

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Test rezistence transgenních rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) vůči abiotickému stresu

Autor: **Eva Dlouhá**

Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství

Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.

Rok: 2023

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské (diplomové) práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

„Ráda bych poděkovala především vedoucímu své bakalářské práce prof. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za věnovaný čas, konzultace, rady a pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry biotechnologií za pomoc a rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala vedoucímu katedry prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnění práce a využívání vybavení v laboratoři.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Dlouhá
Název práce	Test rezistence transgenních rostlin vojtěšky (<i>Medicago sativa</i> L.) vůči abiotickému stresu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p><i>Medicago sativa</i> L. (vojtěška) je jedna z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších vytrvalých luskovin ve světovém zemědělství. Vojtěška je důležitou modelovou rostlinou pro studium vlivu abiotických stresů, jako je např. solný stres. Solný stres aktivuje u vojtěšky signální kaskádu MAPK, v níž hrají klíčovou roli SIMKK a SIMK. SIMK dále také ovlivňuje i dynamiku aktinu. Cílem této bakalářské práce byla regenerace kontrolních rostlin <i>M. sativa</i> kultivaru RSY a transgenních rostlin <i>M. sativa</i> SIMKK RNAi, GFP-FABD2 a SIMKK RNAi in GFP-FABD2 v <i>in vitro</i> podmínkách procesem nepřímé somatické embryogeneze. Dále pak následovala aplikace solného stresu v rámci dlouhodobého experimentu, kdy byl hodnocen a kvalitativně a kvantitativně porovnáván fenotyp kontrolních a transgenních rostlin <i>M. sativa</i>, a to na základě měření délky kořenových soustav rostlin. Následoval krátkodobý experiment zahrnující aplikaci solného stresu a také pozorování a porovnání chování aktinu v buňkách různých liniích.</p>
Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, SIMK, somatická embryogeneze, solný stres
Počet stran	51
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eva Dlouhá
Title	Abiotic stress tolerance in transgenic alfalfa plants (<i>Medicago sativa</i> L.)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Medicago sativa L. (alfalfa) is one of agriculture's most important and widespread perennial legumes worldwide. Alfalfa is an important model plant for studying the effects of abiotic stresses, such as salt stress. Salt stress activates the MAPK signaling cascade in alfalfa, in which SIMKK and SIMK play a key role. SIMK also affects actin dynamics. This bachelor thesis aimed to regenerate control *M. sativa* RSY plants and transgenic *M. sativa* SIMKK RNAi, GFP-FABD2, and SIMKK RNAi in GFP-FABD2 plants in *in vitro* conditions by the process of indirect somatic embryogenesis. This was followed by the application of salt stress as part of a long-term experiment when the phenotype of control and transgenic *M. sativa* plants was assessed and compared qualitatively and quantitatively, based on measuring the length of the plant's root systems. A short-term experiment that followed involved applying salt stress and observing and comparing the actin cytoskeleton behavior in different cells of *M. sativa* lines.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, SIMK, somatic embryogenesis, salt stress
Number of pages	51
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Tolice vojtěška (<i>Medicago sativa</i> L.)	2
2.1.1 Charakteristika	2
2.1.2 Kořen	2
2.1.3 Stonek	2
2.1.4 List	3
2.1.5 Květ	3
2.1.6 Plod a semena	4
2.1.7 Ekologický a zemědělský význam	4
2.2 Množení rostlin metodou somatické embryogeneze v <i>in vitro</i> podmínkách	5
2.2.1 Embryogeneze	5
2.2.2 Somatická embryogeneze	5
2.2.3 Přímá somatická embryogeneze	6
2.2.4 Nepřímá somatická embryogeneze	6
2.2.5 Somatické embryo	7
2.3 Genetické transformace rostlin a jejich využití u vojtěšky	8
2.3.1 Transformace zprostředkované <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
2.3.2 Transformace elektroporací	8
2.3.3 Transformace bombardováním částicemi	9
2.4 Abiotický a biotický stres u rostlin	9
2.4.1 Solný stres	9
2.5 Signální dráhy zprostředkované mitogenem–aktivovanými protein kinázami u rostlin	10
2.5.1 Podíl MAPK kaskád na regulaci růstu a vývoje rostlin	11
2.5.2 MAPK kaskády v hormonální signalizaci	12
2.5.3 MAPK kaskády v biotickém stresu	13
2.5.4 MAPK kaskády v abiotickém stresu	14
2.6 Metody hodnocení fenotypu rostlin po aplikaci abiotických stresových faktorů	15
2.6.1. Měření růstových parametrů rostlin	16
2.6.2 Zobrazování fluorescence chlorofylu	16
2.6.3 Metabolomika	17

2.6.4 Transkriptomika.....	18
2.6.5 Proteomika.....	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1. Materiál	20
3.1.1. Chemikálie	20
3.1.2. Roztoky a média.....	21
3.1.3. Použité přístroje.....	24
3.1.4. Software na zpracování výsledků	24
3.1.5. Rostlinný materiál.....	24
3.2 Metody	25
3.2.1 Příprava média B5H	25
3.2.2. Příprava média B50	25
3.2.3. Příprava média MMS	26
3.2.4. Příprava média MS.....	27
3.2.5. Příprava média MS s přídavkem NaCl.....	27
3.2.6. Příprava tekutého média MS a tekutého média MS s přídavkem NaCl	27
3.2.7. Regenerace rostlin <i>M. sativa</i> procesem somatické embryogeneze	28
3.2.8. Příprava preparátů pro mikroskopické pozorování a mikroskopie.....	28
3.2.9 Statistická analýza.....	29
4.1 Regenerace rostlin <i>M. sativa</i> pomocí nepřímé somatické embryogeneze	30
4.2 Kvalitativní vyhodnocení vystavení <i>M. sativa</i> dlouhodobému solnému stresu.....	31
4.3 Kvantitativní vyhodnocení reakcí rostlin <i>M. sativa</i> na dlouhodobý solný stres	36
4.4 Kvalitativní vyhodnocení reakcí rostlin <i>M. sativa</i> na krátkodobý solný stres.....	38
5. DISKUSE.....	42
6. ZÁVĚR.....	44
7. SEZNAM LITERATURY	45
8. SEZNAM ZKRATEK.....	49
9. PŘÍLOHY	51

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování rešerše zaměřené na:

- problematiku vývojových a agronomicky zajímavých vlastností vojtěšky
- základní popis vojtěšky včetně stádií ontogenetického vývoje
- ekologický a zemědělský význam vojtěšky ve světle moderních metod a přístupů, jako jsou genetické úpravy a transgenóze
- shrnutí známých reakcí rostlin na vnější abiotické stresové faktory
- podíl signálních drah na regulaci vývojových procesů rostlin a jejich reakcí na vnější stresové podmínky
- shrnutí hlavních metod hodnocení fenotypu rostlin po aplikaci abiotických stresových faktorů

Praktická část

- experimenty zaměřené na cílenou kultivaci kontrolních a transgenních rostlin vojtěšky v podmínkách *in vitro*
- aplikace solného stresu a vyhodnocování míry rezistence mezi liniemi
- pomocí kvalitativních a kvantitativních metod vyhodnocování stanovit, do jaké míry potlačení exprese MAPK u vojtěšky ovlivní reakci rostlin na stres

1. ÚVOD

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* Linn.), známá pod názvem „lucerna“, je chladnomilná vytrvalá luštěnina žijící od tří do dvanácti let (Kundan et al., 2011). Řadíme ji do čeledě *fabaceae* neboli bobovité (Rashmi et al., 1997). Vojtěška je trvalou pícninou, která tvoří hluboké kořeny (Radovic et al., 2009). Dospělá rostlina se vyznačuje silným křovitým kořenem s mnoha postranními kořeny. Listy se na stonku tvoří střídavě, přičemž rostlina může mít 5-15 stonků a dosáhnout výšky až 1 m. Barva květů může být žlutá, krémová, bílá nebo fialová (v různých odstínech). Po opylení tyto květy nejčastěji produkují spirálovité lusky obsahující semena (Kundan et al., 2011).

Tolice vojtěška je jedna z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších vytrvalých luskovin ve světovém zemědělství. Tato rostlina hraje důležitou roli v poskytování krmiv s vysokou nutriční hodnotou a stravitelností, jelikož je bohatá na bílkoviny s vynikajícím složením aminokyselin a vysokou stravitelností. Dále je tento druh důležitý pro zlepšení kvality půdy, zejména pak jako účinný zdroj biologické fixace dusíku (Radovic et al., 2009).

Solný stres, tedy stres způsobený vystavením nadbytku soli, má osmotický, iontově toxický, nebo kombinovaný vliv na rostlinné buňky (Zhu, 2016). Solný stres aktivuje u vojtěšky signální kaskádu zahrnující MAPK – mitogen aktivované protein kinázy. Této kaskády se účastní např. SIMKK – solným stresem aktivovaná kináza kináza, která následně aktivuje SIMK – solným stresem aktivovanou kinázu. Tato signální dráha je důležitá k indukci obranných reakcí zasažených rostlin (Kiegerl et al., 2000).

Bakalářská práce se zaměřuje na regeneraci kontrolních rostlin *M. sativa*, a to kontrolní linie kultivaru RSY a transgenních linií *M. sativa* GFP-FABD2, SIMKK RNAi (SIMKKi) a SIMKKi in GFP-FABD2 procesem nepřímé somatické embryogeneze. Praktická část byla zaměřena na aplikaci vybraného abiotického stresu – solného stresu, na tyto rostliny. V rámci dlouhodobého experimentu byla provedena nejen kvalitativní ale také kvantitativní vyhodnocení vlivu potlačení exprese MAPK u vojtěšky na reakci rostlin na solný stres. U krátkodobého experimentu proběhlo vyhodnocení pouze kvalitativních aspektů. V tomto experimentu byly rovněž pozorovány reakce aktinu na solný stres u linií GFP-FABD2 a SIMKKi in GFP-FABD2.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Charakteristika

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* Linn.) je rostlina také známá pod názvem „lucerna“ nebo „alfalfa“ v anglickém jazyce. Řadíme jí do čeledě *Fabaceae* neboli bobovité, přičemž se široce vyskytuje v oblasti Kavkazu, horských oblastech regionu Íránu, Afganistánu a jiných přilehlých oblastech. Kultivovaná forma vznikla pravděpodobně v západní Persii, odkud se dále rozšířila do mnoha dalších zemí (Rashmi et al., 1997). *Medicago sativa* je chladnomilná vytrvalá luštěnina žijící od tří do dvanácti let, v závislosti na odrůdě a klimatu (Kundan et al., 2011).

2.1.2 Kořen

Dospělá rostlina vojtěšky se vyznačuje silným kúlovým kořenem. Tento kúlový kořen, společně s mnohými postranními kořeny, může dokonce dosáhnout i délky 6 m, popř. tuto délku přesáhnout, při růstu v hlubokých a dobře odvodňovaných, vlhkých půdách (Kundan et al., 2011). Pletiva primárního kořene jsou odvozena od apikálního meristému kořene. Skládají se z dobře definované epidermis, kůry a stély. Dosud nediferencované prokambiólní buňky, nacházející se mezi xylémem a floémem vzniklými v dělení primárního meristému kořene, se začnou dělit. K tomuto dělení dochází až po dokončení růstu primárního kořene za vzniku cévního (vaskulárního) kambia. Cévní kambium dává následně vznik sekundárnímu xylému a sekundárnímu floému. Na počátku sekundárního růstu rovněž dochází ke vzniku laterálních (postranních) kořenů (Teuber & Brick, 1988). Na tenkých postranních kořenech vznikají hlízký, což jsou speciální orgány, v nich se nacházejí endosymbiotické bakterie se schopností fixace vzdušného dusíku (Hrabě et al., 2004).

2.1.3 Stonek

Stonek vzniká meristemickou činností stonkového vrcholu. Buněčné dělení, expanze a následná diferenciacie v oblasti apikálního stonkového meristému vede ke vzniku epidermálních, kortikálních a vaskulárních tkání. Stonek je definován podélně uzly (nódy) a internodií. Internodia jsou části mezi uzly, které jsou místem vzniku listů a dalších postranních částí. Postranní části zahrnující listy, axilární větve a květy vznikají podél stonku s alternativní fylotaxií. Mladý stonek rostliny má téměř čtvercový průřez

(Teuber & Brick, 1988; Zobel, 1989). Rostlina vojtěšky, na typickém poli pro produkci píce, dosahuje výšky téměř 1 m a má 5 až 15 stonků (Kundan et al., 2011).

2.1.4 List

Listy vojtěšky vznikají na stonkovém vrcholu činností apikálního meristému. Stonkový vrchol vytváří na straně boční přípory listů, které se vyvíjí v listové primordia. Listové primordium se rozlišuje na tři tkáňové systémy, dermální, cévní a základní tkáňové systémy. Ty dávající vznik epidermis, cévnímu systému a mezofylové tkáni. První pravý list vzniká z epikotylu, je obvykle jednoduchý a vyznačuje se okrouhlou čepelí a palisty. Druhý a další listy jsou běžně zpeřené a trojčetné se štíhlými palisty přiléhajícími k řapíku. Jsou také nejčastěji podlouhlé nebo obvejčité se zoubkovaním směrem k vrcholu s tmavě zeleným zbarvením. Listy s více než třemi lístky (mnoholisté) nejsou neobvyklé. V případě listů může dojít ke vzniku řady anomálií. Běžně se vyskytující anomálie zahrnují: zmačkaný list, složený a strakatý list, roztržený list, lepkavý list, žlutý list, a další (Teuber & Brick, 1988; Hrabě et al., 2004).

2.1.5 Květ

Vývoj květu vojtěšky začíná na stonkovém vrcholu přechodem z vegetativního růstu do generativního růstu (Barnes, 1966). K tomuto přechodu dochází mezi šestým až čtrnáctým uzlem v závislosti na environmentálních a genetických faktorech. Tento přechod je znám jako protuberance meristemické tkáně nacházející se v paždí primordia listu přiléhajícího k vrcholu výhonu. Každé primordium dává vzniknout jednoduchému racemickému květenství zvané hrozen. Květní poupata těchto hroznů procházejí během zrání čtyřmi viditelnými fázemi vývoje: přímý pupen, špičatý pupen, zakrytý pupen a vzpřímený standard (zralý květ). Každé květní primordium je rozlišené a vytváří kalich, korunu, 10 tyčinek a pestík. Kališní trubice je tvořena z pěti kališních lístků zakončených pěti laloky nebo zuby, které přesahují její délku. Koruna, typická pro luštěniny, je vysoce vyvinutá. Skládá se z pěti okvětních lístků: jeden velký standardní okvětní lístek známý jako prapor, dva menší okvětní lístky tzv. boční křídla a dva srostlé okvětní lístky tvořící kýl. Kýlové okvětní lístky jsou drženy pohromadě řadou hřebenů a drážek. Barva květů může být žlutá, krémová, bílá nebo fialová (a to v různých odstínech). Vojtěška je oboupohlavná. Pestík se skládá z jediného plodolistu, který tvoří svrchní semeník a dobře definovanou bliznu. U vojtěšky se obvykle vyvine 10-12 vajíček na semeník. Vajíčka jsou kamyotropní. Tyčinek je 10, přičemž 9 z nich srůstá v trubici a desátá zůstává volná. Pyl vojtěšky je dvoujaderný (Teuber & Brick, 1988; Kundan et al., 2011).

2.1.6 Plod a semena

Semeno vojtěšky se skládá z embrya, endospermu a testy. Semena, jejichž tvar je obvykle ledvinovitý, se tvoří v plodu (lusku). Mnoho semen je však hranatých, a to z důvodu působení vnitřních a vnějších sil v lusku, které tvarují semeno během zrání. Zralá semena jsou dlouhá a široká přibližně 1 až 2 mm a 1 mm silná, jsou také obvykle asi dvakrát tak dlouhá jak široká. Barva semene je běžně žlutá nebo olivově zelená až hnědá, přičemž se mohou objevit i černé a bílá semena. Celá testa je pokryta kutikulou, skládající se z kutinu, komplexní směsi mastných aminokyselin a vosků (Teuber & Brick, 1988). Z biochemického hlediska obsahují semena vojtěšky proteiny a galaktomannan, což jsou hlavní formy zásobních látek. Proteiny jsou uloženy v dělohách (kotyledonech), galaktomannan pak v endospermu (Lai et al., 1995). Semena jsou typicky tvrdá, a tedy špatně propustná pro vodu. Nepropustný obal semen rovněž způsobuje výraznou dormanci semen. Obecně platí, že nejlepší metodou, jak překonat tvrdost semen, je mechanická vertikulace osiva obroušením obalu semene. Osivo semen může zůstat životaschopné po dlouhou dobu. Semena vojtěšky klíčí nestejně, mohou ležet ladem v půdě několik týdnů, měsíce nebo roky předtím, než absorbují vodu a vyklíčí. V oblasti semene zvané hilum dochází k proniknutí primárního kořene, přičemž do půdy proniká jako nerozvětvený kulový kořen. V průběhu narovnávání a prodlužování hypokotylu se také objevují dělohy a vystupují nad povrch půdy (Teuber & Brick, 1988; Bass et al., 1988).

