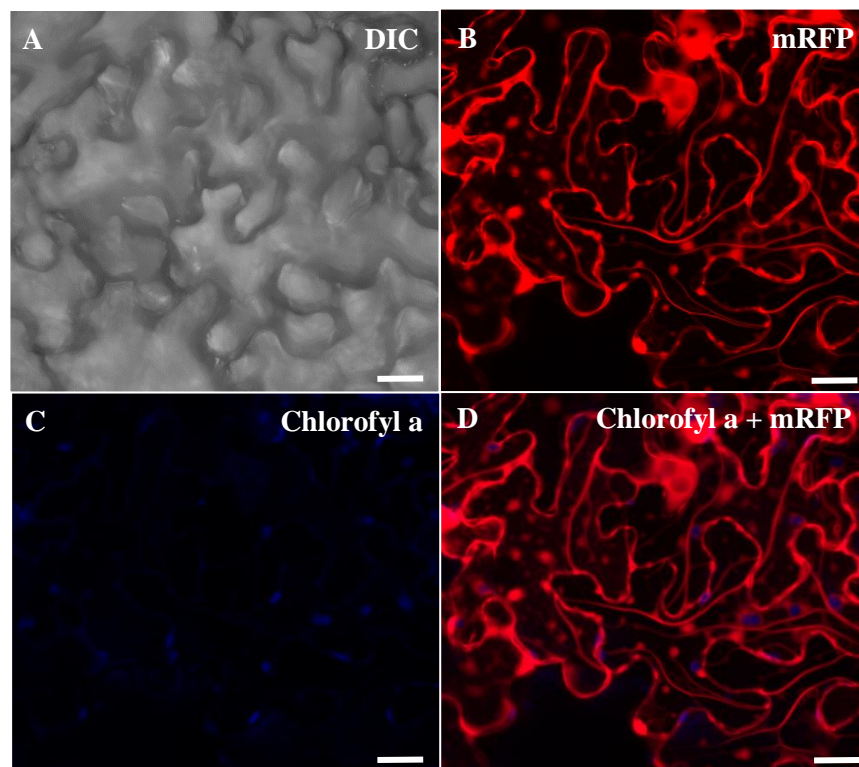
Obr. 16 Tranzientně transformované epidermální buňky listů *N. benthamiana* bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *MAP4:GFP*. **A** procházející světlo, **B** tubulinová vlákna vizualizována pomocí fúzního proteinu MBD-GFP, **C** kontrola autofluorescence, **D** sloučené kanály. Měřítko 20 μm .



Obr. 17 Tranzientně transformované epidermální buňky listů *N. benthamiana* bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *tagRFP:TUA6*. **A** procházející světlo, **B** alfa tubulinová vlákna vizualizována pomocí fúzního proteinu tagRFP-TUA6, **C** kontrola autofluorescence, **D** sloučené kanály. Měřítko 20 μm .



Obr. 18 Tranzientně transformované epidermální buňky listů *N. benthamiana* bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *mRFPL:TUB6*. **A** procházející světlo, **B** beta tubulinová vlákna vizualizována pomocí fúzního proteinu mRFPL-TUB6, **C** kontrola autofluorescence, **D** sloučené kanály. Měřítka 20 μm .



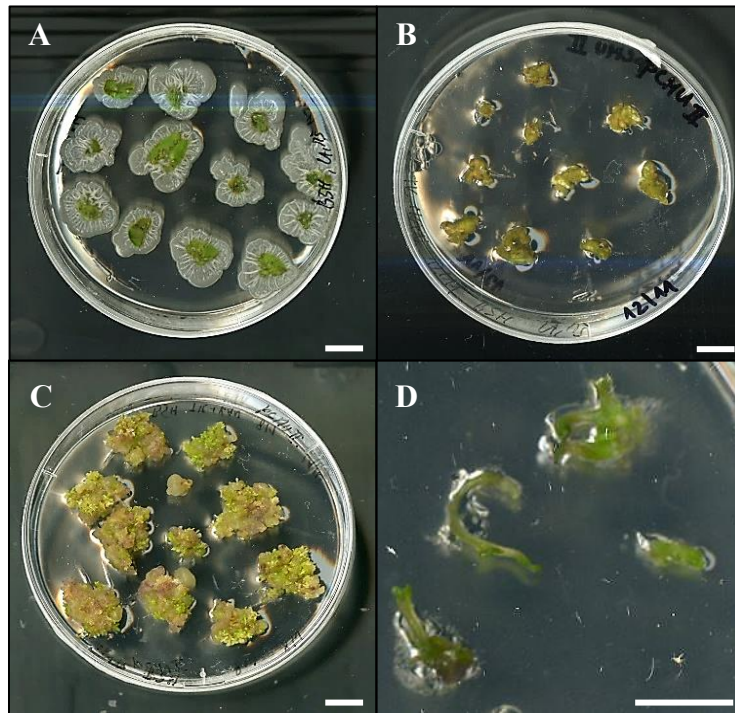
Obr. 19 Tranzientně transformované epidermální buňky listů *N. benthamiana* bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *lifeact:mCherry*. **A** procházející světlo, **B** aktinová vlákna vizualizována pomocí fúzního proteinu lifeact-mCherry, **C** kontrola autofluorescence, **D** sloučené kanály. Měřítka 20 μm .

4.4 Stabilní transformace listů *Medicago sativa* a regenerace transgenních rostlin

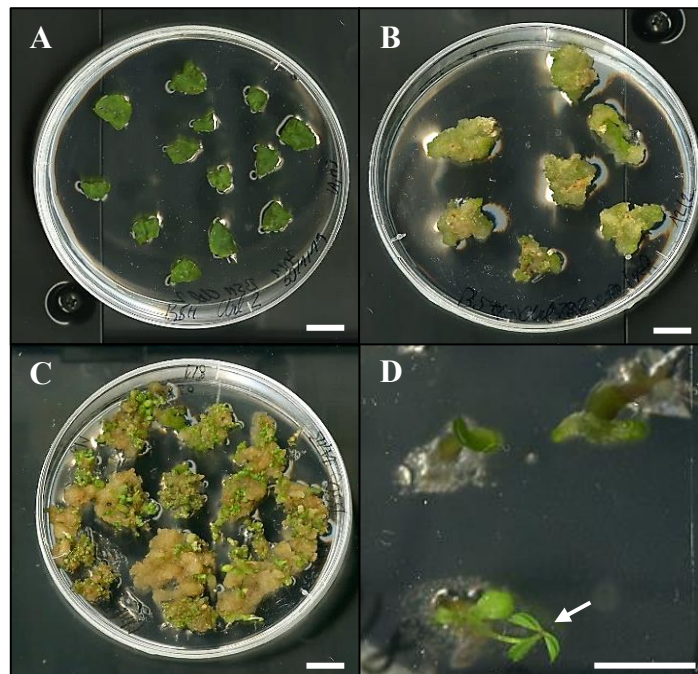
Ověřené bakteriální kultury *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty pro markery cytoskeletu byly použity pro stabilní transformaci *M. sativa* genotyp RSY podle protokolu Samac *et* Austin-Phillips (2006). Transformace listů konstruktem *lifeact:mCherry* byla vybrána pro ukázkou jednotlivých stádií transformace (Obr. 20 A).

U transformovaných listů kultivovaných 7 dní na kalus-indukujícím médiu bylo možné pozorovat bakteriální infekci způsobenou bakterií *A. tumefaciens* (Obr. 20 A). U kontrolních explantátů, kde bylo použito na transformaci jenom LB médium se bakteriální infekce neprojevyly (Obr. 21 A). Transformované kalusy se vytvořily po přibližně 4 týdnech od stabilní transformace listových explantátů (Obr. 20 B). Kalusy z kontrolních explantátů se tvořily už dříve, a to 3 týdny po uložení na kalus-indukující B5H médium (Obr. 21 B). Delší doba kultivace pro tvorbu kalusů u transformovaných explantátů je dána přítomností antibiotik, které nebyly v případě kontrolních explantátů přidány do B5H média.

Po přenesení transgenních i kontrolních (netransgenních) kalusů na médium B50 indukující somatickou embryogenezi bylo možné pozorovat tvorbu prvních somatických embryí na obou typech kalusů, a to 3. – 4. týden po přenosu (Obr. 20 C, 21 C). Somatická embrya v kotyledonární fázi byla přenesena na pevné kultivační MMS médium podporující klíčení a vývin rostlin (Obr. 20 D, 21 D). Po 2 týdnech byly zakořeněné klíčící rostliny přeneseny na MS médium.



Obr. 20 Proces transformace a následné regenerace somatických embryí z listových explantátů transformovaných konstruktem *lifeact:mCherry*. **A** listové explantáty obrůstané *A. tumefaciens* na B5H médiu 7 dní po transformaci, **B** kalusy na B5H médiu 4 týdny od transformace, **C** kalusy na embryogenním B50 médiu 9 týdnů po transformaci, **D** izolovaná somatická embrya přenesena na MMS médiu. Měřítko 1 cm.



