

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



Hodnotenie regeneračného potenciálu kontrolných a transgénnych kultúr lucerny (*Medicago sativa* L.) *in vitro* po modifikáciách indukčného procesu

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Soňa Škodová
Študijný program:	B0512A130007 Biotechnológie a génové inžinierstvo
Študijný odbor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2022

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

V Olomouci dňa

.....

Podpis študenta

Pod'akovanie

„Chcem sa v prvom rade poďakovať môjmu vedúcemu práce pánovi prof. Mgr. Miroslavovi Ovečkovi, Ph.D. za vedenie mojej práce, cenné rady a venovaný čas, taktiež celému kolektívu katedry biotechnológií za pomoc a usmerňovanie pri práci. V poslednom rade ďakujem pánovi prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc., ako vedúcemu katedry za umožnenie využívať kvalitné laboratórne vybavenie.“

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Soňa Škodová
Názov práce	Hodnotenie regeneračného potenciálu kontrolných a transgénnych kultúr lucerny (<i>Medicago sativa</i> L.) <i>in vitro</i> po modifikáciách indukčného procesu
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Medicago sativa L. je významná, celosvetovo rozšírená plodina a krmovina. Jednou z najdôležitejších metód získavania a množenia kontrolných a transgénnych rastlín lucerny v *in vitro* podmienkach je nepriama somatická embryogenéza. Počas indukcie, vývoja a následného udržiavania somatických embryí v *in vitro* podmienkach je nutné využívať špeciálne kultivačné médiá s vhodným zložením. Cieľom bakalárskej práce bola indukcia somatickej embryogenézy z rastlín lucerny, konkrétne u línií RSY, GFP-FABD2 a *SIMKK RNAi*, po modifikáciách kultivačných podmienok a alternatívneho zloženia indukčných a kultivačných médií. Dosiahnuté výsledky prostredníctvom kvalitatívneho a kvantitatívneho vyhodnotenia embryogénneho a regeneračného potenciálu u týchto línií dokumentujú, že alternatívne zloženie indukčného a kultivačného média, spolu s modifikáciami svetelných podmienok počas kultivácie, môžu výrazne ovplyvniť regeneračný proces nielen morfológicky, ale aj z pohľadu efektivity získavania somatických embryí. Výsledky práce tak môžu byť ďalej využité v budúcnosti pri optimalizácii regenerácie lucerny *in vitro*.

Kľúčové slova	<i>Medicago sativa</i> L., somatická embryogenéza, embryogénny potenciál, kultivačné médiá
Počet strán	51
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Soňa Škodová
Title	Characterization of the regeneration potential in control and transgenic alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) <i>in vitro</i> after modification of the induction process
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

Medicago sativa L. is an important worldwide crop and forage. One of the most important methods for obtaining and propagating control and transgenic alfalfa plants under *in vitro* conditions is indirect somatic embryogenesis. For induction, development and following maintenance of somatic embryos *in vitro*, it is necessary to use special culture media with appropriate composition. The aim of this bachelor thesis was the induction of somatic embryogenesis from alfalfa plants, specifically in RSY, GFP-FABD2 and *SIMKK RNAi* lines, following modifications of culture conditions and alternative composition of induction and culture media. The results obtained through qualitative and quantitative evaluation of embryogenic and regenerative potential in these lines document that alternative composition of induction and culture media, together with modifications of light conditions during cultivation, can significantly affect the regeneration process not only morphologically, but also in terms of efficiency of somatic embryo acquisition. Thus, the results of this work can be further utilised in the future optimizing of the alfalfa regeneration *in vitro*.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> L, somatic embryogenesis, embryogenic potential, culture media
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	3
2.1	Základný popis druhu <i>Medicago sativa</i> L.	3
2.1.1	Koreň.....	3
2.1.2	Stonka.....	3
2.1.3	List	4
2.1.4	Kvet.....	4
2.1.5	Plod a semeno	4
2.2	Význam Lucerny siatej v poľnohospodárstve	5
2.3	Embryogenéza	5
2.3.1	Somatická embryogenéza.....	6
2.3.2	Somatické embryo.....	8
2.4	Zložky kultivačných médií	9
2.4.1	Anorganické látky	9
2.4.2	Organické látky	10
2.4.3	Rastové regulátory	11
2.5	Transgenóza u rastlín a využívané transformačné techniky u <i>M. sativa</i>	11
2.5.1	Transformácia sprostredkovaná <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.5.2	Transformácia metódou elektroporácie.....	12
2.5.3	Transformácia metódou bombardovania mikročasticami	13
2.6	Signálne procesy v rastlinách	14
2.6.1	Účasť MAPK v regulácii vývojových procesov	16
2.6.2	Účasť MAPK v reakciách na abiotické stresové faktory	16
2.6.3	Účasť MAPK v reakciách na biotické stresové faktory	17
2.6.4	Transdukcia signálov v rastlinách <i>M. sativa</i> L.....	18
2.7	Metódy vyhodnocovania regeneračného potenciálu u kultúr <i>in vitro</i>	19
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
3.1	Materiál	21
3.1.1	Použité chemikálie	21
3.1.2	Použité prístroje	26
3.2	Metódy.....	27
3.2.1	Príprava B5H média.....	27
3.2.2	Príprava B50 média.....	27
3.2.3	Príprava MMS média	28

3.2.4	Príprava MS média.....	28
3.2.5	Príprava SH4K média	28
3.2.6	Príprava BOi2Y média	29
3.2.7	Indukcia nepriamej somatickej embryogenézy <i>M. sativa</i>	29
3.2.8	Vyhodnocovanie a spracovanie výsledkov	30
4	VÝSLEDKY	31
4.1	Kvalitatívna dokumentácia procesu kalogenézy	31
4.2	Kvalitatívne vyhodnotenie embryogénneho potenciálu	33
4.3	Kvalitatívne vyhodnotenie regeneračného potenciálu.....	37
4.4	Kvantitatívne vyhodnotenie embryogénneho potenciálu	38
5	DISKUSIA	41
6	ZÁVER	43
7	LITERATÚRA.....	44
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	50

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Vypracovanie rešerše zameranej na:

- základný popis lucerny, štádiá ontogenetického vývoja a význam lucerny v poľnohospodárstve
- podiel signálnych dráh a signálnych proteínov na regulácii vývojových procesov lucerny a reakcií na stresové podmienky
- metódy transgenózy u lucerny k získaniu geneticky modifikovaných línií
- spôsoby indukcie a získavanie rastlín lucerny *in vitro*, význam zloženia kultivačného média, typ explantátov a modifikácia kultivačných podmienok
- metódy vyhodnocovania regeneračného potenciálu kultúr lucerny *in vitro*

Praktická časť

- experimenty zamerané na indukciu kontrolných a transgénnych rastlín lucerny v podmienkach *in vitro* prostredníctvom modifikácie kultivačných podmienok a s využitím alternatívneho zloženia kultivačných médií
- kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie embryogénneho a regeneračného potenciálu indukovaných kontrolných a transgénnych kultúr lucerny *in vitro*

1 ÚVOD

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je viacročná tetraploidná rastlina, ktorá sa radí do oddelenia magnóliorasty, triedy dvojklíčnolistové, čeľade bôbovité a rodu lucerna (Rashmi et al., 1997). Vyskytuje sa vo vlhkejších aj suchších oblastiach, vďaka hlbokému zakoreneniu, ktoré zväčšuje absorpčný povrch koreňa, vytvára podmienky na interakcie s pôdnymi symbiotickými baktériami. Morfológia lucerny je charakteristická polo-vzpriamenou stonkou, z ktorej vyrastajú trojpočetné listy s perovitou žilnatinou a zúbkovaným okrajom. Kvet lucerny je obojpohlavný, sfarbený do modro-fialova (Radović et al., 2009).

Lucerna má dôležitý význam v poľnohospodárstve a je považovaná za jednu z najdôležitejších celosvetovo rozšírených plodín a krmovín, vďaka vysokému obsahu vitamínov, proteínov, minerálov a enzýmov. Ďalší dôležitý význam tohto druhu je daný schopnosťou vytvárať symbiotický vzťah s pôdnymi baktériami schopnými fixovať vzdušný dusík. Tento vzťah zabezpečuje zdroj dusíka pre samostatnú rastlinu, ale má aj melioračný význam pre kvalitu pôdy a ostatné rastliny (Ebert, 2007; Radović et al., 2009).

Významným spôsobom regenerácie a množenia rastlín je somatická embryogenéza, teda proces dediferenciácie somatických buniek a ich následná diferenciácia na somatické embryá, ktoré sú bipolárne a morfológicky podobné zygotickým embryám (Fehér, 2019; Méndez-Hernández et al., 2019). Somatická embryogenéza sa vo všeobecnosti rozlišuje na priamu a nepriamu, a využitie nachádza pri rozmnožovaní rastlín, skúmaní rôznych vývojových procesov, či v genetickom inžinierstve (Iantcheva et al., 2005; Zhou et al., 2016). Kľúčovými faktormi indukcie somatickej embryogenézy sú kultivačné prostredie, fyziologické štádium rastlín a taktiež vek a veľkosť explantátov (Iantcheva et al., 2005).

Rastliny pestované v *in vitro* podmienkach pre optimálny rast potrebujú kultivačné médiá obsahujúce potrebné živiny, čo kompenzuje neprítomnosť endospermu. Medzi hlavné zložky kultivačných médií patria anorganické látky, organické látky, zdroj uhlíka, vitamíny, rastové regulátory (Gamborg et al., 1976; Tichá et al., 2020).

Vplyvom meniacich sa podmienok prostredia, ktoré negatívne ovplyvňujú vývoj a produkčné parametre rastlín, je snaha o ich vylepšenie v oblasti rezistencie, kvality a produktivity formou transformačných metód. Pri týchto metódach dochádza k vkladaniu cudzích rekombinantných génov do rastlín, ktorých expresia poskytnú rastline požadované vlastnosti (Ahmad et al., 2012; Jhansi Rani & Usha, 2013). Rastliny sú ale

voči určitým meniacim sa podmienkam a vonkajším vplyvom schopné vyvolávať obranné reakcie aj pomocou mitogén-aktivovaných proteínkináz (MAPK), čo sú moduly signálnych dráh, schopné sprostredkovať tieto signály (Ligterink & Hirt, 2001; Šamajová et al., 2013).

Bakalárska práca sa zameriava na produkciu kontrolných rastlín *M. sativa* kontrolného genotypu RSY a transgénnych rastlín *M. sativa* línií GFP-FABD2 a *SIMKK RNAi* v podmienkach *in vitro* pomocou nepriamej somatickej embryogenézy pri modifikáciách kultivačných podmienok a zloženia kultivačných médií. V druhej časti sa bakalárska práca venuje kvantitatívnemu a kvalitatívnemu vyhodnoteniu embryogénneho a regeneračného potenciálu týchto rastlín pomocou metód analýzy fenotypu a vhodného počítačového spracovania výsledkov.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Základný popis druhu *Medicago sativa* L.

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.), známa aj ako alfalfa, sa zaraďuje do oddelenia magnóliorasty (*Magnoliophyta*), triedy dvojkličnolistové (*Dicotyledonae*), čeľade bôbovité (*Fabaceae*) a rodu Lucerna (*Medicago*). Rod Lucerna zahrňuje jednoročné aj viacročné druhy. Konkrétny druh *Medicago sativa* L. je viacročná rastlina. Predpokladá sa, že kultivovaná forma lucerny sa rozšírila do jednotlivých krajín Ázie, Európy a Ameriky zo západnej Perzie (Rashmi et al., 1997). Vďaka hlbokému zakoreneniu rastie vo vlhkejších aj v suchších oblastiach, vo viac ako 80 krajinách sveta, čo zodpovedá rozlohe väčšej ako 35 miliónov ha (Radović et al., 2009). Lucerna siata je tetraploidná ($2n = 4n = 32$) rastlina s 8 chromozómami a s veľkosťou genómu 800 – 1000 Mbp (Hawkins and Yu, 2018).

2.1.1 Koreň

Pre lucernu je typická rozsiahla koreňová sústava, ktorá môže siahať do hĺbky 2 – 4 metre čo umožňuje dobrý prísun živín (Kizeková, 2020). Apikálny meristém radikuly dáva základ anatomickej štruktúre primárneho koreňa, ktorá pozostáva z epidermis, kortexu a stély. Z hlavného koreňa vyrastajú bočné korene, ktoré ďalej vytvárajú tenšie bočné korene vyššieho rádu, nachádzajúce sa prevažne vo vrchných vrstvách pôdy (Hrabě, 2004). Dôležitou súčasťou koreňa sú koreňové vlásky vyrastajúce z epidermálnych buniek. Majú funkciu v zväčšovaní absorpčného povrchu koreňa a taktiež slúžia na prichytenie symbiotických baktérií (Teuber & Brick, 1988).

2.1.2 Stonka

Stonka rastie predovšetkým meristemickou aktivitou výhonkového vrcholu a následným predlžovaním buniek, pričom delenie, predlžovanie a diferenciácia buniek v tejto oblasti dáva vznik epidermálnym, kortikálnym a vaskulárnym pletivám. Iniciácia rastu stonky začína aj v púčikoch na koreňovom krčku, čo je bazálna časť stonky priamo priliehajúca ku koreňu. Longitudinálne je stonka tvorená z nódov (stonkové uzly) a z internódií (stonkové články). Internódiá sú časti stonky medzi dvomi uzlami a nódy (uzly) sú oblasti, z ktorých vyrastajú listy, bočné vetvy, alebo kvety (Zóbel, 1989). Anatomickou súčasťou stonky sú cievne zväzky, ktoré sú v prípade lucerny kolaterálne (Teuber & Brick, 1988). Mladá stonka má na priečnom priereze takmer štvorcový tvar. Na jednej rastline sa môže vyvíjať až niekoľko býľ, ktoré sú vzpriamené alebo polovzpriamené a dorastajú do dĺžky až 1 metra (Hrabě, 2004).