2.1.7 Ekologický a zemědělský význam

Význam vojtěšky ve světovém zemědělství lze přičíst množství morfologických a fyziologických vlastností přispívajících k vysokému a stabilnímu výnosu. Alogamie a autotetraploidie tohoto druhu přispívají k velké genetické variabilitě v rámci populace nebo v rámci odrůdy. Ekonomický význam této rostliny je založen na vysokém potenciálu produkce biomasy. Krmné části vojtěšky, píče, se vyznačují vysokým obsahem proteinů, které jsou dobře vyváženy vzhledem k obsahu aminokyselin. Dále jsou zde i životně důležité vitamíny a různé mikroelementy nezbytné pro normální růst a vývoj zvířat. Vojtěška je tak základní složkou krmiva pro dojný i masný skot, koně, ovce, ptactvo a další hospodářská zvířata. Je také významná pro svou schopnost symbiotické fixace N_2 , čímž je eliminována potřeba jej do půdy přidávat v chemické formě. Vojtěška tak obohacuje půdu dusíkem a lze jí využít jako předchůdce pro mnoho zemědělských plodin či jí použít jako odsolovací plodinu. Vojtěška je vhodná pro produkci zeleného

hnojení nebo i pro redukci vlivu vodní a větrné eroze vázáním půdy (Radović et al., 2009). Mezi tradiční využití patří konzumace klíčků *M. sativa* ve formě zeleninového salátu, u listů a semen v podobě prášku, tobolek či tablet, a to jako doplněk stravy v prodejnách zdravé výživy. Tradičně se také vojtěška používala v ajurvédské a homeopatické medicíně při poruchách centrálního nervového systému, bolestech ledvin, zánětech a obezitě. Klíčky a listy pak mají význam při léčbě artritidy, ledvinových potíží, při léčbě vředů a také pro své protirakovinné, protirevmatické, kardiotonické, depurativní, laktagogické, emenagogické a antiskorbutické účinky. V Jižní Americe byla tato rostlina používána k léčbě ledvinových a vezikulárních otoků a jako diuretikum (Al-Snafi et al., 2021).

2.2 Množení rostlin metodou somatické embryogeneze v *in vitro* podmínkách

2.2.1 Embryogeneze

Embryogeneze je proces vzniku a vývoje zralého embrya, které se skládá z embryonální osy s póly, na nichž se zakládají výhonky a kořeny a dělohy, popř. scutellum (u jednoděložných). U vyšších rostlin má embryogeneze dvě fáze, a to časné morfologické procesy a procesy pozdního zrání. Časné morfologické procesy dávají vzniknout různým typům embryonálních buněk, tkání a základům orgánových systémů. Procesy pozdního zrání pak umožní plně vyvinutému embryu vstoupit do metabolicky klidového stavu, při kterém se stává dormantním a ztrácí vodu. Procesy, k nimž dochází během embryonálního vývoje, mají tedy za cíl založit organizaci rostlinného těla a připravit embryo na období dormance postembryonálního vývoje (West et al., 1993; Goldberg et al., 1994). Proces embryogeneze může být ovšem zahájen ze zygoty, nebo i ze somatické buňky. V případě je-li zahájen ze zygoty hovoříme o embryogenezi zygotické. Vyvíjí-li se embryo ze somatické buňky jedná se o embryogenezi somatickou (Méndez-Hernández et al., 2019).

2.2.2 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze reprezentuje typický model totipotence rostlinných buněk, přičemž zahrnuje působení komplexní signální sítě a také přeprogramování vzorců exprese genů, jež jsou specificky regulovány. Tato genová regulace je běžně reakcí na exogenní stimuly. Exogenními stimuly mohou být reakce vyvolané rostlinnými růstovými regulátory (fytormony), nebo vystavením abiotickému stresu jako je

například nízká/vysoká teplota, osmotický šok nebo sucho (Méndez-Hernández et al., 2019). Množení a regenerace rostlin prostřednictvím somatické embryogeneze není však vhodné pro všechny druhy rostlin a mohou se vyskytovat odlišnosti mezi kultivary i mezi samotnými genotypy kultivaru. Obecně je regenerační potenciál u rostlin kultivovaných *in vitro* řízen složitými genetickými faktory. Důležité jsou také epigenetické faktory jako je například vzor kondenzace chromatinu, methylace DNA, posttranslační modifikace histonů, a regulace mikro DNA (mirDNA). Některé z nich, např. methylace DNA, jsou dědičné a mohou být zachovány během mitózy. U druhu *Medicago* bylo prokázáno, že jej lze regenerovat pomocí somatické embryogeneze (Tichá et al., 2020). Indukce somatické embryogeneze může být provedena dvěma způsoby. Při přímé somatické embryogenezi se tvoří somatická embrya z individuálních buněk na okraji explantátu, zatímco u nepřímé formy dochází ke vzniku somatických embryí postupnou proliferací z neorganizované tkáně zvané embryogenní kalus (Méndez-Hernández et al., 2019).

2.2.3 Přímá somatická embryogeneze

Tento typ somatické embryogeneze je na rozdíl od nepřímé embryogeneze méně definován. Tato vývojová cesta je charakterizována absencí fáze kalusu. Explantát v tomto systému vykazuje pravidelnější, kompaktní buněčné dělení. Jedna či více buněk ve vrstvě, popř. vrstvách se dělí a vybojí, aby se následně vyvinuly v morfologicky rozpoznatelná embrya, a to bez dalšího ošetření (Horstman et al., 2017).

2.2.4 Nepřímá somatická embryogeneze

Nepřímá somatická embryogeneze je nejběžnější cestou v případě praktického využití somatické embryogeneze. Začíná tvorbou kalusu, zdánlivě neorganizované hmoty původně vakualizovaných buněk vykazujících různé stupně kompaktnosti. Embryogenní kalus se vyvíjí z buněk neorganizovaného kalusu. Po vzniku embryogenního kalusu následuje vývoj proembryogenních mas, označovaných jako tzv. PEM, na povrchu nebo uvnitř kalusu. Z nich se jednotlivé buňky nebo i shluky buněk vyvinou v embrya. Kalus a proembryonální masy jsou obvykle pozorovány po přidání auxinů a to zejména 2,4 – D do média. Auxin podporuje proliferaci kalusu a proembryonálních mas a je jej třeba následně odstranit, aby se podpořila histogeneze (vývoj apikálně-bazálního vzoru) a prodloužení somatického embrya. Somatická embrya vzniklá touto cestou jsou morfologicky podobná embryím vzniklým přímou somatickou embryogenezí, ale vyskytují se zde změny na úrovni genomu (somaklonální variace) z důvodu delší doby kultivace ve fázi neorganizovaného kalusu (Horstman et al., 2017). V případě vojtěšky se

při indukci nepřímé somatické embryogeneze nejprve odebere explantát (nejčastěji list), jež je nutné vysterilizovat a nařezat na menší části. Vzniklé explantáty se umístí na kultivační médium obsahující přídavek rostlinných hormonů pro vyvolání tvorby kalusu. Běžně se u vojtěšky používá médium označované jako B5H médium. Po vzniku kalusů explantáty překládáme na médium bez hormonů, známé pod zkratkou B50 médium, pro indukci embryonálního kalusu a tvorby somatických embryí. Po dokončení vývoje somatických embryí jsou přenášena na médium bohaté na vitamíny a aminokyseliny, zkráceně MMS médium, za účelem vývoje výhonků a kořenů. Pro následné udržování plně vyvinutých rostlin je nutné přeložení vyvíjejících se rostlin na médium MS. Z tohoto média je pak i následně možné rostliny přenést z *in vitro* do *in vivo* podmínek (Tichá et al., 2020).

2.2.5 Somatické embryo

Somatická embrya, stejně jako zygotická embrya, jsou bipolární struktury s apikálním pólem (budoucí výhon) a bazálním pólem (budoucí kořen), z nichž každý má svůj vlastní meristém a nezávislý provaskulární systém. Tato bipolarita somatických embryí je odlišuje od ektopických nebo adventivních orgánů, jako jsou např. výhonky a kořeny, což jsou unipolární struktury s (lignifikovaným) vaskulárním spojením se základním rostlinným orgánem. Somatická embrya také akumulují druhově specifické produkty, které se nenacházejí v jiných fázích vývoje rostlin. Absence trichomů, které lze nalézt na prvních listech některých rostlin se často používá jako morfologický marker pro identifikaci somatických embryí, to však může být zavádějící, jelikož tvorba trichomů může být zpočátku opožděna (Horstman et al., 2019). Mezi somatickými a zygotickými embryi existuje morfologická podobnost, jak bylo popsáno výše, avšak jejich vývoj, stejně jako i samotné vytvoření embrya se liší. U zygotických embryí se má za to, že jsou vyživována přes floémovou tkáň, zatímco somatická embrya přijímají sacharidy exogenně. Morfologická stádia somatických embryí také probíhají na rozdíl od zygotických embryí bez spojení s cévní tkání mateřské rostliny. Vývoj somatického embrya zahrnuje stádia kulovité, srdčité, torpédovitá, a kotyledonární (v případě dvouděložných druhů). U jednoděložných druhů jsou to fáze kulovitá, scutelární a koleoptilní fáze. Jakmile somatická embrya dosáhnou kotyledonárního stádia, iniciují meristém výhonku a začíná růst semenáček (Méndez-Hernández et al., 2019; Sangra et al., 2019).

2.3 Genetické transformace rostlin a jejich využití u vojtěšky

Byly vyvinuty různé metody pro zavedení cizích genů do rostlin. Společným znakem je, že DNA užitá k transformaci musí obejít různé membránové bariéry. DNA nejprve musí vstoupit do rostlinné buňky tím, že pronikne rostlinnou buněčnou stěnu a plazmatickou membránou a poté se musí dostat do jádra a integrovat se do rezidentních chromozomů (Herrera-Estrella et al., 2004). Pro transformaci vojtěšky existují různé metody jako je například transformace zprostředkovaná *Agrobacterium tumefaciens*, transformace elektroporací, 8transformace bombardováním částicemi (Tichá et al., 2020).

2.3.1 Transformace zprostředkované *Agrobacterium tumefaciens*

Tato transformační metoda je nejběžnější a vykazuje vysokou efektivitu. Úspěšnost této metody závisí na správném výběru kmenu *A. tumefaciens* (Tichá et al., 2020). *A. tumefaciens*, člen rodiny eubakterií *Rhizobiaceae*, je organismus zodpovědný za vyvolání tvorby nádorových útvarů u rostlin. Ke vzniku těchto nádorů dochází v důsledku bakteriální infekce v místech poranění rostliny, což můžeme pozorovat na mnoha dvouděložných a jednoděložných rostlinách. Bakterie *A. tumefaciens* přenáší genetickou informaci pomocí Ti plasmidu, přičemž úsek, který se přenáší do hostitelské buňky je označován jako T-DNA. Ti plasmid použit pro transformaci obsahuje T-DNA postrádající geny podílející se na tvorbě nádorů. Systém transformace s využitím *Agrobacteria* má několik výhod oproti jiným transformačním metodám. Tyto výhody zahrnují: a) integrace jediné kopie T-DNA do DNA chromozomu transformované buňky, a to ve významném procentu při úspěšných transformačních událostech, b) dostupnost četných vektorových systémů obsahujících T-DNA, různé reportérové a selekční markerové geny, což umožňuje výzkumníkům vybrat nejvhodnější kombinaci pro vložení heterogenních genů, c) možnost převést velké fragmenty DNA včetně bakteriálních umělých chromozomů, d) u některých rostlin možnost využití transformace *in planta* bez nutnosti tkáňové kultury (Herrera-Estrella et al., 2004).

2.3.2 Transformace elektroporací

Elektroporace je transformační technika s vysokým potenciálem, je jednoduchá a velice účinná. Je používána pro přenos molekul, jako jsou lipidy, RNA, DNA, a proteiny do hostitelské buňky. Metoda je založena na tvorbě pórů v plazmatické membráně díky depolarizaci, což je způsobeno elektrickým polem, které se aplikuje na suspenzi rostlinných buněk. Doba trvání pulsů, počet pulsů, elektroporační roztok a koncentrace

plazmidu mají obvykle silný účinek na transformační účinnost u jednotlivých buněk (Tichá et al., 2020; Rivera et al., 2012).

2.3.3 Transformace bombardováním částicemi

Metoda biolistické transformace vojtěšky, známá jako bombardování částicemi není upřednostňována před jinými metodami, zejména před metodou transformace zprostředkované *A. tumefaciens*. Možnost zavést DNA přímo do buněk vojtěšky však může být významná, k ušetření času a námahy, přičemž může stále vést k úspěšnému získání transgenních rostlin (Tichá et al., 2020). Tato metoda se zakládá na využití mikroprojektilů z wolframu nebo zlata potažených DNA a jejich nastřelování do cílových buněk. Zrychlení při nastřelování může být zajištěno výbuchem střelného prachu nebo uvolněním vysokotlakých plynů jako je helium nebo CO₂. Molekulární analýza buněk transformovaných pomocí biolistické metody často odhalí integraci více kopií bombardované DNA do cílových buněk (Herrera-Estrella et al., 2004).

2.4 Abiotický a biotický stres u rostlin

Rostliny, které žijí v neustále se měnícím prostředí, vzhledem k jejich přisedlému způsobu života, musí být schopny překonávat nevýhodné a stresující podmínky pro jejich vývoj a růst. Tyto podmínky vyvolávající stres mohou být biotického a abiotického charakteru (Zhu, 2016; Fedoroff et al. 2010).

Pro rostliny je typickým biotickým stresem infekce patogenem nebo například napadení herbivory. Abiotický stres pak může mít podobu vystavení suchu, vysokým či nízkým teplotám, ale také například deficit živin, vystavení těžkým kovům jako je hliník, arsen a kadmium, které se mohou vyskytovat v půdě. Důležitým příkladem abiotického stresu je samozřejmě i solný stres. Je to právě stres ze sucha, solí a teplotní stres, které jsou faktory limitující produkci rostlinné výroby v zemědělství a hrají významnou roli v potravinových krizích (Zhu, 2016; Fedoroff et al. 2010).

2.4.1 Solný stres

Solný stres, stejně jako i stres ze sucha, způsobuje u rostlin stres hyperosmotický. Tento stres má na rostlinné buňky silný osmotický vliv, což znamená, že vyvolává u rostlin hypo-osmotický stav. Druhou složkou solného stresu je iontová toxicita. Působení solného stresu pak může vyvolávat množství sekundárních efektů. U rostlin může dojít k poškození některých složek buněk, např. membránových lipidů, proteinů či nukleových kyselin, ale také k metabolické disfunkci a oxidativnímu stresu (Zhu, 2016; Zhu, 2002).

Osmotický stres u rostlin způsobuje snížení množství vody přijímané rostlinou, což prohlubuje fyziologické sucho v rostlině. Iontový stres u rostlin je spojen s růstem obsahu Na^+ a Cl^- iontů. S nárůstem obsahu těchto iontů je snížený přístup k ostatním živinám, jako jsou například draselné, vápenaté a hořečnaté ionty (Serrano et al., 1999).

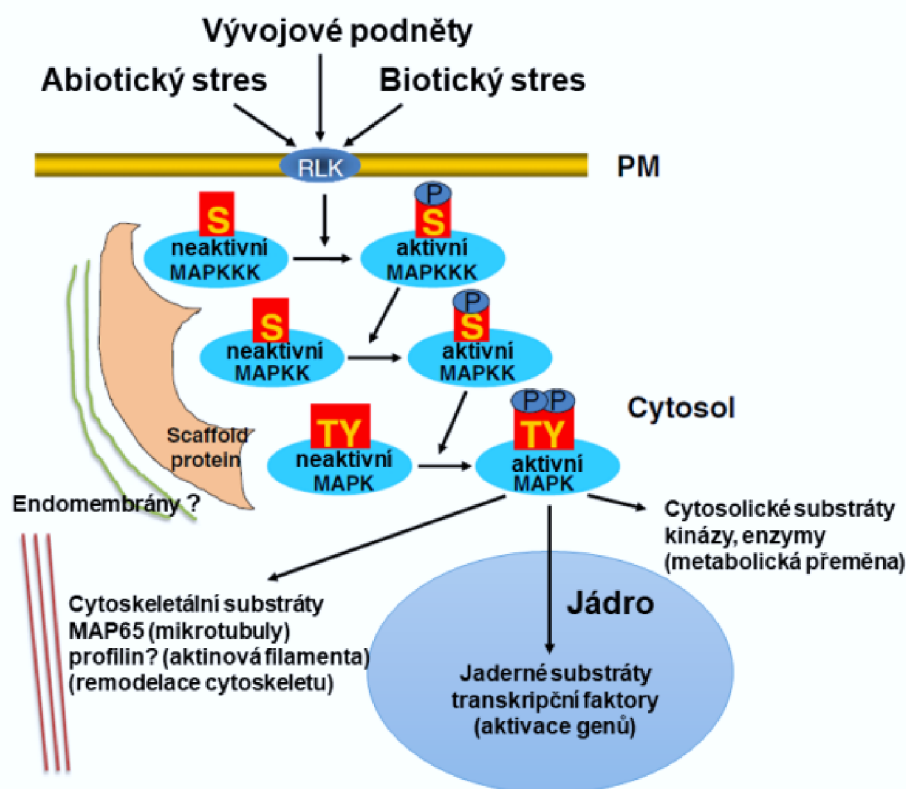
Sekundární efekty způsobené nadměrnou koncentrací NaCl jsou: snížení fotosyntetické aktivity, tvorba reaktivních forem kyslíku a snížení příjmu draselných kationtů, které jsou důležité pro uzavírání průduchů, dokonce i programovaná buněčná smrt (Serrano et al., Rivera 1999).