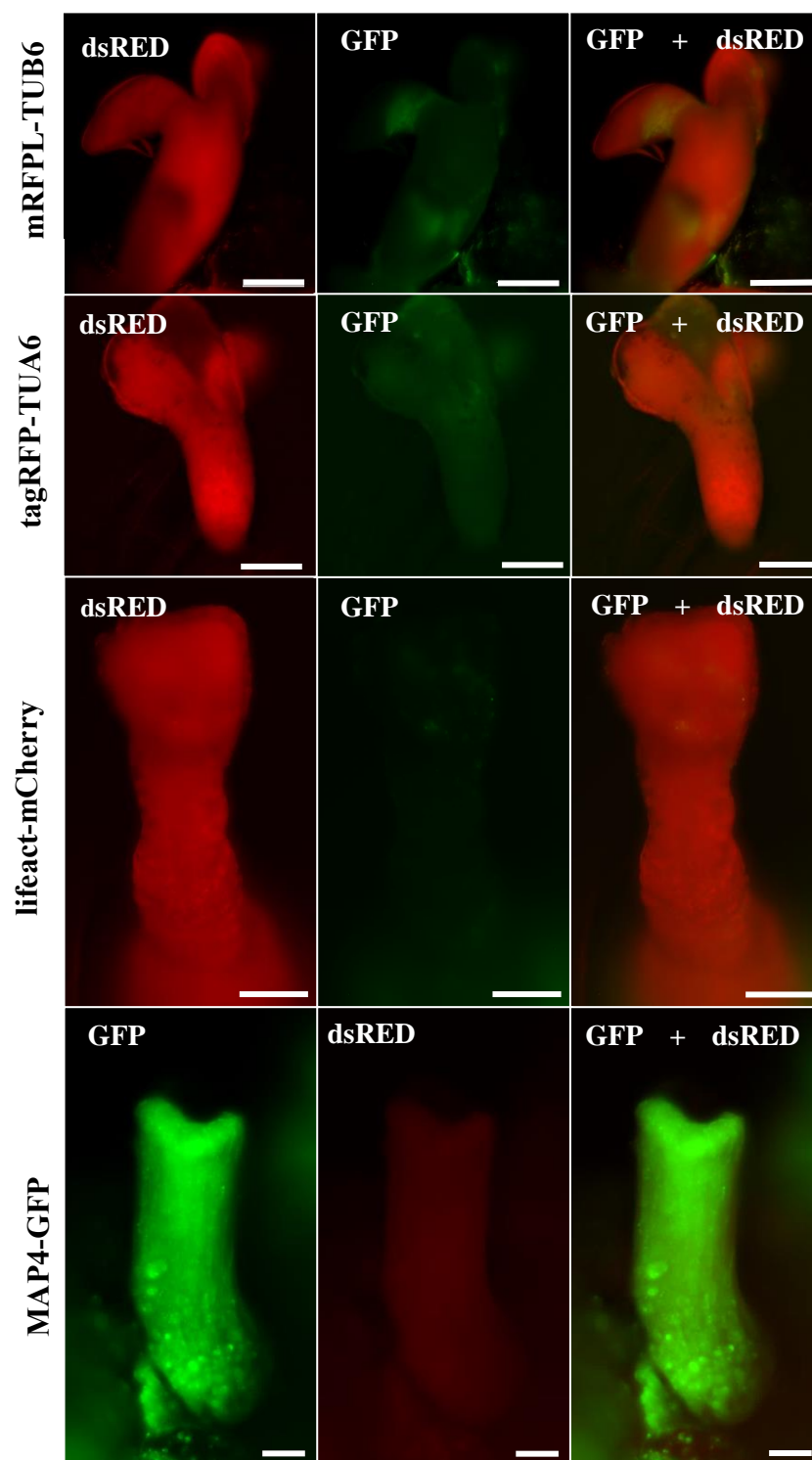
Obr. 21 Proces regenerace somatických embryí z kontrolních listových explantátů. **A** listové explantáty na B5H médiu po 7 dnech kultivace, **B** kalus na B5H médiu po 4 týdnech kultivace, **C** kalusy na embryogenním B50 médiu po 9 týdnech kultivace, **D** izolovaná somatická embrya a vyvíjející se rostlina (bílá šipka) kultivována na MMS médiu. Měřítko 1 cm.

4.4.1 Selekce rostlin exprimujících markery cytoskeletu

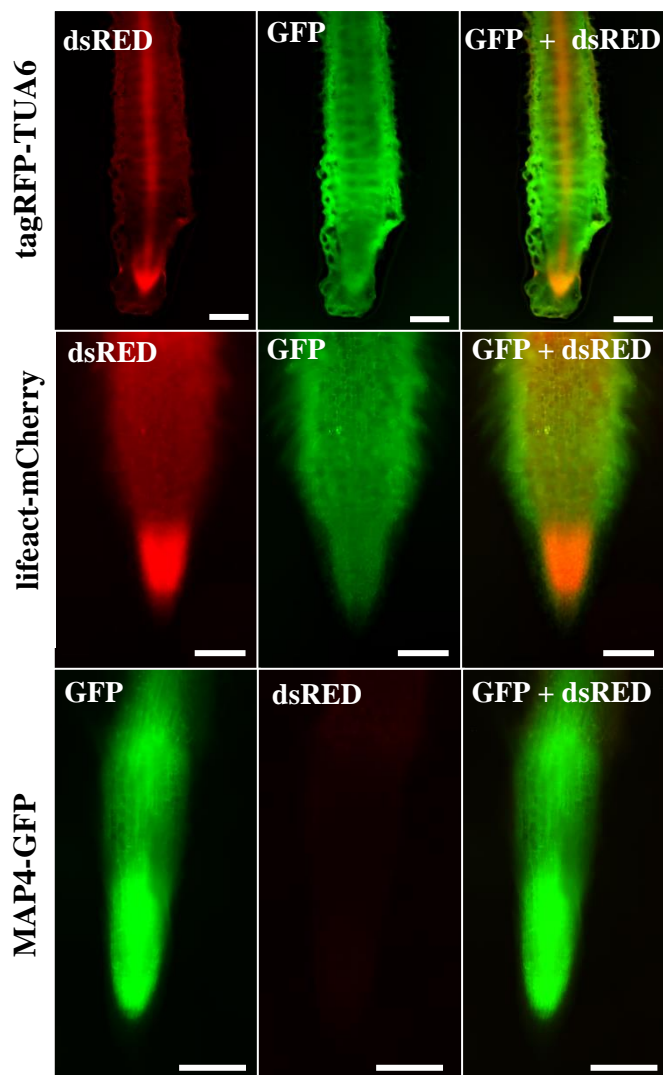
Selekce rostlin stabilně exprimujících markery cytoskeletu probíhala pomocí zoomovacího fluorescenčního mikroskopu.

Fluorescence fúzních cytoskeletálních proteinů byla v případě transformace všech konstruktů pozorována již ve stádiu somatického embrya (Obr. 22). Dále byla fluorescence sledována v kořenech transgenních rostlin (Obr. 23). Při pozorování kořenů rostliny stabilně exprimující konstrukt *lifeact:mCherry* byla fluorescence lokalizovaná především v kořenové špičce. Fluorescenční signál fúzního proteinu *tagRFP-TUA6* byl lokalizován v kořenové špičce a ve středním válci. Fluorescence byla ověřena také v případě pozitivní kontroly stabilně exprimující konstrukt *MAP4:GFP*, kdy byl pozorován silný signál v celém kořeni. Transformace konstruktem *mRFPL:TUB6* je ve stádiu somatické embryogeneze a nebyly dosud získány zakořeněné rostliny.

Pro kontrolu autofluorescence byl v případě konstruktů *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6* a *mRFPL:TUB6* použitý kanál pro GFP a v případě konstruktu *MAP4:GFP* to byl kanál dsRED.



Obr. 22 Fluorescenční mikroskopie transformovaných somatických embryí stabilně exprimujících markery cytoskeletu. Měřítko 500 μm .

