

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Vývojová dokumentácia interakcií rastlín lucerny (*Medicago sativa* L.) s prospešnými mikróbmi

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michal Benkovský
Študijní program:	B1406 Biochémia
Študijní obor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúci práce:	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, PhD
Rok:	2021

Prehlasujem, že som prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa:

Pod'akovanie

„Chem sa predovšetkým poďakovať svojmu školiteľovi bakalárskej práce prof. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za cenné rady, odbornú pomoc, konzultácie a užitočné pripomienky pri písaní tejto bakalárskej práci. Ďalej by som chcel poďakovať celému kolektívu na Oddelení bunecnej biológie za pomoc a užitočné rady pri práci v laboratóriu. Taktiež by som sa rád poďakoval i vedúcemu oddelenia prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnenie využitia vybavenia pri práci v laboratóriu.“

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Michal Benkovský
Názov práce	Vývojová dokumentácia interakcií rastlín lucerny (<i>Medicago sativa</i> L.) s prospešnými mikróbmi
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Oddelenie bunecnej biológie CRH
Vedúci práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Medicago sativa L. ssp. je jednou z najdôležitejších a najrozšírenejších bôbových krmovín hospodárskych zvierat na svete. Jej výnimočnou vlastnosťou je schopnosť interagovať so symbiotickými baktériami, tvoriť koreňové hľúzky a asimilovať atmosférický dusík. Vďaka tejto vlastnosti obohacuje pôdy o dusíkaté látky, ktoré sú dostupné pre následne rastliny. Lucerna siata je týmto spôsobom schopná eliminovať a nahradiť extenzívne využívanie chemicky pripravovaných dusíkatých hnojív. Využitím transgénej línie *Medicago sativa* s expresiou GFP-FABD2 je možné sledovať aktívny cytoskelet v procese symbiocy. Cieľom tejto bakalárskej práce bola regenerácia a kultiváciu transgénnych rastlín *Medicago sativa* v kontrolných podmienkach procesom somatickej embryogenézy a na následné určenie fenotypu získaných rastlín. Vyhodnotili sa merania dĺžok koreňových systémov transgénnych a kontrolných rastlín *Medicago sativa*. Výsledky ukázali, že rastliny transgénej línie GFP-FABD2 majú mierne dlhšie koreňové systémy. Ďalej boli tieto rastliny kokultivované s baktériami *Sinorhizobium meliloti* a sledovali sa symbiotické interakcie týchto rastlín so zameraním na efektivitu procesu tvorby koreňových hľúzok. Výsledky ukázali, že tvorba koreňových hľúzok u transgénej línie GFP-FABD2 bola približne dvojnásobne vyššia než u kontrolných rastlín RSY.

Kľúčové slová	<i>Medicago sativa</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> , GFP-FABD2, somatická embryogenéza, symbiotické interakcie, koreňový systém
Počet strán	64
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Michal Benkovský
Title	Developmental documentation of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) interactions with beneficial microbes
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Medicago sativa L. ssp. is one of the most important and widespread forage legumes of livestock in the world. Its unique feature is the ability to interact with symbiotic bacteria, form root nodules and assimilate atmospheric nitrogen. Thanks to this property, it enriches the soil with nitrogenous substances, which are available for subsequent plants. In this way, alfalfa is able to eliminate and replace the extensive use of chemically prepared nitrogen fertilizers. Using a transgenic line *Medicago sativa* expressing GFP-FABD2, it is possible to monitor the actin cytoskeleton in the process of symbiosis. The aim of this bachelor thesis was the regeneration and cultivation of transgenic *Medicago sativa* plants under control conditions by the process of somatic embryogenesis and the subsequent determination of the phenotype of obtained plants. Measurements of the lengths of the root systems of transgenic and control *Medicago sativa* plants were evaluated. The results showed that plants of the transgenic line GFP-FABD2 have slightly longer root systems. Furthermore, these plants were co-cultivated with *Sinorhizobium meliloti* and the symbiotic interactions of these plants were monitored with a focus on the efficiency of the root nodule formation process. The results showed that the formation of root nodules in the transgenic line GFP-FABD2 was approximately twice as higher as in the control RSY plants.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> , GFP-FABD2, somatic embryogenesis, symbiotic interactions, root system
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

CIELE PRÁCE	8
1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	2
2.1 Lucerna siata (<i>Medicago sativa</i> L.).....	2
2.1.1 Všeobecná charakteristika	2
2.1.2 Stonka a listy	2
2.1.3 Koreň	3
2.1.4 Kvet.....	3
2.1.5 Plody a semená	4
2.1.6 Agronomické využitie	5
2.2 Interakcie rastlín s prospešnými pôdnymi baktériami	5
2.2.1 Priame mechanizmy pôdných baktérií, podporujúce rast rastlín.....	7
2.2.1.1 Fixácia dusíka.....	7
2.2.1.2 Solubilizácia fosforečnanov	8
2.2.1.3 Sekvestrovanie železa	8
2.2.1.4 Modulácia fytohormónov	9
2.2.2 Nepriame mechanizmy pôdných baktérií, podporujúce rast rastlín.....	10
2.3 Symbiotické interakcie rastlín rodu <i>Medicago</i> s rhizóbiálnymi baktériami	10
2.3.1 Všeobecná charakteristika	10
2.3.2 Signalizácia v procese rhizóbiálnej infekcie a organogenézy koreňových hlúčok	11
2.3.2.1 Nodulačné faktory.....	11
2.3.2.2 Rozpoznanie bakteriálnych signálov	11
2.3.2.3 Symbiotická signálna dráha.....	12
2.3.2.4 Transkripčná regulácia procesu rhizóbiálnej infekcie a organogenézy koreňových hlúčok	13
2.3.3 Internalizácia rhizóbií a tvorba infekčného vlákna.....	14
2.3.4 Organogenéza koreňových hlúčok a tvorba symbiozómov	16
2.4 Cytoskelet rastlinných buniek.....	18
2.4.1 Všeobecná charakteristika	18
2.4.2 Zmeny aktínového cytoskeletu počas symbiôzy <i>Medicago</i> s rhizóbiálnymi baktériami	19
2.5 Indukcia a regenerácia rastlín rodu <i>Medicago</i> <i>in vitro</i> procesom somatickej embryogenézy	20
2.6 Transgenóza a stabilná transformácia u <i>Medicago sativa</i>	22
2.6.1 Transformácia sprostredkovaná baktériou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
2.6.2 Transformácia elektroporáciou	22
2.6.3 Transformácia metódou bombardovania časticami.....	22
2.7 Mikroskopia živých buniek	23

2.7.1	Light-sheet fluorescenčná mikroskopia	23
2.7.2	Mikroskopia s vysokým rozlíšením	24
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
3.1	Materiál	25
3.1.1	Použité chemikálie	25
3.1.2	Použité prístroje	26
3.1.3	Roztoky a média	27
3.1.4	Software na spracovanie výsledkov	31
3.1.5	Rastlinný materiál	31
3.1.6	Bakteriálny materiál	32
3.2	Metódy	32
3.2.1	Príprava B5H média na indukciu kalogenézy	32
3.2.2	Príprava B50 média na indukciu embryogénneho kalusu a produkciu somatických embryí.	32
3.2.3	Príprava MMS média na vývoj koreňov a výhonkov zo somatických embryí	33
3.2.4	Príprava MS média na udržiavanie regenerovaných rastlín v <i>in vitro</i> podmienkach	33
3.2.5	Príprava pevného Fahræus média bez obsahu dusíka	34
3.2.6	Príprava tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka	34
3.2.7	Príprava LB média pre <i>S. meliloti</i>	34
3.2.8	Odobranie a povrchová sterilizácia listov z donorových rastlín na indukciu nepriamej somatickej embryogenézy	35
3.2.9	Sledovanie priebehu somatickej embryogenézy	35
3.2.10	Meranie dĺžky koreňového systému <i>Medicago sativa</i>	35
3.2.11	Príprava kultúry <i>S. meliloti</i> zo zásobného roztoku	36
3.2.12	Kokultivácia <i>S. meliloti</i> s <i>M. sativa</i>	36
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Kultivácia a regenerácia rastlín <i>M. sativa</i> v <i>in vitro</i> podmienkach pomocou somatickej embryogenézy	37
4.2	Meranie dĺžky koreňového systému transgénnych a kontrolných rastlín <i>Medicago sativa</i>	43
4.3	Kokultivácia kontrolných a transgénnych rastlín <i>M. sativa</i> so <i>S. meliloti</i>	45
5	DISKUSIA	48
6	ZÁVER	50
7	ZOZNAM LITERATÚRY	51
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	61

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Vypracovanie rešerše zameranej na problematiku:

- poľnohospodárskeho a biologického významu druhu *Medicago sativa* L.
- poľnohospodárskeho a ekologického významu pôdných druhov baktérií *Rhizobium*
- signálnych, vývojových a štruktúrnych aspektov interakcií rastlín lucerny satej s *Sinorhizobium meliloti* v procese tvorby hľúzok
- transformácie rastlín *M. sativa* a *in vitro* regenerácie rastlín *M. sativa* procesom somatickej embryogenézy
- moderných mikroskopických metód neinvazívneho štúdia vývojových procesov rastlín

Praktická časť

- štúdium vývojových procesov rastlín *M. sativa in vitro* v kontrolných podmienkach a ich fenotypová analýza
- optimalizácia kultivačných podmienok pre riadenú aplikáciu baktérií rodu *Rhizobium*
- štúdium interakcií rastlín lucerny s baktériami rodu *Rhizobium*
- sledovanie interakcií a priebehu symbiotického procesu s expresiou fluorescenčného markeru aktínového cytoskeletu u rastlín lucerny
- kvalitatívna a kvantitatívna analýza získaných dát
- vyhodnocovanie výsledkov štúdia interakcií a vývojových procesov rastlín na úrovni koreňového systému so zameraním na efektivitu procesu tvorby koreňových hľúzok

1 ÚVOD

Medicago sativa L., patriaca k čeľadi bôbovité (*Fabaceae*), je najrozšírenejšia bôbovitá krmovina hospodárskych zvierat (Flajoulot *et al.*, 2005). Jednou z výhod strukovín je schopnosť interagovať so symbiotickými baktériami obzvlášť rodu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* a *Sinorhizobium*, ktoré dokážu v symbióze s rastlinami asimilovať atmosférický dusík (Roy *et al.*, 2020). Vďaka tejto schopnosti obohacujú pôdu o dusíkaté látky, čím poskytujú dostupnú formu dusíku následným plodinám (Radović *et al.*, 2009). Zmenou klímy sa neustále zvyšuje závažnosť biotických a abiotických stresov, ktoré ovplyvňujú produkciu *M. sativa*. Tetraploidný genóm tohto rastlinného druhu a nepríbuzenské kríženie sťažili konvenčné šľachtenie (Zhou *et al.*, 2011; Annicchiarico *et al.*, 2015). Avšak pokročilé genomické a genetické metódy umožňujú zavádzať účinné inovatívne postupy vylepšenia mnohých znakov *M. sativa* (Singer *et al.*, 2018).

Veľký prelom v spôsobe šetrného dlhodobého zobrazovania štruktúry a vývoja živých mnohobunecných organizmov predstavuje light-sheet fluorescenčná mikroskopia (LSFM), vďaka ktorej sa dá minimalizovať fototoxická spôsobená vysokými dávkami excitačného svetla. Výhodou LSFM v porovnaní s konfokálnou laserovou skenovacou mikroskopiou (CLSM) a mikroskopiou s rotujúcim diskom („spinning disk“) je, že umožňuje pozorovať živé a vyvíjajúce sa organizmy v takmer prirodzených podmienkach. LSFM je užitočná technika aj pri dokumentácii interakcií strukovín, ako je *Medicago sativa*, so symbiotickými baktériami v rôznych štádiách vzájomných interakcií v procese tvorby koreňových hlúčok (Ovečka *et al.*, 2018).

Bakalárska práca je zameraná na regeneráciu transgénnych rastlín *M. sativa* pomocou somatickej embryogenézy a ich kultivácia v *in vitro* podmienkach, a na následnú charakteristiku fenotypu takto získaných transgénnych rastlín. Ďalej boli sledované symbiotické interakcie týchto rastlín so *Sinorhizobium meliloti* so zameraním na efektivitu procesu tvorby koreňových hlúčok. Použitím transgénej línie *M. sativa* s produkciou fúzneho proteínu GFP-FABD2 je možné fluorescenčne sledovať usporiadanie a dynamiku aktínového cytoskeletu v kontrolných podmienkach v procese symbiózy s baktériami a tvorby koreňových hlúčok.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Lucerna siata (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Všeobecná charakteristika

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.), patriaca k čeľadi bôbovité (*Fabaceae*), je najstaršia pestovaná rastlina využívaná výlučne ako krmivo (Michaud *et al.*, 1988). S najväčšou pravdepodobnosťou pochádza z oblasti Malej Ázie, Zakaukazska, Iránu a Turkménska, odkiaľ sa rozšírila do mnohých krajín Ázie, Európy a Ameriky (Whyte *et al.*, 1953; Bolton, 1962; Wilsie, 1962; McWilliam, 1968; Michaud *et al.*, 1988). V súčasnosti je to najrozšírenejšia bôbovitá krmovina hospodárskych zvierat, pestovaná zhruba na ploche 32 miliónov hektárov (Michaud *et al.*, 1988; Flajoulot *et al.*, 2005). Lucerna siata je autotetraploidný druh (Stanford, 1951), s $2n = 4x = 32$ (Armstrong, 1954), pre ktorý je charakteristické rozmnožovanie cudzoopelením. Tieto vlastnosti lucerny a nepríbuzenské kríženie sťažili konvenčné šľachtenie. Ako modelová strukovina sa oveľa častejšie využíva príbuzný diploidný, samoopel'ovací druh *Medicago truncatula*, ktorý má malý genóm a krátky životný cyklus (Zhou *et al.*, 2011; Annicchiarico *et al.*, 2015). Pokrok v oblasti genómického a genetického výskumu v súčasnosti však môže výrazne prispieť k vylepšeniu mnohých znakov aj u *M. sativa*, ktoré majú biotechnologický a agronomický význam (Singer *et al.*, 2018).

2.1.2 Stonka a listy

Prierez mladej stonky lucerny má takmer štvorcový tvar. Pod epidermou stonky sa nachádza chlorenchým (obsahujúci chloroplasty) a kolenchým, ktorý slúži ako mechanické pletivo. Cievne zväzky vo všetkých stonkách lucerny sú kolaterálne. V stržni sa nachádzajú veľké nelignifikované parenchymatické bunky, ktoré sú kompaktné usporiadané (Teuber a Brick, 1988). Stonky lucerny dosahujú dĺžku až 1 m. Z púčikov na koreňovom krčku vyrastajú vedľajšie stonky, ktorých počet je podmienený vonkajšími faktormi, predovšetkým súhrnom biotických a abiotických stresových faktorov prostredia. Vedľajšie stonky taktiež môžu vyrastať z púčikov axilárnych nódov listov (Skládanka *et al.*, 2014). Usporiadanie listov, bočných výhonkov a kvetov je na hlavnej

stonke striedavé. Trichómy vyskytujúce sa na povrchu stoniek môžu byť mnohobunkové a majú paličkovitý tvar (Teuber a Brick, 1988). Jednobunkové predĺžené trichómy sú však na stonkách početnejšie (Wilson, 1913). Listy lucerny sú trojpočetné, celistvé a na stopke perovito usporiadané. Tvar čepele môže byť buď podlhovastý alebo vajcovitý. Smerom k hornej tretine listu je čepeľ na obvode zúbkovitá (Teuber a Brick, 1988; Skládanka *et al.*, 2014). Listy sú bifaciálne s prieduchmi na oboch stranách listu (Teuber a Brick, 1988). Cole a Dobrenz (1970) určili u piatich kultivarov *M. sativa* priemernú hustotu prieduchov, ktorá sa pohybovala od 146 do 265 na mm^{-2} . Taktiež zistili, že na adaxiálnej strane listu je hustota prieduchov väčšia ako na abaxiálnej strane. Na listoch sa nachádzajú podobne ako na stonke epidermálne trichómy, ktoré sú zvyčajne jednobunkové a hustejšie zastúpené na žilnatinе. Cievne zväzky v listoch vytvárajú perovitú žilnatinu (Teuber a Brick, 1988).

2.1.3 Koreň

Koreň lucerny je kolovitého tvaru, ktorý preniká v prvom roku až 1,5 m hlboko do pôdy. Počas ďalších rokov môže byť celková dĺžka koreňa väčšia ako 5 m. Celkovo môže dosiahnuť dĺžku až 10 m. V hornej časti koreňa vznikajú bočné korene v menšom počte. Na koreňovom krčku sa zakladajú púčiky, z ktorých vyrastajú vedľajšie stonky. Každoročne sa koreňový krčok zaťahuje do pôdy o 10 mm, čo zvyšuje odolnosť lucerny voči chladu (Hrabě *et al.*, 2004; Skládanka *et al.*, 2014). Rastliny s hlbokými koreňovými krčkami sa vyznačujú väčším počtom stoniek vyrastajúcich z pod povrchu pôdy a lepšou odolnosťou na abiotický a biotický stres, ako rastliny s plytkými koreňovými krčkami (Schimada a Murakami, 1976). Koreňový systém lucerny má schopnosť fixovať atmosférický dusík v symbióze s rhizóbiami, a tým pádom obohacovať pôdu o dusík (Roy *et al.*, 2020). Vďaka hlbokému zakoreneniu lucerna odoberá živiny z hlbších vrstiev pôdy a ukladá ich do koreňovej sústavy v horných vrstvách pôdy (Hrabě *et al.*, 2004).

2.1.4 Kvet

Každý kvet lucerny je zložený z kalichu, koruny, 10 tyčíniek a z piestiku. Trubica kalichu pozostáva z 5 zrastených kališných lístkov, ktoré majú na konci 5 kališných lalokov. Koruna má papilionový tvar, ktorý sa skladá z jedného veľkého okvetného lístka (tzv. „štandard“), z dvoch bočných krídlovitých okvetných lístkov a z dvoch spojených

okvetných lístkov v tvare kýlu. Kvety *M. sativa* sú zvyčajne fialovej farby. Piestik je jednopočetný a zložený zo semenníka, z hladkej dutej čnelky a z blizny. Vajíčka sú kamyotropné (Barnes *et al.*, 1972). Najvrchnejšie vajíčko v semenníku je zvyčajne orientované smerom k čnelke, zatiaľ čo zvyšné vajíčka sú zvyčajne orientované smerom k spodnej časti semenníka (Cooper *et al.*, 1937). V semenníku lucerny sa obvykle vyvíja okolo 10 až 12 vajíčok, ktorých počet sa môže výnimočne pohybovať od 6 do 18 (Barnes a Clevevand, 1963). Tyčinky vytvárajú diadelphosovú trubicu, v ktorej je 9 tyčiniek zrastených a 1 tyčinka najbližšia k veľkému okvetnému lístku je voľná. Peľnice tesne priliehajú k blizne v dvoch radoch, pretože zrastené tyčinky sú striedavo krátke a dlhé (Barnes *et al.*, 1972). Peľ lucerny je dvojjadrový (Reeves, 1930). Lucerna sa rozmnožuje cudzoopelením, no v populáciách sa môžu taktiež nachádzať aj samoopelivé jedince. Aby došlo k cudzoopeleniu, je potrebné uvoľnenie piestika a tyčiniek za pomoci opel'ovačov, ako sú včely a čmeliaky (Pelikán *et al.*, 2012; Skládanka *et al.*, 2014).

2.1.5 Plody a semená

Plodom lucerny je viacsemenný struk, v ktorom vznikajú semená obličkovitého tvaru. Počas dozrievania môže byť mnoho semien hranatých v dôsledku vonkajších a vnútorných tlakov v struku. Semeno lucerny pozostáva z osemenia (vonkajšia vrstva semena), z endospermu a z embrya. Po dozretí majú semená približne dĺžku 1 až 2 mm, šírku 1 až 2 mm a hrúbku 1 mm. Vo väčšine prípadov je ich šírka polovičná oproti dĺžke. Farba semien býva olivovozelená, žltá alebo hnedá (Teuber a Brick, 1988). Kutikula pokrývajúca celé osemenie je zložená z kutínu, ktorý je zmesou mastných kyselín a voskov (Lute, 1928; Teuber a Brick, 1988). Osemenie sa skladá z vonkajšej vrstvy palisádových buniek, zo strednej vrstvy osteosklereidových buniek a z vnútornej vrstvy parenchýmu. V strede osemenia sa nachádza semenná jazva (hilum), pod ktorým sa nachádza mikropyla a pod ňou je uložená radikula. Asi 0,4 mm nad semennou jazvou je umiestnená „šošovka“ (po angl. „lens“), ktorá je najslabším miestom palisádovej vrstvy buniek osemenia. Cez tento otvor semeno nasáva vodu počas napučievania (Teuber a Brick, 1988). Klíčenie po napučívaní semien môže pri dostatku vlahy prebiehať aj pri teplote 1 až 2 °C (Pelikán *et al.*, 2012). Medzi osemením a klíčovými listmi (kotyledónmy) leží vrstva endospermu, ktorá je zložená z vrchnej vrstvy aleurónových buniek a zo spodnej vrstvy tenkostenných parenchymatických buniek (Teuber a Brick, 1988).