2.5 Signální dráhy zprostředkované mitogenem–aktivovanými protein kinázami u rostlin

Buňky reagují na vnější podněty mechanismem zahrnující řadu kroků, kdy je vnější signál přenášen přes buněčnou membránu a přes cytoplazmu až do jádra buňky. Jedním z hlavních mechanismů přenosu signálů je využití fosforylace proteinů. U eukaryot se těchto procesů účastní specifické třídy serin-threoninových proteinkináz, jde o mitogenem-aktivované protein kinázy (MAPK). Tyto kinázy hrají klíčovou roli v regulaci mnoha buněčných procesech jako je buněčný růst, proliferace, diferenciace a apoptóza. Kaskády eukaryotických mitogen – aktivovaných protein kináz tedy převádějí environmentální a vývojové podněty až k produkci intracelulárních odpovědí (Cardinale et al., 2002; Kyosseva, 2004; Cristina et al., 2010).

V obecném modelu MAPK signálních modulů jsou nejprve aktivovány MAP kinázy kinázy kinázy (MAP3K; také nazývané MAPKKK nebo MEKK). K jejich aktivaci může docházet i prostřednictvím MAP kináz kináz kináz kináz (MAP4K), které jsou aktivované stimulovanými receptory v plazmatické membráně. Tento proces pokračuje sekvenční fosforylací, kdy MAP3K aktivují MAP kinázy kinázy (MAPKK; také nazývané MAP2K nebo MEK). MAPKK dále aktivují MAPK, ty pak cílí na různé efektorové proteiny v cytoplazmě nebo jádře, které zahrnují další kinázy, enzymy, transkripční faktory nebo cytoskelet. Konkrétně MAP3K, serinové nebo threoninové kinázy, fosforylují MAP2K na konzervovaném motivu $\text{S/T-X}_{3-5}\text{-S/T}$. MAP2K poté fosforylují MAPK na zbytcích threoninu a tyrosinu na konzervovaném motivu T-X-Y . Regulace a deaktivace MAPK je zprostředkována tyrosin- a serin/threonin- specifickými fosfatázami. Tvorbu a integritu MAPK kaskády mohou zprostředkovávat skafoldové proteiny, sdílené dokovací domény a adaptorové, popř. kotvící proteiny (Cristina et al., 2010).

Pro studium a pochopení tkáňové a buněčné exprese a lokalizace MAPK je možné využít různé metody. Pro analýzu aktivity promotoru genů pro *MAPK* (popř. *MAP2K*, *MAP3K*) je možné využít reportérové geny jako je β -glukoronidasa (GUS). Pro analýzu buněčné exprese a lokalizace MAPK se využívá translačních fúzí MAPK s fluorescenčními proteiny (např. GFP – zelený fluorescenční protein). Tyto metody nám mohou poskytnout vodítka k tkáňovým a buněčně specifickým funkcím členů MAPK kaskád. Metoda translační fúze je velmi užitečná při inkorporaci nativního promotoru i genomové sekvence studovaného komponentu z MAPK kaskády a jejich exprese prováděné v mutantech postrádajících funkční endogenní gen (knockout). Dále se také využívají lokalizační studie jako detekce messengerových RNA při *in situ* hybridizaci, nebo vizualizace příslušných proteinů imunofluorescenčními detekčními metodami. Tyto metody jsou rovněž vhodné pro stanovení výskytu MAPK, ale mohou být omezeny dostupností vhodné protilátky (Komis et al., 2018).



Obrázek 1: Schéma subcelulární organizace MAPK kaskády a jejich cílů (upraveno podle Šamajová et al., 2013 a Kotulánová, 2021)

2.5.1 Podíl MAPK kaskád na regulaci růstu a vývoje rostlin

Již u vyvíjejícího se embrya je dán tvar a forma rostliny, i přesto je však rostoucí rostlina v postembryonální fázi schopná modifikace v reakci na vnější podněty, a to za účelem přizpůsobení se podmínkám prostředí (Komis et al., 2018).

MAPK kaskády se podílejí téměř na každém aspektu růstu a vývoje rostlin, a to včetně procesů jako gametogeneze, embryogeneze, morfogeneze, stárnutí, fertilizace a tvorba semen. Důležitou roli hrají také ve dvou klíčových procesech růstu a vývoje rostlinného organismu – při buněčné proliferaci a buněčné diferenciaci. MAPK se tedy podílejí na vývoji gametofytů a produkci gamet, specifikaci orgánů během embryogeneze, jako i kontrole růstu a vývoje vegetativních orgánů (Xu et al., 2015; Komis et al., 2018).

Je známo několik MAPK kaskád zapojených do regulace růstu a vývoje rostlin. Například kaskáda NPK1-NQK1-NRK1 v tabáku a její analog u *Arabidopsis thaliana*, ANPs-MKK6-MPK4, hrají zásadní roli při regulaci cytokineze u rostlin. Další důležitou kaskádou u *A. thaliana* je také kaskáda YODA (YDA)-MKK4/5-MPK3/6, o níž je známo, že reguluje mnoho dalších aspektů při vývoji rostlin. Konkrétně modul MKK4/5-MPK3/6 je zodpovědný za regulaci mnoha aspektů rostlinného vývoje *A. thaliana*, jako například udržování meristémů a architektury květenství (Sun et al., 2022).

2.5.2 MAPK kaskády v hormonální signalizaci

Hormony mají v rostlinách roli sekundárních signálních molekul, přičemž jejich množství se mění v závislosti na primárních signálech přijatých receptory. Rostlinné hormony tedy kontrolují reakce na stres a také vývoj společně se signálními molekulami a zahrnují látky, jako jsou auxiny, cytokininy a gibbereliny. Dalšími fytohormony jsou kyselina salicylová (SA), kyselina abscisová (ABA), jasmonát (popř. kyselina jasmonová) a ethylen. Tyto zmíněné látky fungují jako negativní regulátory signalizace, a jsou také běžné aktivátory MAPK kaskád (Zhang et al., 2018; Tichá et al., 2020).

Ethylen, jeden ze stresových hormonů, je indukován řádově v minutách potom, co je rostlina vystavena abiotickému/biotickému stresu. Při patogenní infekci dochází k fosforylaci MPK3 a MPK6, přičemž ty regulují expresi genů jako je *ACS2* a *ACS6*, tento proces stabilizuje ACS proteiny jejichž aktivita se zvýší při zvýšené produkci ethylenu (Zhang et al., 2018).

Kyselina jasmonová má důležitou funkci při odpovědi rostlin na stresy z prostředí a při vývoji, kdy u *A. thaliana* aktivuje MKK3 – MPK6 kaskádu. Aktivace této kaskády kyselinou jasmonovou má vliv nejen na expresi genů závislých na této kyselině, ale také dochází k inhibici kořenového růstu. U *A. thaliana* bylo dále objeveno, že MAP fosfatáza AP2C1 reguluje nejen aktivitu MAPK ale i množství kyseliny jasmonové a skrze defosforylaci MPK4 a MPK6 i přenos signálu spojených s poškozením (Takahashi et al., 2007).

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný hormon regulující adaptaci rostlin na abiotické stresy jako je sucho, zasolení a chlad nebo také na biotický stres způsobený vystavením patogenům. Adaptaci na stres reguluje ABA pomocí regulace uzavírání průduchů či exprese genů odpovědných za reakci na stres. Mimo této regulace má ABA i svůj podíl na vývoji a růstu rostlin. Konkrétně má například vliv na dozrávání embrya, dormanci semen, klíčení, větvení kořenů, přechod z vegetativního do generativního růstu a další (Wasilewska et al., 2008; Ton et al., 2009). Pro ABA signalizaci jsou důležité tři hlavní proteinové třídy. Do první řadíme pyrabaktionovou rezistenci (PYR)/PYR1, dále pak podobný (PYL) a regulační komponent ABA receptoru (RCAR). Druhou a třetí třídu představuje proteinová fosfatáza 2C (PP2C) a SNF1-příbuzná protein kináza 2 (SnRK2). Tyto zmíněné proteiny tvoří negativně regulační systém. Při navázání PYR/PYL/RCAR na ABA může dojít k jejich interakci a následné inhibici PP2C, která pak aktivuje SnRK2 kinázu a ta poté způsobí fosforylaci transkripčních faktorů nebo membránových proteinů vedoucích k odpovědím spojených s kyselinou abscisovou (Cutler, 2010; Liu, 2012). V regulaci ABA signalizace má roli i mnoho dalších složek jako jsou G-proteiny, redoxní potenciál, od lipidů odvozené signály a vápník (Wasilewska et al., 2008; Cutler, 2010).

Kyselina salicylová je, stejně jako dříve zmíněná kyselina jasmonová, fenolová kyselina. SA má důležitou roli u rostlin při jejich růstu, vývoji a v jejich obranných mechanismech, a to nejen při poranění rostliny ale také v reakci na abiotické stresy. U *A. thaliana* kyselina salicylová reguluje MPK3 a EDR1. AtMPK3, mitogen aktivovaná protein kináza 3, je stejně jako jiné MPK3 z jiných rostlinných druhů, je důležitý regulátor při sekundárních imunitních odpovědích, což je důležité při odolnosti rostlin vůči chorobám, ale také může fungovat jako negativní regulátor signálů indukovaných bakteriálním elicitorem flg22, indukující akumulaci SA (Jagodzi et al., 2018).

2.5.3 MAPK kaskády v biotickém stresu

Existují dvě cesty, jak se mohou rostliny bránit proti patogenům. První cestou je využití tzv. „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP). PAMP obnáší konzervované molekulární vzory, jež jsou asociovány s patogeny. Tyto PAMP jsou společně s „pathogenesis-related proteins“ (PRR), a transmembránovými receptory pro rozpoznávání těchto vzorů, schopny spouštět obranné reakce rostlinných buněk. Možnými obrannými reakcemi jsou například změny v enzymatické aktivitě, změny v genové expresi či produkce antimikrobiálních látek. Tyto procesy vedou k aktivaci imunity zprostředkované PAMP, kterou jsou však mnohé patogeny schopné potlačit.

Z těchto důvodů mají rostliny k dispozici i další možnosti obrany, jako je sekundární rostlinná imunita, nazývána efektoem spuštěná imunita, tzv. ETI (Jones et al., 2006).

MAPK kaskády hrají důležitou roli v obraně proti stresu u rostlin. Při primární imunitní odpovědi v reakci na patogen dochází v rostlinách k aktivaci MPK3, MPK4 a MPK6, ty jsou následně schopny regulovat odolnost rostlin. Odolnost rostlin lze regulovat biosyntézu fytohormonů a fytoalexinů, popř. aktivací jejich substrátů. Fytoalexiny jsou antimikrobiální látky produkované rostlinami (Lin et al., 2021). Rostliny *A. thaliana* produkují fytoalexin zvaný kamalexin, pro jehož produkci jsou důležité AtMPK3 a AtMPK6 (Ren et al., 2008).

2.5.4 MAPK kaskády v abiotickém stresu

Rostliny se jako přisedlé organismy musí bránit vůči velkému množství stresů, a to od stresů teplotních (stres vyvolaný vysokými, ale i nízkými teplotami), přes stres ze sucha a těžkých kovů až po stres osmotický či stres vyvolaný poraněním, popř. UV zářením (Jones et al., 2006). U rostlin se signalizace prostřednictvím MAPK signálních modulů podílí na regulaci reakcí na abiotický stres, a to včetně reakcí na sucho, vysokou salinitu a nízké teploty (Jalmi et al., 2015).

Jedním z primárních abiotických stresů, kterým rostliny čelí, je sucho, které je způsobeno nedostatkem vody. Signalizace MAPK se například podílí na regulaci stresových reakcí rostlin na sucho. U rýže se ukázalo, že aktivace signalizace MAPK reguluje expresi genů reagujících na sucho, a to včetně těch, které se podílejí na biosyntéze a signalizaci ABA (Takahashi et al., 2011).

U rostliny *A. thaliana* je akumulována MEKK1 mRNA v reakci na environmentální stres, a to včetně stresu solného. Metodou dvouhybridové kvasinkové analýzy byly prokázány interakce mezi MEKK1 a MKK2/MEK1 a také interakce mezi MEKK1, MKK2 a MPK4. Následné studie prokázaly přenos signálů vzniklých v reakci na environmentální stres nejméně do dvou MAPK kaskád, které vedou k aktivaci MPK4 a MPK6 (Sinha et al., 2011). V případě hyperosmolarity jsou aktivovány MPK3, MPK4, MPK6 v rostlinkách i v buněčných suspenzích. MPK4 a MPK6 jsou dále aktivovány i při nízkých teplotách, nízké vlhkosti a při dotyku či poranění rostlin *A. thaliana* (Tena et al., 2001; Šamajová et al., 2013).

Dalším důležitým abiotickým stresem, kterému rostliny čelí, je vysoká salinita. Vysoké koncentrace soli mohou vést k iontové nerovnováze a osmotickému stresu, což

vede ke snížení růstu rostlin a produktivity. MAPK signalizace se podílí na regulaci stresových reakcí rostlin na okolní zasolení. Například u rostlin rajčat se ukázalo, že aktivace signalizace MAPK reguluje expresi genů pro proteiny zapojené do transportu iontů a reakcí na osmotický stres, což vede ke zvýšené toleranci k solím. V případě buněk rostliny *M. sativa* dochází k aktivaci SIMK, solí indukované MAPK, jako reakci na vysokou koncentraci NaCl, popř. vlivem hyperosmotických podmínek. K podobné reakci pak dochází i u buněk tabáku. Zde je aktivována SIPK neboli protein kináza indukovaná kyselinou salicylovou (Tena et al., 2001; Sinha et al., 2011; Zhang & Zhang, 2022).

Nízké teploty jsou dalším abiotickým stresem a mohou vést k různým fyziologickým a biochemickým změnám, včetně změn fluidity membrán, akumulace ROS a exprese genů reagujících na chlad. Signalizace MAPK se také podílí na regulaci reakcí na chladový stres u rostlin. Například u rýže se ukázalo, že aktivace signalizace MAPK reguluje expresi genů zapojených do chladové aklimatizace, což vede ke zvýšené toleranci chladu (Chen et al., 2021).

I přes značnou variabilitu mechanismu reakcí na abiotických stres se vyskytují jisté společné znaky jako je využití MAPK kaskád nebo například produkce sekundárních signálních molekul, jako je vápník a H_2O_2 . Existence propojení mezi běžným sekundárním přenašečem H_2O_2 a aktivací MAPK kaskád v reakci na různé abiotické stresy byla prokázána při provedení testu transientní exprese u protoplastů *A. thaliana* (Tena et al., 2001).

2.6 Metody hodnocení fenotypu rostlin po aplikaci abiotických stresových faktorů

V reakci na prostředí se u rostlin vyvíjí různé fenotypy. Pochopení procesů, které rostliny využívají je nezbytné nejen pro šlechtění a práci s plodinami v zemědělství, ale také při vědeckém výzkumu rostlin. Fenotypy je možné určovat u samotných rostlin a jejich částí, ale i v rámci celého porostu, což je vhodné pro pochopení základních procesů probíhajících v rostlinách, k hodnocení produktivity rostlin, či pro praktické aplikace ve šlechtění, pěstování či zpracování plodin. Fenotypizační technologie a protokoly jsou proto důležité nástroje k posouzení struktury a funkce semen, kořenů a kořenových systémů, zásobních orgánů, a to nad a pod zemí, dále pak listů, plodů a květů (Pieruschka & Schurr, 2019).

2.6.1. Měření růstových parametrů rostlin

Parametry růstu rostlin, jako je výška rostlin, plocha listů, biomasa a délka kořenů, lze použít k hodnocení vlivu abiotických stresů na růst rostlin. Tyto parametry lze měřit pomocí různých technik, jako je zobrazování rostlin, analýza biomasy a skenování kořenů. Zobrazování rostlin lze například použít k měření výšky rostlin, plochy listů a biomasy, zatímco skenování kořenů lze použít k měření délky a hustoty kořenů.

Plocha listů je důležitým ukazatelem růstu rostlin a fotosyntetické kapacity. Listovou plochu rostlin lze měřit pomocí různých metod, včetně listových skenerů, analýzy obrazu a ručního měření pomocí měřiče listové plochy. Biomasa výhonků je běžně používaným ukazatelem růstu a produktivity rostlin. Čerstvou biomasu výhonků rostlin lze měřit tak, že se sklídí nadzemní části rostliny a poté se zváží. Kořenová biomasa vypovídá o růstu rostliny a vývoje jejího kořenového systému. Kořenovou čerstvou biomasu rostlin lze měřit tak že je nejprve sklizena podzemních část rostliny, která je následně zvážena. Jako další běžně užívaný indikátor růstu a vývoje rostliny také slouží výška rostliny. Výšku rostlin lze měřit pomocí pravítka nebo měřicí pásky (Erickson, 1976; Wuyts et al., 2015).