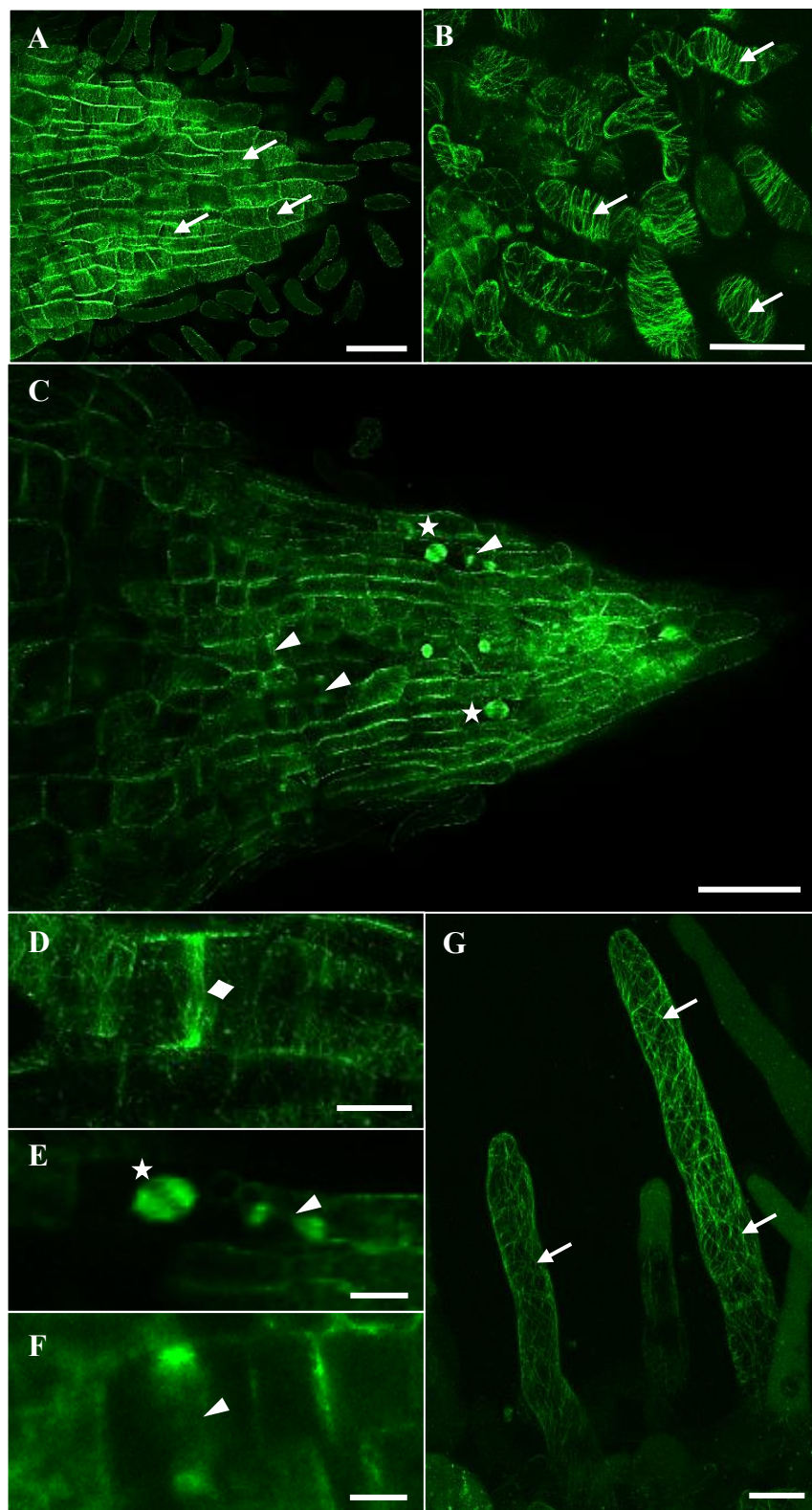


Obr. 23 Fluorescenční mikroskopie kořenů transformovaných rostlin stabilně exprimujících markery. Měřítko 200 μm .

4.4.2 Mikroskopická analýza kořenů rostlin stabilně exprimujících cytoskeletární markery

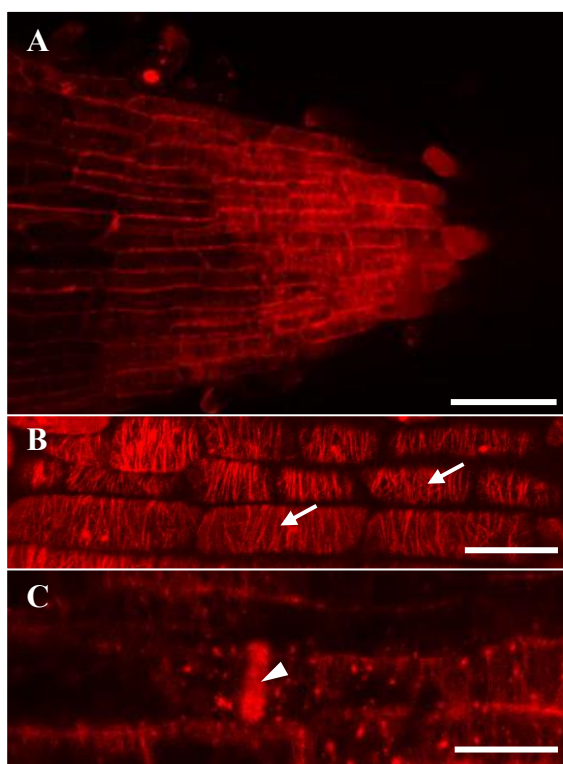
Zelené nebo červené fluorescenční proteiny jsou v transformovaných liniích součástí fúzních proteinů, které slouží jako markery cytoskeletu. Využitím CLSM byla v jednotlivých liniích zkoumána lokalizace a distribuce mikrotubulů a aktinu v kořenech *M. sativa*. Možnost studia dynamiky jednotlivých složek cytoskeletu představuje užitečnou aplikaci v různých oblastech výzkumu, jako jsou například symbiotické interakce s bakteriemi.

Byly pozorovány živé preparáty připravené z kořenů vyvíjejících se somatických embryí a mladých rostlin. V případě stabilní transformace konstruktem *MAP4:GFP*, který byl použit jako pozitivní kontrola transformace, byly získány 4 somatická embrya, která stabilně expimovala tento konstrukt. V epidermálních buňkách kořene (Obr. 24 A) a v buňkách kořenové čepičky (Obr. 24 B) byly pozorovány kortikální mikrotubuly orientované kolmo na osu prodlužování buňky. Byly pozorovány také mitotické mikrotubuly (Obr. 24 C – F) vytvářející preprofázní svazek, který určuje rovinu dělení (Obr. 24 C, D), dělicí vřeténko zodpovědné za rozchod chromozomů k opačným pólům buňky (Obr. 24 C, E) a fragmoplast (Obr. 24 C, E, F). Kortikální mikrotubuly byly pozorovány také v kořenových vláscích (Obr. 24 G).



Obr. 24 Lokalizace mikrotubulů pomocí fúzního proteinu MBD-GFP v kořenu transgenní rostliny *M. sativa* stabilně exprimující konstrukt *MAP4:GFP*. **A** kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořene (šipky), **B** kortikální mikrotubuly v buňkách kořenové čepičky, **C** mitotické mikrotubuly vytvářející dělicí vřeténka (hvězdička) a fragmoplasty (trojúhelník), **D** preprofázní svazek (kosočtverec), **E** dělicí vřeténko, pozdní fragmoplast, **F** pozdní fragmoplast, **G** kortikální mikrotubuly v kořenových vláscích. Měřítka 50 μm (**A**, **B**, **C**), 20 μm (**G**), 10 μm (**D**, **E**, **F**).

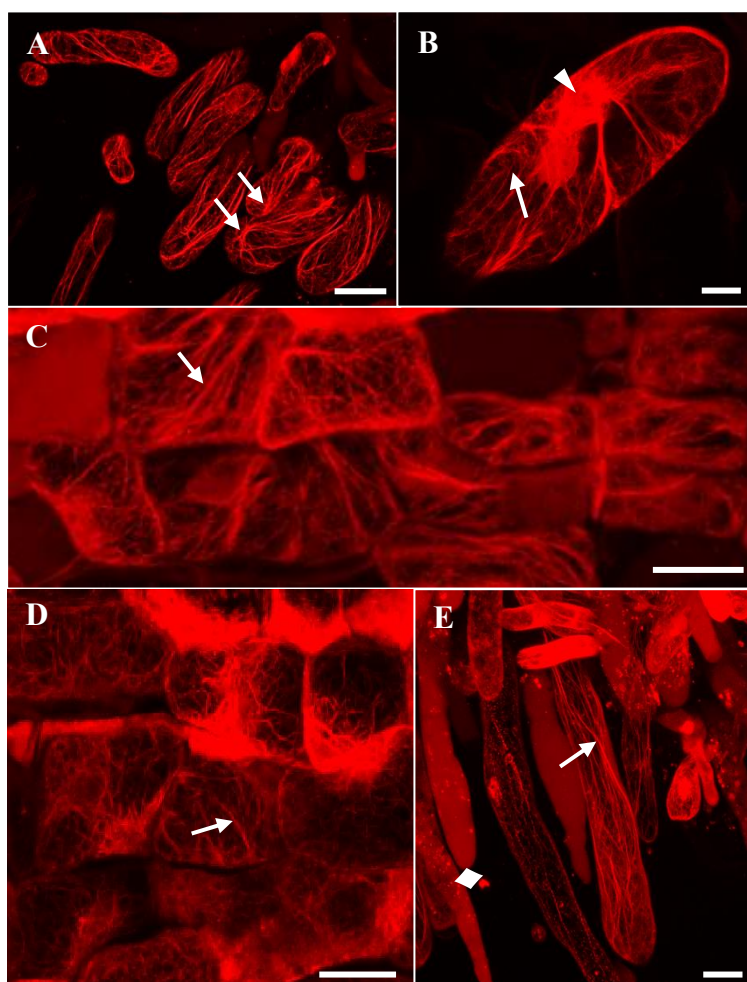
V případě transformace za použití konstruktů *tagRFP:TUA6* byly v rhizodermálních buňkách kořene pozorovány kortikální mikrotubuly orientované kolmo na osu prodlužování buňky (Obr. 25 A, B). Byly pozorovány i mitotické mikrotubuly účastnící se buněčného dělení. Konkrétně bylo možné pozorovat fragmoplast (Obr. 25 C, trojúhelník), který je důležitý pro transport vezikul při tvorbě buněčné stěny během cytokineze. Vlivem dlouhého mikroskopického snímání docházelo k rozpadu mikrotubulů, jak je možné vidět na obrázku 25 C. Bylo získáno jedno somatické embryo stabilně exprimující tento konstrukt.