U lucerny sa vyskytujú často nepriepustné, alebo takzvané tvrdé semená, ktoré nedokážu absorbovať vodu a následne vyklíčiť. Ukázalo sa, že bariéru proti vlhkosti tvoria skôr zosilnené vonkajšie vrstvy palisádových buniek ako samotná kutikula (Lute, 1928).

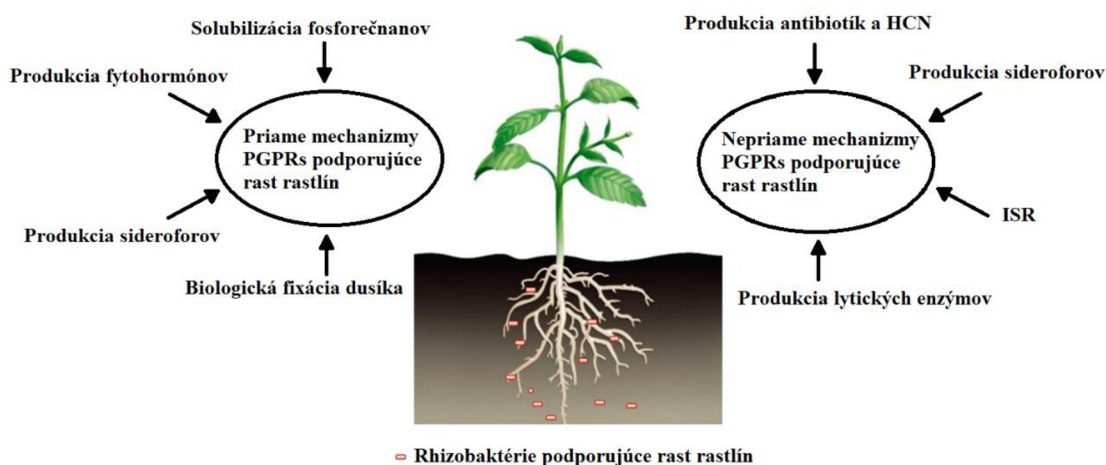
2.1.6 Agronomické využitie

Lucerna je veľmi cennou bôbovitou trvalkou, často využívanou kvôli jej agronomickým a environmentálnym výhodám (Annicchiarico *et al.*, 2015). Kvôli svojej vysokej nutričnej hodnote je považovaná za jednu z najlepších krmovín hospodárskych zvierat (Sanders *et al.*, 2011). Lucerna má vysoký obsah bielkovín, enzýmov, minerálov a je cenným zdrojom vitamínov A, C, K a E, ako aj fytofarmaceutických látok, využitelných na liečenie rôznych zdravotných problémov (Bora a Sharma, 2011). Vďaka jej výživovým hodnotám a nízkemu podielu fibrilárneho materiálu bunkových stien je dobre stráviteľná, čo ju činí dôležitým krmivom prežúvavcov. Na kŕmenia hospodárskych zvierat je používaná najčastejšie vo forme sena, ale aj vo forme siláže, senáže, brikiet alebo pastvín (Radović *et al.*, 2009). Lucerna a strukoviny sú všeobecne prospešné pri ochrane pôdy pred veternou a vodnou eróziou (Karlen *et al.*, 2007), a taktiež sú využívané pre fytoremediáciu pôd (Nirola *et al.*, 2016). Jednou z výhod lucerny je symbiotická fixácia dusíka, vďaka ktorej nevyžaduje takmer žiadne externe dodávané dusíkaté hnojivo. Po degradácii fytomasy obohacuje pôdu o dusíkaté látky, čím poskytuje dostupnú formu dusíku následným plodinám (Radović *et al.*, 2009). Lucerna oproti iným druhom strukovín symbioticky fixuje veľké množstvo atmosférického dusíka, ktoré sa pohybuje od 50 do 463 kg na hektár ročne. Množstvo fixovaného dusíka závisí od typu pôdy a režimov využívania pôdy, ako aj od prítomnosti, hustoty a účinnosti pôdnej baktérie *Sinorhizobium meliloti*. Vďaka tejto schopnosti sú porasty lucerny schopné eliminovať a nahradiť extenzívne využívanie chemicky pripravovaných dusíkatých hnojív (Delić *et al.*, 1998; Radović *et al.*, 2009).

2.2 Interakcie rastlín s prospešnými pôdnymi baktériami

Rôzne bakteriálne druhy sú dôležitou súčasťou pôdneho ekosystému. Dodávajú rastlinám živiny z pôdy, stimulujú ich rast produkciou rastlinných rastových regulátorov, chránia ich pred fytopatogénmi a sú využívané k bioremediácii znečistených pôd sekvestráciou

toxických ťažkých kovov a odbúravaním xenobiôtík (Davison, 1988; Hayat *et al.*, 2010; Ahemad, 2012; Ahemad a Khan, 2011). Takéto bakteriálne druhy kolonizujúce koreňové systavy rastlín boli po prvý krát definované Kloepperom a Schrothom a pomenovali ich ako rhizobaktérie podporujúce rast rastlín (PGPR, angl. plant growth-promoting rhizobacteria) (Kloepper a Schroth, 1978). Tie sa ďalej rozdeľujú na extracelulárne (ePGPR), ktoré sa nachádzajú na povrchu koreňov alebo v medzibunkových priestoroch buniek koreňovej kôry, a na intracelulárne (iPGPR), ktoré sa vyskytujú vo vnútri koreňových buniek, často v špecializovaných hľúzkovitých štruktúrach (Gray a Smith, 2005). PGPR zlepšujú produkciu rastlín zvyčajne priamymi mechanizmami a to buď zvyšovaním dostupnosti zlúčenín alebo kontrolovaním hladín rastlinných hormónov. Taktiež sú schopné znižovať nepriamymi mechanizmami inhibičné účinky na rast a vývoj rastlín rôznych látok, ktoré produkujú patogénne organizmy (Obr. 1, Glick, 1995; Glick, 2012).



Obr. 1 Priame a nepriame mechanizmy pôdných baktérii podporujúce rast a vývin rastlín. K priamym mechanizmom PGPRs patrí biologická fixácia dusíka, solubilizácia fosforečnanov, modulovanie hladín fytohormónov a sekvestrovanie železa a ťažkých kovov pomocou sideroforov. PGPRs nepriamymi mechanizmami, ako je produkcia antibiotík, HCN, sideroforov, lytických enzýmov a vyvolanie indukovanej systémovej rezistencie, kontrolujú rast patogénov (Upravené podľa Oak *et al.*, 2019).

2.2.1 Priame mechanizmy pôdných baktérií, podporujúce rast rastlín

Poskytovanie živín rastlinám rastúcich na pôdach s obmedzením množstvom dusíka, železa a fosforu, patrí medzi najviac zdokumentované mechanizmy, ktorými PGPR podporujú rast rastlín. Kvôli nedostatku, alebo zlej dostupnosti živín, je poľnohospodárstvo čoraz viac závislé na používaní chemických hnojív, ktoré predstavujú hrozbu pre človeka a životné prostredie (Glick, 2012). Preto je zrejmy význam bio-hnojív, ktoré pravdepodobne nahradia v budúcnosti chemické hnojivá (Ahemad a Kibret, 2014). Rastlinné hormóny sú dôležité pre rast a vývoj rastlín. Okrem toho majú významnú funkciu v odpovediach rastlín na biotický a abiotický stres (Davies, 2004). Upravením hladín fytohormónov dokáže rastlina prekonať negatívne účinky spôsobené stresom (Salamone, 2005). Mnohé PGPR sú schopné produkovať fytohormóny a modulovať ich hladiny, čím pozitívne ovplyvňujú rastlinnú odpoveď na stres (Glick *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Fixácia dusíka

Najdôležitejšou živinou rastlín pre rast a vývoj je dusík (N). Atmosférický molekulárny dusík (N_2) je pre rastliny nevyužitelný, a tak je potrebné aby bol premenený na formy využiteľné rastlinami. Mikroorganizmy fixujúce dusík (diazotrofy) premieňajú atmosférický dusík na amoniak (NH_3) pomocou enzýmu nitrogenáza (Kim a Rees, 1994). Globálne je zhruba za dve tretiny fixovaného dusíka zodpovedná biologická fixácia dusíka, zatiaľ čo zvyšok dusíka sa prevažne syntetizuje priemyselne pomocou Haber-Boschovej syntézy (Rubio and Ludden, 2008). Nitrogenáza je dvojzložkový metaloenzým pozostávajúci z Fe-proteínu, nazývaný dinitrogenázová reduktáza, a z dinitrogenázy, ktorá má kovový kofaktor. Dinitrogenáza redukuje N_2 na NH_3 pomocou elektrónov s vysokou redukčnou silou poskytnuté dinitrogenázovou reduktázou (Kim a Rees, 1994). Vo všetkých diazotrofoch sa nachádza dinitrogenáza s FeMo-kofaktorom, ktorá je zodpovedná za väčšinu biologickej fixácie dusíka. Pri nedostatku molybdénu sú exprimované alternatívne dinitrogenázy, v ktorých je molybdén nahradený buď železom alebo vanádom (Joerger a Bishop, 1988; Bishop a Joerger, 1990; Raymond *et al.*, 2004). Gény potrebné pre fixáciu dusíka, nazývané *nif* gény, zahŕňajú štrukturálne gény, gény dôležité na aktiváciu Fe-proteínu, biosyntézu FeMo-kofaktorov, poskytnutie

donorových elektrónov a regulačné gény potrebné pre syntézu a funkciu nitrogenázy. Expresia *nif* génov je negatívne regulovaná kyslíkom, ktorý má taktiež inhibičný účinok na nitrogenázu (Glick, 2012). Biologická fixácia dusíka je energeticky veľmi náročný proces, ktorý vyžaduje hydrolýzu najmenej 16 mólov ATP na každý mól redukovaného dusíka (Berg *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Solubilizácia fosforečnanov

Po dusíku je fosfor (P) druhou najdôležitejšou živinou potrebnou pre rast a vývin rastlín. Napriek tomu, že dostupnosť fosforu v pôdach je obvykle veľká, väčšina týchto organických a anorganických foriem sú pre rastliny nerozpustné. Rastliny môžu absorbovať iba dve rozpustné formy, a to dihydrogénfosforečnanové (H_2PO_4^-) a hydrogénfosforečnanové (HPO_4^{2-}) anióny (Glass, 1989; Bhattacharyya a Jha, 2012). Nevýhodou fosfátových hnojív je, že rastliny ich absorbujú v menších množstvách a zvyšok sa rýchlo premení na nerozpustné formy v pôde (Mckenzie a Roberts, 1990). Ako náhrada fosfátových hnojív môžu byť použité mikroorganizmy solubilizujúce fosfáty, ktoré sprostredkovávajú rastlinám dostupné formy P z pôdy (Khan *et al.*, 2006). Patria k nim PGPR solubilizujúce fosfáty, ktoré môžu rôznymi mechanizmami zásobovať rastliny fosforom. Anorganický fosfor sa zvyčajne solubilizuje v dôsledku pôsobenia nízkomolekulárnych organických kyselín, produkovaných rôznymi pôdnymi baktériami. (Zaidi *et al.*, 2009). Syntéza rôznych fosfatáz, ktoré katalyzujú hydrolýzu esterov kyseliny fosforečnej, vedie k mineralizácii väčšiny organických zlúčenín fosforu (Rodríguez a Fraga, 1999).

2.2.1.3 Sekvestrovanie železa

Železo (Fe) je potrebná živina pre takmer všetky formy života. V aeróbnom prostredí železo nie je ľahko asimilované baktériami ani rastlinami, pretože sa vyskytuje hlavne vo forme Fe^{3+} a vytvára nerozpustné hydroxidy (Ma, 2005; Rajkumar *et al.*, 2010). Jednou z najčastejších stratégií je produkcia nízkomolekulárnych sideroforov baktériami, ktoré majú vysokú afinitu k Fe^{3+} . Baktérie syntetizujú aj membránové receptory, ktoré môžu viazať komplexy sideroforov s Fe, čo umožňuje mikroorganizmom absorbovať viac železa (Neilands, 1981; Hider a Kong, 2010). Bakteriálne siderofory pomocou rôznych mechanizmov umožňujú rastlinám asimilovať železo (Schmidt, 1999). Siderofory môžu

tiež vytvárať stabilné komplexy aj s inými kovmi, vrátane ťažkých kovov, ako sú Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb a Zn, ako aj s rádionuklidmi vrátane U a Np, ktoré zaťažujú životné prostredie. Bakteriálne siderofory teda pomáhajú znižovať aj stresy vyvíjané na rastliny vysokými hladinami ťažkých kovov v pôde (Kiss a Farkas, 1998; Neubauer *et al.*, 2000).

2.2.1.4 Modulácia fytohormónov

Kyselina indolyl-3-octová (IAA) je zďaleka najčastejším a najviac študovaným auxínom (Spaepen *et al.*, 2007; Glick, 2012). Všeobecne IAA ovplyvňuje delenie rastlinných buniek, ich predlžovanie a diferenciáciou. Zrýchľuje vývoj koreňov, xylému v cievných zväzkoch a taktiež iniciuje tvorbu bočných a vedľajších koreňov. Ďalej ovplyvňuje klíčenie semien, fotosyntézu, biosyntézu pigmentov a iných metabolitov (Tsavkelova *et al.*, 2006). Má dôležitú úlohu v symbiotických interakciách medzi strukovinami a rhizóbiami (Glick, 2012). Dostatočné hladiny IAA sú nevyhnutné aj pre strukoviny, pretože procesy ako je bunkové delenie, diferenciácia buniek a tvorba cievných zväzkov sú dôležité pri tvorbe koreňových hlúčok (Spaepen *et al.*, 2007; Glick, 2012). Etylén je nevyhnutným fytohormónom, ktorý rôznymi spôsobmi ovplyvňuje rast a vývoj rastlín. Iniciuje rast koreňov, syntézu ďalších fytohormónov a podporuje dozrievanie plodov, vädnutie kvetov, odpadávanie listov a klíčenie semien. Taktiež má inhibičný účinok na tvorbu koreňových hlúčok (Abeles, 1992; Glick, 2012). Endogénna hladina etylénu sa výrazne zvyšuje za stresových podmienok, čo môže ovplyvniť negatívne rast a vývoj rastlín (Saleem *et al.*, 2007). Prekurzor etylénu je 1-aminocyklopropán-1-karboxylová kyselina (ACC), ktorá je syntetizovaná zo S-adenozylmetionínu pomocou enzýmu ACC syntetáza (Adams a Yang, 1979). Aktivitu enzýmu ACC syntetáza môže stimulovať bakteriálna IAA (Kende, 1993). U pôdnych baktérií bol objavený enzým ACC deamináza, ktorá hydrolyzuje ACC, vylučovanú z koreňov alebo semien rastlín, na amoniak a α -ketobutyrate (Honma a Shimomura, 1978; Glick, 1998). Tým pádom kolonizácia koreňov a semien rastlín s PGPR, ktoré syntetizujú ACC deaminázu, umožňuje regulovať inhibičné účinky vysokých hladín etylénu (Glick, 1998). Mnoho kmeňov PGPR môže syntetizovať cytokiníny a gibberelíny a tak ovplyvňovať ich hladiny u rastlín (Glick, 2012). Vďaka regulácii bunkového delenia sú cytokiníny dôležité pre normálny vývoj koreňových hlúčok (Roy *et al.*, 2020). V procese symbiôzy gibberelíny

zrejme negatívne ovplyvňujú rhizóbiálnu infekciu rastlín (Roy *et al.*, 2020), ale preukázalo sa, že pri vývoji koreňových hľúzok sú dôležité (Hayashi *et al.*, 2014).

2.2.2 Nepriame mechanizmy pôdných baktérií, podporujúce rast rastlín

RGPR nepriamo podporujú rast rastlín kontrolovaním patogénov a ich negatívnych účinkov na rastliny. Pomocou sideroforov, ktoré viažu väčšinu Fe^{3+} v oblasti koreňa rastliny, môžu obmedziť dostupné železo a tak zabrániť množeniu patogénov (Siddiqui, 2005). Syntéza rôznych antibiotík je ďalší efektívny mechanizmus, ktorým zabraňujú množeniu patogénov (Whipss, 2001). U PGPR boli identifikované rôzne antibiotiká, ako sú napríklad 2,4-diacetylfloroglucinol (DAPG) (Défago, 1993), fenazín (Weller, 1983), oligomycín A (Kim *et al.*, 1999), pyrrolnitrín (Ligon *et al.*, 2000) a zwittermycín A (Silo-Suh *et al.*, 1994). Niektoré PGPR produkujú enzýmy, ktoré môžu rozpúšťať bunkovú stenu mnohých patogénnych húb (Glick, 2012), ako sú chitinázy (Frankowski *et al.*, 2001), celulázy (El-Tarabily *et al.*, 1996), β -1,3-glukanázy (Fridlender *et al.*, 1993) a proteázy (Dunne *et al.*, 1997). RGPR môžu indukovať v rastlinách fenotypicky podobnú formu systémovej získanej rezistencie (SAR z angl. systemic acquired resistance) vyvolanej patogénmi, ktorá sa nazýva indukovaná systémová rezistencia (ISR) (van Loon *et al.*, 1998). ISR je často regulovaná signalizačnými dráhami jasmonátu a etylénu, ktoré stimulujú obranné reakcie hostiteľskej rastliny na patogény (Glazebrook, 2005).

2.3 Symbiotické interakcie rastlín rodu *Medicago* s rhizóbiálnymi baktériami

2.3.1 Všeobecná charakteristika

Symbiotická fixácia vzdušného dusíka zohráva významnú úlohu pre rast a vývoj rastlín v podmienkach limitovanej dostupnosti dusíka v pôde. Jednou z výhod strukovín (*Fabaceae*) je schopnosť interagovať so symbiotickými rhizóbiami, obzvlášť rodu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* a *Sinorhizobium*, ktoré dokážu redukovať atmosférický dusík (N_2) na amoniak (NH_3). Táto vlastnosť strukovín má v poľnohospodárstve zásadný význam. Medzi strukovinou a rhizóbiom dochádza ku komplexným symbiotickým interakciám (Roy *et al.*, 2020). Fixácia atmosférického dusíka sa uskutočňuje

v špecializovaných koreňových orgánoch, hlúčkach, ktoré sa diferencujú ako výsledok symbiôzy medzi strukovinami a rhizóbiami (Oldroyd *et al.*, 2011).

2.3.2 Signalizácia v procese rhizóbiálnej infekcie a organogenézy koreňových hlúčok

2.3.2.1 Nodulačné faktory

Symbiôza lucerny a rhizóbií je typicky vyvolaná nízkym obsahom dusíka v pôdach (Wang *et al.*, 2018). Za týchto podmienok hostiteľská rastlina z koreňových vláskov vylučuje flavonoidné zlúčeniny do rhizosféry, ktoré sa viažu na bakteriálne NodD proteíny. Flavonoidmi aktivované proteíny NodD indukujú expresiu rhizóbiálnych nodulačných (*nod*) génov (Schlaman *et al.*, 1992; Perret *et al.*, 2000). Niektoré *nod* gény kódujú enzýmy, ktoré sú potrebné na syntézu lipochitooligosacharidovov (LCOs) nazývané nodulačné (Nod) faktory. Nod faktory pozostávajú z 1,4-N-acetyl-D-glukozamínových zvyškov, ktoré nesú acylový reťazec rôznej dĺžky, pripojený k C-2 uhlíku neredukujúceho konca glukozamínu. Medzi rhizóbiálnymi druhmi sa líši stavba Nod faktorov v počte glukozamínových zvyškov, v štruktúre acylového reťazca a v modifikáciách hlavného reťazca ako sú fukosylácia, sulfatácia, acetylácia, metylácia, karbamoylácia a arabinosylácia. Tieto úpravy prispievajú k špecificite medzi hostiteľskou rastlinou a konkrétnymi rhizóbiami (Dénarié *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000).