2.1.3 List

Listy lucerny sú stopkaté a trojpočetné, pričom stredný list je najdlhší. Avšak prvé listy vyrastajúce z epikotylu sú jednopočetné s oválnym tvarom a palistami na listovej báze. Jednotlivé čepele lístkov môžu mať okrúhly, elipsovité či vajcovité tvar, kde horná polovica listu je zvyčajne užšia. Charakteristickým znakom lístkov je zúbkovaný okraj v ich hornej časti a tmavozelené sfarbenie (Hrabě, 2004). Listy sa vyznačujú perovitou žilnatinou.

2.1.4 Kvet

Kvet lucerny je obojpohlavný a je v ňom prítomný jeden piestik a desať tyčiniek, kde jedna z nich je voľná a zvyšných deväť je zrastených. K zaisteniu vysokej biologickej hodnoty potomstva je u druhu *M. sativa* preferované cudzoopelenie. Kvet je tvorený kalichom s kališnými lístkami a korunou, ktorá sa skladá z piatich plátkov. Dva plátky sú zrastené a vytvárajú člnok, dva voľné tvoria krídla a posledný, a zároveň najväčší, je vrchný korunný plátok (Hrabě, 2004). Okvetie lucerny je tvorené 12 – 15 modro-fialovými kvietkami (Hájková, 2015).

2.1.5 Plod a semeno

Plodom lucerny je mnohosemenný struk, v ktorom sa vyvíjajú semená. Množstvo semien vo vnútri struku, jeho tvar, veľkosť a štruktúra sa líši v závislosti od druhu lucerny (Hrabě, 2004). Tvar semien je nepravidelný, skoro obličkovitý, ovplyvnený strukom a ďalšími vonkajšími vplyvmi, ktoré pôsobia počas dozrievania. Čo sa týka veľkosti, tak zrelé semená sú 1 – 2 mm dlhé, 1 – 2 mm široké a hrubé približne 1 mm pričom platí, že obvykle sú dvakrát viac dlhé ako široké. Farba semien je v škále žltej, olivovo zelenej až hnedej. Na povrchu semena sa nachádza osemenie (testa) pozostávajúca z palisádových buniek a obalená kutikulou tvorenou kutinom (Teuber & Brick, 1988). Obal semena býva tvrdý, čo môže spôsobiť fyzickú dormanciu semien, a tak skomplikovať schopnosť semien napučať počas hydratácie a rovnomerne vyklíčiť. Množstvo takýchto semien môže dosahovať až 60-70%. Stav dormancie spôsobenej tvrdosemennosťou sa dá narušiť stratifikáciou semien, čo je proces prípravy semien pred vyklíčením simulovaním prírodných podmienok. Tento proces je zameraný primárne na zmenu teploty alebo vlhkosti. Starnutie semena ovplyvňuje jeho farbu, pre mladé semená je typická žltohnedá až svetlohnedá, zatiaľ čo staršie semená sú tmavšie a matnejšie (Hrabě, 2004).

2.2 Význam Lucerny siatej v poľnohospodárstve

Na základe vysokého obsahu vitamínov, proteínov, minerálov a enzýmov je lucerna jedna z najdôležitejších celosvetovo rozšírených plodín a krmovín. Obsah vitamínov zahŕňa hlavne vitamíny A, E a C. Využíva sa najmä ako potrava pre prežúvavce, napr. pre hovädzí dobytok, kone, ovce, vtáky, ale aj pre iné druhy zvierat. Vďaka obsahu živín tak podporuje ich správny rozvoj a rast (Radović et al., 2009).

Ďalší význam tejto plodiny spočíva v schopnosti tvoriť symbiotický vzťah s pôdnymi baktériami, schopnými fixovať vzdušný dusík. Baktérie spolu s koreňmi vytvárajú hľúzky, v ktorých menia vzdušný dusík na formu, ktorú je rastlina schopná spracovať. Tento symbiotický vzťah zabezpečuje zdroj dusíka pre hostiteľskú rastlinu lucerny, avšak má aj melioračný význam, pretože dochádza aj k obohateniu okolitej pôdy dusíkom, čo je prospešné pre ostatné rastliny (Ebert, 2007). To vedie k zlepšeniu rastu a zvýšeniu ich úžitkovosti a úrodnosti. Toto je využiteľné ako agrotechnický postup pri striedaní výsadby rôznych druhov rastlín na rovnaké miesto. Pri kultivácii iného druhu rastlín na mieste, kde bola predtým pestovaná lucerna, je nutnosť hnojenia chemickými hnojivami výrazne nižšia práve vďaka spomínanému symbiotickému vzťahu lucerny, ktorý dané miesto obohatil o dusík v dostupnej forme.

2.3 Embryogenéza

Embryogenéza rastlín je proces iniciácie a vývoja zrelého embrya (zárodku) z prekurzorovej bunky (de Vries & Weijers, 2017). Prekurzorovou bunkou môže byť zygóta, tento proces však môže byť iniciovaný aj z iných buniek reprodukčného aparátu, alebo zo somatických buniek (Méndez-Hernández et al., 2019). K zygotickéj embryogenéze prirodzene dochádza po oplodnení vajíčkovej bunky spermatickou bunkou pochádzajúcou z peľu (de Vries & Weijers, 2017; Radoeva & Weijers, 2014). Tento proces spúšťa preprogramovanie vzniknutej zygóty, čo vedie k začatiu ďalších krokov vývoja embrya. Naopak, pri somatickej embryogenéze vznikajú asexuálne somatické embryá, morfológicky podobné zygotickým, avšak pôvodom z vegetatívnych (somatických) buniek rastliny (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). Proces embryogenézy môže pozostávať z troch samostatných fáz. Prvou fázou je morfogénéza, pri ktorej dochádza k vzniku embryonálnych buniek a pletív, zakladá sa vzor budúceho vývoja a organizácie orgánov. V druhej fáze embryo dozrieva a akumulujú sa v kľúčnych listoch embrya, alebo v endosperme semena, zásobné látky. Počas poslednej fázy embryo

vstupuje do metabolicky pokojového stavu, dochádza k zastaveniu vývoja, vysušeniu a dormancii (West & Harada, 1993).

2.3.1 Somatická embryogenéza

História indukcie somatickej embryogenézy u rastlín siaha do päťdesiatych rokov 20. storočia, kedy bola prvýkrát popísaná produkcia somatických embryí z kalusu mrkvy. To viedlo k búrlivému vývoju celej vednej oblasti regenerácie rastlín z bunkových kultúr *in vitro* (Zimmerman, 1993). Kľúčovým faktorom k uskutočneniu somatickej embryogenézy je totipotencia somatických rastlinných buniek, ktorá predstavuje schopnosť re-iniciácie bunkového delenia z diferencovaného stavu, čo postupne vedie k možnosti vytvoriť úplne novú rastlinu (Fehér, 2019). Za vhodných podmienok predstavuje somatická embryogenéza účinný nástroj na rozmnožovanie rastlín v kombinácií s genetickým inžinierstvom, a taktiež umožňuje skúmanie regulačných mechanizmov a morfogénnych procesov (Zhou et al., 2016). Somatická embryogenéza môže prebiehať prirodzene *in vivo*, kedy sa tvoria somatické embryá priamo na vegetatívnych orgánoch rastliny. Podstatne väčší význam však má somatická embryogenéza *in vitro* z častí vegetatívnych orgánov, alebo aj z jednotlivých somatických buniek po zabezpečení potrebných podmienok (Radoeva & Weijers, 2014). Príkladom *in vivo* typu somatickej embryogenézy je sukulentná rastlina *Kalanchoë daigremontiana*, u ktorej sa somatické embryá tvoria pozdĺž okrajov listov, a po vytvorení koreňového systému sa oddelia od materského listu a pokračujú v raste už ako samostatná rastlina (Garcês & Sinha, 2009). Efektivita aj samotná schopnosť somatickej embryogenézy je druhovo-špecifická, teda sa líši v závislosti od rastlinných druhov a ich jednotlivých kultivarov. Zatiaľ čo u niektorých iných rastlinných druhov je indukcia somatickej embryogenézy závislá na type explantátu, somatickú embryogenézu lucerny je možné indukovať zo všetkých častí rastliny (Tichá et al., 2020). Vo všeobecnosti sa rozlišuje priama a nepriama somatická embryogenéza. Kultivačné prostredie, fyziologické štádium rastlín, a taktiež vek a veľkosť explantátov, sú kľúčovými faktormi pre indukciu a efektivitu somatickej embryogenézy (Iantcheva et al., 2005).

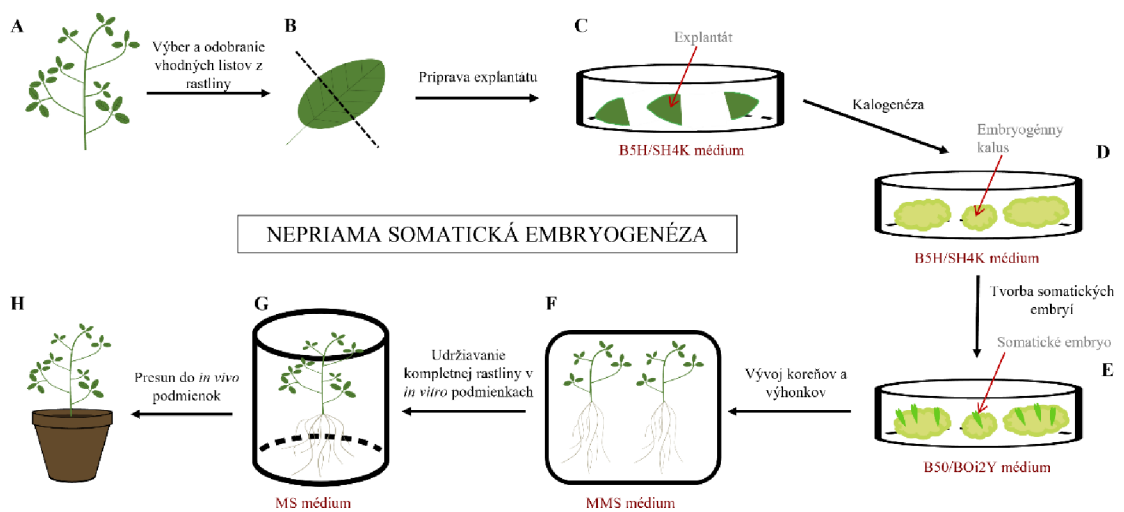
2.3.1.1 Priama somatická embryogenéza

V priamej somatickej embryogenéze sú somatické embryá tvorené priamo z buniek explantátu, s vynechaním fáze tvorby nediferencovaného kalusu (Merkle et al., 1990). Vo všeobecnosti je tento spôsob ľahšie indukovateľný zo somatických buniek, ktoré nie sú až tak ontogeneticky vzdialené od embryonálneho štádia, alebo sú oproti vysoko

diferencovaným vegetatívnym bunkám, ktoré na túto zmenu vyžadujú veľké epigenetické zmeny, stále ešte v meristematicky-aktívnom stave (Brown & Atanassov, 1985).

2.3.1.2 Nepriama somatická embryogenéza

Nepriama somatická embryogenéza (Obr.1) je viacstupňový proces zahŕňajúci tvorbu neorganizovanej a nediferencovanej bunkovej štruktúry (kalusu), z ktorej sa postupne vytvárajú somatické embryá (Von Arnold et al., 2002). Proces somatickej embryogenézy vždy začína výberom vhodného typu explantátu, ktorý musí byť ošetrený vhodnou sterilizáciou. V prípade lucerňy sú ako explantáty najčastejšie využívané horizontálne narezané segmenty mladých listov. Sterilná kultivácia začína na médiu indukujúcom kalogenézu (B5H, SH4K), ktoré je obohatené o hormóny. Po indukcii kalusu sú kultúry prenášané na médium indukujúce tvorbu somatických embryí bez obsahu hormónov (B50, BOi2Y). Vyvinuté somatické embryá sú následne presunuté na médium podporujúce tvorbu koreňov (MMS), a nakoniec na médium určené na vývoj mladých rastlín (MS). Kompletne vyvinuté rastliny môžu byť ďalej pestované *in vitro* podmienkach alebo presunuté do vhodného substrátu na aklimatizáciu do *in vivo* podmienok (Tichá et al., 2020).