Obr. 25 Lokalizace fúzního proteinu tagRFP-TUA6 u stabilně transformované rostliny *M. sativa*. **A, B** kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořenové špičky (šipky), **C** mitotické mikrotubuly vytvářející fragmoplast (trojúhelník); v okolních buňkách docházelo k rozpadu mikrotubulů vlivem delšího mikroskopického snímání. Měřítka 50 μm (A), 20 μm (B, C).

Z časových důvodů nebylo možné odvodit stabilní transgenní linii exprimující konstrukt *mRFPL:TUB6*. Transformace se nachází ve stádiu indukce somatické embryogeneze. Je třeba počkat na vyvinutí kořene, který bude možné mikroskopicky analyzovat. Dosavadní výsledky z tranzientní transformace a pozorování somatických embryí transformovaných konstruktem *mRFPL:TUB6* naznačují, že stabilní transformace proběhla úspěšně.

Stabilní transformace konstruktem *lifeact:mCherry* byla úspěšná. V buňkách kořenové čepičky (Obr. 26 A, B) a v rhizodermálních buňkách kořene byly pozorovány aktinová vlákna značená fluorescenčním proteinem mCherry (Obr. 26 C, D). Kolem jádra odlupujících se buněk kalyptry byla pozorována hustá síť aktinových filament (Obr. 26 B, trojúhelník). Aktinová vlákna byla také pozorována v kořenových vláscích (Obr. 26 E), důležitých pro průnik symbiotických bakterií do kořene. V některých vláscích byl aktin lokalizovaný v cytoplasmě ve formě spotů, což mohlo být způsobeno vysokou citlivostí aktinu na působení laseru během mikroskopického snímání (Obr. 26 E, kosočtverec). Bylo vyselektováno celkem 5 zralých embryí, které stabilně exprimovaly konstrukt *lifeact:mCherry*.

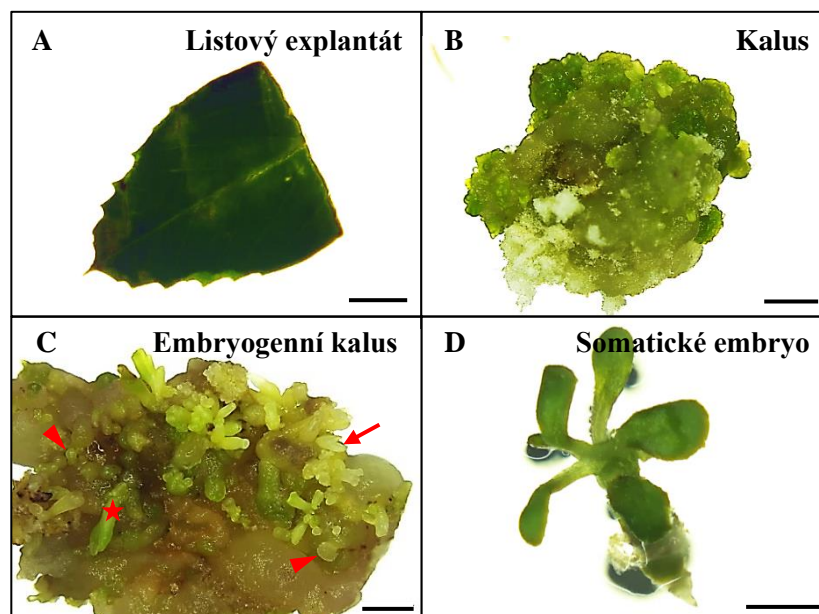


Obr. 26 Lokalizace fúzního proteinu *lifeact-mCherry* u stabilně transformované rostliny *M. sativa*. **A, B** aktinová vlákna v buňkách kořenové čepičky (šipky), **B** síť aktinových vláken okolo jádra (trojúhelník). **C, D** aktinová vlákna v rhizodermálních buňkách kořene, **E** aktinová vlákna v kořenových vláscích (šipka), v některých vláscích distribuce aktinu ve formě bodových struktur (kosočtverec). Měřítko 20 μm .

4.5 Somatická embryogeneze *M. sativa* stabilně exprimující konstrukt *p35S::tagRFP-TUA6*

Rostliny *M. sativa* pěstovány v růstových komorách se bez přítomnosti hmyzích opylovačů (entomogamie) rozmnožovat nedokáží. Navíc ruční opylování je pracné a málo efektivní, což znamená, že jiný způsob množení je nevyhnutelný. Pro propagaci transgenních linií *in vitro* je možné využít proces somatické embryogeneze. V tomto případě byla zvolena rostlina pěstovaná v *ex vitro* podmínkách, která již stabilně exprimovala konstrukt *35S::tagRFP-TUA6*. Pro indukci somatické embryogeneze byly použity listy, které byly po sterilizaci nařezány a uloženy na kalus-indukující B5H médium s obsahem $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kinetinu a $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D (Obr. 27 A).

Po 3 týdnech kultivace na B5H médiu byla po celém povrchu listů pozorována tvorba masy neorganizovaně dělících se buněk (Obr. 27 B). Vytvořené kalusy byly přeneseny na embryogenní B50 médium bez obsahu fytohormonů. Po uplynutí 4 týdnů na embryogenním médiu bylo možné na kalusech pozorovat somatická embrya, která přecházela jednotlivými fázemi embryogeneze téměř identicky, jako u zygotických embryí (Obr. 27 C). Vytvořená embrya s odlišitelným apikálním a bazálním pólem byla přesunuta na MMS médium podporující vývin rostlin. Zakořeněná somatická embrya byla po přibližně dvou týdnech přenesena na MS médium (Obr. 27 D). Transgenní rostliny byly selektovány pomocí zoomovacího fluorescenčního mikroskopu. Do *ex vitro* podmínek bylo přeneseno celkem 7 rostlin stabilně exprimujících uvedený konstrukt. V budoucnu bude možné tyto rostliny využít pro pozorování interakce symbiotických bakterií s kořeny *M. sativa*.

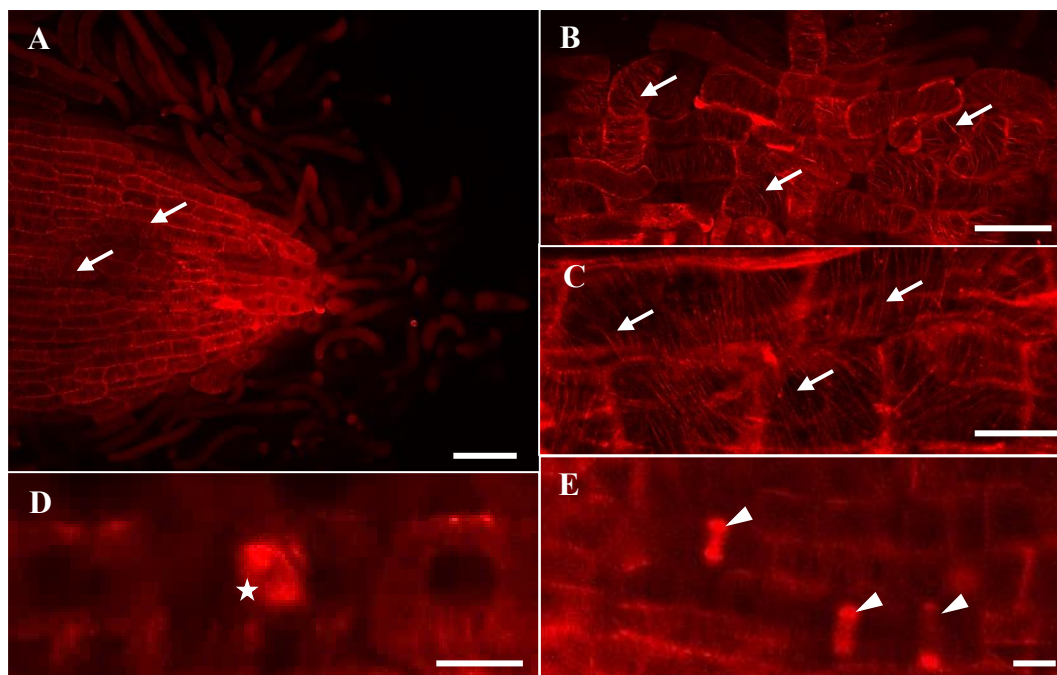


Obr. 27 Jednotlivá stádia somatické embryogeneze *M. sativa* stabilně exprimující konstrukt *tagRFP:TUA6*. **A** listový explantát po sterilizaci na B5H médiu, **B** kalus na B5H médiu, **C** somatická embryo v různých stádiích vývoje na embryogenním B50 médiu: globulární stádium (trojúhelníky), srdčité stádium (šipky), kotyledonární stádium (hvězdičky), **D** mladá rostlina na MMS médiu. Měřítko 200 μ m.