2.3.2.2 Rozpoznanie bakteriálnych signálov

Nod faktory sú rozpoznané rastlinnými Nod faktorovými receptormi (NF receptory) na plazmatickej membráne buniek koreňových vláskov, ktoré sú taktiež známe ako LysM-receptorové kinázy (LysM-RLKs). LysM-receptorová doména je umiestnená na extracelulárnej strane, a kinázová doména sa nachádza na intracelulárnej strane cytoplazmatickej membrány (Kouchi *et al.*, 2010). U *Medicago truncatula* boli identifikované NF receptorové gény, *MtLYK3* kódujúci LYK3 receptor a *MtNFP* kódujúci NFP receptor (Limpens *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006). V procese infekcie je LYK3 receptor potrebný na zakrútenie koreňových vláskov a tvorbu infekčného vlákna (IT) (Limpens *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007). NF receptor NFP je dôležitý v regulácii vytvorenia oscilácie transmembránového gradientu Ca²⁺ v bunkách koreňových vláskov,

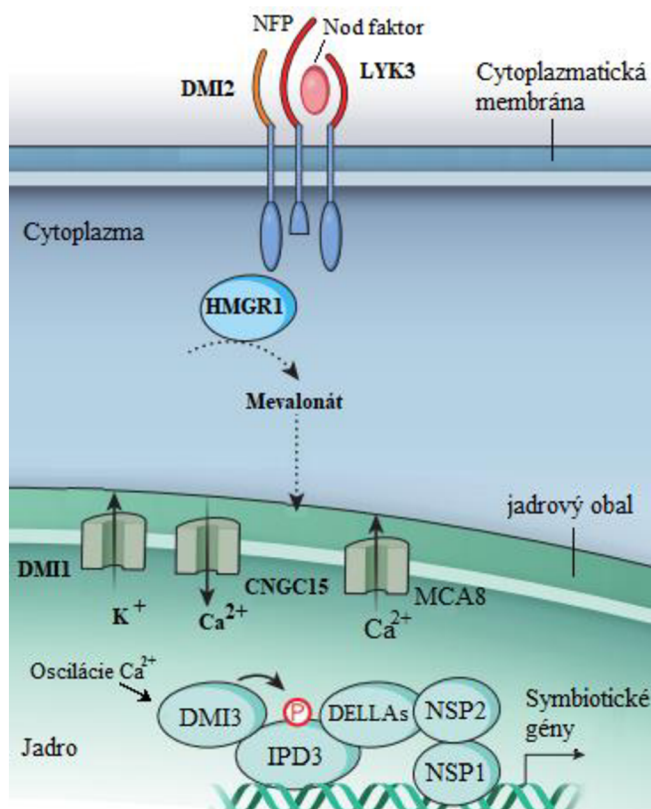
v indukcii zakrútenia koreňových vláskov a pri vývoji infekčného vlákna (Amor *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006).

2.3.2.3 Symbiotická signálna dráha

Po rozpoznaní Nod faktorov dochádza k aktivácii signálnej dráhy, ktorá spúšťa celý proces symbiózy (Obr. 2), vrátane rýchleho toku Ca^{2+} a depolarizácie plazmatickej membrány. Následne dochádza k osciláciám v koncentráciách Ca^{2+} (Ca^{2+} kmitanie) v jadrách buniek koreňových vláskov. Tieto zmeny prenášajú signály k aktivácii génovej expresie, spojenej s rhizóbiálnou infekciou a s vývojom koreňových hľúzok (Oldroyd a Downie, 2004). Predpokladá sa, že aktivácia ortológnych génov ako *DMI2* identifikovaného u *M. truncatula*, a *SYMRK* identifikovaného u *Lotus japonicus*, ktoré kódujú LRR-receptorové kinázy, je nevyhnutná k iniciácii signalizačnej dráhy celého procesu symbiózy (Obr. 2; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). Predpokladá sa, že *DMI2/SYMRK* interagujú s NF receptormi (Antolín-Llovera *et al.*, 2014), vďaka svojej lokalizácii na plazmatickej membráne buniek (Limpens *et al.*, 2005). Zistilo sa, že u *M. truncatula* *DMI2* interaguje s 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA reductázou 1 (HMGR1), ktorá sa podieľa na produkcii mevalonátu. Mevalonát je prekursor mnohých sekundárnych signálnych produktov, z ktorých niektoré môžu aktivovať iónové kanály na jadrovej membráne, čo vedie k osciláciám Ca^{2+} (Obr. 2; Kevei *et al.*, 2007). Taktiež sa ukázalo, že mitogén-aktivovaná proteínkináza kináza (MAPKK) je asociovaná s *DMI2/SYMRK* a môže byť zapojená do signalizácie medzi receptormi na plazmatickej membráne a aktiváciou jadrových iónových kanálov (Chen *et al.*, 2012).

Identifikovalo sa množstvo proteínov, ktoré sú dôležité pre generovanie oscilácií Ca^{2+} v jadre. Na prenos signálu do jadra k indukcii oscilácií Ca^{2+} sú nevyhnutné tri nukleoporíny, a to NUP85 (Saito *et al.*, 2007), NUP133 (Kanamori *et al.*, 2006) a NENA (Groth *et al.*, 2010), ktoré sú všetky súčasťou jadrového póru (Alber *et al.*, 2007). U *M. truncatula* je za vytváranie oscilácií Ca^{2+} zodpovedná vápniková ATP-áza typu SERCA (MCA8), iónový kanál prepúšťajúci draslík DMI1, a vápnikový kanál CNGC15 (Obr. 2; Ané *et al.*, 2004; Capoen *et al.*, 2011; Charpentier *et al.*, 2016). Iónové kanály DMI1 a CNGC15 súčasne interagujú, čo naznačuje ich synchronizáciu pri modulácii lokálnych zmien Ca^{2+} koncentrácie (Charpentier *et al.*, 2016). Oscilácie Ca^{2+} v jadre bunky sú rozpoznané Ca^{2+} -kalmódulín dependentnou proteínkinázou DMI3 (CCaMK DMI3),

ktorá je kódovaná *CCaMK DMI3* génom u *M. truncatula*. DMI3 je nevyhnutná na indukciu transkripčných zmien v expresii génov, potrebných na vybudovanie symbiózy (Obr. 2; Lévy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004).



Obr. 2 Symbiotická signálna dráha. Po rozpoznaní Nod faktora pomocou LysM-receptorových kináz NFP a LYK3, a LRR-receptorovej kinázy DMI2, dochádza k aktivácii symbiotickej signálnej dráhy. DMI2 interaguje s HMGR1, ktorá sa podieľa na produkcii mevalonátu. Mevalonát je prekursor sekundárnych signálnych produktov, z ktorých niektoré môžu aktivovať iónové kanály DMI1, CNGC15 a MCA8 na jadrovej membráne, spôsobujúce oscilácie Ca^{2+} . Oscilácie Ca^{2+} aktivujú DMI3, ktorá fosforyluje IPD3, indukujúci expresiu symbiotických génov. IPD3 vytvára komplex s transkripčnými faktormi NSP1, NSP2 a DELLA, ktoré sú potrebné na expresiu symbiotických génov (Upravené podľa Zipfel a Oldroyd, 2017).

2.3.2.4 Transkripčná regulácia procesu rhizóbialnej infekcie a organogenézy koreňových hľúzok

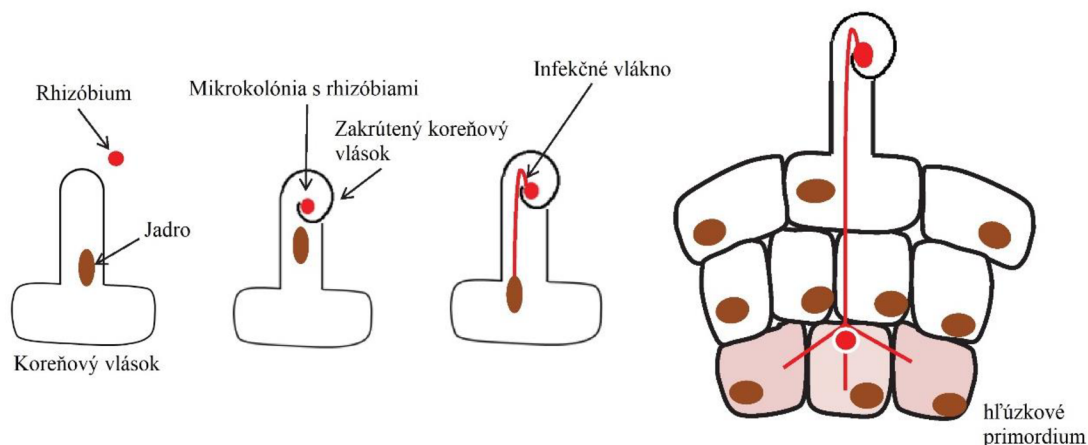
CCaMK interaguje s transkripčným faktorom LjCYCLOPS/MtIPD3, ktorý reguluje génovú expresiu vedúcu k nodulácii a fosforyluje ho (Obr. 2; Yano *et al.*, 2008). Ďalšie tri zložky z komplexu transkripčných faktorov nazývané NSP1, NSP2 a DELLA proteíny

z rodiny GRAS, sú dôležité pri aktivácii expresie nodulačných génov (Obr. 2; Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Fonouni-Farde *et al.*, 2016). NSP1 a NSP2 spoločne interagujú za vzniku komplexu z heterodimérov, ktorý sa viaže na Nod faktorom-indukované gény a aktivuje ich transkripciu (Hirsch *et al.*, 2009). Zdá sa, že DELLA proteíny priamo prepájajú transkripčné faktory IPD3 a NSP2 a tak regulujú génovú expresiu (Jin *et al.*, 2016). Jeden z najdôležitejších génov symbiózy *NIN* kóduje transkripčný faktor, ktorý reguluje množstvo génov kontrolujúcich iniciáciu tvorby IT, organogenézu koreňových hlúčok a ich počet (Schauser *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2019b). Produkcia *NIN* proteínu je indukovaná u *M. truncatula* cez DMI3/IPD3 komplex (CCaMK/CYCLOPS u *L. japonicus*) a cez transkripčné faktory NSP1 a NSP2 (Yano *et al.*, 2008; Hirsch *et al.*, 2009). *NIN* indukuje expresiu podjednotky A-1 jadrového transkripčného faktora Y (MtNF-YA1), ktorý reguluje organogenézu koreňových hlúčok iniciáciou hlúčkového meristému. Ukázalo sa, že MtNF-YA1 taktiež riadi rhizóbiálnu infekciu reguláciou tvorby IT a biosyntézy jeho bunkovej steny (Laporte *et al.*, 2014). Ďalším významným transkripčným faktorom pri iniciácii a tvorbe IT, ako aj pri organogenéze koreňových hlúčok, je ERN1. Je to ERF transkripčný faktor obsahujúci APETALA2 doménu (AP2/ERF) (Middleton *et al.*, 2007). ERN1 má zásadnú úlohu v aktivácii nodulačných génov *ENOD11* a *ENOD12*, ktoré sú nevyhnutné k úspešnému priebehu skorých štádiách rhizóbiálnej infekcie (Andriankaja *et al.*, 2007).

2.3.3 Internalizácia rhizóbií a tvorba infekčného vlákna

Aby sa infekcia rhizóbiami mohla uskutočniť, je najprv potrebné prichytenie rhizóbií na koreňové vlásky a následne ich zachytenie medzi dve bunkové steny zakrútením koreňových vláskov. Najbežnejším spôsobom vstupu rhizóbií do buniek koreňových vláskov je prenos cez tubulárnu štruktúru, nazývanou infekčné vlákno (IT). Tieto počiatočné procesy rhizóbiálnej infekcie sú indukované Nod faktorom (Obr. 3; Gage, 2004). Pri rhizóbiálnej infekcii medzi *Sinorhizobium meliloti* a *M. sativa*, sa preukázala dôležitosť exopolysacharidov (EPS). *S. meliloti* produkuje sukcinoglykán (EPS1), ktorý je potrebný pri iniciácii a predlžovaní IT (Pellock *et al.*, 2000). Rozpoznanie Nod faktora indukuje expresiu génu *MtRIP1* kódujúceho peroxidázu, ktorá produkuje reaktívne formy kyslíka (ROS) (Ramu *et al.*, 2002). Táto dočasná produkcia ROS na špičke koreňového vlásku pozitívne ovplyvňuje rhizóbiálnu infekciu a je nevyhnutná na deformáciu

koreňových vlásokov (Lohar *et al.*, 2007). V špičke zakrúteného koreňového vlásku dochádza k degradácii bunkovej steny enzýmami a k invaginácii cytoplazmatickej membrány, čo umožňuje rhizóbiám vstúpiť do bunky (Suzaki *et al.*, 2015). Integrálné membránové proteíny závislé od NF, ako sú MtFLOT2 a MtFLOT4 sú významnou súčasťou vývoja IT. Predpokladá sa, že flotilíny sú dôležitou zložkou pri invaginácii cytoplazmatickej membrány, pričom MtFLOT4 je taktiež potrebný pri predlžovaní IT (Haney a Long, 2010). Rozpoznaním NF sa jadro premiestňuje do centrálnej polohy bunky a vytvára sa tzv. „cytoplazmatický mostík“ alebo pred-infekčné vlákno, cez ktoré infekčné vlákno prerastá do ďalších buniek. IT teda prerastá cez epidermálnu bunku a cez bunky primárnej kôry koreňa pomocou cytoplazmatických mostíkov. Rhizóbie sa vo vnútri IT delia, čím sa predlžuje jeho dĺžka (van Brussel *et al.*, 1992; Gage, 2004). Aby mohlo IT polárne rásť smerom k primordiu vznikajúcej koreňovej hlúžky, je potrebný exocystický komplex na špičke rastúceho IT. Tento komplex sa nazýva „infektozóm“ a jeho súčasťou je proteín vapyrín (MtVPY), ktorý interaguje spoločne s MtLIN a s podjednotkou exocystického komplexu MtEXO70 H4 (Murray *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019a). Na vývoj a predlžovanie IT je potrebná reorganizácia mikrotubulov a aktínového cytoskeletu (Timmers, 2008). Zistilo sa, že auxín pozitívne reguluje predlžovanie IT (Breakspear *et al.*, 2014). K bunkovému deleniu v primárnej kôre a k diferenciácii buniek hlúžkového meristému dochádza zároveň s tvorbou IT (Oldroyd a Downie, 2008).



Obr. 3 Odpoveď koreňových vlások *M. sativa* na rhizóbiálnu infekciu. Po rozpoznaní Nod faktora sa koreňový vlasok zakrúti, aby zachytil baktérie, ktoré následne preniknú do koreňa cez infekčné vlákno. Tvorba infekčného vlákna je vedená pohybujúcim sa jadrom (Fournier *et al.*, 2008). Infekčné vlákno sa vetví a preniká do buniek hlúzkového primordia, kde sa uvoľňujú baktérie a vzniká koreňová hlúзка (Upravené podľa van Martins a Livina, 2019).

2.3.4 Organogenéza koreňových hlúzkov a tvorba symbiozómov

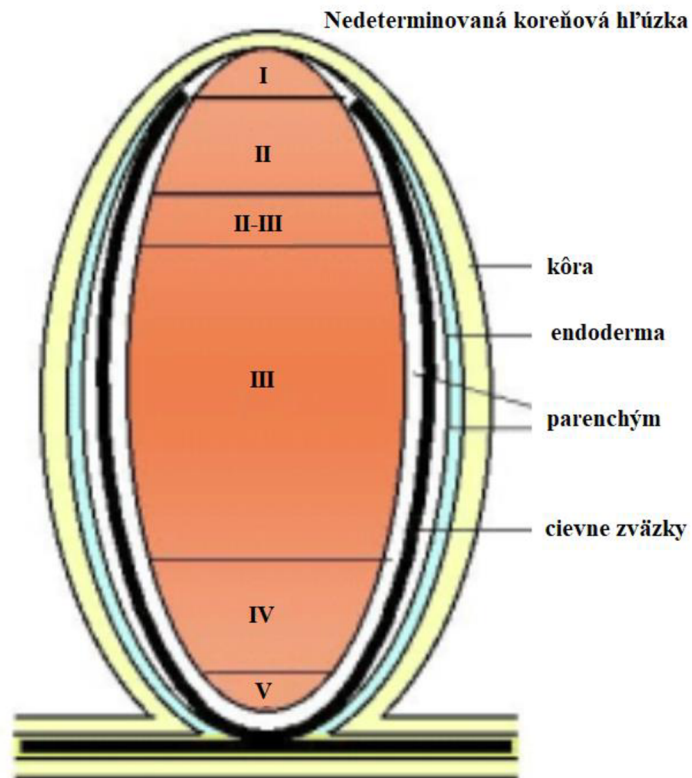
Strukoviny ako je lucerna siata, hrach alebo ďatelina, majú aj po úplnom dozretí hlúziok pretrvávajúci hlúzkovitý meristém, ktorý vytvára predĺžené hlúzkovité štruktúry označované ako „nedeterminované“ koreňové hlúzky (Kouchi *et al.*, 2010). Pri tvorbe nedeterminovaných koreňových hlúzkov dochádza najprv k iniciácii bunkového delenia vo vnútornej vrstve primárnej kôry koreňa. Rozpoznanie Nod faktora a aktivovanie hormonálnej signalizácie indukuje organogenézu koreňových hlúzkov. Delenie buniek v primárnej kôre a ich diferenciácia závisí od správneho pomeru cytokinínov a auxínov (Oldroyd *et al.*, 2011). Cytokinínový receptor MtCRE1 rozpoznáva signály spôsobené cytokinínmi, ktoré regulujú bunkové delenie v primárnej kôre, vedúce k tvorbe hlúzkovitého meristému (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). U *M. truncatula* je inhibícia polárneho transportu auxínu aktiváciou CRE1 receptoru nevyhnutná pre tvorbu nedeterminovaných koreňových hlúzkov (Ng a Mathesius, 2018).

V poslednom štádiu rhizóbiálnej infekcie sa IT rozvetvuje pri novo rozdelených bunkách primárnej kôry. Zo špičky IT sa pomocou exocytózy (sekrečná cesta), uvoľňujú baktérie a následným procesom endocytózy sa dostávajú do hlúzkovitých buniek, čím vznikajú špeciálne organely, nazývané symbiozómy. V symbiozómoch baktérie rastú

a delia sa, kým nevzniknú v infikovanej hľúzkovitej bunke tisíceky symbiozómov s jednou alebo s niekoľkými baktériami (Roth a Stacey, 1989; Limpens *et al.*, 2009).

Po čase sa rhizóbia v symbiozómoch diferencujú a transformujú na bakteroidy, ktoré fixujú atmosférický dusík pomocou enzymatického komplexu nitrogenázy. Amoniak sa uvoľňuje z bakteroidov do hostiteľskej bunky výmenou za redukovaný uhlík a ďalšie živiny z rastliny pomocou transportérov na symbiozómovej membráne (Udvardi a Poole, 2013). V prípade strukovín, ako je *Medicago*, sa u baktérií replikujú chromozómy bez bunkového delenia (endoreduplikácia). Ďalej dochádza ku zmenám v objeme a tvare baktérií a k strate životaschopnosti (Mergaert *et al.*, 2006). Pri fixácii dusíka má kyslík inhibičný účinok na nitrogenázu. V infikovaných bunkách je nízka koncentrácia kyslíka, ktorá je udržiavaná pomocou prítomného leghemoglobínu (Ott *et al.*, 2005).

Zrelé nedeterminované koreňové hľúzky pozostávajú z vonkajšej a vnútornej kôry, endodermy, parenchýmu, cievnych zväzkov a z centrálného pletiva, ktoré sa dá rozdeliť do viacerých zón. Na vrchole sa nachádza apikálny meristém bez rhizóbií (I). V infekčnej zóne (II) sa rastlinné bunky infikujú rhizóbiami. V interzóne (II-III) začínajú baktérie fixovať dusík, čo je typické predovšetkým pre zónu fixácie dusíka (III). K degradácii bakteroidov a rastlinných buniek dochádza v zóne starnutia (IV), pri ktorej sa nachádza zóna (V) nediferencovaných baktérií, ktoré sa delia v rozpadajúcom sa rastlinnom pletive (Obr. 4; Hadri *et al.*, 1998).



Obr. 4 Štruktúra nedeterminovanej koreňovej hľúzky. I - meristematická zóna, II – infekčná zóna, II-III - interzóna, III - zóna fixácie dusíka, IV - zóna starnutia, V- saprofytická zóna (Upravené podľa Scholte, 2002).

2.4 Cytoskelet rastlinných buniek

2.4.1 Všeobecná charakteristika

Rastlinný cytoskelet je dynamická sieť prepojených proteínových vlákien prítomných v cytoplazme. Je tvorený sieťou mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov, ktoré sú významnou súčasťou v mnohých bunecných dejov nevyhnutných na rast a vývoj rastlín. Má dôležitú úlohu pri bunkových signálnych dráhach, oddeľovaní chromozómov počas bunkového delenia, cytokinéze, expanzii buniek a vnútrobunkovom transporte organel a vezikúl (exocytóza) (Smith, 1999; Nakaseko a Yanagida, 2001; Wasteneys a Galway, 2003).