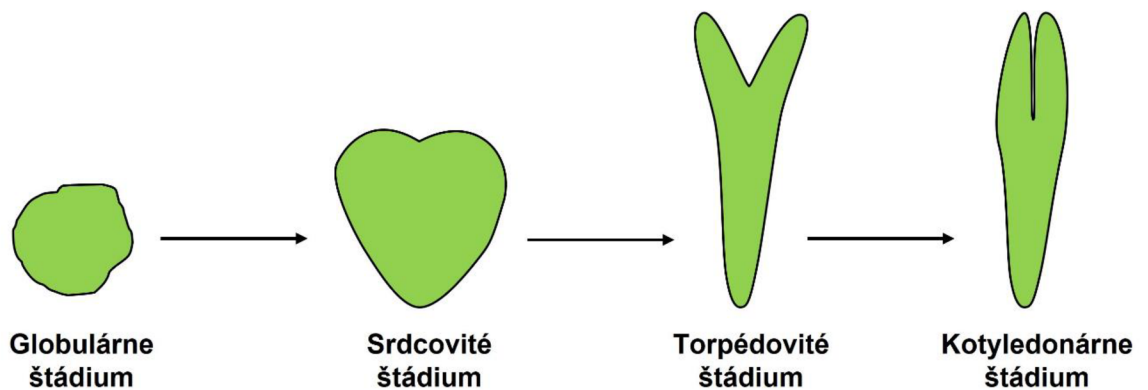


Obrázok 1. Schematické znázornenie nepriamej somatickej embryogenézy u *Medicago sativa*. Donorová rastlina pochádzajúca z *in vitro* podmienok (A), explantát z mladého listu (B), umiestnený na Petriho misku s B5H/SH4K médiom (C), indukcia kalogenézy (D), Petriho miska s médiom B50/BOi2Y, obsahujúca embryogénny kalus so somatickými embryami (E), vývoj mladých rastliniek na MMS médiu (F), udržiavanie komplexných mladých rastliniek na MS médiu (G), a dospelá rastlina v *in vivo* podmienkach (H).

2.3.2 Somatické embryo

Somatické embryo sú bipolárne štruktúry morfoloicky podobné zygotickým embryám, avšak líšiac sa od nich pôvodom vzniku a aj samotným vývojom. Na rozdiel od zygotických embryí, ktoré sú vyživované prostredníctvom vodivých pletív materského organizmu, somatické embryo využívajú exogénny prísun živín z kultivačného média (Méndez-Hernández et al., 2019). Somatické embryo vznikajú zo somatických rastlinných buniek, ktoré sa bežne nepodieľajú na vývoji embryí. Somatické embryo sa môže vytvoriť z jednej somatickej bunky procesom priamej somatickej embryogenézy, alebo zo skupiny embryogénnych buniek procesom nepriamej somatickej embryogenézy (Sahoo, 2018). V rámci vývoja prechádzajú somatické embryo globulárnym, srdcovitým, torpédovitým a kotyledonárnym štádiom (Obr.2), ktoré sú podobné vývojovým štádiám zygotickej embryogenézy (Sangra et al., 2019).

Vývojové štádia rastlinného somatického embrya



Obrázok 2. Schéma vývojových štádií rastlinného somatického embrya: globulárne štádium, srdcovité štádium, torpédovité štádium, kotyledonárne štádium.

2.4 Zložky kultivačných médií

Rastliny, ich pletivá a orgány pestované v *in vitro* podmienkach potrebujú špeciálne média, ktoré im dodávajú živiny potrebné pre ich vývoj a rast. Charakter jednotlivých kultivačných médií výrazne ovplyvňuje úspešný rast a množenie rastlín kultivovaných *in vitro* (George et al., 2008). Základnými zložkami kultivačných médií pre optimálny rast a efektívnu indukciu somatickej embryogenézy sú anorganické látky, organické látky, zdroj uhlíka, vitamíny a rastové regulátory. V prípade lucerny je vhodné zloženie kultivačných médií determinujúcim faktorom, ktorý kompenzuje neprítomnosť endospermu, hlavného zdroja živín a rastových regulátorov v zygotických semenách (Gamborg et al., 1976; Tichá et al., 2020).

2.4.1 Anorganické látky

Rastliny pre svoj rast a vývoj vyžadujú 17 esenciálnych látok. Na základe vyžadovaného množstva sa tieto látky delia na mikro- a makroživiny (mikro- a makroelementy). Makroživiny sú zložky potrebné pre rastliny vo vysokých koncentráciách (väčších ako 0,5 gramu na liter), zatiaľ čo mikroživiny rastliny prijímajú v koncentráciách menších ako 0,5 gramu na liter (Chimdessa Emiru, 2020).

2.4.1.1 Makroživiny

Makroživiny zahŕňajú 6 hlavných zložiek: dusík (N), fosfor (P), draslík (K), vápnik (Ca), horčík (Mg) a síru (S). Dusík je súčasťou nukleotidov tvoriacich nukleové kyseliny, a je hlavným donorom aminokupín k syntéze aminokyselín. Taktiež je potrebný v metabolizme mnohých nebielkovinových zlúčenín (Maathuis, 2009). Fosfor, ako jedna z esenciálnych makroživín, má zásadnú úlohu v bunkovom metabolizme, pri vývoji embrya, klíčení a raste semenáčikov (Maathuis, 2009). Draslík patrí spolu s vápnikom medzi hlavné kationy v rastlinách. Draslík má významnú rolu kofaktoru viacerých proteínov, zatiaľ čo vápnik, ktorý nie je až taký pohyblivý, je zahrnutý vo vytváraní väzieb, bunkovej štruktúry a fyziologických vlastnostiach buniek (George et al., 2008). Horčík je súčasťou fotosyntetického aparátu, ako element zodpovedný za štruktúru a formáciu chlorofylu. Okrem toho je známy ako aktivátor mnohých enzýmov, napríklad fosforyláz a kináz (Yan & Hou, 2018). Síra je využívaná rastlinami pri syntéze lipidov a pri regulácii štruktúry bielkovín tvorbou disulfidických mostíkov. Slúži aj ako ligand spájajúci ióny niektorých kovov (George et al., 2008).

2.4.1.2 Mikroživiny

Esenciálna úloha mikroživín bola oproti makroživinám objavená neskôr. Potrebný obsah konkrétnych mikroživín sa líši v závislosti od rastlinného druhu, a má vplyv na rast, genetický aparát, metabolizmus a na aktivitu rastových regulátorov (George et al., 2008; Saad & Elshahed, 2012). Bolo dokázané, že z veľkého množstva týchto živín sú najviac prospešné a využívané železo (Fe), bór (B), mangán (Mn), zinok (Zn), meď (Cu), kobalt (Co), molybdén (Mo). Mangán (Mn), ako jeden z najdôležitejších mikroživín, je vyžadovaný najmä pre správnu aktivitu niekoľkých enzýmov, a je súčasťou procesov fotosyntézy a dýchania (Clarkson & Hanson, 1980). Zinok je súčasťou stabilných metaloenzýmov s rozličnými funkciami, a zohráva úlohu v širokom spektre procesov, ako napríklad aktivácia enzýmov, syntéza proteínov a tvorba chlorofylu (Bloodnick Ed, 2021; George et al., 2008). Bór je element podieľajúci sa na integrite a udržaní štruktúry a funkcie plazmatickej membrány, metabolizme fenolových kyselín a biosyntéze lignínu (George et al., 2008). Meď je esenciálna mikroživina aj napriek jej nízkemu obsahu v rastlinách. Podieľa sa na mnohých fyziologických procesoch, a je kofaktor metaloproteínov. Avšak jej nadbytok je pre rastlinu toxický, čo môže narušiť dôležité bunkové procesy (Yruela, 2005). Molybdén je komponent niekoľkých rastlinných enzýmov, a je zásadný pre využitie dusíka (George et al., 2008). Kobalt je dôležitý pre rastové procesy, pre zdravý vývoj púčikov a dosiahnutie zrelosti (Minz et al., 2018). Železo slúži ako chelátové činidlo, a v rastlinách nachádza funkciu predovšetkým v chloroplastoch, mitochondriách a peroxizómoch pri oxidačno-redukčných reakciách (George et al., 2008).

2.4.2 Organické látky

Medzi organické zložky sa radia vitamíny, uhľohydráty a aminokyseliny. Vitamíny sú esenciálne zlúčeniny syntetizované v rastlinách, a tak ich prídavok do médií nie je natoľko bežný ako v prípade iných látok. Ukazuje sa, že vitamíny majú vplyv na tvorbu kalusu, koreňov či na embryonálny vývoj. Vitamíny ako biotín, riboflavín hrajú úlohu práve pri vývoji kalusu. Na delenie meristemických buniek, ich elongáciu, a na podporu rastu výhonkov a koreňov sú využívané vitamíny D a C (Abrahamian et al., 2011). Jedným z bežne pridávaných vitamínov do médií je thiamín. Thiamín označovaný ako vitamín B₁ má v rastlinách úlohu ako kofaktor pre dôležité metabolické aktivity, a taktiež je významný v regulačných systémoch a odpovediach rastlín na stres (Subki et al., 2018).

Ako zdroj uhlíka je používaná sacharóza, ktorá je preferovaná väčšinou buniek, no môže byť v určitých prípadoch nahradená aj glukózou prípadne fruktózou. Avšak ostatné jednoduché cukry sú pomerne nevhodný zdrojom uhl'ohydrátov (Gamborg et al., 1976).

Väčšina potrebných aminokyselín pre rast rastliny si rastlina dokáže sama syntetizovať, ale pri zakladaní bunkových kultúr je prídavok určitých aminokyselín obzvlášť dôležitý. Hlavnou funkciou aminokyselín je poskytovanie zdroja dusíka, ktorý je ľahšie a rýchlejšie asimilovaný rastlinami oproti anorganickým zdrojom. V médiách sa využívajú zmesi aminokyselín, ako napríklad hydrolyzát kazeínu, L-glutamín, L-asparagín a glycín (Saad & Elshahed, 2012).

Myo-inositol (inositol) je látka podobná vitamínom, ktorá má rolu v bunkovom delení, vývoji a raste, vďaka rozkladu na kyselinu askorbovú a pektín, a tiež z dôvodu inkorporácie do fosfoinozítidov a fosfatidyl-inozitolu (Loewus & Murthy, 2000; Saad & Elshahed, 2012).

2.4.3 Rastové regulátory

Na podporu iniciácie tvorby kalusu pri nepriamej somatickej embryogenéze sú média doplnené rastlinnými hormónmi, ako sú auxíny, zvyčajne 2,4-dichlórfenoxyoctová kyselina (2,4-D) a cytokiníny, ako napríklad kinetín. Avšak konkrétne 2,4-D má inhibujúci účinok na vývoj embrya, a tak pokračovanie somatickej embryogenézy po jej indukcii prebieha už na médiách bez hormónov (Dudits & Gyorgyey, 1991). Práve auxíny a cytokiníny sú považované za dve najdôležitejšie triedy rastlinných hormónov pri regulácii rastu a vývoja v rastlinných pletivách a orgánových kultúrach. Avšak spoločne aj s kyselinou abscisovou, etylénom a gibberelínmi sú všeobecne uznávané ako päť hlavných tried rastlinných hormónov. Aj napriek tomu, že kyselinu abscisovú, etylén a gibberelíny nie je nutné pridávať do kultivačných médií, a sú syntetizované priamo v pletivách, tiež zohrávajú dôležité úlohy pri regulácii vývojových procesov pri kultivácii *in vitro* (Gaspar et al., 1996).

2.5 Transgenóza u rastlín a využívané transformačné techniky u *M. sativa*

Transgénne rastliny sú geneticky modifikované pomocou technológie rekombinantnej DNA s cieľom iniciovať expresiu vložených exogénnych génov, alebo modifikovať expresiu endogénnych génov (Key et al., 2008). Prakticky to znamená, že transgénne rastliny obsahujú umelo vložený gén alebo viacero génov, nazývané transgény. Tieto gény môžu pochádzať z nepříbuznej rastliny alebo z iného druhu, pričom kódujú proteíny poskytujúce rastline určité nové vlastnosti a charakteristiku (Jhansi Rani & Usha, 2013;

Key et al., 2008). Rastliny vďaka tejto technológii môžu získať mnoho výhod, ako je rezistencia na rôzne druhy stresu, zlepšenie produkčných parametrov, kvality a skladovateľnosti, či vyššia úroda (Ahmad et al., 2012; Jhansi Rani & Usha, 2013).

2.5.1 Transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je všeobecne známa fytopatogénna pôdna baktéria, využívaná pre genetickú transformáciu rastlinných buniek. Spôsobuje tvorbu nádorových útvarov v dvojklíčnolistových rastlinách, čím je umožnený prenos T-DNA do genómu buniek hostiteľskej rastliny (Yoneyama & Natsume, 2010; Ahmed et al., 2022). Transformácie *M. sativa* sprostredkovaná *A. tumefaciens* je v rámci mnohých známych transformačných metód považovaná za najviac efektívnu, a preto sa aj najčastejšie využíva (Tichá et al., 2020). Veľký vplyv na účinnosť transformácie majú interakcie zvoleného genotypu rastliny s konkrétnym bakteriálnym kmeňom, pričom u niektorých bakteriálnych kmeňov bola dokonca zistená minimálna efektivita pri tejto metóde transformácie (Samac, 1995). Na základe doterajších testov a pri preukázanej vysokej efektivite až 60%, a pri zachovaní vysokého embryogénneho potenciálu, sa často používa kmeň LBA4404 obsahujúci vektor pGA482 (Desgagnés et al., 1995). Pri tejto metóde transformácie bol ako najefektívnejší postup popísaný s využitím dostatočne veľkých listov z nekvitnúcich rastlín ako donorových explantátov, ktoré boli kokultivované s vhodným kmeňom *A. tumefaciens* po dobu 7 až 8 dní. Následne došlo k eliminácii *A. tumefaciens* na selekčnom médiu, k tvorbe kalusu a samotnému vývoju somatických embryí, z ktorých sa postupne vytvorili nové regenerované rastlinky. Efektivita tvorby somatických embryí z explantátov dosahovala 60-80%, pričom u 80-100% somatických embryí išlo o transformované rastliny (Samac & Austin-Phillips, 2006).