Ve vyselektovaných rostlinách bylo možné využitím CLSM pozorovat kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořene (Obr. 28 A) a v buňkách laterální kořenové čepičky (Obr. 28 C, šipky), které byly uspořádané zhruba paralelně. V epidermis tranzientní zóny byly mikrotubuly uspořádané méně pravidelně a utvářely slabší svazky (Obr. 28 B, šipky). Fluorescenční signál *tagRFP* značící mikrotubuly kopíroval i mitotické mikrotubuly - dělicí vřeténko (Obr. 28 D, hvězdička) a fragmoplast (Obr. 28 E, trojúhelníky).

Přítomnost funkčního transgenu byla zachována a získal se dostatek rostlinného materiálu pro využití v dalších experimentech. Prostřednictvím somatické embryogeneze je možné se vyhnout opětovným transformacím pro získání nových rostlin obsahující gen zájmu, které proces prodlužují a navíc nemusí být vždy úspěšné.

Přehled počtu získaných rostlin stabilně exprimujících markery cytoskeletu je uveden v Tab. 4.



Obr. 28 Lokalizace fúzního proteinu tagRFP-TUA6 u rostliny získané procesem somatické embryogeneze z rostliny již stabilně exprimující konstruktu *tagRFP:TUA6*. **A**, **B** kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořene a v **C** buňkách laterální kořenové čepičky (šipky), **D** mitotické vřeténko (hvězdička), **E** fragmoplasty (trojúhelníky). Měřítka 50 μm (**A**), 20 μm (**B**, **C**), 10 μm (**D**, **E**).

Tab. 4 Shrnující tabulka udávající počet získaných rostlin stabilně exprimujících jednotlivé markery cytoskeletu.

Konstruktu	Počet stabilně transformovaných rostlin
<i>MAP4:GFP</i>	4
<i>tagRFP:TUA6</i>	8*
<i>mRFPL:TUB6</i>	-
<i>lifeact:mCherry</i>	5

*V počtu stabilně transformovaných rostlin konstruktem *tagRFP:TUA6* jsou započítány rostliny ze somatické embryogeneze.

5 DISKUZE

Cílem mé bakalářské práce byla transformace listových explantátů rostliny *M. sativa* pomocí *A. tumefaciens* nesoucím konstrukty pro fluorescenčně značené cytoskeletální markery a taktéž odvození transgenních linií stabilně exprimující tyto markery.

Transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* a následná regenerace transgenních rostlin procesem somatické embryogeneze je nejčastěji používanou technikou pro stabilní zainkorporování cizorodé genetické informace do genomu *M. sativa* (Schroeder *et al.* 1991; Hill *et al.* 1991). Pro transformaci byl použit kultivar Regen SY, který se vyznačuje vysokou schopností regenerace, což bylo v této bakalářské práci potvrzeno. Jednotlivé kultivary *M. sativa* mají různou regenerační schopnost, a ne u všech je možné navodit indukci nepřímé somatické embryogeneze a regenerovat tak novou rostlinu (Moltrasio *et al.*, 2004).

M. sativa, stejně jako *M. truncatula* se vyznačuje symbiózou s hlízkovitými bakteriemi. Během tohoto procesu dochází v rostlinách ke změnám na orgánové, pletivové i buněčné úrovni. V rostlinných buňkách byla pozorována reorganizace cytoskeletu, změny velikosti jádra a modifikace jiných organel (Bonfante *et Genre*, 2010; Harrison, 2012; Gutjahr *et Parniske*, 2013).

Pro pozorování těchto změn během arbuskulární mikhorizi v *M. truncatula* je možné využít specializované markery, které využívají promotor MtBCP1. Tento promotor zajišťuje expresi genů během penetrace symbiotických bakterií, v kolonizovaných buňkách, kde již došlo k vytvoření arbuskuly, a také v sousedních nekolonizovaných buňkách. Při využití ubiquitinového protomotoru mohou být tyto markery využity pro pozorování buněčných struktur i v jiných jednoděložných a dvouděložných rostlinách (Ivanov *et al.*, 2014).

Plasmid *pCMU-ACTLr*, který využívá pro vizualizaci aktinu krátký peptid LifeAct izolovaný z kvasinky *S. cerevisiae* schopný vázat se na aktin vyšších eukaryot, byl pomocí *A. rhizogenes* transformován do *M. truncatula*, kde byly následně pozorovány aktinové filameny v primární kůře kořene (Ivanov *et al.*, 2014). V případě mé experimentální práce byl tento konstrukt využit na transformaci *M. sativa*, u které bylo možné pozorovat aktinové filameny spíše v buňkách kořenové čepičky (Obr. 26 A, B) a také v rizodermálních buňkách (Obr. 26 C, D). Také byly pozorovány aktinová vlákna

v kořenových vláscích (Obr. 26 E), které jsou důležité pro kontakt se symbiotickými bakteriemi a slouží pro jejich průnik do primární kůry.

V dřívějších studiích bylo zjištěno, že pro vizualizaci aktinového cytoskeletu je vhodnější využít konstrukt *lifeact:mCherry* (Riedl *et al.*, 2008), protože ve srovnání s konstruktem *FIMI-ABD2:mCherry* (Sheahan *et al.*, 2004) poskytuje lepší signál. Hlavním důvodem je schopnost tohoto markeru vázat se na silnější aktinová vlákna (Dyachok *et al.*, 2014).

Pro vizualizaci tubulinu byly v této práci využity konstrukty: *MAP4:GFP*, *tagRFP:TUA6* a *mRFPL:TUB6*.

Mikrotubuly-vážíci doména značená fluorescenčním proteinem se využívá pro studium dynamiky, organizace mikrotubulů a studium buněčného dělení (Marc *et al.*, 1998). Konstrukt *MAP4:GFP* (Vypelová *et al.*, 2017) byl úspěšně transformován do *M. sativa* a pomocí light sheet fluorescenční mikroskopie byla studována rychlost růstu kořene a také délka trvání jednotlivých fází buněčného dělení.

Výsledky mé bakalářské práce také potvrzují expresi tohoto konstruktů a lokalizaci fúzního proteinu MBD-GFP. Ve stabilně transformované *M. sativa* byly pozorovány kortikální mikrotubuly v kořenové čepičce (Obr. 24 B), rhizodermálních buňkách kořene (Obr. 24 A) a kořenových vláscích (Obr. 24 G). Byly také pozorovány mitotické mikrotubuly v jednotlivých stádiích mitózy a cytokineze (Obr. 24 C–F). Rostliny stabilně exprimující tento konstrukt mohou být využity v dalším výzkumu, především ve studiu interakce symbiotických bakterií s kořeny *M. sativa*.

Konstrukt *mRFPL:TUB6* byl úspěšně využit pro vizualizaci mikrotubulů v modelové rostlině *A. thaliana* (Fujita *et al.*, 2011). Z časových důvodů nebylo možné získat zakořeněná somatická embrya exprimující konstrukt *mRFPL:TUB6*, která by byla možná pozorovat pomocí konfokálního mikroskopu. Z tohoto důvodu není možné hodnotit účinnost tohoto konstruktů v *M. sativa*.

Konstrukt *tagRFP:TUA6* stabilně transformovaný v rostlině *A. thaliana* byl využit ve studii zabývající se mechanismem tvorby cytokinetického fragmoplastu (Murata *et al.*, 2013). Při stabilní transformaci *M. sativa* tímto konstruktem bylo taktéž možné pozorovat mitotické a cytokinetické mikrotubuly, konkrétně raný fragmoplast (Obr. 25 C). Pozorovány byly také kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořene (Obr. 25 A, B).

Dalším cílem experimentální práce byla indukce somatické embryogeneze z listových explantátů rostliny, která již stabilně exprimovala konstrukt *tagRFP:TUA6*. Listové

explantáty byly pěstovány na kultivačních médiích bez přítomnosti selekčních antibiotik, což se projevilo v rychlosti tvorby kalusu. Nepřítomnost antibiotik ovšem ztížila selekci jednotlivých somatických embryí, která závisela pouze na pozorování fluorescenčním mikroskopem.

Pomocí CLSM byly pozorovány mikrotubuly v buňkách kořenové čepičky (Obr. 28 D) a v rhizodermis kořene (28 A, B). Byly pozorovány mitotické mikrotubuly tvořící dělicí vřeténko (Obr. 28 D) a fragmoplasty (Obr. 28 E). Bylo získáno 7 kompletních rostlin, které tento konstrukt stabilně exprimovalo. Tyto rostliny byly přeneseny do *ex vitro* podmínek a mohou být využity pro budoucí experimenty.

6 ZÁVĚR

Teoretická část této bakalářské práce byla věnována rostlinnému cytoskeletu – aktinovým filamentům a mikrotubulům a jejich úloze při buněčném dělení. Dále byly popsány techniky přímé i nepřímé transformace, které je možné využít při transformaci *M. sativa*. Závěr teoretické části byl věnován somatické embryogenezi *M. sativa*.