Hlavnou zložkou mikrotubúl sú polypeptidové podjednotky α -tubulín a β -tubulín, ktoré tvoria heterodiméry spájajúce sa do dlhých vlákien (protofilamenty). Väčšina mikrotubúl pozostáva z 13 spojených protofilamentov, ktoré vytvárajú duté vlákna s priemerom asi 24 nm. Konce mikrotubulových vlákien majú polárny charakter. Na plus (+) konci dochádza rýchlejšiemu pridávaniu tubulínových heterodimérov. Mínus (-) konce mikrotubúl sú ukotvené v štruktúrach nazývaných centrá organizácie mikrotubulov (MTOCs). Počas mitózy mikrotubuly zohrávajú zásadnú úlohu pri presune rozdelených chromátid k novovznikajúcim dcérskym jadram (Goddard *et al.*, 1994).

Aktínové mikrofilamenty (F-aktín) sú lineárne polyméry zložené z globulárnych aktínových (G-aktín) podjednotiek. Tieto aktínové vlákna s priemerom 7 nm sú špirálovito zatočené. Medzi každou otáčkou sa nachádza 13 až 14 aktínových podjednotiek. Polymerizácia aktínových filamentov je prepojená s hydrolýzou ATP a je závislá na prítomnosti Ca^{2+} . Na plus (+) konci prebieha polymerizácia rýchlejšie než na mínus (-) konci (Stainger, 2000).

2.4.2 Zmeny aktínového cytoskeletu počas symbiôzy *Medicago* s rhizobiálnymi baktériami

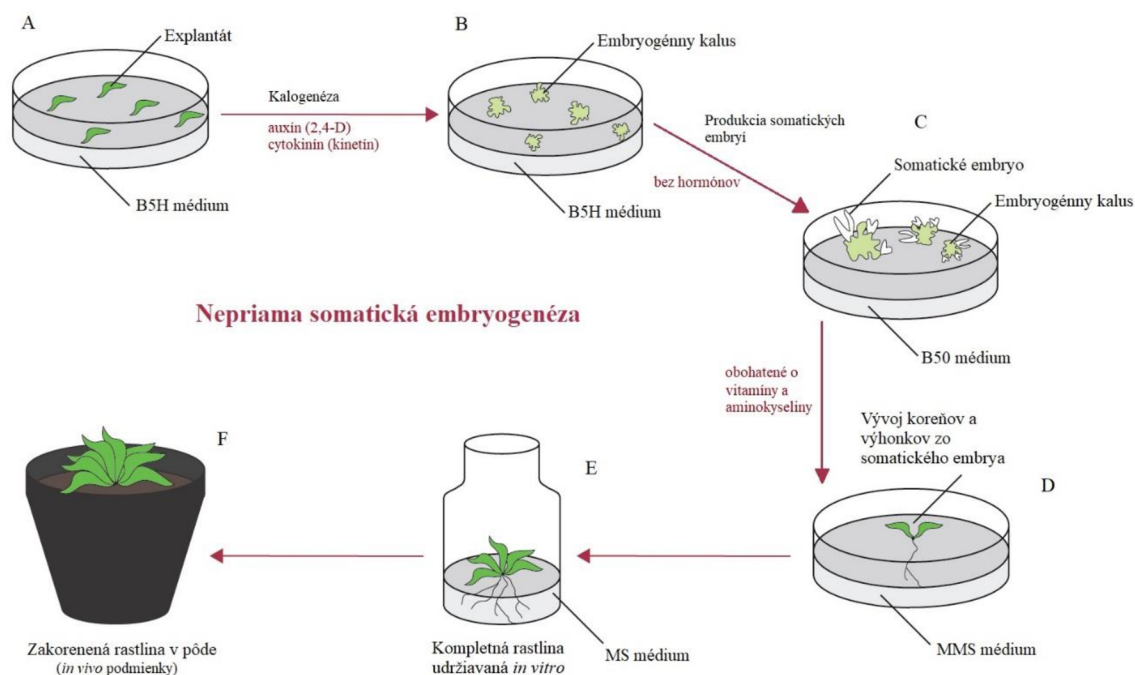
Mikrotubuly a aktínové mikrofilamenty sú v rastlinách dôležitou súčasťou procesov, ako je zakrútenie koreňovej špičky počas rhizobiálnej infekcie, tvorba IT a organogéza koreňových hľúzok (Timmers, 2008). Po aplikácii Nod faktora na koreňové vlásky dochádza v priebehu 5-10 min k zmenám aktínového cytoskeletu. Pozdĺžne zväzky F-aktínu sa pred indukciou deformácie koreňových vláskov a tvorby IT fragmentujú a následne sa zvyšuje počet krátkych a jemných zväzkov aktínových mikrofilamentov v subapikálnej oblasti (Cárdenas *et al.*, 1998; De Ruijter *et al.*, 1999). Aktínový cytoskelet obklopuje IT a infekčné kvapôčky s rhizóbiami, čo vedie k predĺženiu IT a uvoľňovaniu rhizobaktérii do buniek hľúzkovitého meristému. Vyvíjajúce sa symbiozomy sú obklopené aktínovými mikrofilamentmi, ktoré sa po čase v zrelých koreňových hľúzkach reorganizujú na krátke alebo bodkovité aktínové vlákna usporiadané so susediacimi zrelými symbiozómami (Zhang *et al.*, 2019).

Na štúdium a na vizualizáciu aktínového cytoskeletu *in vivo* vo všetkých typoch buniek rastliny v priebehu organogézy sa využíva fúzny proteín GFP-FABD2. Tento konštrukt je fúziou C-terminálneho konca zeleného fluorescenčného proteínu (GFP) k N-

terminálnemu koncu aktín-viažucej domény 2 fimbrínu 1 z *Arabidopsis thaliana* (AtFim1) (Voigt *et al.*, 2005). GFP je malý proteín, prvýkrát izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, ktorý pri vystavení modrému až ultrafialovému svetlu vykazuje zelenú fluorescenciu. V bunkovej a molekulárnej biológii sa gén *GFP* často používa ako marker pre génovú expresiu a lokalizáciu proteínov v živých bunkách (Chalfie *et al.*, 1994).

2.5 Indukcia a regenerácia rastlín rodu *Medicago* *in vitro* procesom somatickej embryogenézy

Somatická embryogenéza (SE) je proces, ktorým sa iniciuje tvorba embryí zo somatických buniek. Pomocou priamej alebo nepriamej somatickej embryogenézy môžu byť regenerované celé rastliny z *in vitro* kultivovaných rastlinných buniek. Tento proces regenerácie rastlín nie je autonómny a je ho teda potrebné indukovať (Fehér, 2019). Priama somatická embryogenéza je bez tvorby kalusu, zatiaľ čo pre nepriamu somatickú embryogenézu je vždy charakteristický medzikrok tvorby kalusu (Pulianmackal *et al.*, 2014) Prostredníctvom somatickej embryogenézy je možné regenerovať rastliny *M. sativa* a ďalšie druhy rodu *Medicago* (Saunders a Bingham, 1972). Všeobecne proces somatickej embryogenézy začína oddelením explantátu (časť vhodného rastlinného orgánu), a jeho prenesením na kultivačné médium obsahujúce fytohormóny, organické látky a soli (Obr. 5 A). Vývoj kalusu, ktorý je indukovaný kombináciou exogénnych rastlinných hormónov v médiu, je potrebný pri procese nepriamej somatickej embryogenézy (Obr. 5 B; Tichá *et al.*, 2020). V prítomnosti rastlinných hormónov sa z buniek tvoria proembryogénne masy buniek (PEMs, z angl. „proembryogenic cell masses“) ako prechodné štádium embryogenézy a následne po odstránení hormónov z kultivačného média sa spúšťa signál indukujúci tvorbu somatických embryí z PEMs (Obr. 5 C; de Vries *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 2010). Plne vyvinuté somatické embryá sú prenesené na kultivačné médium obohatené o vitamíny a aminokyseliny, indukujúce vývoj koreňov a výhonkov (Obr. 5 D). Následne pokračuje vývin embryí do kompletných rastlín, ktoré sú udržiavané v *in vitro* podmienkach (Obr. 5 E), až kým nie sú vhodné na kultiváciu *in vivo* (Obr. 5 F). Tieto regenerované dospelé rastliny pestované v *in vivo* podmienkach sú plne plodné, dokážu vytvárať kvety a produkovať semená, schopné zakladať ďalšiu generáciu rastlín (Tichá *et al.*, 2020).



Obr. 5 Schéma indukcie a regenerácie rastlín *M. sativa* prostredníctvom nepriamej somatickej embryogenézy. Proces začína umiestnením zdravých listov na vhodné kultivačné médium (B5H médium) obsahujúce rastlinné hormóny (2,4-D a kinetín) (A). Nasleduje kalogenéza explantátu (B), po ktorej je embryogénny kalus preložený na médium bez hormónov (B50 médium), aby došlo k tvorbe somatických embryí (C). Ďalší vývin somatických embryí prebieha na médiu, ktoré je bohaté na vitamíny a aminokyseliny (MMS médium) (D), po ktorom sú celé rastliny udržiavané *in vitro* podmienkach na MS (Murashige a Skoog) médiu (E). Dospelé rastliny sú neskôr prenesené do pôdy (F) (Upravené podľa Anami *et al.*, 2013).

Pri somatickej embryogenéze lucerny je rozhodujúce správne zloženie kultivačného média. Rastlinné rastové regulátory (PGRs) hrajú dôležitú úlohu počas somatickej embryogenézy. Auxín 2,4-D (2,4-dichlórfenoxyoctová kyselina), samostatne alebo v kombinácii s cytokinínmi, sa používa na indukciu tvorby kalusu a somatických embryí u mnohých druhov rastlín (Fehér *et al.*, 2003). Medzi najbežnejšie používané cytokiníny patrí kinetín, ktorý má významný vplyv na vývoj a regeneráciu kalusu. Iniciácia kalusu závisí od určitej koncentrácie kinetínu v médiu a od jeho pomeru s auxínom 2,4-D (Wan *et al.*, 1988). Kyselina 4-chlórfenoxyoctová (CPA) a kyselina 1-naftyloctová (NAA) patria medzi ďalšie rastlinné rastové regulátory, ktoré ale podporujú u lucerny iba tvorbu kalusu. Vývoj kalusu aj somatických embryí bol neaktívny pri použití kyseliny indolyl-3-octovej (IAA) (Tichá *et al.*, 2020).

2.6 Transgenóza a stabilná transformácia u *Medicago sativa*

2.6.1 Transformácia sprostredkovaná baktériou *Agrobacterium tumefaciens*

Na transformáciu rastlín lucerny je možné použiť viacero metód transgenózy, z ktorých transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens* je najúčinnnejšia a najbežnejšia (Samac a Austin-Phillips, 2006). Pri transformáciách lucerny sa často ako selekčný marker používa gén *NPTII* pre neomycín fosfotransferasu, ktorý poskytuje transformovaným rastlinám rezistenciu na antibiotikum kanamycín (Tichá *et al.*, 2020). Protokol podľa Samac a Austin-Phillips (2006) je jedným z najpoužívanejších pri transformácii lucerny. Spočíva v kokultivácii listových explantátov *M. sativa* kultivaru Regen-SY s bakteriálnym kmeňom *A. tumefaciens* LBA4404, ktorý nesie žiaduci vektor T-DNA, po ktorej následne prebehne regenerácia transformovaných rastlín pomocou somatickej embryogenézy. Pri selekcii priemerne 60 až 80 % zaočkovaných explantátov vyvíjalo somatické embryá, pričom 80 až 100 % dospelých rastlín, vyvinutých z týchto embryí, obsahovalo T-DNA (Samac a Austin-Phillips, 2006).

2.6.2 Transformácia elektroporáciou

Elektroporácia je nenáročná, rýchla transformačná technika, ktorá je vysoko efektívna pre mnoho rastlinných pletív. Používa sa na transport biochemických molekúl do vnútrobunkového priestoru, ako sú proteíny, lipidy a nukleové kyseliny (RNA a DNA). Počas tejto metódy vznikajú póry na povrchu buniek v dôsledku depolarizácie membrány rastlinných protoplastov (bunky bez bunkovej steny) spôsobenej elektrickým poľom (Rivera *et al.*, 2012). Pomocou elektroporácie bolo transformovaných množstvo rôznych druhov rastlín, ako je aj *Medicago sativa* L. (Kosturkova, 1993), no jej účinnosť je nízka a dá sa aplikovať iba na rastlinné protoplasty (Rivera *et al.*, 2012).

2.6.3 Transformácia metódou bombardovania časticami

Biolistická metóda transformácie, alebo taktiež nazývaná metóda bombardovania časticami, pozostáva z akcelerácie častíc s vysokou hustotou a s priemerom približne 2 µm. Tieto častice, ktoré sú pokryté vnášaným genetickým materiálom alebo chimérickou DNA (DNA z dvoch rôznych druhov), prechádzajú cez povrch do vnútra

buniek. Je to jednoduchá, rýchla a nenákladná transformačná technika (Rivera *et al.*, 2012), ktorou je možné zaviesť gény do lucerny (Huang a Zhang, 1999).

2.7 Mikroskopia živých buniek

Vývoj mnohobunkových organizmov je dynamická spleť molekulárnych a bunkových procesov prebiehajúcich na mikroskopickú úroveň, ktorému sa dá lepšie porozumieť pomocou zobrazovacích techník. V posledných rokoch ale narastá pokrok aj v konfokálnych a v iných pokročilých metódach mikroskopie, čím je možné lepšie získavať dáta na úrovni rastlinných pletív, orgánov alebo celého rastlinného tela (Sappl a Heisler, 2013). Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia (CLSM) spolu s mikroskopiou s rotujúcim diskom bola dlhú dobu používaná pri zobrazovaní živých a fixovaných rastlinných buniek, pletív a orgánov (Ovečka *et al.*, 2018). Rýchlosť zobrazovania u CLSM je časovo obmedzená, pričom na získanie trojrozmerného obrazu vzorku je potrebné opakovať bodové skenovanie v rôznych optických rovinách vzorku. Týmto spôsobom snímania sa stráca možnosť pri trojrozmernom zobrazovaní zachytiť zároveň aj dynamické javy vo vzorke. Ďalšou nevýhodou je osvetľovanie veľkej plochy vo vzorke vysokými dávkami excitačného svetla, čo spôsobuje zvýšenú fototoxicitu pre živé bunky a vypalovanie fluoroforu (Girkin a Carvalho, 2018). Vodorovná poloha rastúcej rastliny v úzkom priestore medzi podložným a krycím sklíčkom je výrazným obmedzením, čo redukuje dostupný priestor a prirodzené podmienky pre rastlinu počas snímania (Tichá *et al.*, 2020).

2.7.1 Light-sheet fluorescenčná mikroskopia

Light-sheet fluorescenčná mikroskopia (LSFM) zapríčinila veľký prelom v spôsobe nedeštruktívneho dlhodobého zobrazovania štruktúry a vývoja živých mnohobunecných organizmov. Pri tejto metóde je osvetlený iba tenká optická rovina z boku pomocou laseru so slabým výkonom, zatiaľ čo objektív sníma obraz kolmo na rovinu osvetlenia. Vďaka tomuto princípu LSFM zabraňuje nadmernému vyžiarovaniu fluoroforov a znižuje fototoxicitu, ktorá je spôsobená vysokými dávkami excitačného svetla (Girkin a Carvalho, 2018; Ovečka *et al.*, 2018). LSFM oproti CLSM a mikroskopii s rotujúcim diskom umožňuje umiestnenie vzorky vo vertikálnom smere, čo je dôležité pre

zobrazovanie vývoja rastlín. Živé a vyvíjajúce sa organizmy snímané pomocou LSM je možné pozorovať v takmer prirodzených podmienkach s minimalizovaným vystavením stresu. Prirodzené fyziologické podmienky sa môžu dosiahnuť pomocou svetelného zdroja osvetľujúceho listy a zavedením perfúzneho systému, ktorý umožňuje nepretržitú výmenu čerstvého kvapalného média, aby sa zabezpečil prísun živín a odstránenie odpadných látok pre pozorovanú rastlinu (Maizel *et al.*, 2011; Ovečka *et al.*, 2018). Táto metóda môže byť taktiež využitá aj pri dokumentácii symbiotických interakcií medzi rhizóbiami a *M. sativa*, a to počas rôznych štádiách infekcie, tvorby IT a tvorby koreňových hlúčok (Ovečka *et al.*, 2018).

2.7.2 Mikroskopia s vysokým rozlíšením

Zobrazovacie techniky s vysokým rozlíšením sú mikroskopické metódy, ktoré boli vyvinuté na prekonanie difrakčných a rozlišovacích obmedzení u klasických mikroskopických techník (Komis *et al.*, 2018). Mikroskopia so stimulovanou depléciou emisií (STED) využíva dva laserové lúče, pomocou ktorých jeden lúč excituje vzorku a druhý lúč pomocou stimulovanej emisie navracia fluorofory okolo centrálného excitovaného bodu do pôvodného stavu (Dyba a Hell, 2003). Mikroskopia so štruktúrovaným osvetlením (SIM) je zobrazovacia technika využívajúca osvetľovanie vzorky vzorovaným svetlom, ktoré je generované kontrolovateľnými rotáciami a fázovými posunmi mriežky, alebo pomocou tekutých kryštálov. Obidve metódy sa dajú využiť pri snímaní živých buniek (Gustafsson, 2000; Komis *et al.*, 2018). Metódy stochastická optická rekonštrukčná mikroskopia (STORM) a fotoaktivačná lokalizačná mikroskopia (PALM) sa používajú hlavne pre snímanie fixovaných vzoriek na lokalizáciu epitopov pomocou imunoznačenia. Dajú sa aplikovať aj na niektoré typy pozorovaní u živých buniek. Tieto metódy sú založené na vysoko presnej lokalizácii jednotlivých fotoprepínateľných fluoroforov (Rust *et al.*, 2006; Komis *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

Autoklávová indikátorová páska, bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm , čierna plastová fólia, filtračný papier, hliníková fólia, chirurgická páska, kadičky, magnetické miešadlá, mikroskúmavky, nožnice, odmerné valce, Pasteurove pipety, parafilm, pinzety, plastové nádoby, sterilné špáradlá, sterilné Petriho misky, sterilné hranaté Petriho misky.