2.5.2 Transformácia metódou elektroporácie

Elektroporácia je jednoduchá, rýchla a efektívna metóda transformácie rastlinných pletív, ktorá sa využíva aj na internalizáciu takých látok do buniek, ako sú lipidy, proteíny, RNA a DNA. Metóda spočíva v použití krátkych elektrických šokov s vysokým napätím na permeabilizáciu plazmatickej membrány buniek, v tomto prípade predovšetkým pripravených protoplastov. Ide o bunky zbavené bunkovej steny, ktorá je inak dôležitou bariérou pre prechod makromolekúl do bunky (Bates, 1995; Rivera et al., 2012). V dôsledku týchto šokov sa v bunkovej membráne tvoria póry, ktoré prepúšťajú exogénne molekuly do vnútra bunky. Elektroporácia je vykonávaná pomocou zariadenia nazývaného elektroporátor. Elektroporátor pozostáva z dvoch paralelných elektród, ktoré

sú v kontakte s kvapalným elektrolytom obsahujúcim bunkovú suspenziu s požadovanou DNA. Počas procesu dochádza k jednému alebo viacerým elektrickým impulzom k inkorporácii DNA, po ktorých sa následne obnoví bunková membrána a postupne sa izolujú transformované bunky (Rivera et al., 2012). Všeobecne je efektívnosť prenosu DNA do bunky ovplyvnená koncentráciou DNA, počtom, dĺžkou a silou elektrických impulzov (Nickoloff & Reynolds, 1992; Sukharev et al., 1992; Hui, 1995).

2.5.3 Transformácia metódou bombardovania mikročasticami

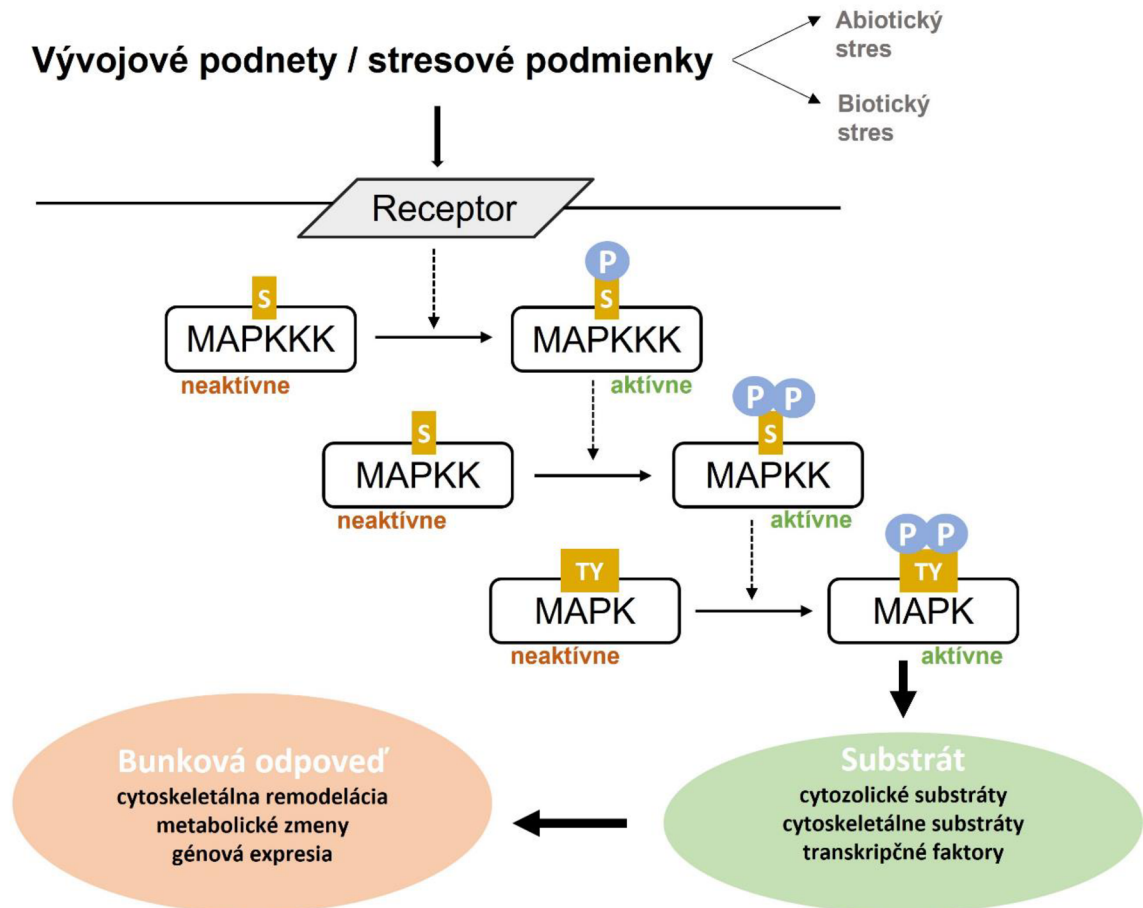
Metóda bombardovania mikročasticami, nazývaná aj biolistická, je jednou z bežných transformačných metód. V rastlinnej ríši je založená na priamom prenose DNA pomocou zlatých alebo volfrámových častíc do rastlinných buniek. Tieto častice o veľkosti približne 2 µm obalené DNA sú vysokou rýchlosťou nastreľované do rastlinných buniek, v ktorých sa DNA uvoľní z častíc, pričom môže dôjsť k transientej expresii, alebo sa vnesená DNA stabilne integruje do genómu hostiteľskej bunky (Rivera et al., 2012; Baltes et al., 2017). Biolistická metóda je po transformácii prostredníctvom *A. tumefaciens* druhou najpoužívanejšou transformačnou metódou. Avšak v rámci priamych transformačných metód, je najrozšírenejšia vďaka širokému spektru využitia, jednoduchosti aplikácie, nízkej časovej náročnosti a cene (Matsumoto & Gonsalves, 2012; Rivera et al., 2012). V prípade *M. sativa* bola metóda bombardovania časticami využitá na získanie stabilne transformovanej lucerny ostreľovaním kalusu (Pereira & Erickson, 1995). Ďalším príkladom je získanie transgénnych rastlín schopných produkcie fertilných semien. Princípom metódy bolo opelenie androgénne-sterilných kvetov fertilným transformovaným peľom, ktorý obsahoval plazmid nesúci GUS reportérový gén. Tento transformovaný peľ bol pripravený biolistickou metódou (Ramaiah & Skinner, 1997). Biolistická metóda transformácie nachádza využitie aj pri transformácii bunkových organel, napríklad chloroplastov, čo má veľký agronomický význam pre mnohé druhy vyšších rastlín. Využitie tejto transformačnej technológie u *M. sativa* poskytlo zvýšenie produkčných parametrov tejto plodiny, čo bolo využiteľné v komerčnej aj agronomickej sfére. Chloroplasty lucerny boli transformované biolistickou metódou, vektorom nesúcim *aadA* a *gfp* gény. Efektívnosť tejto transformácie sa pohybovala v rozmedzí 1,3% pre kalusové explantáty, až 2,79% pre listové explantáty (Wei et al., 2011).

2.6 Signálne procesy v rastlinách

Rastliny sú v neustálom kontakte s množstvom vonkajších signálov a vplyvov, ktoré musí rastlinný organizmus zachytiť, prijať a spracovať. Tieto signály sú vo všetkých eukaryotoch prenášané a sprostredkované pomocou signálnych modulov, ktoré tvoria mitogén-aktivované proteínkinázy (MAPK). Podieľajú sa na prenose signálov, pomocou ktorých je v rastline vyvolaná špecifická obranná alebo adaptačná bunková reakcia na vonkajšie vplyvy (Ligterink & Hirt, 2001; Šamajová et al., 2013). Moduly mitogén-aktivovaných proteínkináz môžu byť definované ako signalizačné kaskády pozostávajúce z troch sekvenčne pôsobiacich proteínkináz (MAPKKK, MAPKK, MAPK), ktoré môžu byť uvedené do proteín-proteínových interakcií pomocou kotviacich a väzbových „scaffold“ proteínov. Tieto interakcie, spolu so špecifickou subcelulárnou kompartmentalizáciou signálnych komplexov a ich zložiek, majú špecifický vplyv na aktiváciu signálnych dráh. Jednotlivé súčasti týchto modulov sú aktivované reverzibilnou fosforyláciou, pri ktorej je MAPK aktivovaná svojou nadradenou MAPK kinázou (MAPKK, MKK, alebo MEK) prostredníctvom fosforylácie konzervovaných treonínových a tyrozínových zvyškov, pričom aktivita MAPKK je regulovaná fosforyláciou najvyššieho postaveného člena daného signálneho modulu, MAPKK kinázy (MAPKKK alebo MEKK) fosforyláciou serínových a serín-treonínových zvyškov (Obr. 3) (Šamajová et al., 2013; Wang et al., 2015; Xu & Zhang, 2015; Komis et al., 2018). MAPK kaskády majú dôležitú rolu v rastlinnom organizme a sú súčasťou procesov regulácie rastlinného vývoja zahŕňajúceho morfogenezu, gametogenezu, embryogenezu, oplodnenie, tvorbu semien, dozrievanie plodov, a zároveň sa podieľajú na stresových reakciách (Šamajová et al., 2013; Xu & Zhang, 2015). Rast a vývoj plodín je výrazne ovplyvňovaný rôznymi stresmi vrátane abiotických a biotických stresov, ktoré majú dopad na kvalitu a úrodu. Z tohto dôvodu je mechanizmus odolávania týmto nepriaznivým podmienkam pomocou sofistikovaných signálnych dráh MAPK značne významný (He et al., 2020).

Na štúdium signálnych dráh vrátane subcelulárnej lokalizácie jednotlivých komponentov MAPK modulov sú využívané rôzne metódy, ako je transientná a stabilná expresia translačne-fúzaných MAPK s fluorescenčnými proteínmi sprostredkovaná buď konštitutívnymi alebo natívnymi promótormi, detekcia aktivity promótorov a produkcie mediátorovej RNA pomocou *in situ* hybridizácie, ako aj využitie imunofluorescenčnej detekcie MAPK. Pre stanovovanie promótorovej aktivity génov kódujúcich MAPK proteíny je vhodná metóda využívajúca reportérové gény. Na príklade

expresných profilov génu *MPK6* z *Arabidopsis thaliana*, ktorý je aktívny v celom tele rastliny, avšak vykazuje zvýšenú expresiu napríklad v kvetných orgánoch, je možné dokumentovať pletivovo-špecifickú aktivitu expresie génov kódujúcich MAPK (Komis et al., 2018).



Obrázok 3. Schéma znázorňuje dráhu signálnych modulov mitogén-aktivovaných proteínkináz (MAPK), ktoré slúžia v rastlinách ako dôležité signálne prenášače, spúšťané vývojovými podnetmi alebo stresovými podmienkami. Pozostávajú z troch sekvenčne pôsobiacich proteínkináz, ktoré sú postupne fosforylované na serínových zvyškoch (S) u MAPKKK a MAPKK, a v prípade MAPK duálne fosforylované na treonínových (T) a tyrozínových zvyškoch (Y). Po aktivácii môžu byť premiestňované v bunkách, fosforylujú špecifické substráty a vyvolávajú bunkovú odpoveď.

2.6.1 Účasť MAPK v regulácii vývojových procesov

Charakteristické znaky ako tvar a vzor budúcej organizácie orgánov rastliny sú stanovené už v embryu, no vplyvom vonkajších podnetov a signalizačných dráh môže dochádzať k určitým zmenám. MAPK sa v rastlinách podieľajú na takmer všetkých vývojových procesoch, zúčastňujú sa ale aj signalizácie pri hormonálnych reguláciách. Tieto procesy zahŕňajú napríklad delenie buniek, embryonálny a postembryonálny vývoj, moduláciu prieduchov (Shi et al., 2010; Komis et al., 2018). Bola identifikovaná MAP3K označovaná ANP2/3 u *A. thaliana* zapájajúca sa do regulácie procesu cytokinézy, ako aj konkrétne MAPK u lucerny a tabaku s definovanými funkciami v procese bunkového cyklu. V rámci subcelulárnej regulácie cytoskeletu sú známe MPK18, MPK6 a MPK4, interagujúce s kortikálnymi mikrotubulmi (Beck et al., 2011; Šamajová et al., 2013). Nevyhnutnosť regulačnej funkcie MAPK kaskád pri cytokinéze bola dokumentovaná indukciou delečných mutácií génov MAPKKK, čo viedlo k narušeniu celého procesu, konkrétne správnej tvorby bunkovej platničky v deliacich sa bunkách tabaku (Zhang et al., 2006).

Asymetrické bunkové delenie je jedným z dôležitých regulačných mechanizmov bunkovej morfogenézy a diferenciácie. Jednou zo známych MAPKK kináz, ktorá má úlohu v skorom morfogénnom vývoji a ovplyvňuje správne asymetrické bunkové delenie je YODA. Má nezastupiteľný význam pre správny vývoj embryí, ale aj prieduchov (Zhang et al., 2006; Taj et al., 2010).