V první části experimentální práce byly transformovány jednotlivé plasmidy nesoucí konstrukty *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6* a *mRFPL:TUB6* do *E. coli* TOP10. Po izolaci plasmidové DNA a jejím ověření restrikním štěpením následovala transformace *A. tumefaciens* GV3101 jednotlivými plasmidy. Po opětovné izolaci plasmidové DNA proběhlo restrikní štěpení pro ověření přítomnosti požadovaných konstruktů v plasmidech.

Funkčnost všech konstruktů byla také ověřena tranzientní transformací listů *N. benthamiana*, která potvrdila účinnost všech konstruktů.

Konstrukty *lifeact:mCherry*, *tagRFP:TUA6*, *mRFPL:TUB6* a *MAP4:GFP* byly prostřednictvím *A. tumefaciens* stabilně transformovány do *M. sativa*. Regenerací transformovaných listových explantátů bylo získáno celkem 5 zakořeněných somatických embryí stabilně exprimujících konstrukt *lifeact:mCherry*, 4 zakořeněná somatická embrya stabilně exprimující konstrukt *MAP4:GFP* a 1 zakořeněné somatické embryo exprimující konstrukt *tagRFP:TUA6*. Rostliny regenerované z těchto somatických embryí mohou být využity pro další studium, například interakce symbiotických bakterií s kořeny *M. sativa*. Transgenní rostliny exprimující konstrukt *mRFPL:TUB6* nebylo z časových důvodů možné získat. Regenerace se nachází ve stádiu somatické embryogeneze a u 4 somatických embryí byl pozorován fluorescenční signál fúzního proteinu mRFPL-TUB6.

Poslední část byla věnována indukci somatické embryogeneze z listových explantátů rostliny *M. sativa*, která již stabilně expimovala konstrukt *tagRFP:TUA6*. Ze získaných somatických embryí se podařilo vypěstovat 7 kompletních rostlin, u kterých byly pomocí CLSM pozorovány kortikální, mitotické i cytokinetické mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořene.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmed A.B.A., Rao A.S., Rao M.V., Taha R.M. (2011): Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllanthus nodiflorus* (L.) Greene. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **54**, 7–13.
- Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P. J., Fauquet C., Huang N., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Thanh Nguyen T., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D. A., Stoger A., Taylor N., Visser R. (2005): Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding* **15**(3), 305–327.
- Amini M., Deljou A., Nabiabad H. S. (2016): Improvement of in vitro embryo maturation, plantlet regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **22**(3), 321–330.
- Bevan M (1984): Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* **12**, 8711–8721.
- Bingham E.T., Hurley L.V., Kaatz D.M., Saunders J.W. (1975): Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Science* **15**, 719–721.
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. (2014): Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews* **94**, 235–263.
- Bonder E.M., Mooseker M.S. (1986): Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament. *Journal of Cell Biology* **102**, 282–288.
- Bonfante P., Genre A. (2010): Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* **1**, 48.
- Bourras S., Rouxel T., Meyer M. (2015): Agrobacterium tumefaciens gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology* **105** (10), 1288–1301.
- Braekman J.C., Daloze D., Moussiaux B., et al. (1987): Jaspamide from the Marine Sponge *Jaspis johnstoni*. *Journal of Natural Products* **50**(5), 994–995.
- Brandizzi F., Snapp E.L., Roberts A.G., Lippincott-Schwartz J., Hawes, C. (2002): Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* **14**, 1293–1309.
- Brandizzi F., Wasteneys G.O. (2013): Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *The Plant Journal* **75**, 339–49.
- Cai G., Cresti, M. (2012): Are kinesins required for organelle trafficking in plant cells? *Frontiers in Plant Science*. **3**, 170.
- Cao J., Duan X., McElroy D., Wu R. (1992): Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports* **11**, 586–591.
- Carlson A.R., Letarte J., Chen J., Kasha K.J. (2001): Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* **20**(4):331–337.
- Castellanos-Hernández O.A., Rodríguez-Sahagun A., Acevedo-Hernández G.J., Rodríguez-Garay B., Cabrera-Ponce J.L., Herrera-Estrella L.R. (2009): Transgenic paulownia *elongata* S.Y. Hu plants using biolistic-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **99**(2), 175–181.
- Dangol S., Singh R., Chen Y., Jwa N. S. (2017): Visualization of Multicolored in vivo Organelle Markers for Co-Localization Studies in *Oryza sativa*. *Molecules and cells* **40**(11), 828–836.
- Day R.N., Davidson M.W. (2009): The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews* **38**(10), 2887–2921.

- Djuzenova C. S., Zimmermann U., Frank H., Sukhorukov V.L., Richter E., Fuhr G. (1996): Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **1284**, 143–52.
- Dou L., He K., Higaki T., Wang X., Mao T. (2018): Ethylene Signaling Modulates Cortical Microtubule Reassembly in Response to Salt Stress. *Plant physiology*, **176**, 2071–2081.
- Dyachok J., Paez-Garcia A., Yoo C.M., Palanichelvam K., Blancaflor E.B. (2016): Fluorescence Imaging of the Cytoskeleton in Plant Roots. *Methods in Molecular Biology* **1365**, 139–153.
- Dyachok J., Sparks J.A., Liao F.Q., Wang Y.S., Blancaflor E.B. (2014): Fluorescent protein-based reporters of the actin cytoskeleton in living plant cells: fluorophore variant, actin binding domain, and promoter considerations. *Cytoskeleton* **71**, 311–327.
- El-Assal S.E., Le J., Basu D., Mallery E.L., Szymanski D.B. (2004): DISTORTED encodes an ARPC2 subunit of the putative *Arabidopsis* ARP2/3 complex. *The Plant Journal* **38**, 526–538.
- Fang I.-J., Trewyn B. G. (2012): Application of Mesoporous Silica Nanoparticles in Intracellular Delivery of Molecules and Proteins. *Methods in enzymology* **508**, 41-59.
- Ferradini N., Giancaspro A., Nicolìa A., Gadaleta A., Veronesi F., Rosellini D. (2016): Efficient, Antibiotic Marker-Free Transformation of a Dicot and a Mo-nocot Crop with Glutamate 1-Semialdehyde Aminotransferase Selectable Marker Genes. In: *Protocol Recombinant Proteins from Plants: Methods and Protocols*. (MacDonald, J., Kolotilin, I. and Menassa, R., Eds.), Springer, Berlin, Germany, 89-98.
- Ferradini N., Nicolìa A., Capomaccio S., Veronesi F., Rosellini D. (2011): A Point Mutation in the *Medicago sativa* GSA Gene Provides a Novel, Efficient, Se-lectable Marker for Plant Genetic Engineering. *Journal of Biotechnology* **156**,147-152.
- Fraley R. T., Rogers S.G., Horsch R.B., Eichholtz D.A., Flick J.S., Fink C.L., Hoffmann N.L., Sanders P.R. (1985): The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Biotechnology (N Y)* **3**, 629–635.
- Franklin C. I., Dixon R. A. (1994): Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. (Dixon R A, Gonzales R A, eds.), Oxford University Press, New York, U.S.A., pp. 11-25.
- Fujii J. A., Slade D., Olsen R., Ruzin S. E., Redenbaugh K. (1990): Alfalfa somatic embryo maturation and conversion into plants. *Plant Science* **72**, 93-100.
- Fujita M., Himmelspach R., Hocart C.H., Williamson R.E., Mansfield S.D., Wasteneys G.O. (2011): Cortical microtubules optimize cell-wall crystallinity to drive unidirectional growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **66**, 915-928.
- Gelvin S. B. (2003): Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and molecular biology reviews* **67**, 16–37.
- Gelvin S. B. (2017): Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics* **51**, 195–217.
- Giancaspro A., Rosellini D., Blanco A., Gadaleta A. (2012): Gabaculine Selection Using Bacterial and Plant Marker Genes (GSA-AT) in Durum Wheat Transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **109**, 447-455.
- Gilliland L.U., Pawloski L.C., Kandasamy M.K., Meagher R.B. (2003): *Arabidopsis* actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *The Plant Journal* **33**, 319–28.
- Grebe M., Xu J., Mobius W., Ueda T., Nakano A., Geuze H. J., Rook M. B., Scheres B. (2003): *Arabidopsis* Sterol Endocytosis Involves Actin-Mediated Trafficking via ARA6-Positive Early Endosomes. *Current Biology* **13**, 1378–1387.
- Gutjahr C., Parniske M. (2013): Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **29**, 593–617.
- Harrison M. J., Choudhary A.D., Dubery I., Lamb C.J., Dixon R.A. (1991): Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 8. Cis-elements and transacting factors for the quantitative expression of a bean chalcone synthase gene promoter in electroporated alfalfa protoplasts. *Plant Molecular Biology* **16** (5), 877–890.