3.1.1 Použité chemikálie

1000X Gamborg's vitamin solution (Duchefa Biochemie)

1000X Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa Biochemie)

Adenín (Sigma-Aldrich)

Dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrogénfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)

Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)

Etanol denaturovaný (96%, Lihovar Kojetín)

Gamborg's B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Gellan gum powder (Alfa Aesar)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich)

Heptahydrát síranu železnatého (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)

Chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich)

Chlórnan sodný (Sigma-Aldrich)

Incidur (Ecolab)

Kinetín (Duchefa Biochemie)

Kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) (Duchefa Biochemie)

Kyselina boritá (Duchefa Biochemie)

Kyselina chlorovodíková (37%, Sigma-Aldrich)

LB broth (MO BIO laboratories)
L-glutamín (Duchefa Biochemie)
L-glutati3n (Sigma-Aldrich)
L-prolín (Sigma-Aldrich)
L-serín (Sigma-Aldrich)
Micro agar alebo Phyto agar (Duchefa Biochemie)
Monohydrát síranu mangánatého (Sigma-Aldrich)
Monohydrát síranu zinočnatého (Sigma-Aldrich)
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Myoinozitol (Duchefa Biochemie)
Na₂EDTA (Sigma-Aldrich)
Pentahydrát síranu meďnatého (Duchefa Biochemie)
Sachar3za (Sigma-Aldrich)
Sterilná destilovaná voda
Tikarcilin (Duchefa Biochemie)
Tween® 20 (Sigma-Aldrich)
Voda (Sigma-Aldrich)
Vodovodná voda

3.1.2 Použit3 prístroje

Analytick3 váhy (XA 110/2X, RADWAG)
Automatick3 pipety (Eppendorf)
Box laminárny Biohazard (Merci)
Centrifúga stolná chladená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)
Elektromagnetická miešačka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)
Flourescenčný stereomikroskop Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss)
Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
Hlboko mraziaci box (Panasonic)
Inkubátor s nastaviteľnou teplotou (Mettler)
Laboratórna chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)
Laboratórne váhy S1502 (BEL Engineering)
Mrazička LIE G 5216 513L (Comfort)

pH meter PC 2700 (Eutech Instruments)
Skener (Image Scanner III)
Spektrofotometer (Smart Spec™ plus, Bio-Rad)
Trepáčka s inkubáciou ES-20 (Biosan)
Vortex Genie - 2 (Scientific Industries)
Výrobník deionizovanej vody Simplicity water purification system (Millipore)

3.1.3 Roztoky a média

Sterilizačný roztok na sterilizáciu listov *M. sativa* (100 ml)

1 ml chlórnan sodný
50 µl Tween
Doplniť MilliQ H₂O do 100 ml
Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm

B5H médium

3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
0,5 g·l⁻¹ KNO₃
0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
0,5 g·l⁻¹ prolín
30 g·l⁻¹ sacharóza
4,5 g·l⁻¹ gellan gum
Doplniť MilliQ H₂O
Upraviť pH na 5,7 (1 M KOH)
Sterilizácia autoklávom
Po sterilizácii autoklávom nechať vychladnúť na 55 °C a potom pridať:
30 ml·l⁻¹ zmes aminokyselín
1 mg·l⁻¹ 2,4-D (250 µl zásobného roztoku 2,4-D na 250 ml média)
0,1 mg·l⁻¹ kinetínu (250 µl zásobného roztoku kinetínu na 250 ml média)
1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin solution

Zmes aminokyselín

6,65 g glutamín

0,83 g serín

0,004 g adenín

0,083 g L-glutatión

Doplniť MilliQ H₂O do 250 ml

Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm

Skladovať pri 4 °C

Zásobný roztok 2,4-D (1,0 mg·ml⁻¹)

10 mg 2,4-D rozpustiť v 50 µl Et-OH

800 µl MilliQ H₂O

150 µl 1M NaOH

Zmiešať vo vortexe

Doplniť MilliQ H₂O do 10 ml

Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm

Skladovať pri -20 °C

Zásobný roztok kinetínu (0,1 mg·ml⁻¹)

1 mg kinetínu rozpustiť v 20 µl 1M NaOH

Zmiešať vo vortexe

Doplniť MilliQ H₂O do 10 ml

Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm

Skladovať pri -20 °C

B50 médium

3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture

0,5 g·l⁻¹ KNO₃

0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O

0,5 g·l⁻¹ prolín

30 g·l⁻¹ sacharóza

4,5 g·l⁻¹ gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O

Upraviť pH na 5,7 (1 M KOH)

Sterilizácia autoklávom

Po sterilizácii autoklávom nechať vychladnúť na 55 °C a potom pridať:

30 ml·l⁻¹ zmes aminokyselín

1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin solution

MMS médium

4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)

0,1 g·l⁻¹ myoinozitol

30 g·l⁻¹ sacharóza

4,5 g·l⁻¹ gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O

Upraviť pH na 5,7 (1 M KOH)

Sterilizácia autoklávom

Po sterilizácii autoklávom nechať vychladnúť na 55 °C a potom pridať:

1,0 ml·l⁻¹ 1000X Nitsch and Nitsch vitamin solution

MS médium

4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)

30 g·l⁻¹ sacharóza

4,5 g·l⁻¹ gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O

Upraviť pH na 5,7 (1 M KOH)

Sterilizácia autoklávom

LB médium

25 g·l⁻¹ LB broth

Doplniť MilliQ H₂O

Upraviť pH na 7,2

Sterilizácia autoklávom

Tekuté Fahräeus médium bez obsahu dusíka

Množstvo zásobných roztokov použitých do média: w/v zásobných roztokov:

Makroelementy:

1 ml·l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1232 g·ml ⁻¹
1 ml·l ⁻¹	KH ₂ PO ₄	0,0953 g·ml ⁻¹
2 ml·l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,0712 g·ml ⁻¹
2,5 ml·l ⁻¹	Fe-EDTA	

Mikroelementy:

100 µl·l ⁻¹	MnSO ₄ · H ₂ O	0,001 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0015 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	ZnSO ₄ · H ₂ O	0,0017 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	H ₃ BO ₃	0,001 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0011 g·ml ⁻¹

Doplniť MilliQ H₂O

Upraviť pH na 6,5 (1 M a 0,1 M HCl)

Po sterilizácii autoklávom nechať vychladnúť na 55 °C a potom pridať:

100 µl·l ⁻¹	CaCl ₂	0,11098 g·ml ⁻¹
------------------------	-------------------	----------------------------

Pevné Fahräeus médium bez obsahu dusíka

Množstvo zásobných roztokov použitých do média: w/v zásobných roztokov:

Makroelementy:

1 ml·l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1232 g·ml ⁻¹
1 ml·l ⁻¹	KH ₂ PO ₄	0,0953 g·ml ⁻¹
2 ml·l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,0712 g·ml ⁻¹
2,5 ml·l ⁻¹	Fe-EDTA	
13 g·l ⁻¹	Microagar	

Mikroelementy:

100 µl·l ⁻¹	MnSO ₄ · H ₂ O	0,001 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0015 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	ZnSO ₄ · H ₂ O	0,0017 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	H ₃ BO ₃	0,001 g·ml ⁻¹
100 µl·l ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0011 g·ml ⁻¹

Doplniť MilliQ H₂O

Upraviť pH na 6,5 (1 M a 0,1 M HCl)

Po sterilizácii autoklávom nechať vychladnúť na 55 °C a potom pridať:

100 μl·l⁻¹ CaCl₂ 0,11098 g·ml⁻¹

Roztok Fe-EDTA (10 ml)

0,056 g FeSO₄ · 7H₂O

0,074 g Na₂EDTA

Doplniť do 10 ml MilliQ H₂O

Rozpustiť pri 50 °C za stáleho miešania

3.1.4 Software na spracovanie výsledkov

ImageJ (NIH)

PowerPoint 365 (Microsoft Office)

Excel 365 (Microsoft Office)

Zen Blue 2014 ver. 2.3 (Carl Zeiss)

3.1.5 Rastlinný materiál

Medicago sativa L. divoký typ, kultivar Regen SY (RSY)

Medicago sativa L. transgénna línia 35S::*GFP:FABD2*

Na experimenty boli použité rastliny *Medicago sativa* L., divoký typ, kultivar RSY a rastliny *Medicago sativa* L., transgénej línie GFP-FABD2, ktoré boli pripravené pred začiatkom riešenia tejto bakalárskej práce stabilnou transformáciou listových explantátov z kontrolných dospelých rastlín *M. sativa*, kultivaru RSY prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens*. Po transformácii boli transgénne rastliny regenerované pomocou nepriamej somatickej embryogenézy. Kontrolné rastliny *M. sativa*, kultivaru RSY boli taktiež regenerované pomocou nepriamej somatickej embryogenézy. Takto získané rastliny boli zdrojom explantátov, z ktorých bola indukovaná somatická embryogenéza a nová generácia rastlín, využitých v tejto práci. Transgénna línia obsahovala fúzny proteín GFP-FABD2, N-terminálnu fúziu aktín-viažucej domény 2

fimbrínu 1 z *Arabidopsis thaliana* (AtFim1), s GFP (Chalfie *et al.*, 1994; Voigt *et al.*, 2005).

3.1.6 Bakteriálny materiál

Kmeň *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 obsahujúci plazmid pHC60 (tet^R), kódujúci mRFP (Boivin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2016). Kmeň bol poskytnutý prof. Dr. Karstenom Niehausom, Univerzita Bielefeld, Nemecko.

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava B5H média na indukciu kalogenézy

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bola pridaná zmes makro- a mikroelementov (Gamborg's B5 basal salt mixture), ďalej KNO₃, MgSO₄ · 7H₂O, prolín, sacharóza a gellan gum, ktoré boli vopred navážené na analytických váhach. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 5,7 pomocou 1M KOH.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fľaše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C. V sterilnom prostredí laminárneho boxu boli do média s objemom 250 ml pridané: zmes aminokyselín, zmes vitamínov (1000X Gamborg's vitamin solution), hormóny (2,4-D a kinetín) a antibiotikum tikarcilín (TIC) v riedení 1000x (250 µl TIC na 250 ml média). Médium bolo rozdelené za sterilných podmienok vo flowboxe do 10 sterilných Petriho misiek po 25 ml. Po vychladnutí boli Petriho misky s médiom zaizolované parafilmom a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.2 Príprava B50 média na indukciu embryogénneho kalusu a produkciu somatických embryí

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bola pridaná zmes makro-

a mikroelementov (Gamborg's B5 basal salt mixture), ďalej KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, prolín, sacharóza a gellan gum. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 5,7 pomocou 1 M KOH.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fláše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C. V sterilnom prostredí laminárneho boxu boli do média s objemom 250 ml pridané: zmes aminokyselín, zmes vitamínov (1000X Gamborg's vitamin solution) a antibiotikum tikarcilín (TIC) v riedení 1000x (250 µl TIC na 250 ml média). Médium bolo rozdelené za sterilných podmienok vo flowboxe do 10 sterilných Petriho misiek po 25 ml. Po vychladnutí boli Petriho misky s médiom zaizolované parafilmom a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.3 Príprava MMS média na vývoj koreňov a výhonkov zo somatických embryí

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bola pridaná zmes makro- a mikroelementov (MS basal salt mixture), myoinozitol, sacharóza a gellan gum. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 5,7 pomocou 1 M KOH.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fláše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C. V sterilnom prostredí laminárneho boxu bola do média s objemom 250 ml pridaná zmes vitamínov (1000X Nitsch and Nitsch vitamin solution) a antibiotikum tikarcilín (TIC) v riedení 1000x (250 µl TIC na 250 ml média). Médium bolo rozdelené za sterilných podmienok vo flowboxe do 10 sterilných Petriho misiek po 25 ml. Po vychladnutí boli Petriho misky s médiom zaizolované parafilmom a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.4 Príprava MS média na udržiavanie regenerovaných rastlín *in vitro* podmienkach

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bola pridaná zmes makro- a mikroelementov (MS basal salt mixture), sacharóza a gellan gum. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 5,7 pomocou 1 M KOH.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fľaše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C. Médium bolo rozdelené za sterilných podmienok vo flowboxe do 10 sterilných Petriho misiek po 25 ml. Po vychladnutí boli Petriho misky s médiom zaizolované parafilmom a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.5 Príprava pevného Fahræus média bez obsahu dusíka

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bola pridaná zmes makro- a mikroelementov zo zásobných roztokov a mikroagar. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 6,5 pomocou 1 M a 0,1 M HCl.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fľaše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C. V sterilnom prostredí laminárneho boxu sa do média s objemom 250 ml pridalo 25 µl CaCl₂ (Fahraeus, 1957, upravené).

3.2.6 Príprava tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bola pridaná zmes makro- a mikroelementov zo zásobných roztokov. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 6,5 pomocou 1 M a 0,1 M HCl.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fľaše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C. V sterilnom prostredí laminárneho boxu sa do média s objemom 250 ml pridalo 25 µl CaCl₂ (Fahraeus, 1957, upravené).

3.2.7 Príprava LB média pre *S. meliloti*

Do 1000 ml nádoby bolo pridaných približne 800 ml MilliQ vody a magnetické miešadlo. Za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke bol pridaných 25 g·l⁻¹ LB broth. Objem bol doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené na 7,2.

Médium sa rozdelilo do štyroch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml, ktoré sa sterilizovali pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom boli fľaše s médiom v inkubátore udržiavané pri teplote 55 °C.

3.2.8 Odoberanie a povrchová sterilizácia listov z donorových rastlín na indukciu nepriamej somatickej embryogenézy

Z rastlín *M. sativa* rastúcich v pôde vo fytotrone boli odobrané zdravé a dobre vyvinuté listy do Falcon skúmavky s vodovodnou vodou. V sterilnom prostredí laminárneho boxu sa zo skúmavky Falcon s listmi odliala voda do odpadnej kadičky a 5 až 10 sek sa sterilizovali v 70 % etanole. Následne boli listy prenesené do Falcon skúmavky so sterilizačným roztokom (1 % chlórnan sodný + 0,05 % Tween) a pretrepávané po dobu 1,5 min. Následne boli listy 3x prepláchnuté MilliQ vodou a prenesené na Petriho misku so sterilným filtračným papierom. Pomocou sterilného skalpela boli listy priečne prerezané na polovicu a následne takto pripravené listové explantáty boli položené na B5H médium indukujúce kalogenézu.

3.2.9 Sledovanie priebehu somatickej embryogenézy

Jednotlivé štádia nepriamej somatickej embryogenézy boli snímané pri prechádzajúcom svetle a pri fluorescenčnom osvetlení pre GFP signál priamo na Petriho miskách pomocou fluorescenčného zoomavacieho stereomikroskopu v rôznych časových intervaloch. Pozorované boli rastliny *M. sativa* kontrolnej línie RSY a transgéennej línie GFP-FABD2, u ktorej bol detekovaný GFP signál.

3.2.10 Meranie dĺžky koreňového systému *Medicago sativa*

V laminárnom boxe boli pripravené hranaté Petriho misky s MS médiom, na ktorých boli kultivované rastliny *M. sativa* kontrolnej línie RSY a transgéennej línie GFP-FABD2. Pre meranie dĺžky koreňového systému bolo vybratých 10 zdravých rastlín z každej línie. Celé Petriho misky s rastlinami boli snímané pomocou stolového skenera a dĺžka koreňového systému bola meraná pomocou programu ImageJ.

3.2.11 Príprava kultúry *S. meliloti* zo zásobného roztoku

Z mraziaceho boxu (-80 °C) bola vytiahnutá mikroskúmavka Eppendorf s glycerolovým roztokom a s kultúrou baktérii *Sinorhizobium meliloti* s produkciou mRFP, a prenesená do sterilného prostredia laminárneho boxu. Z glycerolového roztoku sa so sterilnou špičkou odobralo približne 30 µl kultúry, ktorá sa preniesla i so špičkou do 10 ml LB média v 50 ml skúmavke Falcon. Bakteriálna kultúra v LB médiu bola inkubovaná na trepačke v tme, 48 hod, pri 180 otáčkach za minútu a teplote 28 °C, pokiaľ nebola dosiahnutá optická hustota pri 600 nm (OD_{600}) približne medzi 0,8 – 1,5. Optická hustota OD_{600} bola kontrolovaná pomocou spektrofotometra, kde sterilné LB médium slúžilo ako blank. Na separáciu bakteriálnej kultúry od média sa použila centrifuga pri 3000 g po dobu 5 minút, pri laboratórnej teplote. Supernatant bol odstránený a bakteriálne bunky z peletu boli resuspendované v čistom tekutom Fahræus médiu bez dusíka, pre dosiahnutie optickej hustoty $OD_{600} = 0,5$. Skúmavky Falcon s tekutým Fahræus médiom bez dusíka a s bakteriálnou kultúrou boli obalené alobalom a inkubované na trepačke pri teplote 28 °C a pri 150 otáčok za minútu.

3.2.12 Kokultivácia *S. meliloti* s *M. sativa*

Vyvinuté rastliny *Medicago sativa* kultivaru Regen-SY a rastlín *Medicago sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 z MS média boli preložené na Petriho misky s pevným Fahræusovým médiom bez obsahu dusíka. Na každej Petriho miske boli maximálne tri rastliny. Povrch Petriho misiek v spodnej časti, kde sa nachádzal koreňový systém rastlín bol prekrytý čiernou plastovou fóliou, aby korene rástli v tieni. Po 7 dňoch „hladovania“ boli pipetou na rastliny aplikované baktérie *Sinorhizobium meliloti* s produkciou mRFP (5 ml) z tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka o optickej hustote pri 600 nm (OD_{600}) 0,5. Petriho misky boli obalené čiernou fóliou a kultivované v kultivačnej komore. Počítanie koreňových hľúzok sa uskutočnilo 30 dní po kokultivácii.

4 VÝSLEDKY

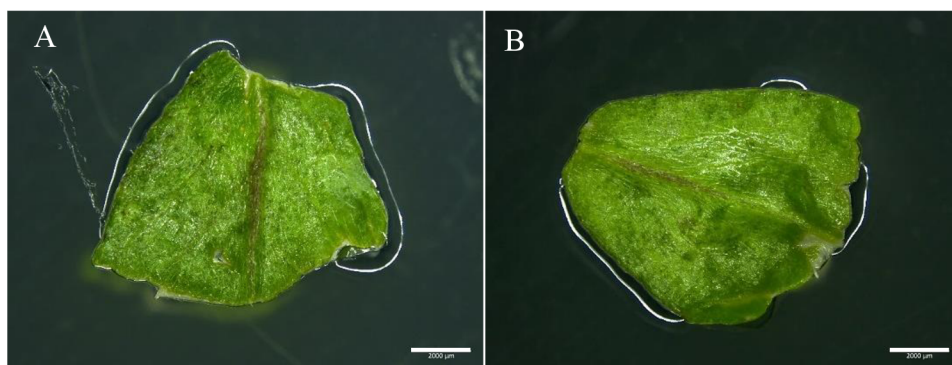
Výsledky tejto bakalárskej práce sú rozdelené do 3 samostatných kapitol. Prvá časť sa zaoberá kultiváciou a regeneráciou rastlín *Medicago sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 v *in vitro* podmienkach pomocou somatickej embryogenézy a ich porovnanie s kontrolnou líniou RSY. Druhá kapitola je zameraná na stanovenie fenotypu rastlín *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 regenerovaných procesom somatickej embryogenézy. Zmerané dĺžky koreňových sústav sa porovnali s kontrolnou líniou RSY a následne sa štatisticky vyhodnotili výsledky. V tretej časti výsledkov bola pozorovaná kokultivácia rastlín *M. sativa* so *Sinorhizobium meliloti* na pevnom Fahræus médiu bez obsahu dusíka so zameraním na efektivitu procesu tvorby koreňových hlúčok a štatistické vyhodnotenie počtu koreňových hlúčok u kontrolnej línie RSY a u transgéennej línie GFP-FABD2.

4.1 Kultivácia a regenerácia rastlín *M. sativa* v *in vitro* podmienkach pomocou somatickej embryogenézy

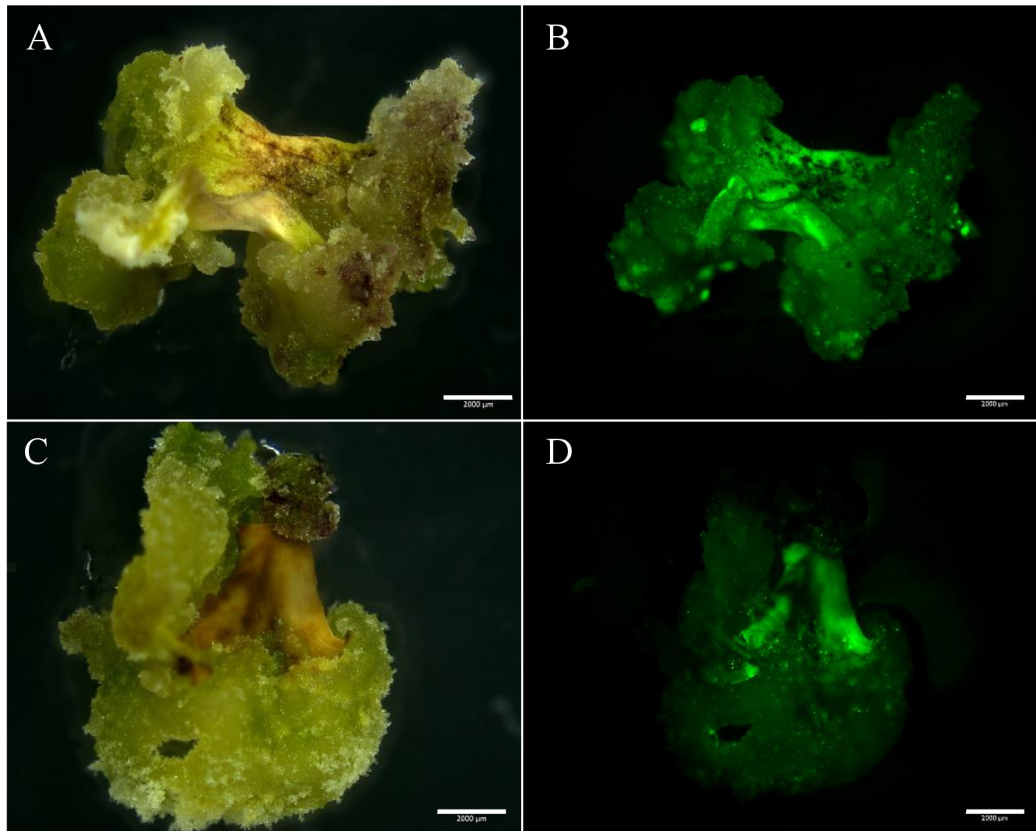
Kultivácia a regenerácia rastlín *M. sativa* v *in vitro* podmienkach procesom somatickej embryogenézy bola indukovaná u kontrolnej línie RSY a u transgéennej línie GFP-FABD2. Zdrojovým rastlinným orgánom pre regeneráciu rastlín boli listové explantáty odobrané z rastlín rastúcich v pôde vo fytotrone z každej línie, ktoré sa najprv sterilizovali. Následne boli kultivované na kultivačných médiách, prispôbených pre jednotlivé kroky nepriamej somatickej embryogenézy.