2.6.2 Zobrazování fluorescence chlorofylu

Zobrazování fluorescence chlorofylu je neinvazivní technika, kterou lze použít k hodnocení výkonu fotosyntézy rostlin. Tato technika měří fluorescenci emitovanou molekulami chlorofylu v reakci na světelnou excitaci. Abiotické stresy, jako je sucho a salinita, mohou ovlivnit výkon fotosyntézy rostlin, a proto lze k hodnocení účinku abiotických stresů na fotosyntézu rostlin použít fluorescenční zobrazování chlorofylu.

Díky zobrazování fluorescence lze určit několik parametrů, které souvisejí s fotosyntetickým výkonem. Příkladem takového parametru je maximální kvantová účinnost PSII (F_v/F_m). F_v/F_m je měřítkem účinnosti fotosystému II (PSII) při přeměně světelné energie na chemickou během fotosyntézy, přičemž F_v/F_m je široce používaný parametr pro hodnocení fotosyntetického výkonu rostlin ve stresových podmínkách. Dalším parametrem je efektivní kvantový výtěžek PSII (Φ_{PSII}). Φ_{PSII} je měřítkem skutečné účinnosti PSII při přeměně absorbované světelné energie na chemickou energii. Φ_{PSII} je citlivý indikátor změn fotosyntetického výkonu vyvolaných stresem. Parametrem souvisejícím s fotosyntetickým výkonem je také nefotochemické zhášení (NPQ). NPQ je měřítkem schopnosti rostlin rozptýlit přebytečnou absorbovanou světelnou energii formou tepla, čímž chrání PSII před poškozením světlem. NPQ je klíčovou součástí fotoprotektivních mechanismů rostlin a lze jej použít k posouzení reakce rostlin na stresové podmínky (Gorbe & Calatayud, 2012; Yao et al., 2018).

Fluorescenční zobrazování chlorofylu lze provádět pomocí různých zařízení, včetně ručních zařízení a zobrazovacích systémů. Ruční zařízení jsou přenosná a snadno se používají, ale obvykle poskytují méně podrobné informace než laboratorní zobrazovací systémy. Ruční zařízení tedy mohou být použity v terénu nebo v laboratoři a často se dodávají se softwarem, který umožňuje analýzu a vizualizaci dat. Některá oblíbená ruční zařízení pro zobrazování fluorescence chlorofylu zahrnují Handy PEA (Analyzátor fotosyntetické účinnosti rostlin) a Pocket PEA od Hansatech Instruments. Laboratorní zobrazovací systémy mohou poskytovat obrazy fluorescence chlorofylu s vysokým rozlišením, což umožňuje podrobnou analýzu fotosyntetického výkonu. Jsou obvykle dražší než ruční zařízení a vyžadují více technických znalostí k provozu. Zobrazovací systémy lze použít ke studiu velkých oblastí rostlinné tkáně nebo dokonce celých rostlin a mohou poskytnout prostorové a časové informace o fluorescenci chlorofylu. Některé populární zobrazovací systémy pro fluorescenční zobrazování chlorofylu zahrnují FluorCam a Imaging-PAM od Heinz Walz GmbH (Gorbe & Calatayud, 2012; Yao et al., 2018).

2.6.3 Metabolomika

Metabolomika je nástroj pro komplexní analýzu endogenních metabolitů v biologických vzorcích, přičemž slouží nejen k jejich identifikaci, ale také k jejich kvantifikaci. Metabolity jsou malé molekuly, které se účastní různých metabolických drah v buňkách a mohou být ovlivněny podmínkami abiotického a biotického stresu. Metabolity jsou různé nízkomolekulární látky ať už např. lipidy, aminokyseliny, peptidy, nukleové kyseliny, organické kyseliny, vitamíny, thioly, či např. uhlohydráty. Analýza metabolitů nám poskytuje informace o biochemických drahách a fyziologických procesech, které jsou ovlivněny stresem a může tak pomoci při identifikaci potenciálních cílů pro šlechtění rostlin tolerantních vůči daným stresům.

Metabolomika zahrnuje použití vysoce výkonných analytických technik, jako je hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická rezonanční (NMR) spektroskopie, k detekci a kvantifikaci metabolitů v biologických vzorcích. Spolu s těmito technikami užívá i chemometrické statistické nástroje, jako je analýza hlavních složek (PCA) a částečné nejmenší čtverce (PLS) (Zhang et al., 2012).

Metabolomiku lze použít k hodnocení vlivu abiotických stresů na rostliny porovnáním profilů metabolitů stresovaných a nestresovaných rostlin. Identifikací metabolitů, které jsou specificky ovlivněny stresem, je pak možné zjistit, které metabolické dráhy jsou stresem změněny. Kromě toho lze metabolomiku použít k identifikaci biomarkerů, tedy

metabolitů, které jsou spojeny s tolerancí vůči stresu, což je následně možné využít při výběru rostlin se zlepšenou tolerancí vůči stresu (Kumar et al., 2017).

2.6.4 Transkriptomika

Transkriptomika je definována jako studium transkriptomu – kompletní sady RNA, známé také jako profilování exprese genů. Je to studium úrovně exprese mRNA v dané buněčné populaci. Transkriptom je dynamický, jelikož je to odraz genů, které jsou exprimovány v jakémkoliv daném čase a za různých podmínek. Určuje vzorec změn genové exprese v důsledku vnitřních a vnějších faktorů, mezi které patří i biotický a abiotický stres. Transkriptomika poskytuje informace o specifických genech a molekulárních drahách, které se podílejí na reakci rostlin na stres, a může tak pomoci při identifikaci potenciálních cílů pro šlechtění tolerance vůči stresu (Van Emon, 2016).

Transkriptomika typicky zahrnuje použití mikročipů (popř. biočipů) nebo vysoce výkonných sekvenčních technik, jako je sekvenování RNA (RNA-seq). Mikročipy se skládají z krátkých nukleotidových oligomerů, známých jako „sondy“, které jsou uspořádány na pevném substrátu (např. skle). Množství transkriptů je určováno hybridizací fluorescenčně značených transkriptů k těmto sondám. Intenzita fluorescence pak indikuje množství transkriptů pro danou sekvenci sondy. RNA-Seq označuje kombinaci vysoce výkonné sekvenační techniky s výpočetními metodami pro zachycení a kvantifikaci transkriptů přítomných v extraktu RNA. RNA-seq se užívá k detekci a kvantifikaci exprese genů v biologických vzorcích a umožňuje analýzu celého transkriptomu rostliny, přičemž ji lze použít k identifikaci odlišně exprimovaných genů (DEG) mezi stresovanými a nestresovanými rostlinami. Identifikace DEG může poskytnout cenné informace o specifických genech a molekulárních drahách, které se podílejí na reakci rostlin na stres. Transkriptomika může proto být také použita k identifikaci regulačních drah zapojené do odpovědí rostlin na stres (Lowe et al., 2017).

2.6.5 Proteomika

Proteomika je systematická analýza, která charakterizuje proteom a to včetně přítomnosti, struktury, funkční podobnosti a modifikací proteinů během různých fází. Proteomika slouží k identifikaci proteinů zapojených do buněčných procesů a lze jí využít například pro studium proteinů v biosyntetických drahách vedoucích k produkci sekundárních metabolitů (Jacobs et al., 2000; Aslam et al., 2016).

Pro separaci proteinových směsí je nejúčinnější dostupnou technikou dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE). Proteiny jsou separovány podle svého izoelektrického bodu a dále dle jejich molekulové hmotnosti pomocí izoelektrické fokusace (IEF) a pomocí dodecylsulfátu sodného (SDS)-PAGE. Po separaci lze proteiny následně identifikovat hmotnostní spektrometrií (MS). Pomocí MS je možné identifikovat proteiny ve femtomolárních množstvích. (Jacobs et al., 2000).

Proteomika není důležitá jen pro mapování kompletních proteomů, ale především pro jejich srovnávání za účelem identifikace různě zastoupených proteinů a lze ji tedy například využít pro porovnávání proteomů rostlin rezistentních a citlivých rostlinných tkání a k následné identifikaci proteinů souvisejících s odolností vůči stresům. Tato metoda může sloužit ke sledování změn v produkci proteinů u rostlin po vystavení abiotickému stresu a pro získávání nových poznatků v oblasti molekulárních mechanismů spojených s těmito stresy. Tyto informace je pak možné využít ve šlechtění za účelem získání rostlin s vyšší produktivitou a odolností vůči měnícím se podmínkám (Eldakak et al., 2013).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

Kádinky, odměrné válce, plastové misky na vážení, lžičky, magnetická míchadla, nádoby na médium, autoklávová indikátorová páska, nůžky, skalpel, pinzety, Pasteurovy pipety, filtrační papír, mikrozkušavky, zkumavky typu Falcon, sterilní špičky, sterilní okrouhlé a hranaté Petriho misky, chirurgická páska, bakteriologický filtr s póry o velikosti 0,22 μm , krycí sklíčka 40 mm, podložní sklíčka, Parafilm

3.1.1. Chemikálie

1000x Gamborg's vitamin solution (Duchefa Biochemie)

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa biochemie)

2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (Duchefa Biochemie)

Adenin (Sigma-Aldrich)

Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)

Ethanol denaturovaný (96 %, PENTA)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich)

Hydroxid draselný (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)

Gamborg's B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Gellan gum powder (Alfa Aesar)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)

Kinetin (Duchefa Biochemie)

L-Glutamin (Duchefa Biochemie)

L-glutathion (Sigma-Aldrich)

L-Prolin (Sigma-Aldrich)

L-Serin (Sigma-Aldrich)

Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Myoinositol (Duchefa Biochemie)

MilliQ voda

Sacharosa (Sigma-Aldrich)

Vodovodní voda

3.1.2. Roztoky a média

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 prolin
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Následuje doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (pomocí 1M KOH, popř. 0,1M KOH).
- Takto připravené médium je sterilizováno autoklávem.
- Po autoklárování a vychladnutí na přibližně 55 °C a následuje přidání:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1,0 mg·l⁻¹ 2,4-D
 - 0,1 mg·l⁻¹ kinetin
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

Směs aminokyselin byla připravena:

- 6,65 g glutamin
- 0,83 g serin
- 0,004 g adenin
- 0,083 g L-glutathion
- Následovalo doplnění MilliQ H₂O do 250 ml a sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm.
- Takto připravenou směs je nutné uchovávat při 4 °C.

Roztok 2,4-D ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) byl připraven:

- 50 mg 2,4-D
- 5 ml 1M NaOH
- Takto připravená směs byla doplněna do 50 ml MilliQ H₂O
- Roztok byl sterilizován bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm .
- Uchovávání při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$

Roztok kinetinu ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) byl připraven:

- 10 mg kinetinu
- 0,1 ml 0,1M NaOH
- Doplnění do 10 ml MilliQ H₂O
- Roztok byl sterilizován bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm .
- Uchovávání při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$

B50 médium

- $3,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Gamborg's B5 basal salt mixture
- $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ KNO₃
- $0,25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ MgSO₄·7H₂O
- $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ prolin
- $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sacharosa
- $4,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (1M KOH, popř. 0,1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování a vychladnutí na přibližně $55 \text{ }^\circ\text{C}$ následně přidáváme:
 - $30 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi aminokyselin
 - $1,0 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ 1000X Gamborg's vitamin

MMS médium

- $4,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ myoinositol
- $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sacharosa
- $4,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (1M KOH, popř. 0,1M KOH)

- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 1 ml·l⁻¹ 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution

Pevné MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (1M KOH, popř. 0,1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

Pevné MS médium s přídavkem NaCl (200 mM)

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (1M KOH, popř. 0,1M KOH)
- 11, 688 g·l⁻¹ NaCl

Tekuté MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- Doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (1M KOH, popř. 0,1M KOH)
- Médium bylo sterilizováno bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm.

Tekuté MS médium s přídavkem NaCl (200 mM)

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- Doplnění MilliQ H₂O a úprava pH na 5,7 (1M KOH, popř. 0,1M KOH)
- 11, 688 g·l⁻¹ NaCl
- Médium bylo sterilizováno bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm.

3.1.3. Použité přístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Laboratorní váhy S1 502 (BEL Engineering)

Automatické pipety (Eppendorf)

Autokláv – parní sterilizátor (Stervap, MMM Group)

Elektromagnetická míchačka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)

Laminární box Biohazard (Merci)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Skener (Image Scanner III)

Výrobek deionizované vody Simplicity water purification system (Millipore)

Fluorescenční stereomikroskop (Axio Zoom.V16, Carl Zeiss)

Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM710 (Carl Zeiss)

3.1.4. Software na zpracování výsledků

Excel 365 (Microsoft Office)

PowerPoint 365 (Microsoft Office)

ImageJ (NIH)

Statistika 14.0.0

ZEN 3.5 – blue edition (Carl Zeiss)

ZEN 2.3 PS1 – black edition (Carl Zeiss)

3.1.5. Rostlinný materiál

Medicago sativa L. - divoký typ, kultivar Regen SY

Medicago sativa L. SIMKKi – transgenní linie SIMKK RNAi s relativním snížením úrovně exprese genu *SIMKK* (na úrovni *mRNA* transkriptu)

Medicago sativa L. GFP-FABD2 – transgenní linie, jež produkuje aktin-vazebnou doménu č.2 proteinu fibrinu z *Arabidopsis thaliana*, translačně fúzovanou so zeleným fluorescenčním proteinem, GFP

Medicago sativa L. SIMKKi in GFP-FABD2 – transgenní linie s potlačeným projevem exprese genu *SIMKK* a zároveň produkující aktin-vazební doménu č. 2 proteinu fibrin z *Arabidopsis thaliana*, translačně fúzovanou se zeleným fluorescenčním proteinem, GFP

3.2 Metody

3.2.1 Příprava média B5H

B5H médium je kultivační médium, které obsahuje přidané hormony. Toto médium slouží pro navození tvorby kalusu procesem zvaným kalogeneze. Doba kultivace explantátů na tomto médiu je přibližně 3 týdny.

Byla připravena laboratorní kádinka, do níž byly nalita MiliQ voda ± 800 ml, do níž byly následně přidávány další složky média. Přidávané složky zahrnovaly směs Gamborg's B5 basal salt mixture, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dále byl přidán prolin a sacharóza, a nakonec Gellan gum sloužící na ztužení. Tato směs byly za neustálého míchání na elektromagnetické míchačce doplněna na objem 1 l. Bylo změřeno pH této směsi, které bylo následně upraveno na 5,7 pomocí KOH (1M, popř. 0,1M). Takto připravené médium bylo rozlito do dvou uzavíratelných skleněných lahví s obsahem 1 l, a to vždy po 500 ml. Následně byly tyto lahve dány na sterilizaci do autoklávu. Po sterilizaci bylo médium ponecháno vychladnout na 55 °C. Po vychladnutí byla do média v laminárním boxu přidána směs aminokyselin, hormony (kinetin a 2,4-D) a vitamíny (1000X Gamborg's vitamin). Směs aminokyselin, hormony a vitamíny byly před přidáním do média vysterilizovány průchodem přes membránové filtry. Médium bylo rozlito do kulatých Petriho misek po 50 ml a ponecháno vychladnout do jeho ztuhnutí při laboratorní teplotě.

3.2.2. Příprava média B50

B50 médium je kultivační médium, které neobsahuje přidané rostlinné hormony. Toto médium je určeno pro indukci embryogenního kalusu a následné tvorby somatických embryí. Doba kultivace na tomto médiu se pohybuje v rozmezí 2-3 týdnů.

Do připravené laboratorní kádinky byla nalita MiliQ voda ± 800 ml, do níž byly přidávány další složky média. Smíchány byly tyto složky: směs Gamborg's B5 basal salt mixture, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, v neposlední řadě byl přidán prolin a sacharóza, a nakonec Gellan gum, jako ztužovací složka. Připravená směs byla za neustálého míchání na elektromagnetické míchačce doplněna na objem 1 l. Následně bylo změřeno pH, jež bylo následně upraveno na 5,7 pomocí KOH (1M, popř. 0,1M). Takto připravené médium bylo rozlito do dvou 1 l uzavíratelných skleněných lahví po 500 ml. Lahve byly poté sterilizovány v autoklávu. Po sterilizaci bylo médium ponecháno vychladnout na 55 °C. Po vychladnutí byla do média v laminárním boxu přidána směs aminokyselin a vitamíny (1000X Gamborg's vitamin). Směs aminokyselin, hormony a vitamíny bylo před přidáním do média nutné vysterilizovat. Sterilizace probíhala průchodem přes membránové filtry. Médium bylo rozlito do 10 kulatých Petriho misek po 50 ml a ponecháno vychladnout do jeho ztuhnutí při laboratorní teplotě.

3.2.3. Příprava média MMS

MMS médium je kultivační médium využívané při vývoji somatických embryí, a to především pro vývoj kořenů ale také i výhonků. Doba kultivace somatických embryí na médiu MMS se pohybuje v rozmezí 2 až 3 týdnů.