2.6.2 Účasť MAPK v reakciách na abiotické stresové faktory

Rastliny sa ako imobilné organizmy musia prispôbovať meniacim sa podmienkam prostredia, ktoré môžu mať negatívny vplyv vo forme stresu na ich rast a vývoj. Zmeny prostredia vyvolané suchom, nízkymi a vysokými teplotami, zasolením, UV radiáciou prípadne toxickými kovmi, je možné zhrnúť pod pojem abiotický stres (He et al., 2020; Zhu, 2016). Ako odpoveď na stres si rastliny vyvinuli obranné mechanizmy, ktorých aktiváciu sprostredkujú signálne dráhy. V prípade *A. thaliana* boli identifikované viaceré MAPK, ktorých aktivácia sprostredkúva toleranciu voči chladu, soli, dotykcom, alebo poraneniám. Medzi najdôležitejšie patria MAPK3, MAPK4 a MAPK6. Pri reakcii na chladový a soľný stres bola u *A. thaliana* charakterizovaná kompletná kaskáda prenosu signálu, ktorá pozostáva z MEKK1, ktorá špecificky aktivuje MKK2, čo vedie k následnej aktivácii MPK4 a MPK6 (Ichimura et al., 2000; Teige et al., 2004; Šamajová et al., 2013).

Ozón (O_3) je toxický plyn, ktorého molekulu tvoria tri atómy kyslíku. Táto látka je významný znečisťujúci faktor bežne sa vyskytujúci v prostredí. Ozón tvorí v apoplaste rastlinných buniek reaktívne formy kyslíka (ROS), zahŕňajúce superoxidový anión a peroxid vodíka. Produkciou ROS, a akumuláciou kyseliny jasmónovej (JA) a kyseliny salicylovej (SA) ozón aktivuje signálne dráhy MAPK, čo môže viesť nielen k zmenám v expresii génov, ale až k lokálnej bunkovej smrti (Ahlfors et al., 2004; Šamajová et al., 2013; Bataklijev et al., 2014). Signálne dráhy MAPK sú indukované stresom z ROS, ale zohrávajú aj významnú úlohu aj pri regulácii ich odbúravania (Pitzschke & Hirt, 2009). V tabaku ozón indukuje SIPK, MAPK indukovanú kyselinou salicylovou, ktorej ďalšou významnou úlohou pri regulácii ROS je kontrola inaktívácie ďalšej MAPK označovanej ako WIPK (MAPK indukovaná poranením) (Samuel & Ellis, 2002). Podobne ako v prípade tabaku, bola dokázaná indukcia najmenej dvoch MAPK vplyvom ozónu aj v rastlinách *A. thaliana*. Primárne ide o MPK3 a MPK6, ktoré sú popri aktivácii presúvané do jadra, a ich aktivácia je kvantitatívne závislá od signalizácie kyseliny salicylovej (Ahlfors et al., 2004).

Ťažké kovy, ako kadmium (Cd), meď (Cu), olovo (Pb), zinok (Zn) a nikel (Ni) sú prirodzene sa vyskytujúce zložky v zemskej kôre, avšak vplyvom ľudskej činnosti sa zmenila ich prirodzená rovnováha a geochemické cykly. Z tohto dôvodu dochádza k ich akumulácii v rastlinách, čo vedie k poškodeniu buniek a narušeniu bunkovej iónovej homeostázy (Singh et al., 2011). Rastliny reagujú na toxické hladiny ťažkých kovov aktiváciou MAPK. Príklad zapájania signálnych dráh MAPK spôsobený prítomnosťou medi a kadmia v prostredí bol preukázaný v rastline *Oryza sativa* L., kde bola zaznamenaná aktivácia OsMAPK3 a OsMPK6 (Yeh et al., 2007; Šamajová et al., 2013).

2.6.3 Účasť MAPK v reakciách na biotické stresové faktory

Rastliny sú počas ich života napádané baktériami, hubami a vírusmi. Infekcie a ochorenia spôsobené týmito druhmi organizmov sa súborne označujú ako biotický stres (He et al., 2020). Počas evolúcie sa u rastlín vyvinul rad obranných mechanizmov v podobe imunitného systému, vďaka ktorému sú schopné brániť sa proti patogénom. Rastliny reagujú pomocou modulárneho vrodeneho imunitného systému, zloženého z dvoch úrovní. Prvá úroveň špecificky deteguje molekuly spoločné pre mnoho mikróbov, patogénov ako aj nepatogénov pomocou transmembránových receptorov, a spúšťa obranné mechanizmy. Druhá trieda je založená na priamych, alebo nepriamych reakciách voči virulentným faktorom patogénov, na základe rozpoznania efektorových proteínov

patogénu za pomoci proteínov rezistencie (Jones & Dangl, 2006; Šamajová et al., 2013; He et al., 2020). V obranných reakciách vrodenej imunity zohrávajú dôležitú úlohu MAPK (Šamajová et al., 2013).

Dôležitú rolu signálnych dráh vo vrodennom imunitnom systéme *A. thaliana* zohráva modul MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4. Ukázalo sa, že pozitívne reguluje obranné mechanizmy proti nekrotrofným hubám, a zároveň negatívne reguluje obranné reakcie voči biotrofným patogénom (Wang et al., 2015).

Ďalším dôkazom významu MAPK je príklad kaskády NPK1-MEK1-Ntf6 u tabaku, ktorá reguluje odolnosť voči vírusu tabakovej mozaiky sprostredkovanú proteínom rezistencie N (Liu et al., 2004; Wang et al., 2015).

Rastliny si vyvinuli obranné mechanizmy aj proti najrozšírenejšej skupine herbivorných organizmov, hmyzu. Prvou primárnou ochranou rastlín je fyzická obrana zahŕňajúca trne, trichómy a kutikulu. Druhým spôsobom je využitie sekundárnych metabolitov, ktoré tvoria konštitutívnu, alebo indukovateľnú obranu. Pri útoku herbivora sú aktivované MAPK, ktorých signalizácia má vplyv na zmenu hladiny fytohormónov, čo spôsobuje zmenu na úrovni transkriptómu a proteómu, ako súčasť aktívnej obrany rastlín (Hettenhausen et al., 2015).

2.6.4 Transdukcia signálov v rastlinách *M. sativa* L.

Podobne ako u iných eukaryotických organizmov, aj u *M. sativa* boli identifikované signálne moduly MAPK, zúčastňujúce sa vývojových procesov a reakcií na stresové faktory. Jednou z hlavných známych MAPK u lucerny je SIMK, indukovaná stresom zo zasolenia a elicitorami (Cardinale et al., 2000). SIMK je prevažne lokalizovaná v cytoplazme a jadrách, odkiaľ je počas tvorby koreňových vláskov redistribuovaná v aktívnej forme do ich rastúcej špičky, čo ukazuje úlohu SIMK pri ich vývoji a raste (Šamaj et al., 2002). Po aktivácii soľným stresom dochádza k premiestneniu časti SIMKK-SIMK modulu z jadra do cytoplazmatických kompartmentov, zatiaľ čo v neaktívnom stave sú SIMK a jej nadradená kináza SIMKK lokalizované voľne v jadre a cytoplazme (Ovečka et al., 2014). K aktivácii známych MAPK (SIMK, MMK2, MMK3, SAMK) v semenáčikoch lucerny dochádza vplyvom stresu z ťažkých kovov, spôsobeného iónmi kadmia alebo medi (Taj et al., 2010). Z iných objavených MAPK v *M. sativa* je možné zmieniť OMTK1, čo je MAPKKK1 aktivovaná oxidatívnym stresom. V nestresovaných rastlinných protoplastoch vykazovala len bazálnu kinázovú

aktivitu, po aktivácii však bola schopná viazať a aktivovať MMK3. Aktivácia OTMK1 pomocou H₂O₂ zapríčiňuje indukciu bunkovej smrti (Nakagami et al., 2004).

Transgénná línia *M. sativa* označovaná *SIMKK RNAi* je línia so zníženým obsahom mRNA pre SIMKK (umlčaním expresie *SIMKK*). Táto línia bola získaná stabilnou transformáciou mladých listov rastlín *M. sativa* kultivaru RSY, pomocou kmeňa GV3101::Pmp90 *A. tumefaciens*, ktorý nesie plazmid pHellsgate12-SIMKKi. Po umlčaní expresie *SIMKK* bolo u tejto línie zistené výrazné zníženie produkcie SIMK (Bekešová et al., 2015; Hrbáčková et al., 2021).

2.7 Metódy vyhodnocovania regeneračného potenciálu u kultúr *in vitro*

Regenerácia kompletných rastlín je výsledným krokom procesov ako somatická embryogenéza a organogenéza, počas ktorej sa tvoria jednotlivé orgány pomocou rôznej kombinácie hormónov v *in vitro* podmienkach (Bhatia, 2015). Rastliny veľmi citlivo vnímajú vplyv okolitého prostredia čo má dopad na ich rast a vývoj. Z tohto dôvodu aj zaznamenávanie vývoja, rastu a všeobecne regeneračného potenciálu kultúr *in vitro* je dôležitým predpokladom pre lepšie pochopenie molekulárnych, fyziologických a bunkových procesov v rastlinách (Tichá et al., 2020).

Embryogénny a regeneračný potenciál *in vitro* môže byť vyhodnocovaný viacerými metódami. Prvým spôsobom je kvantitatívne vyhodnotenie embryogénneho potenciálu, čo je vyhodnotenie počtu somatických embryí vytvorených na daný počet použitých explantátov (Piccioni et al., 1996; Sangra et al., 2019). Ako ďalšie kvantitatívne spôsoby stanovenia regeneračného a embryogénneho potenciálu, sa bežne využíva percentuálne stanovenie počtu explantátov tvoriacich kalus, počet kalusov produkujúcich somatické embryá po určitej dobe na regeneračnom médiu, alebo stanovenie počtu somatických embryí schopných konverzie na kompletnú rastlinu (Varga & Badea, 1992; Zare et al., 2009)

K vyhodnoteniu kvantitatívnymi spôsobmi sa embryogénny potenciál dokumentuje aj vyhodnotením kvalitatívnym. Na kvalitatívne vyhodnotenie sa využívajú najmä mikroskopické, fotografické a rôzne iné skriningové metódy. Skrining sa využíva napríklad na identifikáciu genotypov rastlín lucerny schopných regenerovať celé rastliny z kalusu a bunkových suspenzií (Varga & Badea, 1992). Na vyhodnotenie embryogénneho potenciálu suspenzií sa dá použiť analýza textúry makroskopických snímky, na základe rozdielov vo vizuálnom vzhľade medzi embryogénnymi a neembryogénnymi suspenziami (Ibaraki et al., 1998). Na štúdium a skúmanie

jednotlivých vývojových procesov a fyziológie rastlín sa využívajú najmä mikroskopické metódy (Reddy et al., 2007). Môže byť použitá konfokálna laserová skenovacia mikroskopia, čo je neinvazívna vizualizačná technika s vysokým kontrastom, založená na princípe laseru, ako zdroja svetla (Dürrenberger et al., 2001; Teng et al., 2020). Ďalšou využívanou mikroskopickou technikou je moderná „light-sheet“ fluorescenčná mikroskopia, založená na osvetlení preparátu tenkým svetelným lúčom v tvare listu, a následnej detekcii obrazu kolmo na rovinu osvetlenia (Ovečka et al., 2018). Tento typ vizualizácie je možné využívať pri štúdiu rôznych procesov v rastlinách, ako napríklad na dokumentáciu dynamiky rastu, pohybu jadier či analýzu bunkového delenia (Berthet & Maizel, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

Autoklávová indikátorová páska, bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 μm , filtračný papier, hliníková fólia, chirurgická páska, kadičky, magnetické miešadlá, mikroskúmvky, nožnice, odmerné valce, Pasteurove pipety, parafilm, pinzety, skalpel, skúmvky typu Falkon, sterilné Petriho misky okrúhle, sterilné Petriho misky hranaté, sterilné špičky.

3.1.1 Použité chemikálie

1000x Gamborg's vitamin solution (Duchefa Biochemie)

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa biochemie)

2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (Duchefa Biochemie)

Adenín (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma Aldrich)

Dusičnan amónny (Biochemica)

Dusičnan draselný (Sigma Aldrich)

Ethanol 96% (Tereos TTD)

FeNaEDTA

Glycín (Sigma Aldrich)

Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma Aldrich)

Heptahydrát síranu zinočnatého (Sigma Aldrich)

Chlorid draselný (Sigma Aldrich)

Iodid draselný (Sigma Aldrich)

Kinetin (Duchefa Biochemie)

Kvasničný extrakt (Sigma Aldrich)

Kyselina boritá (Sigma Aldrich)

L-glutamin (Duchefa Biochemie)

L-glutathion (Sigma- Aldrich)

MilliQ voda

Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Myo-inositol (Duchefa Biochemie)

Prolin (Sigma Aldrich)

Sacharóza (Sigma Aldrich)

Schenk and Hildebrant zmes vitamínov (Duchefa Biochemie)

Síran draselný (Sigma Aldrich)

Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Sigma Aldrich)

Tetrahydrát síranu manganatého

Thiamin hydrochlorid (Sigma Aldrich)

Thioprolin (Sigma Aldrich)

Tikarcilin (Duchefa Biochemie)

Tween ® 20 (Sigma-Aldrich)

Vodovodná voda

3.1.2 Roztoky a médiá

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

1 ml chlórnan sodný

50 µl Tween

Doplňte MilliQ H₂O do 100 ml. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 µm.

Roztok 2,4-D

10 mg 2,4-D rozpustiť v 50 µl Et-OH, pridať 800 µl H₂O a 150 µl 1M NaOH, zvortexovať, doplniť do 10 ml H₂O. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 µm. Skladovanie pri teplote -20°C.

Roztok kinetínu

1 mg kinetínu rozpustiť v 20 μ l 1M NaOH, zvortexovať, doplniť do 10 ml H₂O. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 μ m. Skladovanie pri teplote -20°C.