Listové explantáty kontrolnej a transgéennej línie *M. sativa* po sterilizácii boli prenesené na sterilné B5H médium s antibiotikom tikarcilín (TIC) (Obr. 6). Listové explantáty boli kultivované po dobu 3 týždňoch vo fytotrone pri teplote 22-24 °C, fotoperióde 16 hodín svetlo/8 hodín tma a pri intenzite svetla 60-80 mE·m⁻²·s⁻¹. Rastlinné hormóny 2,4-D a kinetin, obsiahnuté v B5H médiu, indukovali kalogenézu somatických buniek explantátov (Obr. 7 A, C). Pri transgéennej línii GFP-FABD2 bola zdokumentovaná fluorescencia GFP v kaluse 12 dní po kultivácii (Obr. 7 B). V kontrolnej línii RSY špecifická fluorescencia GFP nebola v kaluse detekovaná, ale zaznamenala sa len autofluorescencia nekrotického pletiva pôvodného listu (Obr. 7 D). Po perióde troch

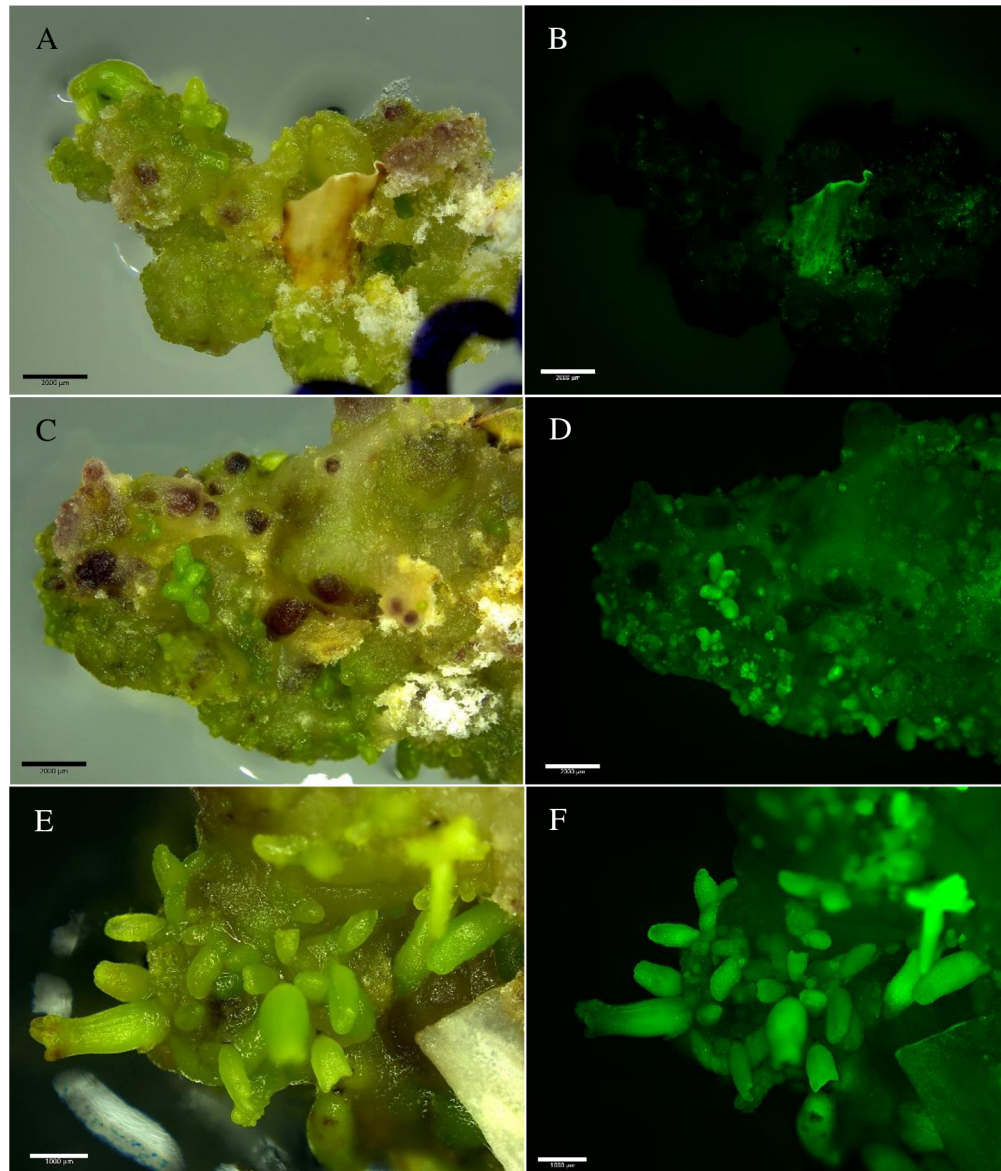
týždňoch boli celé explantáty s vyvinutým kalusom z oboch línií preložené na B50 médium (s obsahom TIC), ktoré neobsahuje rastlinné hormóny (Obr. 8 A, C). B50 médium indukovalo tvorbu somatických embryí, v ktorých bol tiež zdokumentovaný fluorescenčný signál GFP u transgéennej línie GFP-FABD2 (Obr. 8 D). Táto špecifická fluorescencia GFP sa v kaluse a somatických embryách kontrolnej línie RSY nevyskytovala (Obr. 8 B). Kalusy so somatickými embryami boli kultivované po dobu 2-3 týždňoch vo fytotrone pri rovnakých *in vitro* podmienkach. U transgéennej línie GFP-FABD2 boli pozorované hlavne somatické embryá v globulárnom štádiu (Obr. 10). Taktiež boli viditeľné somatické embryá srdcovitého tvaru (Obr. 10), torpédovitého tvaru (Obr. 9A, B a 10), a tiež v kotyledonárnom štádiu (Obr. 9 C, D). Zrelé somatické embryá boli prenesené na MMS médium (s obsahom TIC), pre vývoj koreňov a výhonkov (Obr. 11). 5 dní po preložení na MMS médiu boli viditeľné kľúčne listy (kotyledony) a korene s koreňovými vláskami (Obr. 12). Rastúce somatické embryá (mladé rastlinky) boli následne prenesené na MS médium. Tu sa vývin celých rastlín dokončil. V týchto *in vitro* podmienkach sa rastliny *M. sativa* udržiavali v sterilných plastových boxoch s MS médiom (Obr. 13). Tieto regenerované rastliny *M. sativa* boli následne využité v experimentoch fenotypovej analýzy a kokultivácie so *S. meliloti*.



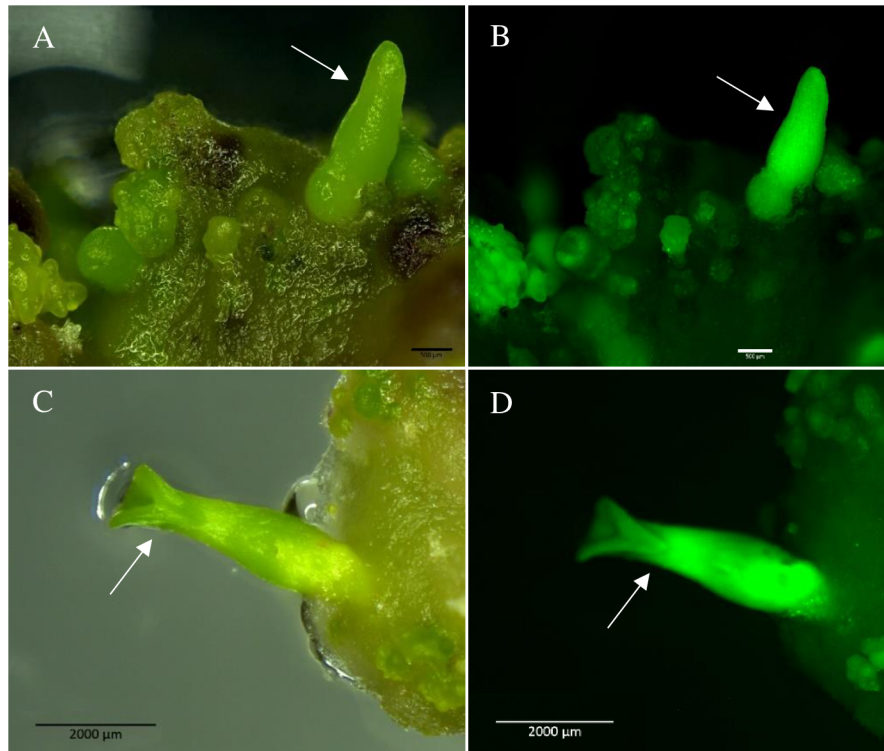
Obr. 6 Listové explantáty *M. sativa* prenesené po sterilizácii na B5H médium + TIC. (A) Listový explantát *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 v prechádzajúcom svetle, (B) Listový explantát *M. sativa* kontrolnej línie RSY v prechádzajúcom svetle. Mierka - 2000 µm.



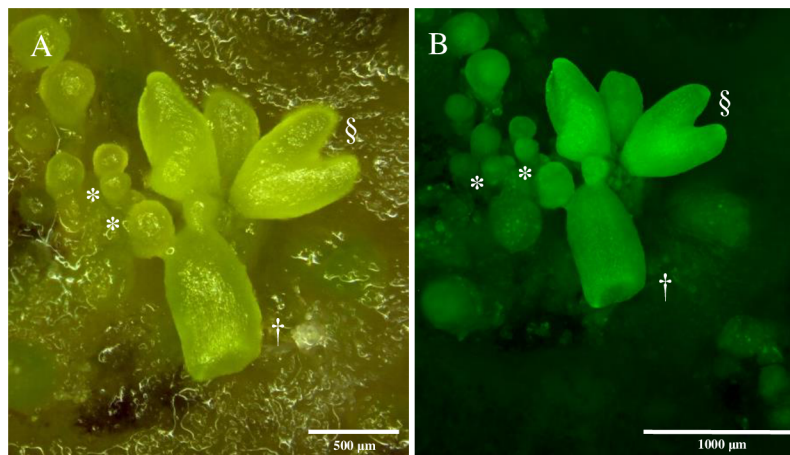
Obr. 7 Kalogenéza somatických buniek listových explantátov *M. sativa* 12 dní na B5H médiu + TIC. Listový explantát *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2 v prechádzajúcom svetle (A), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (B). Listový explantát *M. sativa* kontrolnej línie RSY v prechádzajúcom svetle (C), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (D). Mierka - 2000 μm .



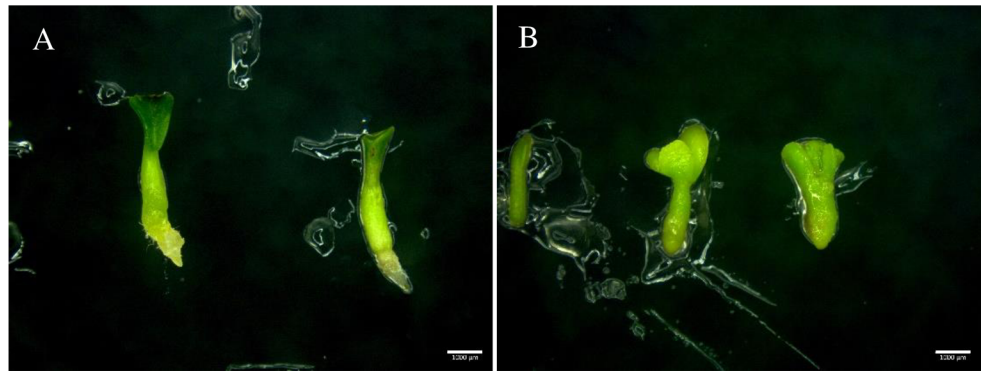
Obr. 8 Tvorba somatických embryí z kalusov *M. sativa* po 5 a 15 dňoch na B50 médiu + TIC. 5 dňový kalus so somatickými embryami *M. sativa* kontrolnej línie RSY v prechádzajúcom svetle (A), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (B). 5 dňový kalus so somatickými embryami *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 v prechádzajúcom svetle (C), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (D). 15 dňový kalus so somatickými embryami *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 v prechádzajúcom svetle (E), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (F). Mierka - 2000 µm u A, B, C, D a 1000 µm u E, F.



Obr. 9 Somatické embryá vyvinuté z kalusov *M. sativa* trangénnej línie GFP-FABD2 po 5 dňoch na B50 médiu + TIC. Somatické embryo torpédovitého tvaru v prechádzajúcom svetle (A), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (B). Somatické embryá v kotyledonárnom štádiu v prechádzajúcom svetle (C), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (D). Somatické embryá sú označené šípkou. Mierka - 500 μm u A, B; mierka - 2000 μm u C, D.



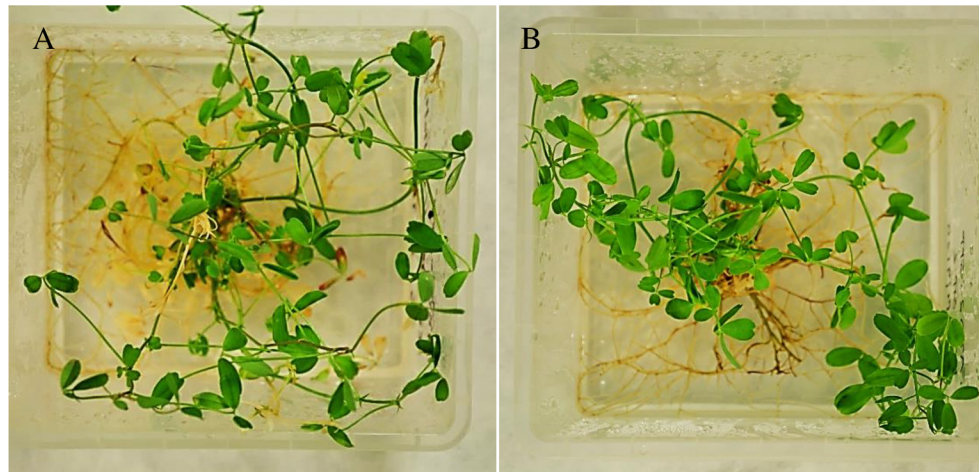
Obr. 10 Somatické embryá vyvinuté z kalusov *M. sativa* trangénnej línie GFP-FABD2 po 15 dňoch na B50 médiu + TIC. Somatické embryá v globulárnom štádiu (*), srdcovitého tvaru (§), a torpédovitého tvaru (†). Snímané v prechádzajúcom svetle (A), a vo fluorescenčnom kanáli pre GFP (B). Mierka - 500 μm u A; mierka - 1000 μm u B.



Obr. 11 Zrelé somatické embryá *M. sativa* v kotyledonárnom štádiu prenesené na MMS médium + TIC. (A) Somatické embryá *M. sativa* kontrolnej línie RSY v prechádzajúcom svetle, (B) Somatické embryá *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2 v prechádzajúcom svetle. Mierka – 1000 μm .



Obr. 12 Somatické embryá *M. sativa* s vyvíjajúcimi sa kotyledonmi a koreňmi 5 dní po preložení na MMS médium + TIC. (A) Somatické embryá *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2 v prechádzajúcom svetle, (B) Somatické embryá *M. sativa* kontrolnej línie RSY v prechádzajúcom svetle. Mierka – 1000 μm .



Obr. 13 Dospelé rastliny *M. sativa* udržiavané v in vitro podmienkach na MS médiu v plastových boxoch. (A) Dospelé rastliny *M. sativa* kontrolnej línie RSY (B) Dospelé rastliny *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2.

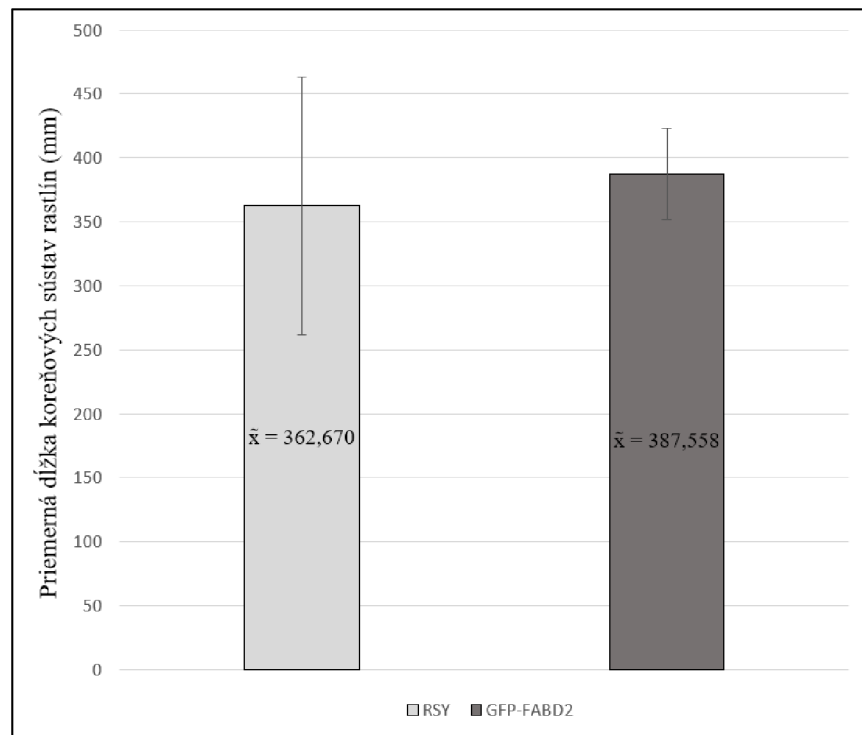
4.2 Meranie dĺžky koreňového systému transgénnych a kontrolných rastlín *Medicago sativa*

Pre určenie fenotypu transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 regenerovaných procesom somatickej embryogenézy bolo uskutočnené meranie dĺžky koreňových systémov. Pre fenotypovú analýzu sa vybralo 10 kontrolných rastlín *M. sativa*, kultivar Regen SY a 10 transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2. Kvantitatívna analýza sa urobila 7 dní po prenesení rastlín na čerstvé MS médium (Obr. 14). Rastliny *M. sativa* na Petriho miskách s MS médiom boli snímané pomocou stolového skenera a dĺžka koreňového systému bola meraná priamo z nasnímaných záberov pomocou programu ImageJ.

Priemerná dĺžka koreňového systému u kontrolných rastlín *M. sativa* RSY bola 362,67 mm a priemerná dĺžka koreňového systému u transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 bola 387,558 mm (Obr. 15). Z týchto výsledkov vyplýva že transgénná línia *M. sativa* GFP-FABD2 má približne priemerne o 24,888 mm dlhšiu koreňovú sústavu ako kontrolné rastliny *M. sativa* RSY.



Obr. 14 Vyvinuté koreňové systémy (A) kontrolných rastlín *M. sativa* kultivaru RSY a (B) transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 na MS médiu 7 dní po preložení. Mierka – 10 mm.



Obr. 15 Priemerná dĺžka koreňových systémov (modrá) kontrolných rastlín *M. sativa* kultivaru RSY a transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 7 dní po preložení. Priemerná dĺžka koreňového systému u kontrolných rastlín *M. sativa* RSY bola 362,67 mm a (*) smerodajná odchýlka zo vzorky je 100,7508 mm. Priemerná dĺžka koreňového systému u transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 bola 387,558 mm a (†) smerodajná odchýlka zo vzorky je 36,01904 mm.

4.3 Kokultivácia kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* so *S. meliloti*

Vyvinuté kontrolné rastliny *Medicago sativa* RSY a rastliny transgénnej línie GFP-FABD2 zo somatickej embryogenézy boli preložené z MS média na Petriho misky s pevným Fahräeus médiom bez obsahu dusíka. Koreňový systém rastlín na Petriho miskách bol prekrytý aby korene rástli v tieni. Na rastliny po 7 dňoch „hladovania“ bola aplikovaná pipetou suspenzia baktérií *Sinorhizobium meliloti* s produkciou mRFP (5 ml) z tekutého Fahräeus média bez obsahu dusíka o $OD_{600} = 0,5$. Petriho misky s rastlinami po inokulácii boli obalené čiernou fóliou a inkubované v kultivačnej komore. Po 30 dňoch kokultivácie boli na rastlinách pozorované pomocou zoomovacieho stereomikroskopu vytvorené koreňové hľúžky (Obr. 16, 17, 18). Na kontrolných aj transgénnych rastlinách *M. sativa* sa vytvorili koreňové hľúžky, ktoré boli tmavé, senescentné a ďalej nerástli (Obr. 16 B, 17), a koreňové hľúžky, ktoré boli zdravé, ružové, a plne funkčné (Obr. 16 A, 18).