- Harrison M.J. (2012): Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 691–698.
- Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Teixeira da Silva J.A., Fujita M. (2012): Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies*. (Bandi V., Shanker A.K., Shanker C., Mandapaka M., Eds.), Springer, Berlin, Germany, 261–316.
- Hashimoto T. (2015): Microtubules in plants. *The Arabidopsis Book* **13**, 1-20.
- Hawkins C., Yu L. X. (2018): Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal* **6**, 565-575.
- He D.G., Mouradov A., Yang Y.M., Mouradova E., Scott K.J. (1994): Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) through electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports* **14**, 192–196.
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2006): Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chemické listy* **100**, 495-500.
- Hill K.K., Jarvis-Eagan N., Halk E.L., Krahn K.J., Liao L.W., Mathewson R.S., Merlo, D.J., Nelson S.E., Rashka K.E., Loesch-Fries L.S. (1991): The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Biotechnology* **9**, 373-377.
- Huang M., Zhang L. (1999): Association of the movement protein of alfalfa mosaic virus with the endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulb scales. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** (8), 680–90.
- Huang S., An Y.Q., McDowell J.M., McKinney E.C., Meagher R.B. The Arabidopsis ACT11 actingene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Molecular Biology* **33**, 125–39.
- Hussey P.J., Ketelaar T., Deeks M.J. (2006): Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 109-25.
- Charest P. J., Devantier Y., Lachance D. (1996): Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **32**, 91–99.
- Chawla H. S. (2002): *Introduction to plant biotechnology*, 2. vydání, Science Publishers Inc., Enfield, USA, 538 stran.
- Checucci A., Azzarello E., Bazzicalupo M., Galardini M., Lagomarsino A., Mancuso S., Marti L., Marzano M.C., Mocali S., Squartini A., Zanardo M., Mengoni A. (2016): Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti-medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1-11.
- Christie P. J., Gordon J. E. (2014): The Agrobacterium Ti Plasmids. *Microbiol Spectr* **2**(6), 1-29.
- Christou P. (1992): Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The plant journal* **2**(3), 275-281.
- Chudakov D., Matz M., Lukyanov S., Lukyanov K. (2010): Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiological Reviews* **90**, 1103-1163.
- Inan G., Zhang Q., Li P., Wang Z., Cao Z., Zhang H., Zhang C., Quist T.M., Goodwin S.M., Zhu J., Shi H., Damsz B., Charbaji T., Gong Q., Ma S., Fredricksen M., Galbraith D.W., Jenks M.A., Rhodes D., Hasegawa P.M., Bohnert H.J., Joly R.J., Bressan R.A., Zhu J.K. (2004): Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology* **135**, 1718–1737.
- Ivanov S., Harrison M. J. (2014): A set of fluorescent protein-based markers expressed from constitutive and arbuscular mycorrhiza-inducible promoters to label organelles, membranes and cytoskeletal elements in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **80**, 1151–1163.
- Jan S.A., Shinwari Z.K., Shan S.H., Shahzad A., Zia M. A., Ahmad N. (2016): In-plant transformation: recent advances. *Romanian Biotechnological Letters* **21**, 11085-11091.
- Jiang Q. Zhang J.Y., Guo X., Monteros M.J., Wang Z.Y. (2009): Physiological characterization of transgenic Alfalfa (*Medicago sativa*) plants for improved drought tolerance. *International Journal of Plant Sciences* **170**, 969–978.

- Jin T., Chang Q., Li W., Yin D., Li Z., Wang D., Liu B., Liu L. (2010): Stress-inducible expression of GmDREB1 conferred salt tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **100**, 219–227.
- Johnson F.H., Shimomura O. (1978): Introduction to the bioluminescence of medusae, with special reference to the photoprotein aequorin. *Methods in enzymology* **57**, 271–291.
- Johnson L. D., Marquez-Ortiz J. J., Lamb J. F., Barnes D. K. (1998): Root Morphology of Alfalfa Plant Introductions and Cultivars. *Crop Science* **38**, 497-502.
- Joshee N., Biswas B.K., Yadav A.K. (2007): Somatic embryogenesis and plant development in *Centella asiatica* L. a highly prized medicinal plant of the tropics. *Horticultural Science* **42**, 633–637.
- Joshi B. N., Sainani M. N., Bastawade K. B., Gupta V. S., Ranjekar P. K. (1998): *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246**, 382-387.
- Kado C. I. (2000): The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 643–648.
- Kemner J. M., Liang X., Nester E. V. (1997): The *Agrobacterium tumefaciens* Virulence Gene *chvE* Is Part of a Putative ABC-Type Sugar Transport Operon. *Journal of bacteriology* **179**, 2452–2458.
- Kijima S.T., Staiger C.J., Katoh K., Nagasaki A., Ito K., Uyeda T.Q. (2018): Arabidopsis vegetative actin isoforms, AtACT2 and AtACT7, generate distinct filament arrays in living plant cells. *Scientific Reports* **8**:4381, <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22707-w>.
- Kim H., Park M., Kim S.J., Hwang I. (2005): Actin filaments play a critical role in vacuolar trafficking at the Golgi complex in plant cells. *Plant Cell* **17**, 888–902.
- Kirti P. B. (2008): *Handbook of New Technologies for Genetic Improvement of Legumes*. CRC press, Florida, USA, 680 stran.
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E. and Christou, P. (2003): Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology*. **52**, 247–258.
- Komis G, Luptovčiak I, Doskočilova A, Šamaj J. (2015) Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnology Advances* **33**, 1043-62
- Konig A. (2003): A framework for designing transgenic crops—science, safety and citizen's concerns. *Nature Biotechnology* **21**, 1274–1279.
- Kopczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P. (1992): The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *Plant Cell* **4**, 539–47.
- Kost B., Chua N.H. (2002): The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference *Cell* **108**, 9-12.
- Kost B., Spielhofer P., Chua, N. H. (1998): A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *The Plant Journal* **16**, 393–401.
- Kosturkova G. (1993): Expression of Foreign Genes Following Electroporation of *Medicago* Protoplasts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **7**(2), 43-46.
- Krishnakumar V., Kim M., Rosen B. D., Karamycheva S., Bidwell S. L., Tang H., Town C. D. (2015): MTGD: The *Medicago truncatula* Genome Database, *Plant and Cell Physiology*, **56** (1), 1-9.
- Krochko J. E., Pramanik S. K., Bewley J. D. (1992): Contrasting storage protein synthesis and mRNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **99**, 46-53.
- Lai F. M., McKersie B. D. (1993): Effect of nutrition on maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science* **91**, 87-95.
- Lee Y.R., Giang H.M., Liu B. (2001): A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles. *Plant Cell* **13**, 2427–2439.
- Lee Y.R., Liu B. (2004): Cytoskeletal motors in *Arabidopsis*. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiology*. **136**, 3877–3883.
- Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2015): Signaling to Actin Stochastic Dynamics. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 1.1–1.26.

- Li J., Xu Y., Chong K. (2012): The novel functions of kinesin motor proteins in plants. *Protoplasma* **249**, 95–100.
- Li, X.; Pan, S.Q. (2017): Agrobacterium delivers VirE2 protein into host cells via clathrin-mediated endocytosis. *Science Advances* **3**, 1–11.
- Litz R.E. (1993): Organogenesis and somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* **336**, 199–206.
- Liu B., Joshi H.C., Wilson T.J., Silflow C.D., Palevitz B.A., Snustad D.P. (1994): Gamma-tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* **2**(6), 303–14.
- Liu F., Cao M.Q., Li Y., Robaglia C., Tourneur C. (1998): In planta transformation of pakchoi (*Brassica campestris* L ssp *Chinensis*) by infiltration of adult plants with Agrobacterium. *Acta Horticulturae* **467**, 187–192.
- Marc J., Granger C. L., Brincat J., Fisher D. D., Kao T., McCubbin A. G., Cyr R. J. (1998): A GFP-MAP4 Reporter Gene for Visualizing Cortical Microtubule Rearrangements in Living Epidermal Cells: *The Plant Cell* **10** (11), 1927-1939.
- Marc J., Granger C.L., Brincat J, Fisher D.D., Kao T.-H., McCubbin A.G., Cyr R.J. (1998): A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**, 1927-1940.
- Margolin G., Gregoret I. V., Cickovski T. M., Li C., Shi W., Alber M. S., Goodson H. V. (2012): The mechanisms of microtubule catastrophe and rescue: implications from analysis of a dimer-scale computational model. *Molecular Biology of the Cell* **23** (4), 642–656.
- Middleton R., Sjolander K., Krishnamurthy N., Foley J., Zambryski P. (2005): Predicted hexameric structure of the Agrobacterium VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 1685–1690.
- Mitten D.H., Sato S.J., Skokut T.A. (1984): In vitro regeneration potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Science* **24**, 943-945.
- Moltrasio R., Robredo C.G., Gomez M.C., Diaz Paleo A.H., Diaz D.G., Rios R.D., Franzone, P.M. (2004): Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favorable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**, 119-124.
- Monteiro M., Appezzato-da-Glória B., Valarini M. J., de Oliveira C. A., Vieira M. L. (2003): Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. *Scientia Agricola* **60**, 683-689.
- Murata T., Sano T., Sasabe M., Nonaka S., Higashiyama T., Hasezawa S., Machida Y., Hasebe M. (2013): Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature communications* **4**, 1-12.
- Mysore K. S., Bassuner B., Deng X. B., Darbinian N. S., Motchoulski A., Ream W., Gelvin S. B. (1998): Role of the Agrobacterium tumefaciens VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 668–83.
- Nakamura, M., Naoi, K., Shoji, T., and Hashimoto, T. (2004): Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in *Arabidopsis* epidermal cells. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1330-1334.
- Nicolia A., Ferradini N., Veronesi F., Rosellini D. (2017): An Insight into T-DNA Integration Events in *Medicago sativa*. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1-16.
- Nogales E., Wolf S. G., Downing K. H. (1998): Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-203.
- Nolan K.E., Rose R. J., (1998): Plant regeneration from cultured *Medicago truncatula* with particular reference to abscisic acid and light treatments. *Australian Journal of Botany* **46**, 151-160.
- Pereira L. F., Erickson L. (1995): Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant cell reports* **14**, 290-293.
- Pescitelli S., Sukhapinda K. (1995): Stable transformation via electroporation into maize type II callus and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Reports* **14** (11), 712–6.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002): Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cellular & Molecular Biology Letters* **7**(3), 849–858.