Do laboratorní kádinky byly nalita MiliQ voda ± 800 ml zde byly následně smíchány další složky média. Smíchána byla směs MS basal salt mixture (Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture), myoinositol, sacharóza a následně Gellan gum pro ztužení. Jednotlivé složky byla přidávány za stálého míchání a pro dosažení výsledného objemu 1 l byla přidána MiliQ voda. Upravení pH na 5,7 probíhalo pomocí KOH (1M popř. 0,1M). Připravené médium bylo rozlito do skleněných uzavíratelných lahví po 500 ml, přičemž objem lahví byl 1 l. Lahve s médiem byl vysterilizovány v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na teplotu přibližně 55 °C byla přidána do objemu 500 ml směs vitamínů (1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution). Přidání směsi probíhalo stejně jako její sterilizace, provedena průchodem směsi přes membránové filtry, ve sterilním laminárním boxu. Médium bylo rovnoměrně rozlito do 10 hranatých Petriho misek a ponecháno ochladit a ztuhnout při laboratorní teplotě.

3.2.4. Příprava média MS

MS médium je kultivační médium určené pro dokončení vývoje kultivovaných mladých rostlin a jejich udržování v *in vitro* podmínkách. Kultivace není časově omezena, ale je nutná výměna média v intervalu 3 týdnů za účelem zamezení vyčerpání živin.

Do laboratorní kádinky byla nalita MiliQ voda ±800 ml do které byly následně přimíchávány další složky média. Smíchána byla směs MS basal salt mixture (Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture), sacharóza a následně Gelan gum pro ztužení. Jednotlivé složky byla přidávány za stálého míchání a pro dosažení výsledného objemu 1 l byla přidána MiliQ voda. Následovalo upravení pH na 5,7 pomocí KOH (1M popř. 0,1M) a rozlití média do dvou 1 l lahví po 500 ml. Láhve s médiem byly vysterilizovány v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí na 55 °C bylo médium rozlito rovnoměrně do 10 Petriho misek a necháno vychladit do ztuhnutí při laboratorní teplotě.

3.2.5. Příprava média MS s přídavkem NaCl

MS médium s přídavkem NaCl bylo určeno pro pokus č. 1, kdy byla testována odolnost 3 linií *Medicago sativa* L. vůči solnému stresu. Kultivace na tomto médiu probíhala po dobu dvou týdnů.

Do laboratorní kádinky byly nalita MiliQ voda ±800 ml do které byly následně přimíchávány další složky média. Smíchána byla směs MS basal salt mixture (Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture), sacharóza a následně Gelan gum pro ztužení. Jednotlivé složky byla přidávány za stálého míchání a pro dosažení výsledného objemu 1 l byla přidána MiliQ voda. Následovalo upravení pH na 5,7 pomocí KOH (1M popř. 0,1M). Poté bylo do takto připraveného média přidáno NaCl ke konečné koncentraci 200 mM a médium bylo rozlito do dvou 1 l lahví po 500 ml. Láhve s médiem byly vysterilizovány v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí na 55 °C bylo médium rozlito rovnoměrně do 10 Petriho misek a bylo ponecháno zchladnout do ztuhnutí při laboratorní teplotě.

3.2.6. Příprava tekutého média MS a tekutého média MS s přídavkem NaCl

Tekuté médium MS, popř. MS + NaCl (200 mM) slouží zejména pro tvorbu prostředí pro rostliny, u nichž potřebujeme pozorovat procesy probíhající v rostlinách *in vitro*.

Do laboratorní kádinky byla nalita MiliQ voda ±70 ml do které byly následně přimíchávány další složky média. Smíchána byla směs MS basal salt mixture (Murashige

and Skoog médium-Basal salt mixture) a sacharóza. Jednotlivé složky byly přidávány za stálého míchání a pro dosažení výsledného objemu 100 ml byla přidána MiliQ voda. Následovalo upravení pH na 5,7 pomocí KOH (1M popř. 0,1M). Médium o objemu 50 ml bylo odlito do zkumavky typu Falcon. Do zbylých 50 ml byla přidána NaCl ke konečné koncentraci 200 mM, načež následovalo přelití zbylých 50 ml do druhé Falconovy zkumavky. Takto připravená média byla vysterilizována průchodem přes membránové filtry.

3.2.7. Regenerace rostlin *M. sativa* procesem somatické embryogeneze

K odběru listových explantátů byly použity rostliny rostoucí v *in vitro* podmínkách, tj. rostoucích na MS médiu v plastových boxech. Z rostlin bylo ve sterilních podmínkách v laminární boxu odstříženo několik listů, které byly umístěny do Petriho misky s MiliQ vodou, z něj byly po jednom vždy přeneseny na filtrační papír a rozříznuty na půl pomocí skalpelu, načež byly jednotlivě umístěny na B5H médium v kulatých Petriho miskách. Každá Petriho miska byla označena a umístěna do fytotronu kde probíhala kultivace po dobu tří týdnů při teplotě 24 °C, intenzitě světla 60–80 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma za účelem indukce kalusu (kalogeneze). Kalusy vzniklé tímto procesem byly po třech týdnech přeneseny na B50 médium, kde byly kultivovány po dobu 3 týdnů za vzniku embryogenního kalusu a somatických embryí. Plně vyvinutá somatická embrya byla následně přenesena na MMS médium, kde byla kultivována do vzniku kořenů a výhonku, v závislosti od rostliny se doba kultivace pohybovala v rozmezí 2-3 týdnů. Odtud byly mladé rostlinky přeneseny na MS médium, kde byly dále udržovány v *in vitro* podmínkách.

3.2.8. Příprava preparátů pro mikroskopické pozorování a mikroskopie

V laminárním boxu bylo připraveno podložní sklíčko, na jehož kraje delších stran byly na sebe nalepen tři proužky parafilmu (délky stran proužku byly $\pm 0,5$ cm a ± 3 cm) a doprostřed bylo pomocí pipety naneseo malé množství tekutého MS média. Kořen rostliny byl následně položen do média a přikryt krycím sklíčkem. Pomocí parafilmu byly delší okraje takto vytvořené komůrky uzavřeny parafilmem. Parafilmem byla také jemně překryta výhonková část rostliny za účelem zabránění vysychání preparátu. Takto vytvořený preparát byl ponechán ve vlhké komůrce minimálně 3 h, aby se rostlina mohla aklimatizovat na nové podmínky. Před mikroskopováním byl zkontrolován obsah média, které bylo v případě potřeby doplněno. Pro výměnu tekutého MS média za tekuté MS médium s NaCl (200 mM) bylo MS médium vysáváno pomocí nastříhaných proužků

filtračních papírů z neuzavřené části komůrky na straně umístění kořenu za současného pipetování média s NaCl v oblasti výhonkové části rostliny. Mikroskopická analýza byla provedena na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu LSM710 (Carl Zeiss), s využitím objektivu Plan-Apochromat 20×/0.8 NA, s fluorescenční excitací pomocí laseru 488 nm a detekcí fluorescence v rozmezí 495–590 nm.

3.2.9 Statistická analýza

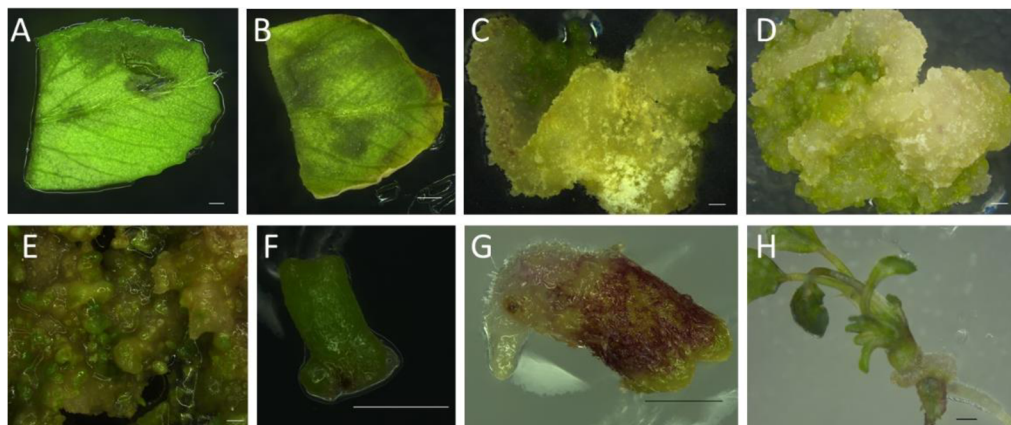
Statistické vyhodnocení kvantitativních dat bylo provedeno metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) a následného Fisher Least Significant Difference (LSD) testu na hladině významnosti $P < 0.05$.

4. VÝSLEDKY

V první části této kapitoly bude prezentován průběh nepřímé somatické embryogeneze nutné k získání rostlin pro další experimenty. V druhé a třetí části této kapitoly budou prezentovány výsledky prvního z prováděných experimentů, přesněji kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení efektů vystavení rostlin *M. sativa* dlouhodobému solnému stresu. V prvním experimentu byly rostliny tří linií, RSY (kontrolní linie), SIMKKi (SIMKK RNAi), transgenní linie se sníženou expresí a produkcí proteinu SIMKK a SIMK, a GFP – FABD2, transgenní linie obsahující fluorescenčně značený protein FABD2. Následně budou prezentovány výsledky z druhého prováděného experimentu, tedy vyhodnocení efektů vystavení rostlin krátkodobému solnému stresu. Druhý experiment byl prováděn na čtyřech liniích: RSY, SIMKKi, GFP – FABD2 a SIMKKi in GFP-FABD2.

4.1 Regenerace rostlin *M. sativa* pomocí nepřímé somatické embryogeneze

Rostliny *M. sativa* byly regenerovány procesem nepřímé somatické embryogeneze. Regenerace probíhala z listových explantátů rostlin kultivovaných v *in vitro* podmínkách (Obr. 2 A, B), a to z kontrolní linie RSY a transgenních linií SIMKKi, GFP-FABD2 a SIMKKi in GFP-FABD2. Listové explantáty byly nejprve přeneseny na B5H médium, kde byly ve sterilních podmínkách kultivovány po dobu tří týdnů. U somatických buněk byla tedy takto vyvolána kalogeneze (Obr. 2 C, D). Vzniklé kalusy byly následně přeneseny na B50 médium, kde byly kultivovány ve sterilních podmínkách po dobu 3 týdnů za indukce somatické embryogeneze (Obr. 2 E). Somatická embrya, která byla takto získána (Obr. 2 F), byla kultivována na sterilním MMS médiu po dobu 2-3 týdnů do vzniku kořenů (Obr. 2 G) a výhonkové části (Obr. 2 H).



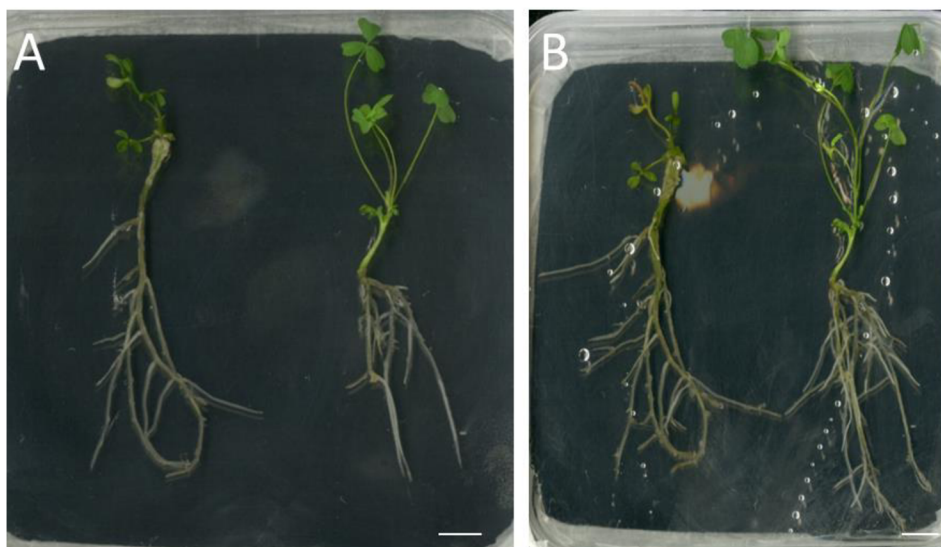
Obrázek 2. Průběh nepřímé somatické embryogeneze linie RSY, listové explantáty (A, B), kalogenze (C, D), somatická embryogeneze (E), somatické embryo (F), embryo s kořenovou částí (G), mladá rostlina (H), měřítko 1 mm

Mladé rostliny byly dále kultivovány na MS médiu. U mladých rostlin byl na MS médiu dokončen jejich vývoj a následně zde byly udržovány v *in vitro* podmínkách. Pro fotografickou dokumentaci celého procesu byl využit Zoom stereomikroskop.

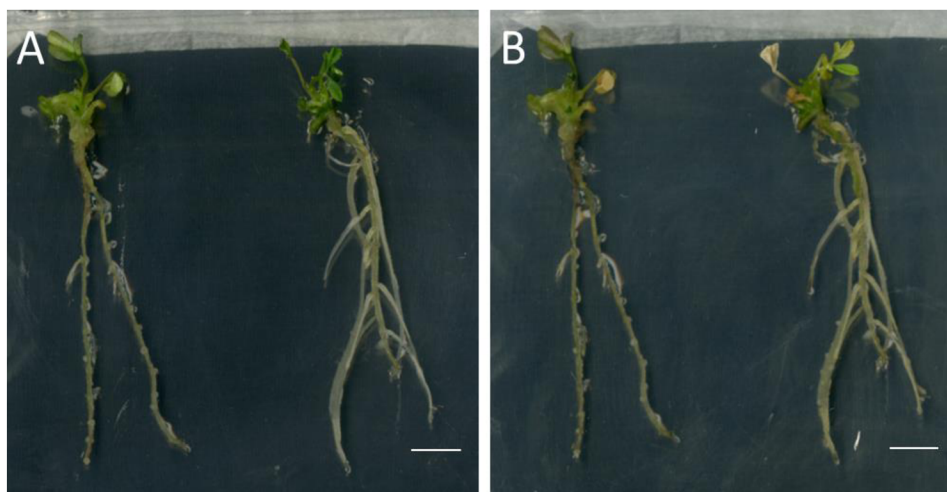
4.2 Kvalitativní vyhodnocení vystavení *M. sativa* dlouhodobému solnému stresu

Při tomto experimentu byly rostliny *M. sativa* linie RSY, SIMKKi a GFP – FABD2 vystaveny dlouhodobému solnému stresu po dobu dvou týdnů. Solného stresu bylo dosaženo přenesením rostlin kultivovaných na MS, na médium MS s přidavkem chloridu sodného u poloviny z pozorovaných rostlin (Obr. 4, 5, 7, 8, 10). Výsledná koncentrace NaCl v médiu byla 200 mM. Druhá polovina pozorovaných rostlin byla přenesena na kontrolní MS médium (Obr. 3, 6 a 9), za účelem otestování vlivu možného mechanického stresu způsobeného přenosem.

U kontrolní linie RSY byly v případě rostlin na MS médiu pozorovány nejen přírůstky v části kořenové, ale i stonkové. U rostlin bylo zachováno zeleného zbarvení listů, a i v jejich případě byl pozorován přírůstek (Obr. 3). V případě rostlin přenesených na MS médium s přidavkem NaCl (200 mM) bylo pozorováno zhoršení stavu rostlin. Přírůstky v kořenové části pozorovány nebyly, popř. byly minimální. U těchto rostlin došlo ke žloutnutí listů a dále bylo možné pozorovat vznik bílých útvarů na kořenech několika rostlin, způsobených nejspíše akumulací soli v rostlinách (Obr. 4 a 5).



Obrázek 3. Rostliny linie RSY na MS médiu, den 0 (A) a den 14 (B), měřítko 1 cm



Obrázek 4 Rostliny linie RSY na médiu MS + NaCl (200mM), den 0 (A) a den 14 (B), měřítko 1 cm

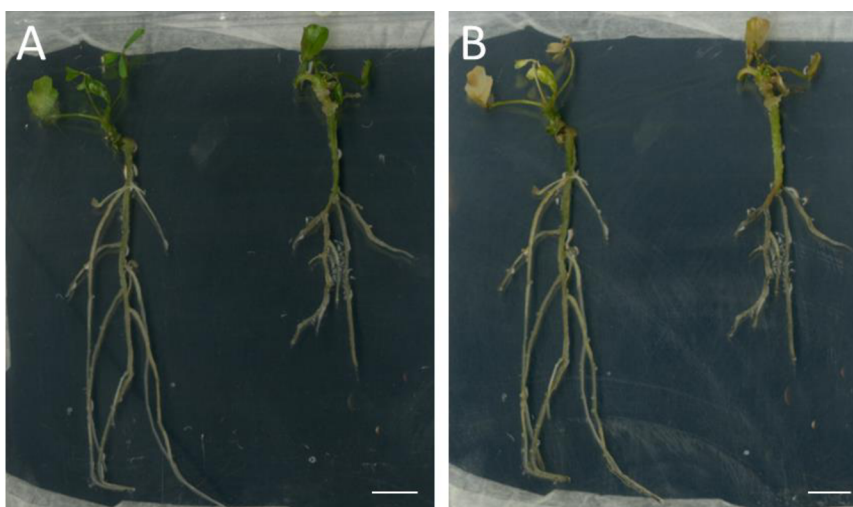


Obrázek 5. Detail z obrázku 4, linie RSY po 14denním vystavení NaCl (200mM), detail kořenového systému (A), detail nadzemní části (B), měřítko 1 cm

U rostlin transgenní linie SIMKKi na kontrolním MS médiu byl pozorován velký přírůstek zejména v kořenové i stonkové části, a v případě listů byl přírůstek méně výrazný (Obr. 6). U linie SIMKKi na MS médiu s přídavkem NaCl (200 mM) nebyl pozorován přírůstek v kořenové a stonkové části, popř. byl tento přírůstek minimální. U rostlin nastalo hnědnutí a bělení listů. U některých z pozorovaných rostlin došlo i k hnědnutí kořenů (Obr. 7 a 8). Celkový stav se v porovnání s linií kontrolní jevil jako horší, což naznačuje menší odolnost této transgenní linie. Stejně jako u linie kontrolní byla i zde pozorována tvorba zakrslých útvarů na kořenech.