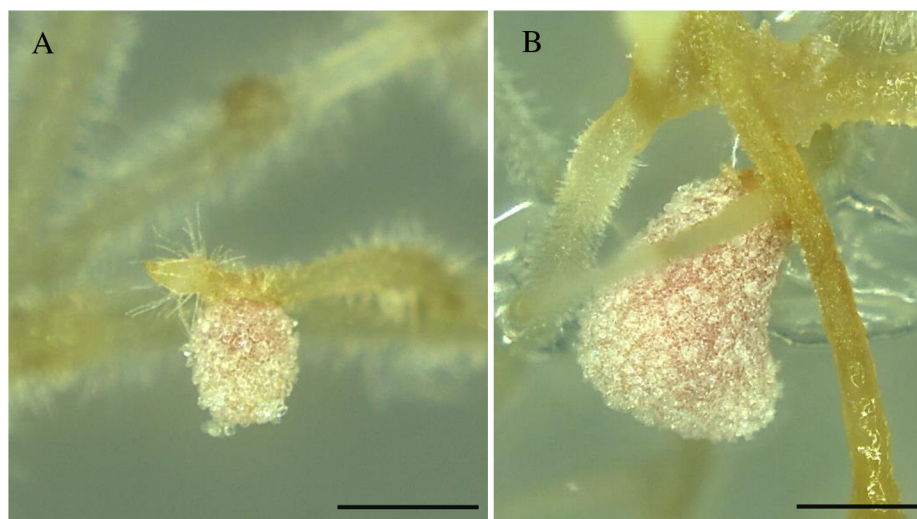
Na vyhodnotenie počtu vytvorených koreňových hľúžok sa použilo 5 kontrolných rastlín *M. sativa* RSY a 5 rastlín transgénnej línie GFP-FABD2. U rastlín *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2 sa vytvorilo celkovo 128 koreňových hľúžok, z ktorých bolo iba 22 plne funkčných (Obr. 19). U rastlín *M. sativa* kontrolnej línie RSY sa vytvorilo celkovo 61 koreňových hľúžok, z ktorých bolo iba 12 plne funkčných (Obr. 19). Z výsledkov vyplýva, že transgénne rastliny *M. sativa* GFP-FABD2 mali približne dvojnásobok vyvinutých koreňových hľúžok než kontrolná línia *M. sativa* RSY.



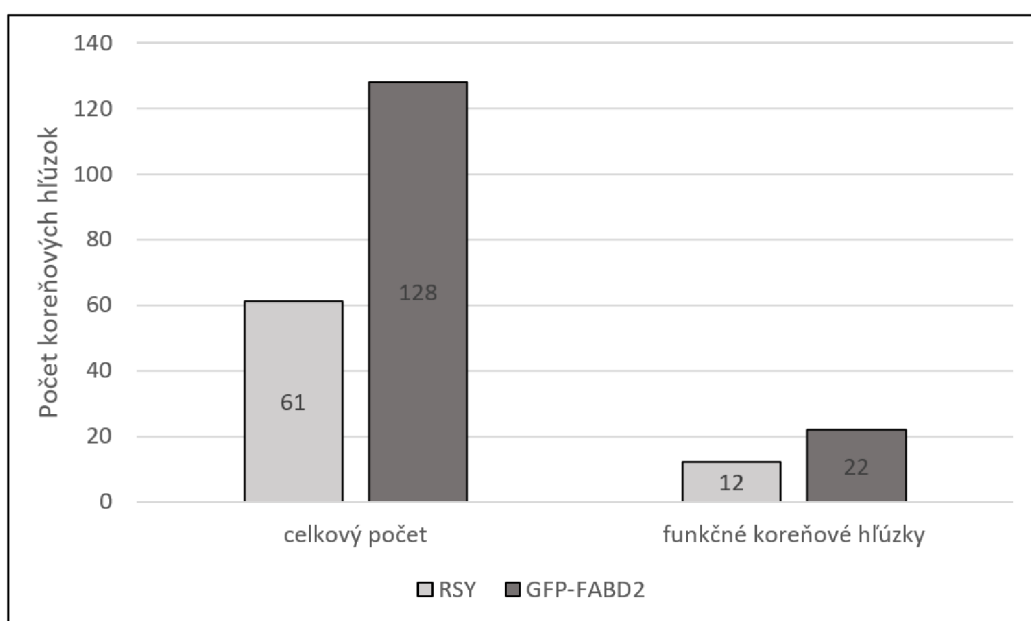
Obr. 16 Vyvinuté koreňové hľúzky na rastlinách *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2 rastúce na pevnom Fahräeus médiu bez dusíka po 30 dňoch kokultivácie so *S. meliloti*. (A) Funkčné a zdravé koreňové hľúzky ružovej farby a (B) tmavé, senescentné koreňové hľúzky. Mierka – 1000 μm .



Obr. 17 Tmavé, senescentné koreňové hľúzky na kontrolných rastlinách *M. sativa* kultivaru RSY rastúce na Fahräeus médiu bez dusíka po 30 dňoch kokultivácie so *S. meliloti*. Mierka - 1000 μm .



Obr. 18 Priblížené zdravé, plne funkčné koreňové hľúzky ružovej farby na rastlinách *M. sativa* rastúce na Fahræus médiu bez dusíka po 30 dňoch kokultivácie so *S. meliloti*. (A) Koreňová hľúzka na rastlinách kontrolnej línie RSY. (B) Koreňová hľúzka na rastlinách transgéennej línie GFP-FABD2. Mierka – 1000 µm.



Obr. 19 Počet koreňových hľúzok u kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* rastúcich na Fahræus médiu bez obsahu dusíka po 30 dňoch kokultivácie so *S. meliloti*. U transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 sa vytvorilo celkovo 128 koreňových hľúzok, z ktorých bolo iba 22 plne funkčných. U kontrolných rastlín *M. sativa* RSY sa vytvorilo celkovo 61 koreňových hľúzok, z ktorých bolo iba 12 plne funkčných.

5 DISKUSIA

Jeden z hlavných cieľov predkladanej bakalárskej práce bolo získanie regenerovaných transgénnych a kontrolných rastlín *Medicago sativa* prostredníctvom nepriamej somatickej embryogenézy a ich kultivácia v *in vitro* podmienkach pre ďalšie použitie v experimentoch. Rastliny *M. sativa* transgénnej línie obsahujú fúzny proteín GFP-FABD2 značiaci aktínový cytoskelet pomocou fluorescenčného markeru GFP (Voigt *et al.*, 2005). Na vyhodnotenie špecifickej fluorescence u kultivovaných listových explantátov transgénnej línie počas jednotlivých krokov somatickej embryogenézy sa použili kontrolné rastliny *M. sativa*, kultivar Regen SY. Po 12 dňoch na kultivačnom médiu B5H s obsahom fytohormónov indukujúcich kalogenézu, bola v kaluse transgénnych rastlín *M. sativa* GFP-FABD2 detekovaná špecifická fluorescencia s vysokou intenzitou. Táto špecifická fluorescencia u kontrolnej línie RSY nebola viditeľná, bola zaznamenaná len sa autofluorescencia spôsobená nekrozou pôvodného pletiva explantátu. Tento fakt je dôkazom prítomnosti fúzneho proteínu u transgénnej línie. Kalogenéza je typickým medzikrokom nepriamej somatickej embryogenézy, po ktorom dochádza odstránením rastlinných hormónov z média k indukcii tvorby somatických embryí (Pulianmackal *et al.*, 2014). Po vytvorení somatických embryí na B50 médiu bola viditeľná fluorescencia v somatických embryách iba u transgénnej línie. Somatické embryá boli pozorované v rôznych štádiách, ako je globulárne, srdcovité, torpédovité a kotyledonárne štádium. Na vývin výhonkov a koreňov sa somatické embryá preniesli na MMS médium a následne na MS médium, kde boli kompletne kontrolné a transgénne rastliny kultivované v *in vitro* podmienkach.

Vďaka výsledkom z experimentu merania koreňových systémov na určenie fenotypu transgénnej línie *M. sativa* GFP-FABD2 sa dá predpokladať, že expresia GFP-FABD2 mierne vplyva na predlžovanie koreňov. Vyplýva to z faktu, že oproti kontrolnej línie bola priemerná dĺžka celkového koreňového systému väčšia u transgénnej línie. Zo štúdií na *Arabidopsis thaliana* sa zistilo, že expresiou fúzneho proteínu FABD2-GFP alebo GFP-FABD2 vykazujú rastliny predĺženie epidermálnych buniek, čo má za následok predĺženie primárnych koreňov a hypokotyllov (Voigt *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Pre presnejšie určenie tejto hypotézy bude potrebné tento experiment viackrát zopakovať s väčším počtom skúmaných vzoriek.

Kontrolné a transgénne rastliny boli kokultivované spoločne s baktériami *S. meliloti* na pevnom Fahræus médiu bez obsahu dusíka. Po 30 dňoch kokultivácie sa vyhodnotili výsledky počtov vytvorených koreňových hľúzkok na koreňoch. Transgénna línia *M. sativa* GFP-FABD2 mala približne dvojnásobok vyvinutých koreňových hľúzkok než kontrolná línia *M. sativa* RSY. Boli pozorované zdravé, funkčné koreňové hľúzky ružovej farby, ktoré sú schopné fixovať atmosférický dusík. Ich typické sfarbenie spôsobuje leghemoglobín udržiavajúci nízke hladiny kyslíka, ktorý má inhibičný účinok na nitrogenázu (Ott *et al.*, 2005). Taktiež boli viditeľné nefunkčné, tmavé koreňové hľúzky, ktorých senescencia môže byť predčasne spôsobená rôznymi typmi stresu, ako je napríklad oxidatívny stres. Hlavným dôvodom senescencie týchto hľúzkok ale pravdepodobne boli obmedzené podmienky rastu rastlín v uzavretých Petriho miskách po dobu 30 dní. Udržanie životaschopnosti všetkých hľúzkok by bolo pre rastliny v týchto podmienkach energeticky príliš náročné. Kultivačné média použité pri somatickej embryogenéze obsahovali antibiotikum tikarcilín, ktoré mohlo taktiež ovplyvniť vitalitu regenerovaných rastlín. Bohužiaľ, z dôvodov karanténnych opatrení nebolo možné vykonať tieto experimenty s viacerými opakovaniami.

6 ZÁVER

V teoretickej časti bakalárskej práce je popísaný súčasný stav literatúry zameraný na *Medicago sativa* z hľadiska morfológie a agronomického využitia. Ďalej sú tu sumarizované mechanizmy prospešných pôdných baktérií podporujúce rast a vývin rastlín, a aspekty symbiotických interakcií medzi rastlinami *Medicago sativa* a baktériami *Sinorhizobium meliloti*. V tejto práci sa využívala transgénna línia *M. sativa* s expresiou GFP-FABD2, a preto v ďalšej časti je v teoretickom úvode popis cytoskeletu rastlinných buniek so zameraním na zmeny aktínového cytoskeletu počas symbiózy. V ďalšej časti je popis metód regenerácie rastlín *M. sativa* v *in vitro* podmienkach, transformácie u *M. sativa* a mikroskopických metód snímania živých buniek.

V prvej praktickej časti bola uskutočnená regenerácia a kultivácia kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* v *in vitro* podmienkach procesom somatickej embryogenézy. U transgénnych rastlinách *M. sativa* s produkciou GFP-FABD2 bola zdokumentovaná fluorescencia počas jednotlivých krokov somatickej embryogenézy.

V ďalšej praktickej časti boli regenerované rastliny *M. sativa* s expresiou GFP-FABD2 a kontrolné rastliny *M. sativa* RSY využité na charakteristiku fenotypu koreňového systému. Merania dĺžok koreňových systémov u transgéennej línie boli porovnané s kontrolnou líniou a z výsledkov sa zistilo, že transgénna línia GFP-FABD2 má priemerne dlhší koreňový systém.

V záverečnej časti práce boli na transgénne a kontrolné rastliny *M. sativa* aplikované baktérie *S. meliloti*. Po 30 dňoch kokultivácie sa z výsledkov počtu koreňových hlúčok zistilo, že transgénna línia GFP-FABD2 vytvárala koreňové hlúčky približne v dvojnásobnom počte v porovnaní s kontrolnou líniou RSY.

7 ZOZNAM LITERATÚRY

- Abeles F. B., Morgan P. W., Saltveit M. E. Jr. (1992): *Ethylene in Plant Biology*. 2nd ed., Academic Press, New York, NY, U.S.A., 414 strán.
- Adams D. O., Yang S. F. (1979): Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 170-174.
- Ahemad M. (2012): Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. *IIOAB Journal* **3**, 39-46.
- Ahemad M., Khan M. S. (2011): Pesticide interactions with soil microflora: importance in bioremediation. In: *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. (Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J., eds.), Springer, New York, U.S.A., 393-413.
- Ahemad M., Kibret M. (2014): Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* **26**, 1-20.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L. M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprpto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B. T., Sali A., Rout M. P. (2007): The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**, 695-701.
- Amor B. B., Shaw S. L., Oldroyd G. E., Maillet F., Penmetsa R. V., Cook D., Long S. R., Dénarié J., Gough C. (2003): The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant Journal* **34**, 495-506.
- Anami S., Njuguna E., Coussens G., Aesaert S., Van Lijsebettens M. (2013): Higher plant transformation: principles and molecular tools. *International Journal of Developmental Biology* **57**, 483-94.
- Andriankaja A., Boisson-Dernier A., Frances L., Sauviac L., Jauneau A., Barker D. G., de Carvalho-Niebel F. (2007): AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent MtENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**, 2866-2885.
- Ané J. M., Kiss G. B., Riely B. K., Penmetsa R. V., Oldroyd G. E., Ayax C., Lévy J., Debelle F., Baek J. M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B. A., Long S. R., Dénarié J., Cook D. R. (2004): *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**, 1364-1367.
- Annicchiarico P., Barrett B., Brummer E. C., Julier B., Marshall A. H. (2015): Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 327-380.
- Antolín-Llovera M., Ried M. K., Parniske M. (2014): Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with Nod factor receptor 5. *Current Biology* **24**, 422-427.
- Armstrong J. M. (1954): Cytological studies in alfalfa polyploids. *Canadian Journal of Botany* **32**, 531-542.
- Arrighi J. F., Barre A., Amor B., Bersoult A., Soriano L. C., Mirabella R., Carvalho-Niebel de F., Journet E. P., Ghérardi M., Huguet T., Geurts R., Dénarié J., Rougé P., Gough C. (2006): The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiology* **142**, 265-279.
- Barnes D. K., Cleveland R. W. (1963): Inheritance of ovule number in diploid alfalfa. *Crop Science* **3**, 499-504.
- Barnes D. K., Bingham E. T., Axtell J. D., Davis W. H. (1972): The flower, sterility mechanism, and pollination control. In: *Alfalfa science and technology*. Vol. 15 (Hanson C. H. ed.), The American Society of Agronomy, Madison, WI, U.S.A., 123-141.
- Berg M. J., Tymoczko L. J., Stryer L. (2002): *Biochemistry*. 5th ed., W. H. Freeman, New York, U.S.A., 1050 strán.

- Bhattacharyya P. N., Jha D. K. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 1327–1350.
- Bishop P. E., Joerger R. D. (1990): Genetics and Molecular Biology of Alternative Nitrogen Fixation Systems. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**, 109-125.
- Boivin C., Camut S., Malpica C. A., Truchet G., Rosenberg C. (1990): *Rhizobium meliloti* Genes Encoding Catabolism of Trigonelline Are Induced under Symbiotic Conditions. *Plant Cell* **2**, 1157-1170.
- Bolton J. L. (1962): Origin and history. In: *Alfalfa: Botany, Cultivation and Utilization*, World Crop Books. (Polunin N. ed.), Leonard Hill, London, U.K., 1.
- Bora K. S., Sharma A. (2011): Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical Biology* **49**, 211-220.
- Breakspear A., Liu C., Roy S., Stacey N., Rogers C., Trick M., Morieri G., Mysore S. K., Wen J., Oldroyd G. E. D., Downie J. A., Murray, J. D. (2014): The Root Hair “Infectome” of *Medicago truncatula* Uncovers Changes in Cell Cycle Genes and Reveals a Requirement for Auxin Signaling in Rhizobial Infection. *The Plant Cell Online* **26**, 4680-4701.
- Capoen W., Sun J., Wysham D., Otegui M. S., Venkateshwaran M., Hirsch S., Miwa H., Downie J. A., Morris R. J., Ané J. M., Oldroyd G. E. (2011): Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14348-14353.
- Cárdenas L., Vidali L., Domínguez J., Pérez H., Sánchez F., Hepler P. K., Quinto C. (1998): Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiology* **116**, 871-877.
- Cole D. F., Dobrenz A. K. (1970): Stomate density of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Crop Science* **10**, 61-63.
- Cooper D. C., Brink R. A., Albrecht H. R. (1937): Embryo mortality in relation to seed formation in alfalfa (*Medicago sativa*). *American Journal of Botany* **24**, 203-213.
- Davies P. J. (2004): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 802 strán.
- Davison J. (1988): Plant Beneficial Bacteria. *Nature Biotechnology* **6**, 282-286.
- De Ruijter N. C. A., Bisseling T., Emons A. M. C. (1999): *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 829-832.
- de Vries S. C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde H. D., Thomas T. L., van Kammen A. (1988): Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* **176**, 196–204.
- Défago G. (1993): 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathology* **42**, 311-312.
- Delić D., Tomić Z., Radović J. (1998): Uticaj *Rhizobium meliloti* na prinos lucerke (*Medicago sativa* L.). *Arhiv za poljoprivredne nauke* **209**, 51-58.
- Dénarié J., Debelle F., Promé J. C. (1996): *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 503-535.
- D'Halluin K., Botterman J., de Greef W. (1990): Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Science* **30**, 866-871.
- Dunne C., Crowley J. J., Moëne-Loccoz Y., Dowling D. N., de Bruijn F. J., O'Gara F. (1997): Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* **143**, 3921-3931.
- Dyba M., Hell S. W. (2003): Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission. *Applied Optics* **42**, 5123-5129.
- El-Tarabily K. A., Sykes M. I., Kurtböke I. D., Hardy Gest J., Barbosa A. M., Dekker R. F. H. (1996): Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an

- antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. *Canadian Journal of Botany* **74**, 618-624.
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G. B. (2002): A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- Fahræus G. (1957): The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* **16**, 374-381.
- Fehér A. (2019): Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science* **10**:536. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00536/full>.
- Flajoulot S., Ronfort J., Baudouin P., Barre P., Huguet T., Huyghe C., Julier B. (2005): Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 1420-1429.
- Fonouni-Farde C., Tan S., Baudin M., Brault M., Wen J., Mysore K. S., Niebel A., Frugier F., Diet A. (2016): DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nature Communications* **7**:12636. <https://www.nature.com/articles/ncomms12636>.
- Fournier J., Timmers A. C. J., Sieberer B. J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D.G. (2008): Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology* **148**, 1985-1995.
- Frankowski J., Lorito M., Scala F., Schmidt R., Berg G., Bahl H. (2001): Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology* **176**, 421-426.
- Fridlender M., Inbar J., Chet I. (1993): Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 1211-1221.
- Gage D. J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280-300.
- Girkin J. M., Carvalho M. T. (2018): The light-sheet microscopy revolution. *Journal of Optics* **20**, 053002.
- Glass A. D. M. (1989): *Plant nutrition: an introduction to current concepts*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A., 234 strán.
- Glazebrook J. (2005): Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205-227.
- Glick B. R. (1995): The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**, 109-117.
- Glick B. R. (2012): Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, **2012**:15. <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>.
- Glick B. R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. (2007): Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* **119**, 329-339.
- Glick B. R., Penrose D. M., Li J. (1998): A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* **190**, 63-8.
- Goddard R. H., Wick S. M., Silflow C. D., Snustad D. P. (1994): Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. *Plant Physiology* **104**, 1-6.
- Gonzalez-Rizzo S., Crespi M., Frugier F. (2006): The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**, 2680-2693.
- Gray E. J., Smith D. L. (2005): Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 395-412.
- Groth M., Takeda N., Perry J., Uchida H., Dräxl S., Brachmann A., Sato S., Tabata S., Kawaguchi M., Wang T. L., Parniske M. (2010): NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required

- for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* **22**, 2509-2526.
- Gustafsson M. G. (2000): Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* **198**, 82-87.
- Hadri A.-E., Spaink H. P., Bisseling T., Brewin N. J. (1998): Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In: *The Rhizobiaceae*. (Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas P. J. J., eds.), Springer, Dordrecht, Netherlands, 347-360.
- Haney C. H., Long S. R. (2010): Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 478-483.
- Hayashi S., Gresshoff P. M., Ferguson B. J. (2014): Mechanistic action of gibberellins in legume nodulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**, 971-978.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. (2010): Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* **60**, 579-598.
- Hider R. C., Kong X. (2010): Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* **27**, 637-657.
- Hirsch S., Kim J., Muñoz A., Heckmann A. B., Downie J. A., Oldroyd G.E. (2009): GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**, 545-557.
- Honma M., Shimomura T. (1978): Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**, 1825-1831.
- Hrabě F. a kol. (2004): Trávy a jetelovino-trávy v zemědělské praxi. Nakladatelství Ing. Petr Baštan, Olomouc, Česká republika, 121 strán.
- 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**, 680-690.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Charpentier M., Sun J., Vaz Martins T., Radhakrishnan G. V., Findlay K., Soumpourou E., Thouin J., Véry A. A., Sanders D., Morris R. J., Oldroyd G. E. (2016): Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* **352**, 1102-1105.
- Chen T., Zhu H., Ke D., Cai K., Wang C., Gou H., Hong Z., Zhang Z. (2012): A MAP kinase interacts with SymRK and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24**, 823-838.
- Jin Y., Liu H., Luo D., Yu N., Dong W., Wang C., Zhang X., Dai H., Yang J., Wang E. (2016): DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nature Communications* **7**:12433. <https://www.nature.com/articles/ncomms12433>.
- Joerger R. D., Bishop P. E. (1988): Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *Critical Reviews in Microbiology* **16**, 1-14.
- Kaló P., Gleason C., Edwards A., Marsh J., Mitra R. M., Hirsch S., Jakab J., Sims S., Long S. R., Rogers J., Kiss G. B., Downie J. A., Oldroyd G. E. (2005): Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**, 1786-1789.
- Kanamori N., Madsen L. H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E. M. H., Miwa H., Downie J. A., James E. K., Felle H. H., Haaning L. L., Jensen T. H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2006): A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 359-364.
- Karlen D. L., Lemunyon J. L., Singer J.W. (2007): Forages for conservation and improved soil quality. In: *Forages*. Vol. 2, *The Science of Grassland Agriculture*, 6th ed., (Barnes R. F., Nelson C. J., Moore K. J., Collins M. eds.), Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, U.S.A., 149-166.