Zmes aminokyselín (pre B5H)

6,65 g glutamín

0,83 g serín

0,004 g adenín

0,083 g L-glatatión

Doplniť MilliQ H₂O do 250 ml. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 μ m. Skladovanie pri teplote 4°C.

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 . 7 H₂O

0,5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychladiť na cca 55 °C a cez bakteriologický filter pridať:

30 ml.l⁻¹ zmes Aminokyselín

1 mg.l⁻¹ 2,4-D

0,1 mg.l⁻¹ kinetín

1 ml.l⁻¹ 1000x Gamborg's vitamin

B50 médium

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

0,5 g.l⁻¹ KNO₃

0,25 g.l⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O

0,5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychladiť na cca 55 °C a cez bakteriologický filter pridať:

30 ml.l⁻¹ zmes Aminokyselín

1 ml.l⁻¹ Gamborg's vitamin

MMS médium

4,3 g.l⁻¹ MS basal salt mixture

0,1 g.l⁻¹ myo-inositol

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplnenie MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychladnutie na cca 55 °C a pridať:

1 ml.l⁻¹ 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution

MS médium

4,3 g.l⁻¹ MS basal salt mixture

0,1 g.l⁻¹ myo-inositol

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplnenie MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu

SH4K médium

3,2 g.l⁻¹ Schenk and Hildebrandt

25 mM prolín

0,4 mM thioprolín

50 mM K₂SO₄

2 g.l⁻¹ kvasničný extrakt

100 mg.l⁻¹ myo-inositol

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplnenie MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychlaďiť na cc 55 °C a cez bakteriologický filter pridať:

1 mg.l⁻¹ 2,4-D

0,1 mg.l⁻¹ kinetín

BOi2Y médium

0,2 mg.l⁻¹ glycín

0,1 mg.l⁻¹ Thiamín hydrochlorid

30 g.l⁻¹ sacharóza

36,7 mg.l⁻¹ FeNaEDTA

100 mg.l⁻¹ myo-inositol

2 g.l⁻¹ kvasničný extrakt

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Makroelementy

300 mg.l⁻¹ KH₂PO₄

100 mg.l⁻¹ KNO₃

1 g.l⁻¹ NH₄NO₃

347 mg.l⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O

35 mg.l⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O

65 mg.l⁻¹ KCl

Mikroelementy

0,8 mg.l⁻¹ KI

1,5 mg.l⁻¹ ZnSO₄ · 7 H₂O

1,6 mg.l⁻¹ H₃BO₃

4,4 mg.l⁻¹ MnSO₄ · H₂O

3.1.2 Použité prístroje

Analytické váhy

Automatické pipety

Autokláv (Stervap, MMM Group)

Box laminárny Biohazard (Merci)

Elektromagnetická miešačka IKA combimag REO (Drehzahl Electronic)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Laboratórne váhy S1 502 (BEL Engineering)

Chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)

Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)

pH meter PC 2700 (Eutech Instruments)

Skener (Image Scanner III)

Stereomikroskop Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss)

Výrobník deionizovanej vody Simplicity water purification system (Millipore)

3.1.4 Software na spracovanie výsledkov

Excel (Microsoft Office)

PowerPoint (Microsoft Office)

ImageJ (NIH)

ZEN 3.5 – blue edition (Carl Zeiss)

Inkscape 1.1.2

3.1.5 Rastlinný materiál

Ako rastlinný materiál boli vybrané tri línie *Medicago sativa* L.:

Regen SY (RSY) – kontrolná línia

SIMKK RNAi – transgénná línia s potlačeným prejavom expície génu *SIMKK*

GFP-FABD2 – transgénná línia produkujúca aktín-väzobnú doménu č.2 proteínu fibrínu z *Arabidopsis thaliana*, translačne fúzovanú so zeleným fluorescenčným proteínom, GFP

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava B5H média

Do kadičky s objemom 1000 ml bolo pridaných 850 ml MilliQ vody. Za stáleho miešania na magnetickej miešačke pomocou magnetického miešadla bolo do MilliQ vody pridané Gamborg's basal salt mixture, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Následne bol postupne pridaný prolín, sacharóza a Gellan gum a objem bol doplnený na 1000 ml MilliQ vodou. Po dôkladnom premiešaní zložiek bolo pH upravené na 5,7 pomocou 1 M alebo 0,1 M KOH. Médium bolo rozliate po 500 ml do 1000 ml sklenených fliaš a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo médium ochladené na približne 55°C. Do vychladeného média za sterilných podmienok v laminárnom boxe (flowbox) bola pridaná zmes aminokyselín, hormóny (2,4-D, kinetín), 1000x Gamborg's vitamin a antibiotikum Tikarcilín (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na prevenciu proti bakteriálnym infekciám. Zložky pridávané po sterilizácii v autokláve boli vopred prefiltrované cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm . Nakoniec bolo rozliatych 500 ml média po 25 ml do 20 sterilných okrúhlych Petriho misiek. Médium v Petriho miskách bolo na ďalšie použitie skladované v chladničke pri teplote 4 °C.

3.2.2 Príprava B50 média

V 1000 ml kadičke bolo do 850 ml MilliQ vody pridané Gamborg's basal salt mixture, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Ďalej bol pridaný prolín, sacharóza, Gellan gum a objem bol doplnený do 1000 ml MilliQ vodou. Po dôkladnom premiešaní bolo pomocou 1M/ 0,1 M KOH upravené pH na 5,7. Médium bolo rozliate do 1000 ml sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo vychladené na cca 55 °C a za sterilných podmienok v laminárnom boxe bol pridaný Tikarcilín (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), zmes aminokyselín a 1000x Gamborg's vitamin, ktoré boli

vopred prefiltrované cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm . Médium bolo rozliate po 25 ml do sterilných okrúhlych Petriho misiek a skladované v chladničke pri teplote 4°C pre ďalšie použitie.

3.2.3 Príprava MMS média

V 1000 ml kadičke bolo zmiešaných 850 ml MilliQ vody, MS basalt salt mixture, myo-inositol, sacharóza a nakoniec Gellan gum. Všetky zložky boli pridávané do MilliQ vody za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Objem bol doplnený MilliQ vodou na 1000 ml a pH upravené na 5,7 pomocou 1M/0,1 M KOH. Následne bolo médium rozliate do 1000 ml sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované autoklávom. Po sterilizácii a ochladení média na cca 55°C bolo do média v sterilných podmienkach v laminárnom boxe pridané 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution. Médium bolo rozliate po 50 ml do sterilných hranatých Petriho misiek a skladované v chladničke pri teplote 4°C pre ďalšie použitie.

3.2.4 Príprava MS média

Do 1000 ml kadičky bolo pridaných 850 ml MilliQ vody, MS basalt salt mixture, myo-inositol, sacharóza a Gellan gum. Všetky zložky boli pridávané za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Po pridaní a rozmiešaní všetkých zložiek bol objem doplnený MilliQ vodou na 1000 ml a pH upravené na 5,7 pomocou 1 M/0,1 M KOH. Médium bolo rozliate po 500 ml do dvoch 1000 ml sklenených fliaš a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii bolo vychladené na cca 55°C a v sterilných podmienkach v laminárnom boxe doplnené o antibiotikum Tikarcilín (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pripravené médium bolo rozliate do hranatých sterilných Petriho misiek po 50 ml. Médium bolo skladované v chladničke pri teplote 4°C.

3.2.5 Príprava SH4K média

V 1000 ml bolo zmiešané za stáleho miešania na magnetickej miešačke 850 ml MilliQ vody, Schenk and Hildebrandt, síran draselný, kvasničný extrakt, myo-inositol, roztok prolínu s thioprolínom, sacharózu a nakoniec Gellan gum. Objem bol na 1000 ml doplnený MilliQ vodou a pH bolo upravené 1 M/0,1 M KOH na 5,7. Médium bolo rozliate po 500 ml do dvoch 1000 ml sklenených fliaš a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo médium ochladené na približne 55°C. Do vychladeného média za sterilných podmienok v laminárnom boxe boli pridané hormóny (2,4 – D, kinetín) a antibiotikum Tikarcilín (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na prevenciu proti bakteriálnym infekciám.

Zložky pridávané po sterilizácii v autokláve boli vopred prefiltrované cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm . Médium bolo rozliate do sterilných okrúhlych Petriho misiek po 25 ml a pre ďalšie použitie skladované v chladničke pri teplote 4°C.

3.2.6 Príprava BOi2Y média

Do kadičky s objemom 1000 ml bolo za stáleho miešania na magnetickej miešačke pridaných 850 ml MilliQ vody, do ktorej postupne boli pridané zo zásobných roztokov makroživiny (KH_2PO_4 , KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, KCl), glycín, thiamín hydrochlorid, kvasničný extrakt, sacharóza, FeNaEDTA a Gellan gum. Objem bol doplnený MilliQ vodou na 1000 ml a pH bolo upravené 1 M/0,1 M KOH na 5,7. Následne médium bolo rozliate po 500 ml do dvoch 1000 ml sklenených fliaš a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo médium ochladené na približne 55°C a doplnené zásobným roztokom mikroživín (KI , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) prefiltrovanými cez bakteriologický filter s veľkosťou pórov 0,22 μm a antibiotikom Tikarcilín (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Médium bolo rozliate do sterilných okrúhlych Petriho misiek po 25 ml a pre ďalšie použitie skladované v chladničke pri teplote 4°C.

3.2.7 Indukcia nepriamej somatickej embryogenézy *M. sativa*

3.2.7.1 Sterilizácia listov *M. sativa*

Z rastlín *M. sativa* rastúcich v *in vitro* podmienkach vo fytotrone boli odobraté listy. Na jednu Petriho misku boli odobrané dva listy z hornej časti výhonkov nekvitnúcej rastliny. Pri prvom prevedení somatickej embryogenézy boli za sterilných podmienok v laminárnom boxe listy prenesené do skúmavky typu Falcon (50 ml) so 70% etanolom a sterilizované po dobu 3 s. Následne boli presunuté do skúmavky typu Falcon (50 ml) so sterilizačným roztokom (1% hypochlorit sodný + 0,05% tween), v ktorom boli sterilizované 1,5 min za stáleho pretrepávania. Po sterilizácii boli listy 3x prepláchnuté v sterilnej vode. Pri druhom prevedení somatickej embryogenézy boli listy rovnako odobrané z rastlín pestovaných v *in vitro* podmienkach, ale boli len prepláchnuté v sterilnej vode s vynechaním procesu sterilizácie.

3.2.7.2 Príprava explantátov

Po sterilizácii (prípadne len preplachovaní sterilnou vodou) boli listy pomocou pinzety presunuté zo skúmavky typu Falcon na navlhčený sterilný filtračný papier v Petriho miske. Jednotlivé listy boli skalpelom horizontálne prerezané na polovicu. Tieto časti boli následne uložené abaxiálnou stranou na kalus-indukujúce médium (B5H médium, SH4K

médium) v Petriho miskách. Všetky kroky boli robené v sterilných podmienkach laminárneho boxu.

3.2.7.3 Regenerácia rastlín a ich udržiavanie v *in vitro* podmienkach

Jedna Petriho miska z každej línie bola náhodne zvolená a zabalená do alobalu a uložená do fytotronu na kultiváciu v tme. Ostatné Petriho misky boli označené a kultivované vo fytotrone pri fotoperióde 16 hodín svetlo, 8 hodín tma, intenzite svetla $60-80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplote 24°C . Kultivácia na kalus-indukujúcom médiu prebiehala po dobu 3 týždňov až do vytvorenia embryogénnych kalusov. Kalusy boli preložené na médium indukujúce tvorbu somatických embryí (B50 médium, alternatívne BOi2Y médium) na dobu približne troch týždňoch až do vytvorenia vyvinutých somatických embryí vhodných na preloženie na médium podporujúce tvorbu koreňov (MMS médium). Petriho misky zabalené v alobale v prvej fáze somatickej embryogenézy zostali v alobale zabalené aj v priebehu prvých 6 dní po preložení na B50 a BOi2Y médium. Následne ďalšia kultivácia prebiehala rovnako, ako v prípade zvyšných vzoriek, teda na svetle. Po vytvorení koreňov boli rastlinky prenesené na MS médium, určené na vývoj a uchovávanie mladých rastlín.

3.2.8 Vyhodnocovanie a spracovanie výsledkov

Proces nepriamej somatickej embryogenézy v rámci praktickej časti bol vyhodnocovaný kvalitatívne a kvantitatívne. Na kvalitatívnu dokumentáciu a kvantitatívne vyhodnotenie formovania kalusov, vytvorených na B5H a SH4K médiu na Petriho miskách, bola použitá obrazová dokumentácia pomocou skenera (Image scanner III). Po presunutí na B50 a BOi2Y médium boli jednotlivé kalusy a proces tvorby somatických embryí fotograficky dokumentované na Zoom mikroskope, a vyhodnotené pomocou softvéru ZEN 3.5 blue edition. Táto analýza bola vykonaná po 22 dňoch kultivácie kultúr na zmienených médiách.