Obrázek 6. Rostliny linie SIMKKi na MS médiu, den 0 (A) a den 14 (B), měřítko 1 cm

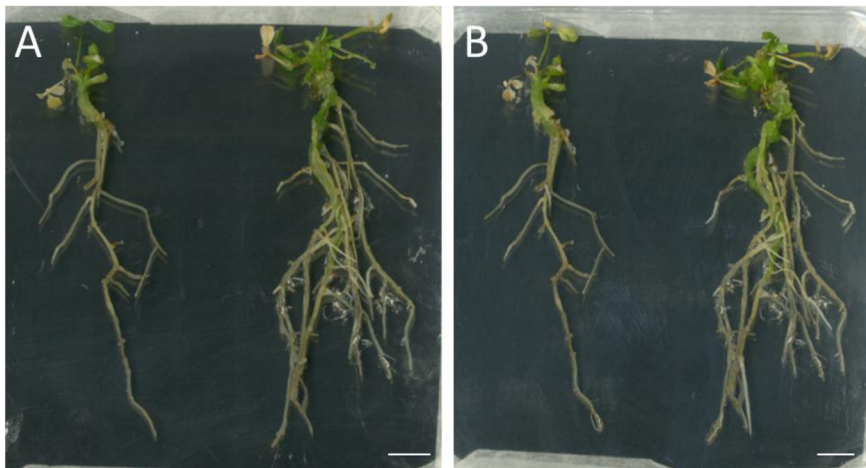


Obrázek 7. Rostliny linie SIMKKi na MS médiu s přidavkem NaCl (200mM), den 0 (A), den 14 (B), měřítko 1 cm

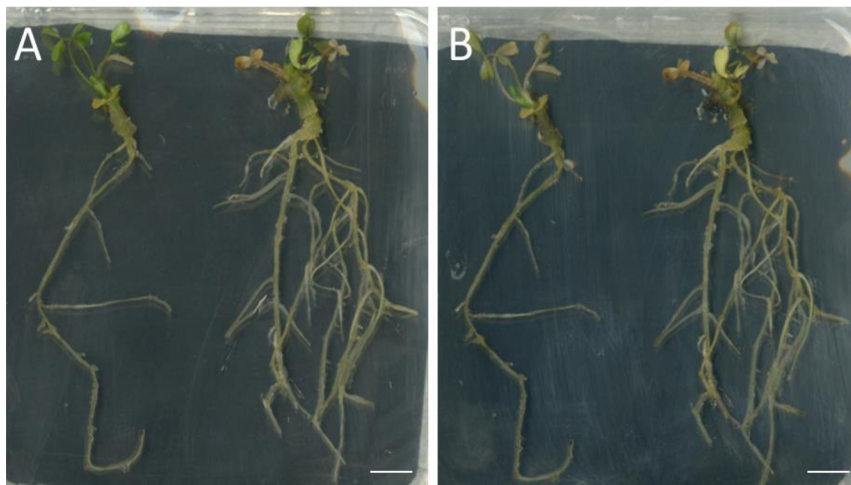


Obrázek 8. Detail obrázku 7, rostliny linie SIMKKi po 14denním vystavení NaCl (200mM), detail kořenového systému (A), detail nadzemní části (B), měřítko 1 cm

Třetí pozorovanou linií byla transgenní linie GFP – FABD2. Stejně jako u předchozích linií i u této linie byl u rostlin na MS médiu pozorován vznik nových bočních kořenů, kořenových vlásků a celkový nárůst stávajícího kořenového systému. Také bylo zachováno zelené zbarvení stonku a listů rostlin (Obr. 9). Přírůstek v nadzemní části nebyl příliš pozorován. U rostlin na MS médiu s přidavkem NaCl (200 mM) bylo pozorováno hnědnutí a bělení listů. Hnědnutí kořenového systému, prodlužování kořenů či tvorba nových bočních kořenů pozorována nebyla, popř. byla velmi malá (Obr. 10). Celkový stav rostlin byl podobný stavu linie SIMKKi a tedy horší než u linie kontrolní.



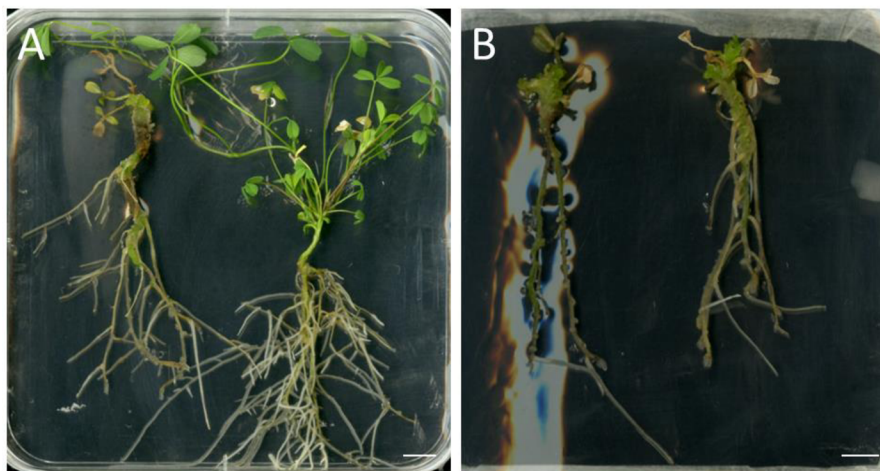
Obrázek 9. Rostliny linie GFP-FABD2 na MS médiu, den 0 (A), den 14 (B), měřítko 1 cm



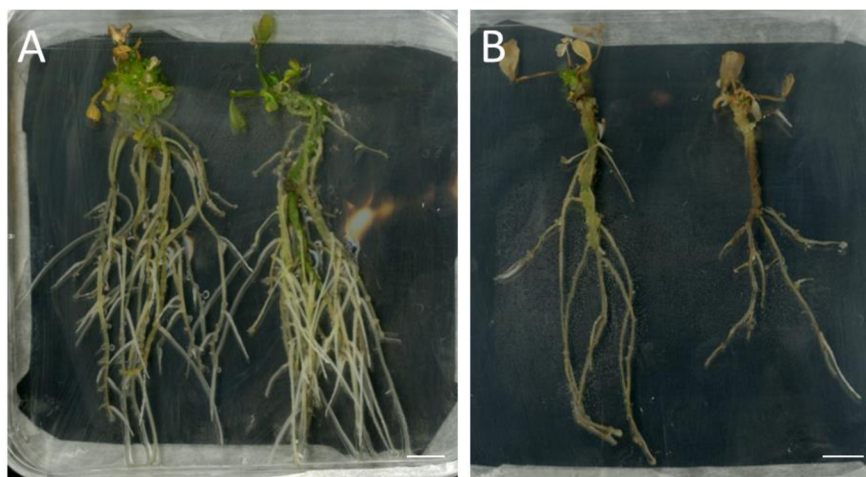
Obrázek 10. Rostliny linie GFP-FABD2, na MS médiu s přidavkem NaCl (200mM), den 0 (A), den 14 (B), měřítko 1 cm

Po dvou týdnech byly všechny rostliny přeloženy na nové MS médium a následně byla po dalších třech týdnech pozorována jejich adaptace. Rostliny umístěné původně na kontrolním MS médiu z linií RSY a SIMKKi (Obr. 11, 12) pokračovaly v intenzivní růstu, a to hlavně v případě kořenového systému. U rostlin linie RSY původně na médiu MS + NaCl (200 mM) byla adaptace lepší než u linie SIMKKi. U rostlin z linie GFP –

FABD2 nebylo možné zcela objektivně posoudit růst rostlin na MS či MS+ NaCl (200 mM) z důvodu rozsáhlé infekce (Obr. 13, 14).



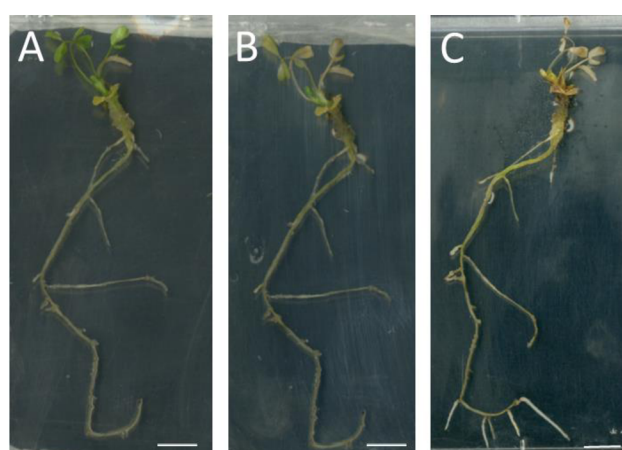
Obrázek 11. Rostliny linie RSY na MS médiu, původně na MS (A), původně na MS + NaCl (200mM) (B), měřítko 1 cm



Obrázek 12. Rostliny SIMKKi na MS médiu, původně na MS (A), původně na MS+ NaCl (200mM) (B), měřítko 1 cm



Obrázek 13. Rostliny GFP-FABD2 na MS médiu, původně na MS (A), původně na MS+ NaCl (200mM) (B), měřítko 1 cm



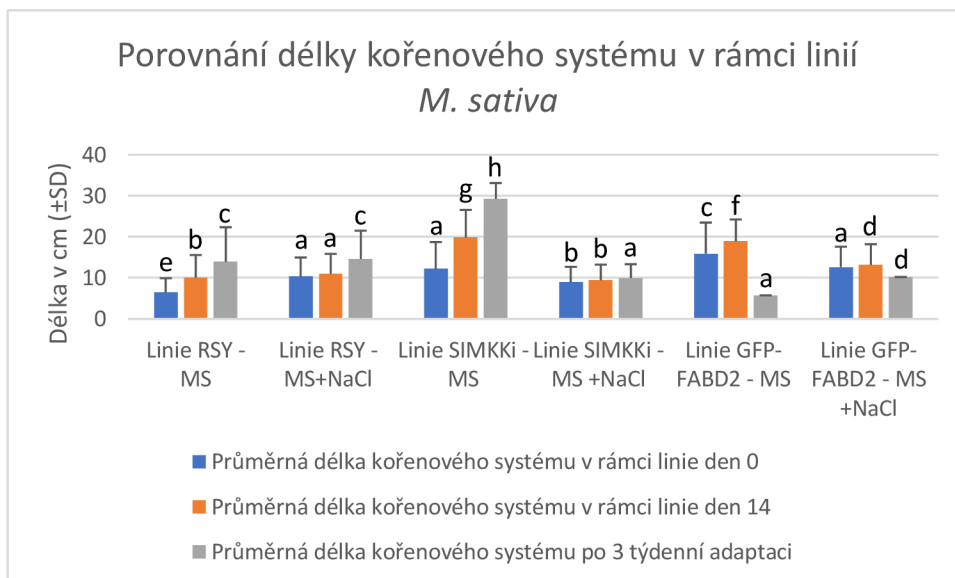
Obrázek 14. Rostlina GFP-FABD2, na MS+NaCl (200mM) médiu den 0 (A), na MS+NaCl (200mM) médiu den 14 (B), adaptace rostlin původně na MS+ NaCl (200mM) (C), měřítko 1 cm

4.3 Kvantitativní vyhodnocení reakcí rostlin *M. sativa* na dlouhodobý solný stres

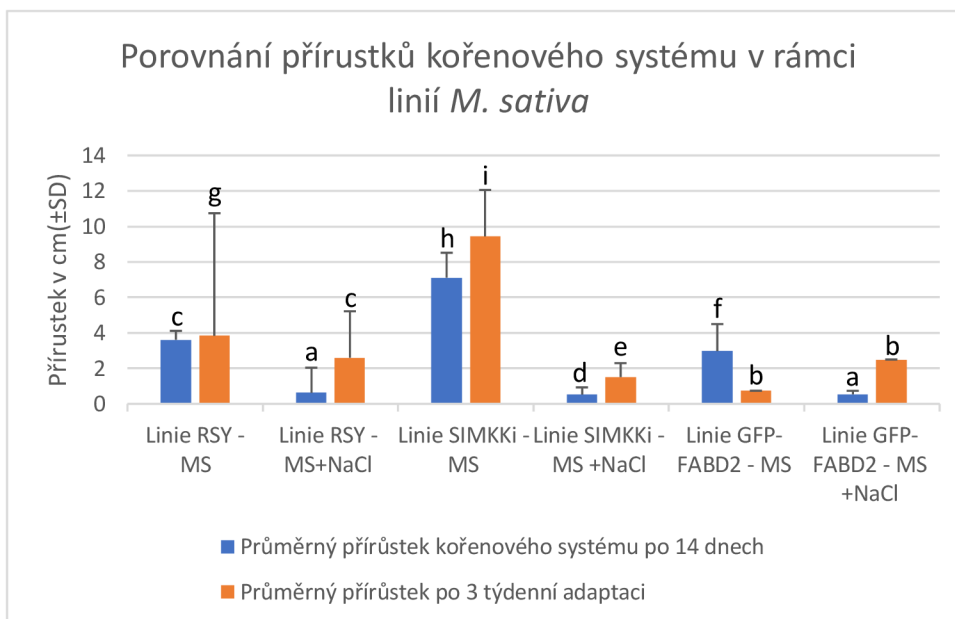
U experimentu, kdy byly rostliny *M. sativa* vystaveny dlouhodobému solnému stresu, byly fotograficky zdokumentovány rostliny linií RSY, SIMKKi a GFP-FABD2 a následně bylo provedeno měření celého kořenového systému pomocí programu ImageJ.

Byly měřeny pozorované rostliny umístěny na kontrolním MS médiu, v případě linie RSY a SIMKKi se jednalo o 6 rostlin a v případě linie GFP-FABD2 se jednalo o 7 rostlin. Druhá polovina rostlin byla umístěna na MS médium s přídavkem NaCl (200 mM), u každé linie bylo vyhodnoceno 6 rostlin. Celková délka kořenového systému byla změřena první den na daném médiu a následně 14 den. Délka kořenového systému byla opět změřena po přenosu všech rostlin na kontrolní médium, kde probíhala jejich adaptace po dobu 3 týdnů (Obr. 15). U linie GFP-FABD2 došlo ke kontaminaci, a z toho důvodu bylo možné změřit délku kořenového systému pouze v případě jedné rostliny, umístěné původně na kontrolním MS médiu a jedné rostliny původně umístěné na MS médiu s přídavkem NaCl (200 mM).

V rámci kvantitativního vyhodnocení byl rovněž vypočten přírůstek délky kořenového systému. Přírůstek délky kořenového systému byl pozorován u všech hodnocených rostlin. V případě rostlin, jež byly umístěny na kontrolním MS médiu po dobu 14 dnů byly přírůstky vyšší, než u rostlin na MS médiu s NaCl (200 mM). Nejvyšší přírůstky na MS médiu s NaCl (200 mM) vykazovali rostliny linie RSY, poté linie GFP-FABD2, a nejmenší přírůstky byly u linie SIMKKi. Po třítýdenní adaptaci na kontrolním MS médiu byl přírůstek u rostlin původně umístěných na MS médiu s NaCl (200 mM) největší u linie RSY. U rostlin původně umístěných na kontrolním MS médiu byl přírůstek nejvyšší u linie SIMKKi, poté u linie RSY, a nejmenší přírůstek byl u linie GFP-FABD2 (Obr. 16).