- Rao A. Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A., Husnain T., Riazuddin S. (2009): The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* **27**, 753-763.
- Rashmi R., Sarkar M., Aditya V. (1997): Cultivation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ancient Science of Life* **17**, 117-119.
- Reddy A.S., Day I.S. (2001): Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biology* **2**, 1-17.
- Riedl J., Crevenna A. H., Kessenbrock K., Yu J.H., Neukirchen D., Bista M., Bradke F., Jenne D., Holak T. A., Werb Z., Sixt M., Wedlich-Soldner R. (2008): Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* **5**, 605-607.
- Rivera A.L., Gomez-Lim M., Fernandez F., Loske A.M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* **9** (3), 308-345.
- Roh J. Y., Koo B. C., Kwon M. S., Kim M., Kim N.-H., Kim T. (2013): Modification of Enhanced Green Fluorescent Protein for Secretion out of Cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **18**, 1135-1141.
- Samac D.A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods in Molecular Biology* **343**, 301-311.
- Samac D.A., Smigocki A. C. (2003): Expression of oryzacystatin I and II in transgenic alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode. *Phytopathology* **93**, 799-804.
- Sanford J.C., Smith F.D., Russel J.A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* **217**, 483-509.
- Saunders, J.W., Bingham, E.T. (1972): Production of alfalfa plants from tissue culture. *Crop Science*. **12**, 804-808.
- Seagull R. W. (2016): *The Plant Cytoskeleton. Reference Module in Food Science*, doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.02873-0.
- Sehroeder H.E., Khan R.I., Knibb W.R., Spencer D., Higgins T.J.V. (1991): Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars. *Australian journal of plant physiology* **18**, 495-505.
- Sheahan M. B., Staiger C. J., Rose R. J., McCurdy D. W. (2004): A Green Fluorescent Protein Fusion to Actin-Binding Domain 2 of *Arabidopsis* Fimbrin Highlights New Features of a Dynamic Actin Cytoskeleton in Live Plant Cells. *Plant Physiology* **136**, 3968-3978.
- Shen Y., Chen Y., Wu J., Shaner N. C. Campbell R. E. (2017): Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *Public Library of Science* **12** (2), e0171257.
- Sheng J., Citovsky V. (1996): Agrobacterium-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* **8**, 1699-1710.
- Shetty K., McKersie B.D. (1993): Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*. **88**, 185-193.
- Snustad D.P., Haas N.A., Kopczak S.D., Silflow C.D. (1992): The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *Plant Cell* **4**, 549-56.
- Sood P., Bhattacharya A., Sood A. (2011): Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum* **55**(1), 1-15.
- Spector I., Shochet N.R., Kashman Y., Groweiss A. (1983): Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**, 493-495.
- Stuart D. A., Strickland S. G. 1984: Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters* **34**, 165-174.
- Tian L., Wang H., Wu K., Latoszek-Green M., Hu M., Miki B., Brown D. (2002): Efficient Recovery of Transgenic Plants through Organogenesis and Embryogenesis Using A Cryptic Promoter to Drive Marker Gene Expression. *Plant Cell Reports* **20**, 1181-1187.
- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A. (2000): Transformation of *Medicago truncatula* via Infiltration of Seedlings or Flowering Plants with *Agrobacterium*. *The Plant Journal* **22**, 531-541.

- Turgut-Kara N., Ari S. (2010): The optimization of voltage parameter for tissue electroporation in somatic embryos of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *African Journal of Biotechnology* **9**(29), 4584–4588.
- Ueda H., Yokota E., Kutsuna N., Shimada T., Tamura K., Shimmen T., Hasezawa S., Dolja V.V., Hara-Nishimura I. (2011): Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* **107**, 6894–6899.
- Valentine L. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* and the Plant: The David and Goliath of Modern Genetics. *Plant Physiology* **133**, 948–955.
- Votrubová O. (2011): *Anatomie rostlin*. 3. vydání, Karolinum, Praha, Česká republika, 192 stran.
- Vyplelová P., Ovečka M., Šamaj J. (2017): Alfalfa Root Growth Rate Correlates with Progression of Microtubules during Mitosis and Cytokinesis as Revealed by Environmental Light-Sheet Microscopy. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1870.
- Waldmann H., Hu T., Renner S., et al. (2008): Totalsynthese von Chondramid C und Bindung an F-Aktin. *Angewandte Chemie* **120**(34), 6573–6577.
- Weeks J. T., Ye J., Rommens C. M. (2008): Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*. **17**, 587–597.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., et al. (2001): The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2317–2323.
- Xu X., Li B. (1994): Fertile transgenic indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. *Plant Cell Reports* **13**, 237–242.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., van Montagu M., Schell J. (1983): Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *THE EMBO Journal* **2**, 2143–2150.
- Zhang B., Liu Y., Li X. (2015): Alteration in the expression of cytochrome P450s (CYP1A1, CYP2E1, and CYP3A11) in the liver of mouse induced by microcystin-LR. *Toxins* **7**, 1102–1115.
- Zhang B.H., Liu F., Liu Z.H., Wang H.M., Yao C.B. (2001): Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. *Plant Growth Regulation* **33**, 137-149.
- Zhang H., Huang Q., Su J. (2010): Development of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Regeneration System and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Agricultural Sciences in China* **9** (2), 170-178.
- Zhang J.Y., Broeckling C.D., Blancaflor E.B., Sledge M.K., Sumner L.W., Wang Z.Y. (2005): Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal* **42**, 689–70.
- Zhang Y., Liu J. (2011): Transgenic alfalfa plants co-expressing glutathione S-transferase (GST) and human CYP2E1 show enhanced resistance to mixed contaminants of heavy metals and organic pollutants. *Journal of Hazardous Materials* **189**, 357–362.
- Zhang Y.M., Liu Z.H., Wen Z.Y., Zhang H.M., Yang F., Guo X.L. (2012): The vacuolar Na⁺ – H⁺ antiport gene TaNHX2 confers salt tolerance on transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Functional Plant Biology* **39**, 708.
- Zhu C., Dixit, R. (2012): Functions of the Arabidopsis kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins. *Protoplasma* **249**, 887–899.
- Zhu J., Oger P.M., Schrammeijer B., Hooykaas P.J.J., Farrand S.K., Winans S.C. (2000): The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* **182**, 3885–3895.
- Zupan J., Muth T. R., Draper O., Zambryski P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* **23**, 11-28.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
ABA	abcisová kyselina
ABD2	aktin-vážíci doména 2
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
<i>bar</i>	fosfinotricin N-acetyltransferasa
BFP	modrý fluorescenční protein
CFP	modro-zelený fluorescenční protein
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DREB1	dehydration-responsive element-binding protein
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	ednoplasmatické retikulum
F-aktin	filamentální aktin
GA	Golgiho aparát
G-aktin	globulární aktin
GDP	guanosindifosfát
GSA	glutamát-1-semialdehyd aminotransferasa
GST	glutathion-S-transferasa
GTP	guanosintrifosfát
H ⁺	vodíkový kation
<i>HPT</i>	hygromycinfosfottransferasa
Chve	cukr-vážíci periplasmový receptor
LB médium	lysogen broth médium
MAP4	mitogen aktivovaný protein 4
MBD	mikrotubuly-vážíci doména
MES	kyselina 2-(N-morpholino)ethanesulfonová
MS médium	Murashige a Skoog médium
Na ⁺	sodný kation

NHX2	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 2
<i>NPTII</i>	neomycinfosfottransferasa II
OD	optická denzita
P _i	anorganický fosfát
PPB	preprofázní svazek
RFP	červený fluorescenční protein
RNasa A	ribonukleasa A
RSY	kultivar Regen SY
SH médium	Shenk a Hildebrant médium
SOC médium	super optimal broth médium s glukosou
T-DNA	transferová DNA
Ti plasmid	tumor indukující plasmid
UV	ultrafialové záření
YFP	žlutý fluorescenční protein