- Kende H. (1993): Ethylene Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 283-307.
- Kevei Z., Lougnon G., Mergaert P., Horváth G. V., Kereszt A., Jayaraman D., Zaman N., Marcel F., Regulski K., Kiss G. B., Kondorosi A., Endre G., Kondorosi E., Ané J. M. (2007): 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **19**, 3974-3989.
- Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A. (2006): Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. *Agronomy for Sustainable Development* **27**, 29-43.
- Kim B. S., Moon S. S., Hwang B. K. (1999): Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany* **77**, 850-858.
- Kim J., Rees D. C., (1994): Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **33**, 389-397.
- Kiss T., Farkas E. (1998): Metal-binding ability of desferrioxamine B. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **32**, 385-403.
- Kloepper J. W., Schroth M. N. (1978): Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*. Vol. 2, (Station de pathologie végétale et phyto-bactériologie ed.), Gilbert-Clarey, Tours, France, 879-882.
- Komis G., Novák D., Ovečka M., Šamajová O., Šamaj J. (2018) Advances in imaging plant cell dynamics. *Plant Physiology* **176**, 80-93.
- Kosturkova G. (1993): Expression of foreign genes following electroporation of *Medicago* protoplasts. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **7**, 43-46.
- Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Saganuma N., Kawaguchi M. (2010): How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1381-1397.
- Laporte P., Lepage A., Fournier J., Catrice O., Moreau S., Jardinaud M. F., Mun J. H., Larrainzar E., Cook D. R., Gamas P., Niebel A. (2014): The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *Journal of Experimental Botany* **65**, 481-494.
- Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E. P., Ané J. M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debelle F. (2004): A putative Ca²⁺ and calmodulin-independent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**, 1361-1364.
- Ligon J. M., Hill D. S., Hammer P. E., Torkewitz N. R., Hofmann D., Kempf H. J., van Pee K. H. (2000): Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* **56**, 688-695.
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemsse J., Bisseling T., Geurts R. (2003): LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**, 630-633.
- Limpens E., Ivanov S., van Esse W., Voets G., Fedorova E., Bisseling T. (2009): *Medicago* N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell* **21**, 2811-2828.
- Limpens E., Mirabella R., Fedorova E., Franken C., Franssen H., Bisseling T., Geurts R. (2005): Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10375-10380.
- Liu C. W., Breakspear A., Stacey N., Findlay K., Nakashima J., Ramakrishnan K., Liu M., Xie F., Endre G., de Carvalho-Niebel F., Oldroyd G. E. D., Udvardi M. K., Fournier J., Murray J. D. (2019a): A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nature Communications* **10**:2848. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10029-y>.
- Liu C.-W., Breakspear A., Guan D., Cerri M. R., Jackson K., Jiang S., Robson F., Radhakrishnan G. V., Roy S., Bone C., Stacey N., Rogers C., Trick M., Niebel A., Oldroyd G. E. D., de Carvalho-Niebel F., Murray J. D. (2019b): NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection. *Plant Physiology* **179**, 1704-1722.

- Lohar D. P., Haridas S., Gantt J. S., VandenBosch K. A. (2007): A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytologist* **173**, 39-49.
- Lute A. M. (1928): *Impermeable seed of alfalfa*. Bulletin of the Colorado Agricultural Experiment Station, Fort Collins, CO, U.S.A. 326 strán.
- Ma J. F. (2005): Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 267-281.
- Maizel A., von Wangenheim D., Federici F., Haseloff J., Stelzer H. K. E. (2011): High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *Plant Journal* **68**, 377-385.
- McKenzie R. H., Roberts T. L. (1990): Soil and fertilizers phosphorus update. In: *Proceedings of the 27th Annual Alberta Soil Science Workshop*. (R. P. Innes ed.), Edmonton, Alberta, Canada, 84-104.
- McWilliam J. R. (1968): Lucerne, the plant. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **34**, 191-193.
- Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A.-E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E. (2006): Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5230-5235.
- Middleton P. H., Jakab J., Penmetsa R. V., Starker C. G., Doll J., Kaló P., Prabhu R., Marsh J. F., Mitra R. M., Kereszt A., Dudas B., VandenBosch K., Long S. R., Cook D. R., Kiss G. B., Oldroyd G. E. (2007): An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**, 1221-1234.
- Michaud R., Lehman W. F., Rumbauch M. D. (1988): World distribution and historical development. In: *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Vol. 29, (Hanson A. A., Barnes D. K., Hill R. R., eds.), The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, WI, U.S.A., 25-91.
- Mitra R. M., Gleason C. A., Edwards A., Hadfield J., Downie J. A., Oldroyd G. E., Long S. R. (2004): A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4701-4705.
- Murray J. D., Muni R. R., Torres-Jerez I., Tang Y., Allen S., Andriankaja M., Li G., Laxmi A., Cheng X., Wen J., Vaughan D., Schultze M., Sun J., Charpentier M., Oldroyd G., Tadege M., Ratet P., Mysore K. S., Chen R., Udvardi M. K. (2011): Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **65**, 244-252.
- Nakaseko Y., Yanagida M. (2001): Cytoskeleton in the cell cycle. *Nature* **412**, 291-292.
- Neilands J. B. (1981): Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual Review of Nutrition* **1**, 27-46.
- Neubauer U., Furrer G., Kayser A., Schulin R. (2000): Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **2**, 353-368.
- Ng J. L. P., Mathesius U. (2018): Acropetal auxin transport inhibition is involved in indeterminate but not determinate nodule formation. *Frontiers in Plant Science* **9**:169. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00169/full>.
- Nirola R., Megharaj M., Beecham S., Aryal R., Thavamani P., Vankateswarlu K., Saint C. (2016): Remediation of metalliferous mines, revegetation challenges and emerging prospects in semi-arid and arid conditions. *Environmental Science and Pollution Research* **23**, 20131–20150.
- Oak U., Srivastav A., Kumar V. (2019): Perspectives of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Conferring Salinity Tolerance in Crops. In: *Microbial Interventions in Agriculture and Environment*. Vol. 3, *Soil and Crop Health Management*. (Singh D., Prabha R., eds.), Springer, Singapore, Republic of Singapore, 299-313.

- Oldroyd G. E. D., Downie J. A. (2004): Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 566–576.
- Oldroyd G. E. D., Downie J. A. (2008): Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 519-546.
- Oldroyd G. E., Murray J. D., Poole P. S., Downie J. A. (2011): The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45**, 119-144.
- Ott T., van Dongen J. T., Günther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M. K. (2005): Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* **15**, 531-535.
- Ovečka M., von Wangenheim D., Tomančák P., Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2018): Multiscale imaging of plant development by lightsheet fluorescence microscopy. *Nature Plants* **4**, 639-650.
- Pelikán J., Hýbl M. a kol. (2012): *Rostliny čeledi Fabaceae LINDL. (bobovitě) České republiky*. Vydavatelství Petr Baštan, Olomouc, Česká republika, 230 strán.
- Pellock B. J., Cheng H. P., Walker G. C. (2000): Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology* **182**, 4310-4318.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 180-201.
- Pulianmackal A. J., Kareem A. V., Durgaprasad K., Trivedi Z. B., Prasad K. (2014): Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science* **5**:142. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00142/full>.
- Radović J., Sokolović D., Marković J. (2009): Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* **25**, 465-475.
- Rajkumar M., Ae N., Prasad M. N. V., Freitas H. (2010): Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* **28**, 142-149.
- Ramu S. K., Peng H.-M., Cook D. R. (2002): Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 522-528.
- Raymond J., Siefert L. J., Staples R. C., Blankenship E. R. (2004): The Natural History of Nitrogen Fixation, *Molecular Biology and Evolution* **21**, 541-554.
- Reeves R. G. (1930): Nuclear and cytoplasmic division in the microsporogenesis of alfalfa. *American Journal of Botany* **17**, 29-40.
- Rivera A. L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A. M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* **9**, 308-345.
- Rodríguez H., Fraga R. (1999): Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* **17**, 319-339.
- Rose R. J., Mantiri F. R., Kurdyukov S., Chen S., Wang X., Nolan K. E., et al. (2010): Developmental biology of somatic embryogenesis. In: *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*. (Pua E. C., Davey M. R., eds.), Springer, Berlin, Heidelberg Germany, 3–26.
- Roth L. E., Stacey G. (1989): Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology* **49**, 13-23.
- Roy S., Liu W. Nandety R. S., Crook A., Mysore S. K., Pislariu I. C., Frugoli J., Dickstein R., Udvardi K. M. (2020): Celebrating 20 years of genetic discoveries in Legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **32**, 15-41.
- Rubio L. M., Ludden P. W. (2008): Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology* **62**, 93-111.
- Rust M. J., Bates M., Zhuang X. (2006): Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* **3**, 793-795.

- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Murooka Y., Szczyglowski K., Downie J. A., Parniske M., Hayashi M., Kawaguchi M. (2007): NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**, 610-624.
- Salamone I. E. G., Hynes R. K., Nelson L. M. (2005): Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (Siddiqui Z. A. ed.), Springer, Amsterdam, Netherlands, 173-195.
- Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S. (2007): Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**, 635-648.
- Samac D. A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In: *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 343 (Wang K., ed.), Springer, Totowa, NJ, U.S.A., 301-311.
- Sanders I., Sukharnikov L., Najjar F., Roe B. (2011): *Medicago*. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Legume Crops and Forages*. (Kole C. ed.), Springer Berlin Heidelberg, New York, NY, U.S.A., 207-222.
- Sappl P. G., Heisler M. G. (2013): Live-imaging of plant development: latest approaches. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 33-40.
- Saunders J. W., Bingham E. T. (1972): Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Science* **12**, 804-808.
- Schimada T., Morakami K. (1976): Principle component analysis of root and crown characteristics of alfalfa in relation to their persistence. *Obihiro Chikusan Daigoku Res. Bull.* **10**, 203-210.
- Schlaman H. R. M., Okker R. J. H., Lugtenberg B. J. J. (1992): Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. *Journal of Bacteriology* **174**, 5177-5182.
- Schmidt W. (1999): Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* **141**, 1-26.
- Scholte M. (2002): *T-DNA tagging in Medicago truncatula*. Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.
- Siddiqui Z.A. (2005): PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (Siddiqui Z.A. ed.), Springer, Dordrecht, Netherlands, 111-142.
- Silo-Suh L. A., Lethbridge B. J., Raffel S. I., He H. Y., Clardy J., Handelsman J. (1994): Biological activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2023-2030.
- Singer S. D., Hannoufa A., Acharya S. (2018): Molecular improvement of alfalfa for enhanced productivity and adaptability in a changing environment. *Plant, Cell and Environment* **41**, 1955-1971.
- Skládanka J. a kol. (2014): *Picinářství*. Mendelova univerzita, Brno, Česká republika, 368 strán.
- Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T. (2007): *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiology* **145**, 183-191.
- Smit P., Raedts J., Portyanko V., Debellé F., Gough C., Bisseling T., Geurts R. (2005): NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**, 1789-1791.
- Smith L. G (1999). Divide and conquer: cytokinesis in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 447-453.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 425-448.
- Stainger Ch. J. (2000): Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 257-288.

- Stanford E. H. (1951): Tetrasomic inheritance in alfalfa. *Agronomy Journal* **43**, 222-225.
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K., Parniske M. (2002): A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.
- Suzaki T., Yoro E., Kawaguchi M. (2015): Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology* **316**, 111-158.
- Teuber L. R., Brick M. A. (1988): Morphology and anatomy. In: *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Vol. 29, (Hanson A. A., Barnes D. K., Hill R. R., eds.), The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, WI, U.S.A., 125-162.
- Tichá M., Illésová P., Hrbáčková M., Basheer J., Novák D., Hlaváčková K., Šamajová O., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020): Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology* **40**, 1265-1280.
- Timmers A. C. (2008): The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy* **231**, 247-256.
- Tsavkelova E. A., Klimova S. Y., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**, 117-126.
- Udvardi M., Poole P. S. (2013): Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 781-805.
- van Brussel A. A., Bakhuizen R., van Spronsen P. C., Spaink H. P., Tak T., Lugtenberg B. J., Kijne J. W. (1992): Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**, 70-72.
- van Loon L. C., Bakker P. A., Pieterse C. M. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453-483.
- Vaz Martins T., Livina V. N. (2019): What Drives Symbiotic Calcium Signalling in Legumes? Insights and Challenges of Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:2245. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2245>.
- Voigt B., Timmers A. C., Šamaj J., Müller J., Baluška F., Menzel D. (2005): GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology* **84**, 595-608.
- Wan Y., Sorensen E. L., Liang G. H. (1988): The effects of kinetin on callus characters in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica* **39**, 249-254.
- Wang C., Yu H., Luo L., Duan L., Cai L., He X., Wen J., Mysore K.S., Li G., Xiao A. (2016): Nodules with activated defense1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **212**, 176-191.
- Wang Q., Liu J., Zhu H. (2018): Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**:313. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00313/full>.
- Wang Y. S., Yoo C. M., Blancaflor E. B. (2007): Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist* **177**, 525-536.
- Wasteneys G. O., Galway M. E. (2003): Remodelling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 691-722.
- Weller D. M. (1983): Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* **73**, 1548-1553.
- Whipps J. M. (2001): Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**, 487-511.
- Whyte R. O., Nilsson-Leissner G., Trumble H. C. (1953): *Legumes in agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 367 strán.

- Wilsie C. P. (1962): *Crop adaptation and distribution*. W. H. Freeman, San Francisco, U.S.A., 448 strán.
- Wilson O.T. (1913): Studies on the anatomy of alfalfa. *The University of Kansas science bulletin* **7**, 291-299.
- Yano K., Yoshida S., Müller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T. L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M. (2008): CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20540-20545.
- Zaidi A., Khan M. S., Ahemad M., Oves M., (2009): Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **56**, 263-284.
- Zhang X., Han L., Wang Q., Zhang C., Yu Y., Tian J., Kong Z. (2019): The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **221**, 1049–1059.
- Zhou C., Han L., Pislariu C., Nakashima J., Fu C., Jiang Q., Quan L., Blancaflor E. B., Tang Y., Bouton J. H., Udvardi M., Xia G., Wang Z. (2011): From model to crop: functional analysis of a STAY-GREEN gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement. *Plant Physiology* **157**, 1483-1496.
- Zipfel C, Oldroyd G. E. (2017): Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**, 328-336.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	2,4-dichlórfenoxyoctová kyselina
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACC	1 aminocyklopropán-1-karboxylová kyselina
AP2/ERF	z angl. APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtFim1	fimbrín 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
B50 médium	médium indukujúce tvorbu somatických embryí
B5H médium	médium indukujúce kalogenézu
Ca²⁺	vápenatý kation
CCaMK	proteínkináza závislá od Ca ²⁺ -kalmodulínu
CLSM	konfokálna laserová skenovacia mikroskopia
CNGC15	z angl. cyclic nucleotide-gated ion channel protein 15
CoA	koenzým A
CPA	4-chlórfenoxyoctová kyselina
DAPG	2,4-diacetylfloroglucinol
DELLAs	proteíny z rodiny transkripčných faktorov GRAS (D - kyselina asparágová, E - kyselina glutámová, L – leucín, L – leucín, A – alanín)
DMI1	iónový kanál (z angl. oes not make infections protein 1)
DMI2	z angl. Does not make infections protein 2
DMI3	z angl. Does not make infections protein 3
<i>ENOD11</i>	gén kódujúci proteín „Early nodulin-11“
<i>ENOD12</i>	gén kódujúci proteín „Early nodulin-12“
EPS	exopolysacharidy
EPS1	sukcinoglykán
ERN1	transkripčný faktor reagujúci na etylén ERN1
Et-OH	etanol
F-aktín	aktínové mikrofilamenty
g·l⁻¹	gram na liter
g·ml⁻¹	gram na mililiter

G-aktín	globulárny aktín
GFP	zelený fluorescenčný proteín (z angl. green fluorescent protein)
GFP-FABD2	fúzní proteín – fúzia C-terminálneho konca GFP k N-terminálnemu koncu aktín-viažucej domény 2 (z angl. actin binding domain 2) z fimbrínu 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFim1)
GRAS	z angl. GIBBERELIC ACID INSENSITIVE REPRESSOR OF ga1-3 SCARECROW
HMGR1	3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA reduktáza 1
IAA	indolyl-3-octová kyselina
IPD3	DMI3-interagujúci proteín IPD3
ISR	indukovaná systémová rezistencia
IT	infekčné vlákno
<i>L. japonicus</i>	<i>Lotus japonicus</i> (<i>Lj</i>)
LB médium	médium pre kultiváciu baktérií (z angl. Lysogeny broth)
LCOs	lipochitooligosacharidy
LRR	repetica bohatá na leucín
LSFM	Light-sheet fluorescenčná mikroskopia
LYK3	LysM receptoru-podobná kináza 3
LysM doména	z angl. lysin motif domain
LysM-RLKs	LysM receptoru-podobné kinázy (z angl. LysM receptor-like kinases)
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L ssp.
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i> (<i>Mt</i>)
MAPKK	mitogén-aktivovaná proteínkináza kináza
MCA8	vápniková ATP-áza typu IIA
$\text{mE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	hodnota svetelného toku; fotosynteticky aktívne žiarenie (spektrálny rozsah slnečného žiarenia je od 400 do 700 nm)
$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	miligram na liter
$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	miligram na mililiter
min	minúta
ml	mililiter
$\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$	mililiter na liter

mm	milimeter
MMS médium	médium indukujúce vývoj koreňov a výhonkov
mRFP	červený fluorescenčný proteín
MS médium	Murashige and Skoog médium
MTCOs	centrá organizácie mikrotubulov
MtCRE1	z angl. Cytokinin Response 1 receptor
MtEXO70 H4	podjednotka EXO70 proteínového komplexu exocysty
MtFLOT2	Flotilínu-podobný proteín 2
MtFLOT4	Flotilínu-podobný proteín 4
MtLIN	z angl. putative E3 ubiquitin-protein ligase LIN
MtLYK3	gén u <i>Medicago truncatula</i> kódujúci LYK3
MtNFP	gén u <i>Medicago truncatula</i> kódujúci NFP
MtNF-YA1	podjednotka A-1 jadrového transkripčného faktora Y
MtRIP1	gén u <i>Medicago truncatula</i> kódujúci peroxidázu
MtVPY	vapyrín
Na₂EDTA	disodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej
NAA	1-naftyloctová kyselina
NENA	z angl. WD40 repeat nucleoporin similar to SEH1
NF receptor	receptory rozpoznávajúce Nod faktory
NFP	serín/treonínovému receptoru-podobná kináza NFP (alternatívny názov z angl. Nod factor preception protein)
nif	gény zapojené v fixácii atmosférického dusíka
NIN	z angl. nodule inception protein
Nod faktory	nodulačné faktory
nod	nodulačné gény
NodD	nodulačný proteín D
NPTII	gén kódujúci neomycín fosfotransferasu
NSP1	z angl. protein NODULATION SIGNALING PATHWAY 1
NSP2	z angl. protein NODULATION SIGNALING PATHWAY 2
NUP133	nukleoporínu 133 podobný nukleoporín (z angl. Nup133-like nucleoporin)
NUP85	nukleoporín 85 (z angl. nuclear pore complex protein Nup85)

Obr.	obrázok
OD₆₀₀	optická hustota pri 600 nm
PEMs	proembryogénna masa buniek
PGPR	rhizobaktérie podporujúce rast rastlín (z angl. plant growth-promoting rhizobacteria)
PGRs	rastlinné rastové regulátory
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových kationov
ROS	reaktívne formy kyslíka
RSY	kultivar Regen SY, <i>M. sativa</i> L. divoký typ
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SAR	systemová získaná rezistencia (z angl. systemic acquired resistance)
SE	somatická embryogenéza
SERCA	z angl. sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SIM	mikroskopia so štruktúrovaným osvetlením
ssp.	poddruh
STED	mikroskopia so stimulovanou depléciou emisií
STORM	stochastická optická rekonštrukčná mikroskopia
SYMRK	kináza podobná-receptoru symbiózy
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
TIC	tikarcilín
w/v	hmotnosť na objem
μl	mikroliter
μl·l⁻¹	mikroliter na liter
μm	mikrometer