Obrázek 15. Graf porovnání délky kořenového systému u linií RSY, SIMKKi a GFP-FABD2, písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl (pokud se liší, jsou-li stejné tak nikoliv) při <math><0,05</math> stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem

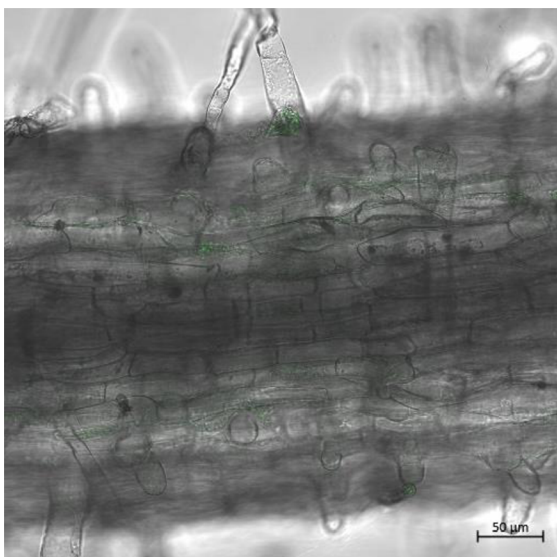


Obrázek 16. Graf porovnání přírůstku kořenového systému u linií RSY, SIMKKi a GFP-FABD2, písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl (pokud se liší, jsou-li stejné tak nikoliv) při <math><0,05</math> stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem

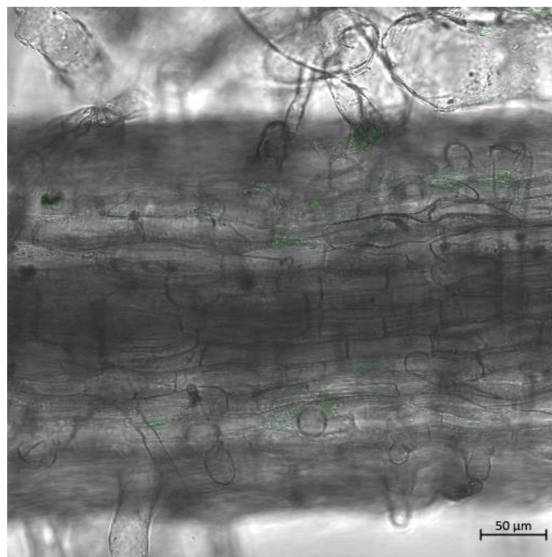
4.4 Kvalitativní vyhodnocení reakcí rostlin *M. sativa* na krátkodobý solný stres

Pro experiment, kde byly sledovány rostliny *M. sativa* vystavené krátkodobému solnému stresu, byly využity linie: RSY, SIMKKi, GFP-FABD2 a SIMKKi in GFP-FABD2. Ke sledování reakcí rostlin byla využita mikroskopická analýza. Sledována byla přítomnost plazmolýzy epidermálních buněk kořene u všech linií, a reakce aktinového cytoskeletu u transgenních linií s produkcí GFP-FABD2. Rostliny, kultivované na ztuženém MS médiu, byly umístěny do připravené mikroskopické komůrky obsahující tekuté MS médium. Po zdokumentování v kontrolním MS médiu pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu následovala výměna tohoto média za tekuté MS médium s obsahem NaCl (200 mM). V mikroskopické komůrce, obsahující MS médium s přídavkem NaCl (200 mM) byly rostliny udržovány po dobu 65 min, přičemž byly mikroskopicky dokumentovány v 10 min intervalech v procházejícím světle a při fluorescenční excitaci. Samotná doba snímání jednotlivých časosběrných záběrů v 3D nepřesáhla 5 minut.

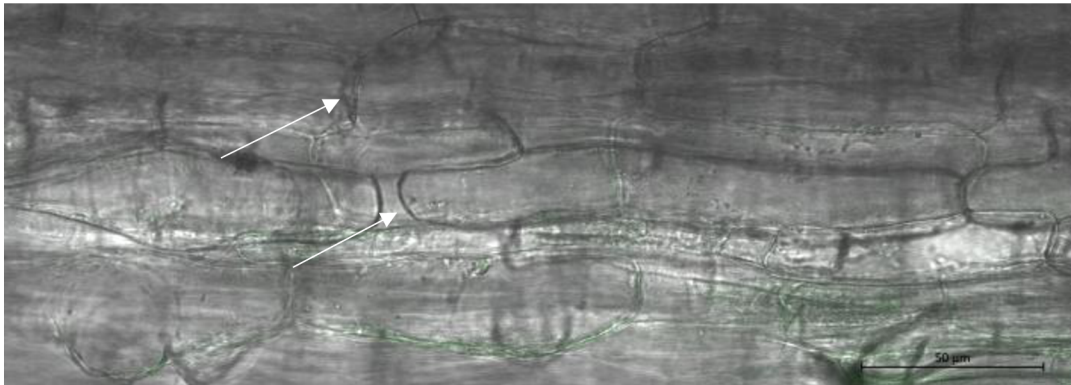
U linie RSY (Obr. 17,18,19) byla reakce na stres mírnější než u linie SIMKKi (Obr. 20,21,22). Linie GFP-FABD2 (Obr. 23,24,25,26) se také jevila odolnější než SIMKKi in GFP-FABD2 (Obr.27,28,29). Zaznamenanou reakcí na stres byla plazmolýza epidermálních buněk kořene, zpomalení pohybu aktinových vláken, či jejich svazkování. Aktinová vlákna byla pozorována jen u linií značených pomocí GFP-FABD2.



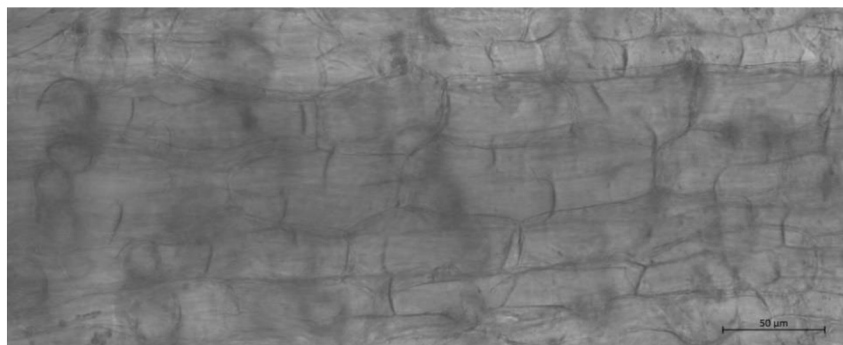
Obrázek 17. kořenové buňky linie RSY, v tekutém MS médiu



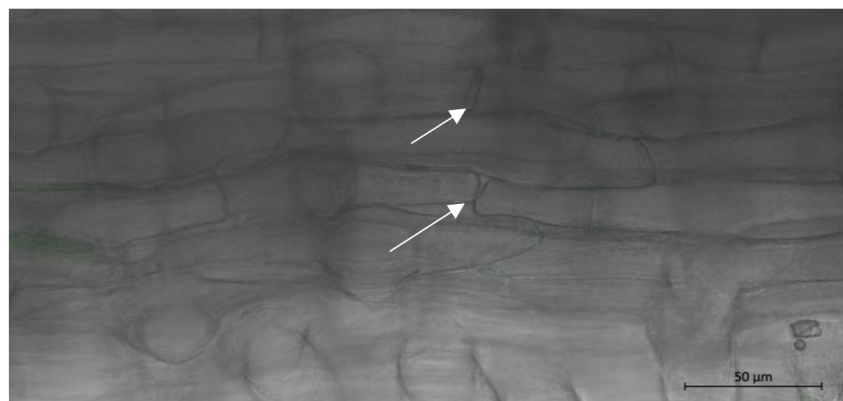
Obrázek 18. Kořenové buňky linie RSY, 60-65 minut v tekutém MS + NaCl (200mM)



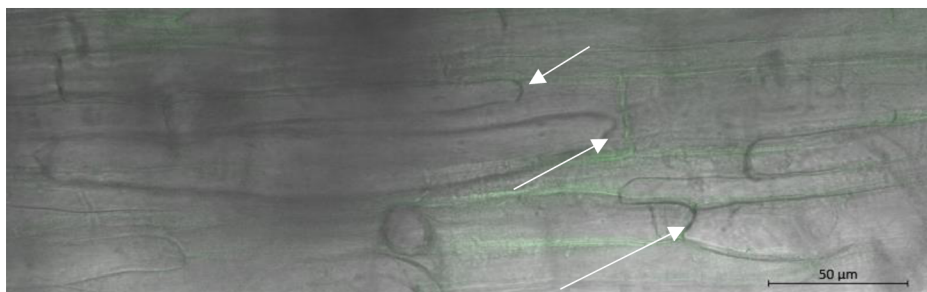
Obrázek 19. Detail kořenových buněk linie RSY, po 65minutách v tekutém MS+NaCl (200mM), šipky označují místa plazmolýzy



Obrázek 20. Kořenové buňky linie SIMKKi, v tekutém MS médiu



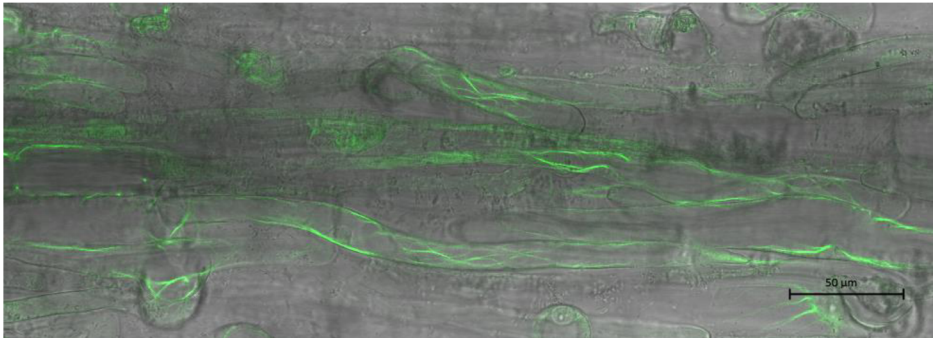
Obrázek 21. Kořenové buňky linie SIMKKi, po 60-65 minutách na MS+NaCl (200mM), šipky označují místa plazmolýzy



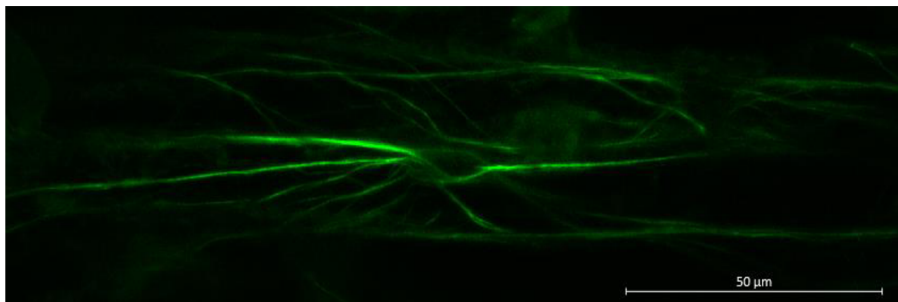
Obrázek 22. Kořenové buňky linie SIMKKi, po 65 minutách na MS+NaCl, detail plazmolýzy, šipkami jsou označena místa plazmolýzy

V případě linie RSY došlo k plazmolýze až po uplynutí 65 minut (Obr.19) a jen u malého množství buněk, přičemž většina kořenových buněk plazmolýzována nebyla. U linie SIMKKi byla plazmolýza pozorována již po 60 minutách (Obr.21) a po 65 minutách (Obr.22) byla plazmolýza pozorována u velkého množství buněk.

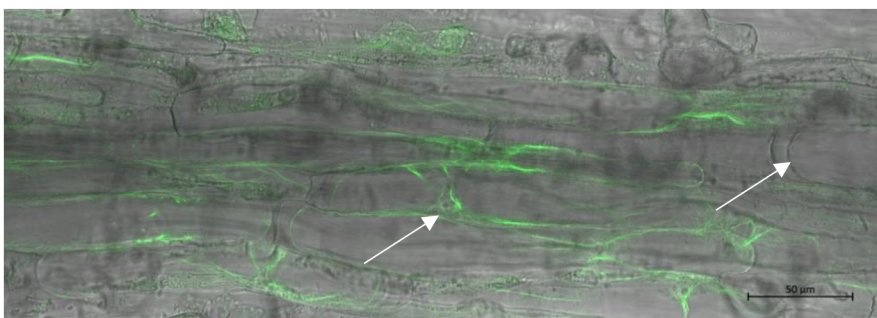
U linie GFP-FABD2 byla také pozorována plazmolýza u kořenových buněk, a to po uplynutí 65 minut (Obr.25). Dále bylo u této linie pozorováno chování aktinu před (Obr.24) a po vystavení solnému stresu – 200 mM NaCl (Obr.26).



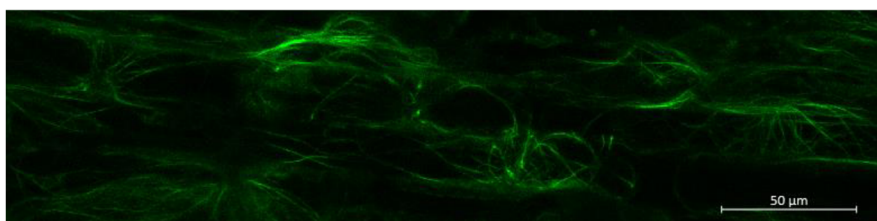
Obrázek 23. Kořenové buňky linie GFP-FABD2, v tekutém MS médiu



Obrázek 24. Detail kořenové buňky linie GFP-FABD2, pouze fluorescenční kanál, v tekuté MS médiu

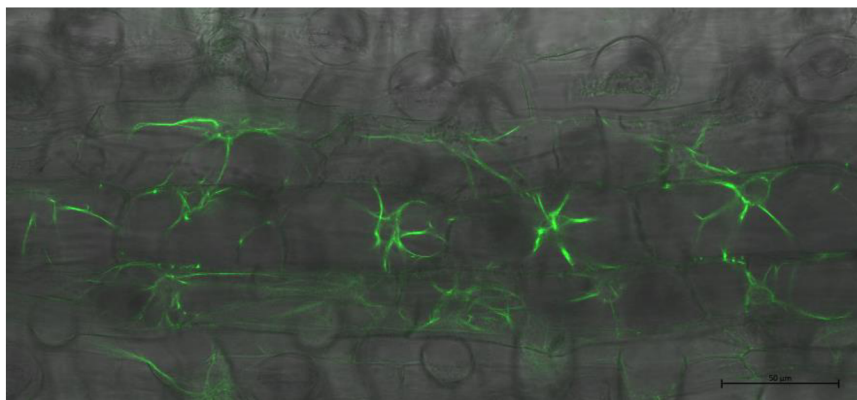


Obrázek 25 Kořenové buňky linie GFP-FABD2, po 65minutách, v tekutém MS + NaCl (200mM) médiu, šipka označuje místo plazmolýzy

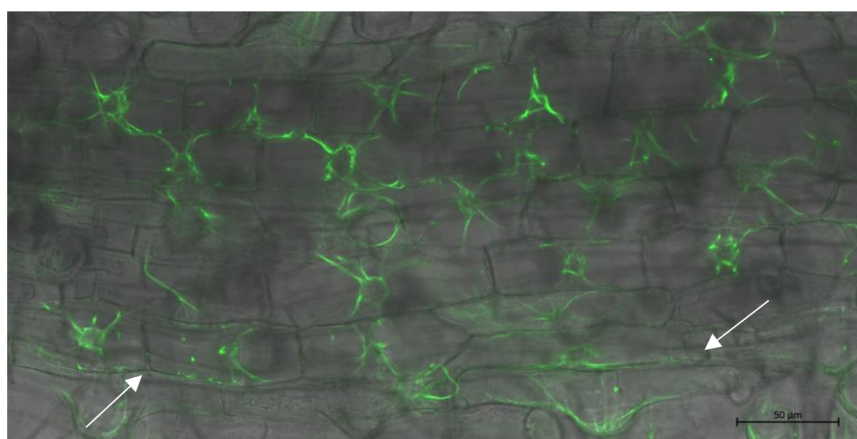


Obrázek 26. Kořenové buňky linie GFP-FABD2, reakce aktinu na solný stres po 65minutách pouze ve fluorescenčním kanálu, v tekutém MS + NaCl (200mM) médiu

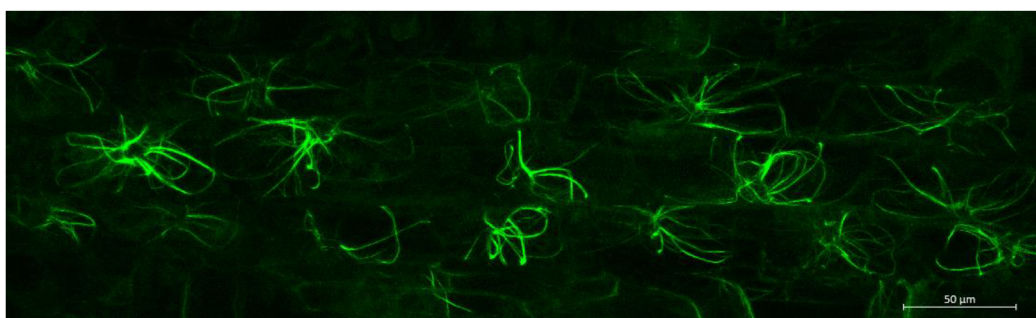
U linie SIMKKi in GFP-FABD2 byla pozorována plasmolýza již po 50 minutách (Obr. 28). Intenzivní reakce aktinu na solný stres ale byla u této linie pozorována až po 65 minutách (Obr. 29).