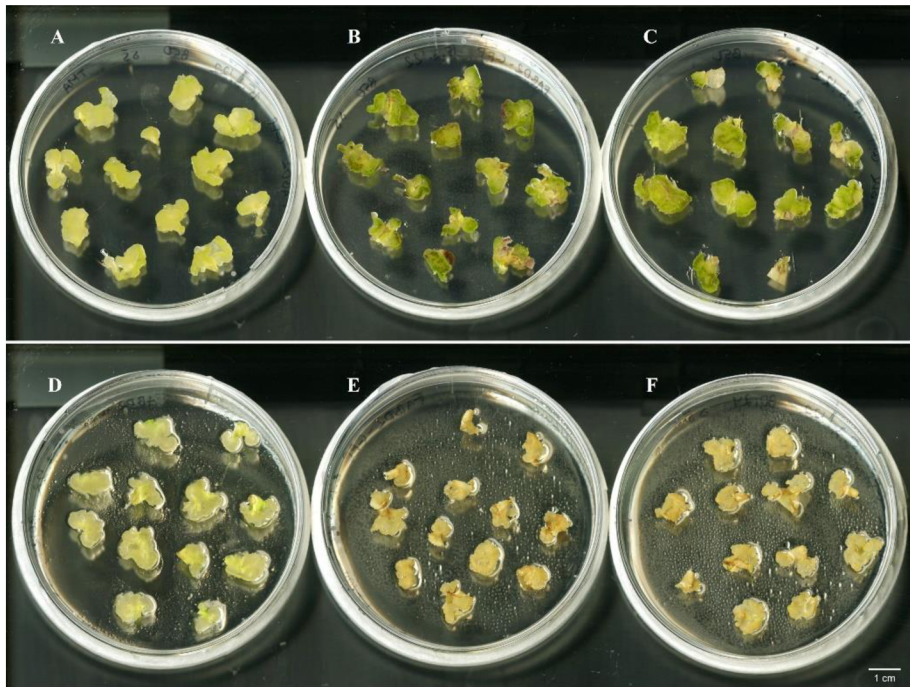
Výsledky získané z obrazovej dokumentácie pomocou skenera a mikroskopu, použité na kvalitatívne vyhodnotenie, boli spracované v programe Power Point 365, a kvantitatívne vyhodnotené pomocou programu Image J a Microsoft Excel 365. Štatistická analýza získaných dát bola spracovaná v programe GraphPad Prism 9.3.1 prostredníctvom One-way ANOVA testu a následného Turkey's multiple comparisons testu.

4 VÝSLEDKY

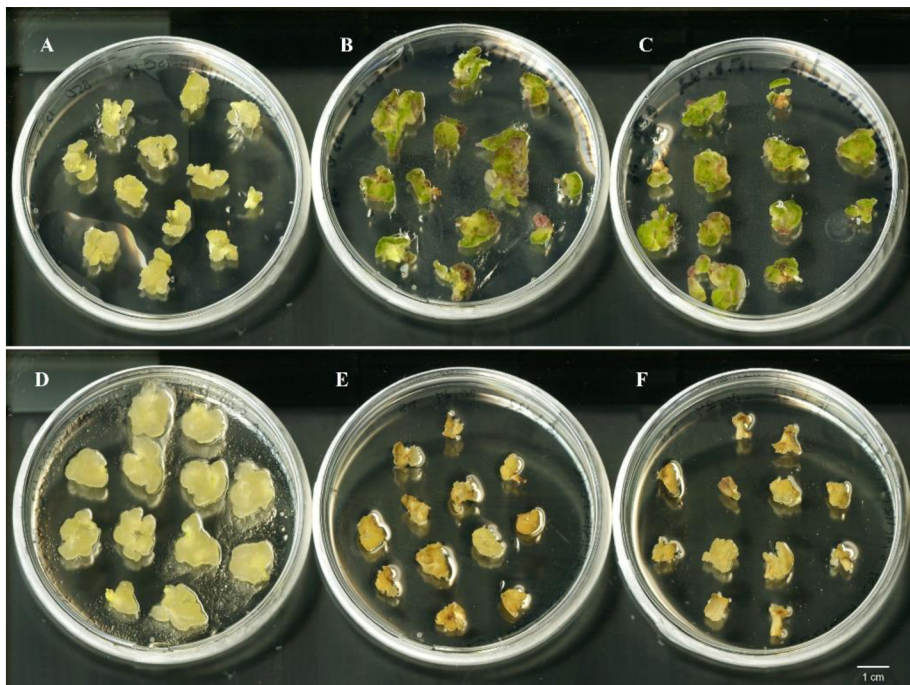
Táto kapitola je zameraná na vyhodnotenie získaných výsledkov z experimentálnej časti práce. Prvá časť tejto kapitoly sa zameriava na kvalitatívnu charakteristiku embryogénneho a regeneračného procesu *in vitro* u kontrolných a transgénnych kultúr *M. sativa*, a druhá časť sa venuje kvantitatívnemu vyhodnoteniu embryogénneho potenciálu týchto kultúr.

4.1 Kvalitatívna dokumentácia procesu kalogenézy

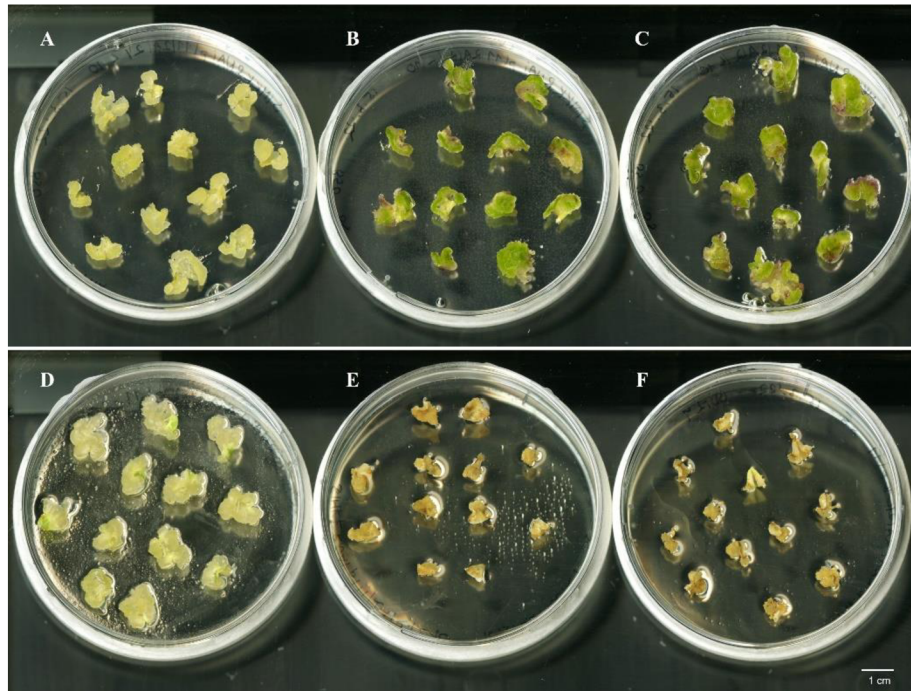
Nepriama somatická embryogenéza u všetkých študovaných línií *M. sativa* (kontrolný genotyp RSY, a transgénne línie GFP-FABD2 a *SIMKK RNAi*) bola indukovaná na okrúhlych Petriho miskách s dvomi alternatívnymi médiami, B5H a SH4K. Tieto médiá by mali indukovať kalogenézu na primárnych explantátoch. Z celkového počtu troch Petriho misiek na každú sledovanú líniu a verziu kultivačného média, vždy jedna bola náhodne vybraná a kultivovaná počas celého obdobia indukcie kalogenézy na týchto médiách v tme. Zvyšné dve misky z každej línie boli kultivované za štandardných podmienok striedania svetla a tmy vo fytotronovej komore. Po troch týždňoch kultivácie na týchto médiách boli vytvorené kalusy preložené na B50 a BOi2Y média bez hormónov. Preklad prebiehal vždy podľa stanoveného protokolu, teda kalusy z B5H média boli preložené na B50 médium, a kalusy z SH4K média na BOi2Y médium. Bezprostredne po preložení kalusov boli Petriho misky skenované pomocou skenera, aby bolo možné zo získaných obrázkov charakterizovať kalusy, líšiace sa farebne a morfológicky, a korelovať to s vplyvom odlišných podmienok kultivácie (Obr. 4, 5, 6). Kalus na B5H médiu za štandardných svetelných podmienok bol sfarbený do zelena (Obr. 4B, 4C, 5B, 5C, 6B, 6C), avšak kalus vytvorený pri modifikovaných podmienkach (v tme) bol v prípade B5H média (Obr. 4A, 5A, 6A) aj SH4K média (Obr. 4D, 5D, 6D) krémovo-biely. Kalus vytvorený na SH4K médium za štandardných svetelných podmienok bol vysušený, nekrotický, a mal bielo-žltú až hnedú farbu (Obr. 4E, 4F, 5E, 5F, 6E, 6F).



Obrázok 4. Kalusy línie RSY na B50 a BOi2Y médiu nasnímané po preložení z B5H a SH4K médií, na ktorých prebiehala kultivácia 3 týždne: B50 médium, modifikované podmienky (tma; A), B50 médium, štandardné svetelné podmienky (B, C), BOi2Y médium, modifikované podmienky (tma; D), BOi2Y médium, štandardné svetelné podmienky (E, F). Mierka – 1 cm.



Obrázok 5. Kalusy línie GFP-FABD2 na B50 a BOi2Y médiu nasnímané po preložení z B5H a SH4K médií, na ktorých prebiehala kultivácia 3 týždne: B50 médium, modifikované podmienky (tma; A), B50 médium, štandardné svetelné podmienky (B, C), BOi2Y médium, modifikované podmienky (tma; D), BOi2Y médium, štandardné svetelné podmienky (E, F). Mierka – 1 cm.

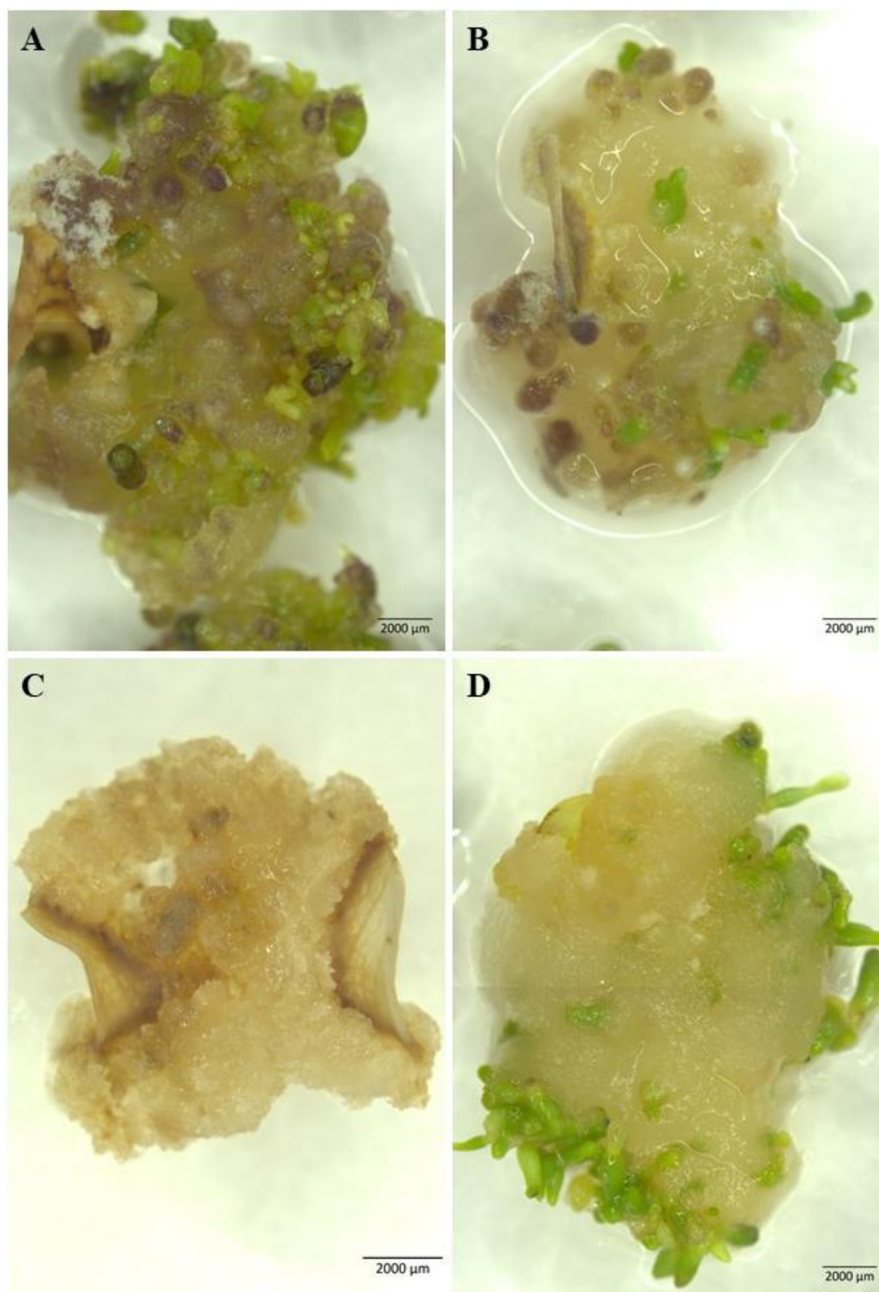


Obrázok 4. Kalusy línie *SIMKK RNAi* na B50 a BOi2Y médiu nasnímané po preložení z B5H a SH4K médií, na ktorých prebiehala kultivácia 3 týždne: B50 médium, modifikované podmienky (tma; A), B50 médium, štandardné svetelné podmienky (B, C), BOi2Y médium, modifikované podmienky (tma; D), BOi2Y médium, štandardné svetelné podmienky (E, F). Mierka – 1 cm.