Obrázek 27. Kořenové buňky linie SIMKKi in GFP-FABD2, v tekutém MS médiu



Obrázek 28. Kořenové buňky linie SIMKKi in GFP-FABD2, po 50 minutách v tekutém MS +NaCl (200mM) médiu, šipkami jsou označena místa plasmolýzy



Obrázek 29. Kořenové buňky linie SIMKKi in GFP-FABD2, ve fluorescenčním kanálu po 65+ minutách v tekutém MS +NaCl (200mM) médiu

5. DISKUSE

Rostliny jsou jak známo přisedlé organismy, které jsou za svého života vystaveny množství stresů, a to biotických i abiotických. Příkladem často studovaného abiotického stresu je solný stres. U solného stresu je u rostlin vyvolán tzv. stres hyperosmotický. Tento stres má na rostlinné buňky silný osmotoxický vliv, což znamená, že vyvolává u rostlin hypo-osmotický stav. Solný stres má však i druhou složku a tou je iontová toxicita (Zhu, 2016; Zhu, 2002). Působení solného stresu pak může vyvolávat množství sekundárních efektů jako je např. snížení fotosyntetické aktivity, tvorba reaktivních forem kyslíku a snížení příjmu draselných kationtů, které jsou důležité pro uzavírání průduchů, dokonce i programovaná buněčná smrt (Serrano et al., 1999).

Abiotické stresy, jako je i stres solný, jsou rostlinami vnímány skrze aktivaci MAPK. Signální kaskády prostřednictvím mitogen – aktivovaných protein kináz (MAPK) u eukaryotních buněk tedy převádějí environmentální a vývojové podněty až k produkci intracelulárních odpovědí. U vojtěšky pak bylo zjištěno, že právě SIMK je solí a elicitory aktivovaná MAPK (Cardinale et al., 2002; Kyosseva, 2004; Cristina et al., 2010). Tato MAPK je aktivována při odpovědi na solný stres prostřednictvím SIMKK, což je jak známo stresem aktivovaná MAPK (Kiegerl et al., 2000; Bekešová et al., 2015). SIMK se nachází v jádře a cytoplazmě kořenových buněk, přičemž u kořenových vlásku byla pozorována její relokalizace do špičky rostoucích kořenových vlásků. SIMK pak společně s dynamickým aktinovým cytoskeletem reguluje u vojtěšky růst kořenových vlásků (Šamaj et al., 2002). Relokalizace SIMK a SIMKK pak byla vyvolána i solným stresem (Ovečka et al., 2014). V případě nadměrné exprese SIMK dochází k produkci delších kořenových vlásků, zatímco u linií s potlačenou expresí (SIMKK RNAi) dochází k tvorbě kořenových vlásku kratších (Hrbáčková et al., 2021).

V rámci této bakalářské práce bylo provedeno pozorování linií s potlačenou expresí SIMKK, a to bez i se značeným aktinem pomocí translační fúze FABD2 s GFP. V průběhu dlouhodobého experimentu se jevila odolnost rostlin těchto transgenních rostlin vystavených solnému stresu (200 mM NaCl) menší u rostlin kontrolních. Rovněž u rostlin SIMKKi s i bez značení aktinu, byla během krátkodobého experimentu, kdy byly tyto rostliny vystaveny 200 mM NaCl po dobu 65 minut, pozorována silnější reakce na solný stres u rostlin transgenních než u rostlin kontrolních. Tyto data podporují dříve diskutované informace o důležitosti SIMKK při reakci na solný stres. Dále byla u rostlin s vizualizací aktinu SIMKKi in GFP-FABD2 a GFP-FABD2 provedena mikroskopická

analýza. Zejména u rostlin SIMKKi in GFP-FABD2 byla pak pozorována zajímavá reakce aktinu na solný stres. Na rozdíl od kontrolní linie GFP-FABD2, docházelo zde k intenzivnímu zpomalení pohybu aktinu ale i k velmi intenzivnímu svazkování.

V rámci dlouhodobého experimentu byla také sledována adaptace rostlin kontrolních (RSY) i rostlin transgenních (SIMKKi, GFP-FABD2 a SIMKKi in GFP-FABD2), přičemž adaptace rostlin kontrolních se jevila jako úspěšnější. Tuto informaci by ale bylo vhodné potvrdit dalšími experimenty, a to zejména z důvodu poměrně malého počtu pozorovaných rostlin, způsobeného kontaminací u jedné z linií (GFP-FABD2) a také nutností doplnění více dat z linie SIMKKi in GFP-FABD2.

6. ZÁVĚR

Bakalářská práce byla rozdělena na část teoretickou a praktickou. Teoretická část byla zaměřena na problematiku vývojových a agronomicky zajímavých vlastností vojtěšky společně s jejím základním popisem. Popis vojtěšky také zahrnoval stádia ontogenetického vývoje a ekologický a zemědělský význam vojtěšky. Následně byl popsán proces somatické embryogeneze se zaměřením na nepřímou somatickou embryogenezi. Dále byly popisovány moderní metody a přístupy, jako jsou genetické úpravy a transgenóza. Byly rovněž popsány biotické a abiotické stresy a shrnuty známé reakce rostlin na tyto stresy. V neposlední řadě byly shrnuty informace o signálních drahách zprostředkovaných mitogenem-aktivovanými protein kinázami. Poslední kapitola shrnuje metody hodnocení fenotypu rostlin po aplikaci abiotických stresových faktorů.

V praktické části byly nejprve získány rostliny procesem nepřímé somatické embryogeneze. Získány byly rostliny z linií RSY, SIMKKi, GFP-FABD2 a SIMKKi in GFP-FABD2, přičemž byl tento proces fotograficky zdokumentován. Rostliny z linií RSY, SIMKKi a GFP-FABD2 byly použity pro dlouhodobý experiment, kdy byla polovina rostlin vystavena solnému stresu v podobě přidavku 200 mM NaCl do kultivačního média po dobu 14 dnů, zatímco druhá polovina rostlin byla kultivována na kontrolním médiu. Z výsledků vyplývá, že rostliny kontrolní linie RSY, vystavené solnému stresu v podobě 200 mM NaCl, měly nejvyšší přírůstky v rámci kořenového systému i po 3týdenní adaptaci po odeznění stresu. Linie SIMKKi a GFP-FABD2 vykazovala přírůstky kořenů menší při 14denním vystavení 200 mM NaCl, i v případě 3týdenní adaptace. U linie GFP-FABD2 během adaptace po odeznění stresu však došlo ke kontaminaci, a tak tyto výsledky nejsou zcela vypovídající. Výsledky krátkodobého experimentu podpořili teorii větší odolnosti linií RSY a GFP-FABD2 oproti liniím SIMKKi a SIMKKi in GFP-FABD2. U linií RSY a GFP-FABD2 nastala plazmolýza epidermálních buněk kořene pomaleji a v menším měřítku než u linií SIMKKi a SIMKKi in GFP-FABD2. Zde byla pozorována již po 50-60 minutách. Intenzivnější svazkování aktinu bylo pozorováno u linie SIMKKi in GFP-FABD2 v porovnání s linií GFP-FABD2. Získané výsledky mohou přispět k podrobnější charakterizaci těchto linií v naší laboratoři, přičemž bude nutné zopakování experimentů s větším množstvím rostlinného materiálu pro ověření výsledků.

7. SEZNAM LITERATURY

- Al-Snafi, A. E., Khadem, H. S., Al-Saedy, H. A., Alqahtani, A. M., & El-Saber, G. (2021). A review on *Medicago sativa*: A potential medicinal plant. *Int. J. Biol. Pharm. Sci. Arch*, 1, 22-33.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2016). Proteomics: technologies and their applications. *Journal of chromatographic science*, 1-15.
- Barnes, D. K. (1966). Flower color inheritance in diploid and tetraploid alfalfa: a reevaluation (No. 1353). US Department of Agriculture.
- Bass, L. N., Gunn, C. R., Hesterman, O. B., & Roos, E. E. (1988). Seed physiology, seedling performance, and seed sprouting. *Alfalfa and alfalfa improvement*, 29, 961-983.
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vyplelová, P., Ovečka, M., Luptovčíak, I., Illeš, P., Šamaj, J. (2015). Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Frontiers in plant science*, 6, 336.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., & Hirt, H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell*, 14(3), 703-711.
- Cristina, M. S., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 61, 621-649.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*, 61, 651-679.
- Eldakak, M., Milad, S. I., Nawar, A. I., & Rohila, J. S. (2013). Proteomics: a biotechnology tool for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 4, 35.
- Erickson, R. O. (1976). Modeling of plant growth. *Annual review of plant physiology*, 27(1), 407-434.
- Fedoroff, N. V., Battisti, D. S., Beachy, R. N., Cooper, P. J., Fischhoff, D. A., Hodges, C. N., ... & Zhu, J. K. (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century. *science*, 327(5967), 833-834.
- Goldberg, R. B., De Paiva, G., and Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266, 605-614.
- Gorbe, E., & Calatayud, A. (2012). Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: A review. *Scientia Horticulturae*, 138, 24-35.
- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., & Martínez-Trujillo, M. (2004). Transgenic plants: an historical perspective. *Transgenic plants: methods and protocols*, 3-31.
- Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4(4), 201-216.
- Hrabě F. a kol. (2004): *Trávy a jeteloviny v zemědělské praxi*. Nakladatelství Ing. Petr Baštan, Olomouc, ISBN 80-903275-1-6, 121stran.
- Hrbáčková, M., Luptovčíak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., ... & Šamaj, J. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal*, 19(4), 767-784.
- Chen, X., Ding, Y., Yang, Y., Song, C., Wang, B., Yang, S., Guo, Y., Gong, Z. (2021). Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. *Journal of integrative plant biology*, 63(1), 53-78.

- Jacobs, D. I., van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (2000). Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(5), 277-287.
- Jagodzik, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in plant science*, 9, 1387.
- Jalmi, S. K., & Sinha, A. K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. *Frontiers in plant science*, 6, 769.
- Jacobs, D. I., van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (2000). Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(5), 277-287.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H., & Meskiene, I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant cell*, 12(11), 2247-2258.
- Komis, George, Olga Šamajová, Miroslav Ovečka, and Jozef Šamaj. "Cell and developmental biology of plant mitogen-activated protein kinases." *Annual Review of Plant Biology* 69 (2018): 237-265.
- Kotulánová V. (2021). Fenotypická charakterizace kontrolních a transgenních rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) se sníženou expresí mitogenem-aktivovaných protein kináz [Bakalářská práce]. Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika
- Kumar, R., Bohra, A., Pandey, A. K., Pandey, M. K., & Kumar, A. (2017). Metabolomics for plant improvement: status and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1302.
- Kundan Singh Bora & Anupam Sharma (2011) Phytochemical and pharmacological potential of *Medicagosativa*: A review, *Pharmaceutical Biology*, 49:2, 211-220, DOI: 10.3109/13880209.2010.504732
- Kyosseva, S. V. (2004). Mitogen-activated protein kinase signaling. *International review of neurobiology*, 59, 201-220.
- Lai, F. M., Lecouteux, C. G., & McKersie, B. D. (1995). Germination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds and desiccated somatic embryos: I. Mobilization of storage reserves. *Journal of plant physiology*, 145(4), 507-513.
- Lin, L., Wu, J., Jiang, M., & Wang, Y. (2021). Plant mitogen-activated protein kinase cascades in environmental stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1543.
- Liu, Y. (2012). Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant cell reports*, 31, 1-12.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), e1005457.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 77.
- Ovečka, M., Hlaváčková, K., Samajova, O., Hrbáčková, M., & Šamaj, J. (2022). Genetic manipulation of stress-induced mitogen-activated protein kinase modulates early stages of the nodulation process in *Medicago sativa*. *bioRxiv*, 2022-11.

- Ovečka, M., Takáč, T., Komis, G., Vadovič, P., Bekešová, S., Doskočilová, A., & Šamaj, J. (2014). Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2335-2350.
- Pieruschka, R., & Schurr, U. (2019). Plant phenotyping: past, present, and future. *Plant Phenomics*.
- Radović, J., Sokolović, D., & Marković, J. J. B. A. H. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475.
- Rashmi, R., Sarkar, M., and Vikramaditya, T. (1997). Cultivaton of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Anc. Sci. Life* 17, 117–119
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K. Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., & Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5638-5643.
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345.
- Sangra, A., Shahin, L., Dhir, S. K. (2019). Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(8).
- Serrano, R., Mulet, J. M., Rios, G., Marquez, J. A., De Larrinoa, I. F., Leube, M. P., ... & Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of experimental botany*, 1023-1036.
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., & Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 196-203.
- Sun, T., & Zhang, Y. (2022). MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO reports*, 23(2), e53817.
- Šamaj, J., Ovečka, M., Hlaváčková, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkman, D., Bögre, L. and Baluška, F., et al. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth.
- Šamajová, O., Plíhal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., & Šamaj, J. (2013). Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances*, 31(1), 118-128.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(3), 805-818.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2011). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 3006–3019.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W. L., & Sheen, J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current opinion in plant biology*, 4(5), 392-400.
- Teuber, L. R., & Brick, M. A. (1988). Morphology and anatomy. Alfalfa and alfalfa improvement, 29, 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(8), 1265–1280.
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in plant science*, 14(6), 310-317.
- Van Emon, J. M. (2016). The omics revolution in agricultural research. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(1), 36-44.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., ... & Leung, J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more.... *Molecular plant*, 1(2), 198-217.
- West M, Harada JJ. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell*. 1993 Oct;5(10):1361-1369.
- Wuyts, N., Dhondt, S., & Inze, D. (2015). Measurement of plant growth in view of an integrative analysis of regulatory networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 90-97.
- Xu, J., & Zhang, S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in plant science*, 20(1), 56-64.
- Yao, J., Sun, D., Cen, H., Xu, H., Weng, H., Yuan, F., & He, Y. (2018). Phenotyping of Arabidopsis drought stress response using kinetic chlorophyll fluorescence and multicolor fluorescence imaging. *Frontiers in plant science*, 9, 603.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137(2), 293-300.
- Zhang, M., Su, J., Zhang, Y., Xu, J., & Zhang, S. (2018). Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 1-10.
- Zhang, M., & Zhang, S. (2022). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *Journal of integrative plant biology*, 64(2), 301-341.
- Zobel, A. M. (1989). Origin of Nodes and Internodes in Plant Shoots. I. Transverse Zonation of Apical Parts of the Shoot. *Annals of Botany*, 63(2), 201-208.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.

8. SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
ETI	z angl. effector-triggered immunity
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
IAA	kyselina indol-3-octová
JA	kyselina jasmonová
KIN	kinetin
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L.
MAP2K	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza
MAP3K	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza kináza
MAPK	mitogen-aktivovaná protein kináza
MAPKK	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza
MAPKKK	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza kináza
MEKK	mitogen-aktivovaná protein kináza kináza kináza
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	heptahydrát síranu horečnatého
MilliQ H ₂ O	purifikovaná voda technologií společnosti Millipore Corporation
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MS	Murashige and Skoog médium
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
PAMP	z angl. pathogen-associated molecular patterns
PTI	z angl. PAMP-triggered immunity
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
SA	kyselina salicylová
SIMK	solným stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kináza

SIMKK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kináza kináza
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina (z angl. transfer deoxyribonucleic acid)
Ti	tumor indukující (z angl. tumor inducing)
YDA	YODA, mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza

9. PŘÍLOHY

ANOVA										
Graf 1					Graf 2					
GFP-FABD2 MS adaptace 3 týdny	5,74400	****	****	****	a	SIMKKi - MS+NaCl 14. den	0,528833	****		d
RSY MS 0.den	6,47017	****			e	GFP-FABD2 - MS+NaCl 14. den	0,542333	****	****	a
SIMKKi MS+NaCl 0.den	8,90450	****	****		b	GFP-FABD2 - MS 3.tyden	0,565000	****	****	b
SIMKKi MS+NaCl 14.den	9,43333	****	****		b	RSY - MS+NaCl 14. den	0,630500	****	****	a
RSY MS 14.den	10,08100	****	****		b	SIMKKi - MS+NaCl 3. týden	1,515333	****	****	e
GFP-FABD2 MS+NaCl adaptace 3 týdny	10,21200	****	****	****	d	GFP-FABD2 - MS+NaCl 3. týden	2,499000	****	****	b
RSY MS+NaCl 0.den	10,36500	****	****		a	GFP-FABD2 - MS 14. den	2,658000	****	****	f
SIMKKi MS+NaCl adaptace 3 týdny	10,94867	****	****		a	RSY - MS+NaCl 3. týden	3,603500	****	****	c
RSY MS+NaCl 14. den	10,99550	****	****		a	RSY - MS 14. den	3,609167	****	****	c
GFP-FABD2 MS+NaCl 0.den	12,63383	****	****		a	RSY - MS 3. týden	3,843000		****	g
SIMKKi MS 0.den	12,71450	****	****		a	SIMKKi - MS 14. den	7,110500		****	h
GFP-FABD2 MS+NaCl 14. den	13,22117	****	****	****	d	SIMKKi - MS 3. týden	9,442333		****	i
RSY MS adaptace 3 týdny	13,92400	****	****	****	c					
GFP-FABD2 MS 0.den	14,27514	****	****	****	c					
RSY MS+NaCl adaptace 3 týdny	14,59900	****	****	****	c					
GFP-FABD2 MS 14. den	16,93314		****	****	f					
SIMKKi MS 14. den	19,82500			****	g					
SIMKKi MS adaptace 3 týdny	29,26733			****	h					

Příloha 1. Výstup z ANOVA analýzy použité pro grafy 1 a 2 v kapitole výsledky (označení Obrázek 15 a 16), graf 1 - měření kořenového systému rostlin *M. sativa* – linie RSY, SIMKKi a GFP-FABD2, graf 2- přírůstek kořenového systému po experimentu – 14. den a po 3.týdenní adaptaci.