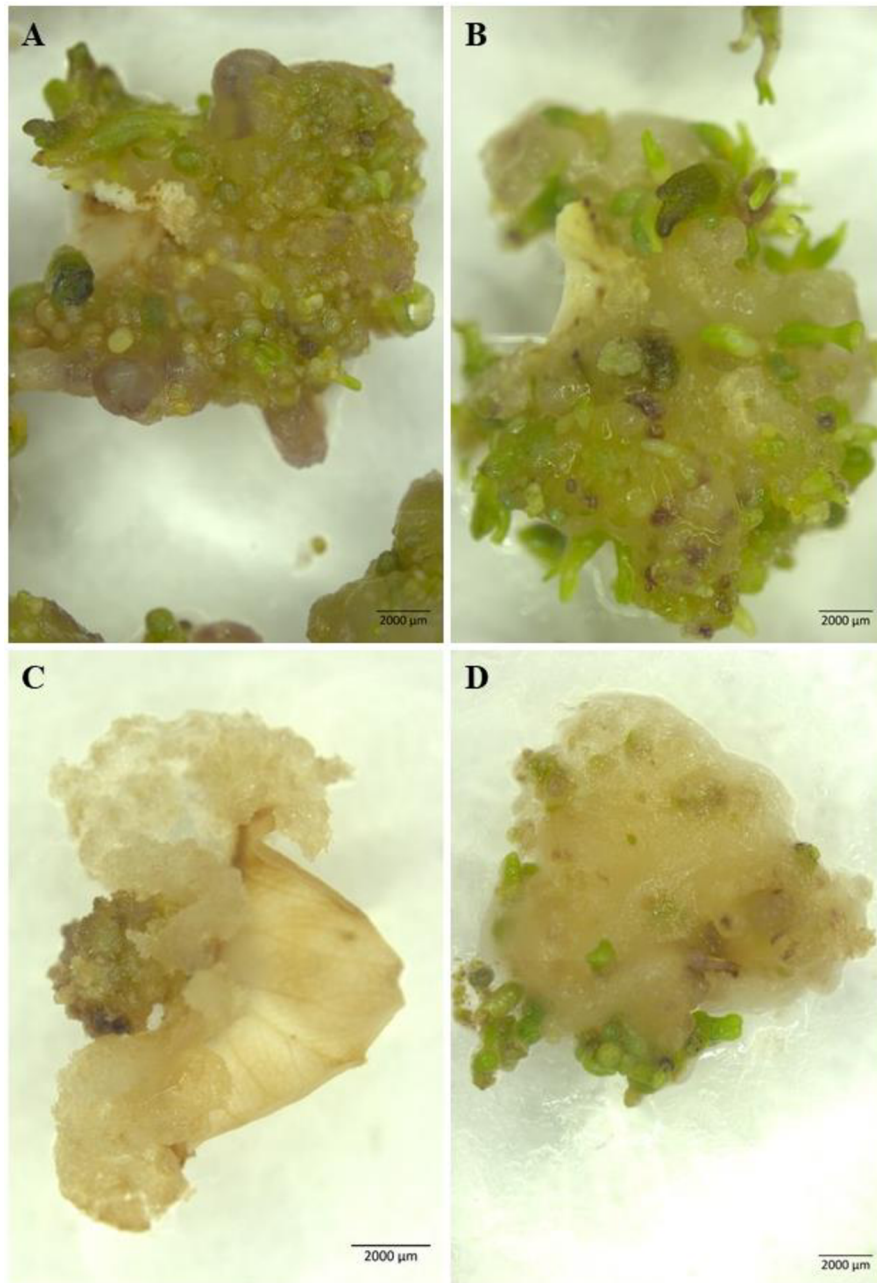
4.2 Kvalitatívne vyhodnotenie embryogénneho potenciálu

Po troch týždňoch kultivácie na B50 a BOi2Y médiu sa na embryogénnych kalusoch vytvorili somatické embryá, ktoré boli v rôznych vývojových štádiách. Z pozorovaní bolo zrejmé, že somatické embryá vytvorené pri modifikovaných podmienkach (tma) na médiu BOi2Y boli lokalizované hlavne na okrajoch kalusov (Obr. 7 D, 8D, 9D). V prípade štandardných svetelných podmienok nedošlo na BOi2Y médiu k vytvoreniu diferencovaných somatických embryí (Obr. 7 C, 8C, 9C), s výnimkou jedného explantátu u línie RSY, kde bola pozorovaná počiatková fáza ich tvorby (Obr. 10). Somatické embryá vytvorené na B50 médiu za štandardných svetelných podmienok (Obr. 7A, 8A, 9A), ale aj za modifikovaných podmienok (tma; Obr. 7B, 8B, 9B) sa tvorili na celom povrchu kalusu. Avšak v prípade štandardných svetelných podmienok väčšina somatických embryí bola zaznamenaná v skorých vývojových štádiách (globulárne a srdcovité štádium), pričom v prípade modifikovaných podmienok (tma) bol zjavný výskyt somatických embryí prevažne v neskorších vývojových štádiách (torpédovité a kotyledonárne štádium). Kalusy, ktoré boli kultivované v tme počas prvej fázy indukcie

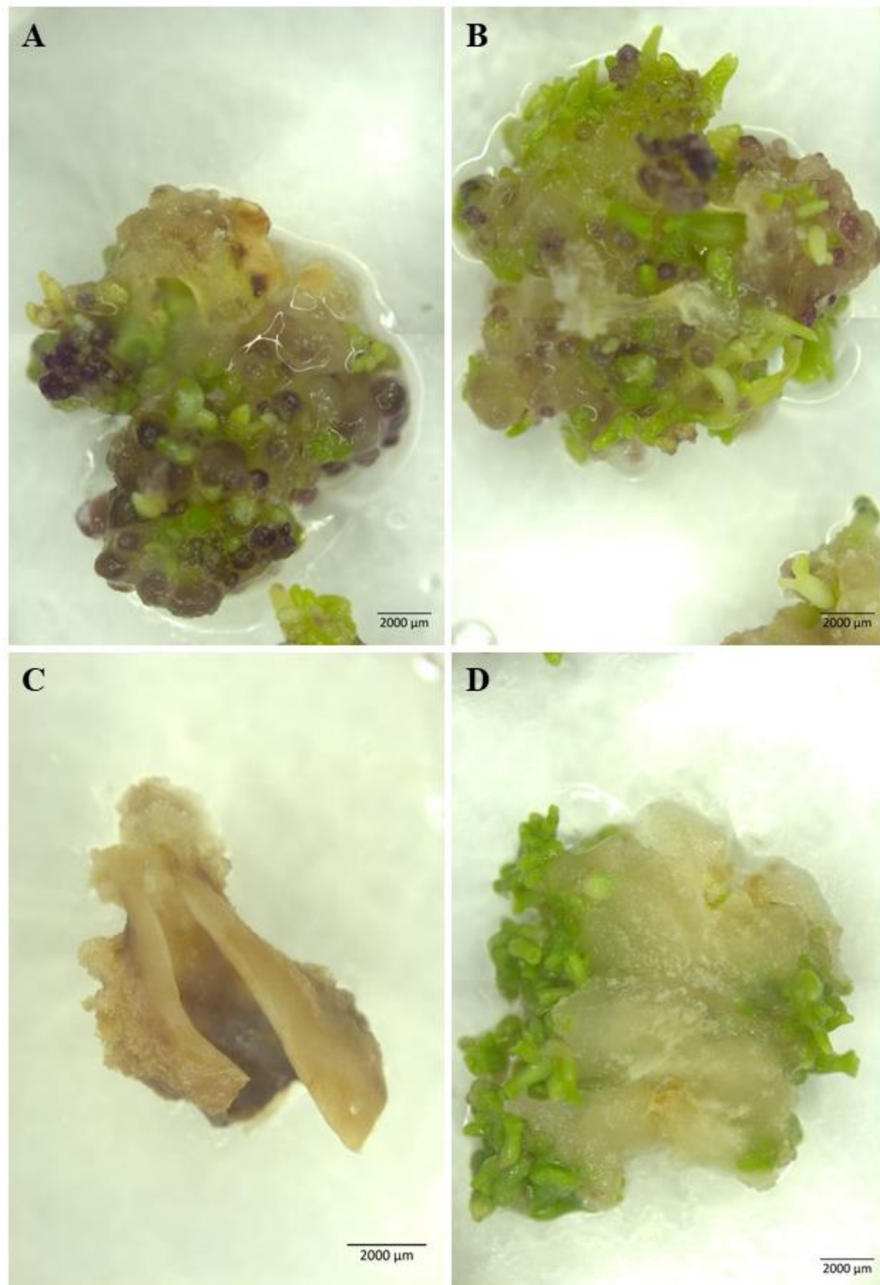
(na médiách s obsahom hormónov), a aj ďalších 6 dní po prenesení na bezhormonálne médiá, mali stále bledšie zafarbenie oproti kalusom produkovaným za štandardných svetelných podmienok, s výnimkou kalusov na BOi2Y médiu za štandardných svetelných podmienok, ktoré mali výrazne tmavší odtieň hnedej farby.



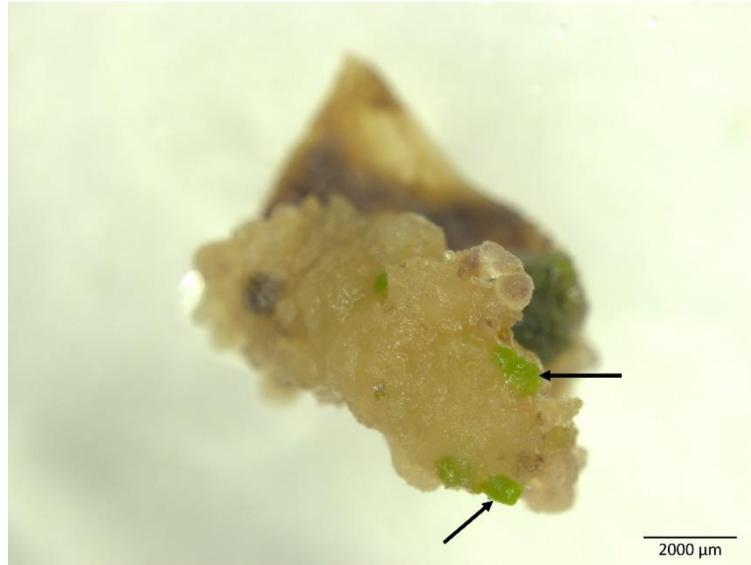
Obrázok 5. Kalusy a somatické embryá línie RSY vytvorené po 3 týždňoch kultivácie na B50 a BOi2Y médiu: B50 médium, štandardné svetelné podmienky (A), B50 médium, modifikované podmienky (tma; B), BOi2Y médium, štandardné svetelné podmienky (C), BOi2Y médium, modifikované podmienky (tma; D). Mierka – 2000 µm.



Obrázok 6. Kalusy a somatické embryá línie GFP-FABD2 vytvorené po 3 týždňoch kultivácie na B50 a BOi2Y médiu: B50 médium, štandardné svetelné podmienky (A), B50 médium, modifikované podmienky (tma; B), BOi2Y médium, štandardné svetelné podmienky (C), BOi2Y médium, modifikované podmienky (tma; D). Mierka – 2000 µm.



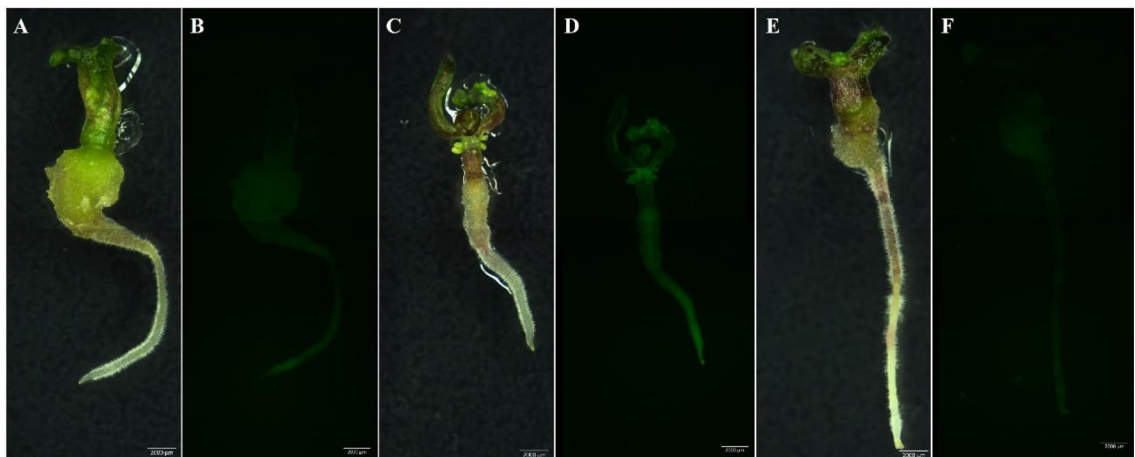
Obrázok 7. Kalusy a somatické embryá línie *SIMKK RNAi* vytvorené po 3 týždňoch kultivácie na B50 a BOi2Y médiu: B50 médium, štandardné svetelné podmienky (A), B50 médium, modifikované podmienky (tma; B), BOi2Y médium, štandardné svetelné podmienky (C), BOi2Y médium, modifikované podmienky (tma; D). Mierka – 2000 μm.



Obrázok 8. Kalus línie RSY vytvorený na BOi2Y médiu pri štandardných svetelných podmienkach. Šípky označujú iniciačnú fázu tvorbu somatických embryí. Mierka - 2000 μm .

4.3 Kvalitatívne vyhodnotenie regeneračného potenciálu

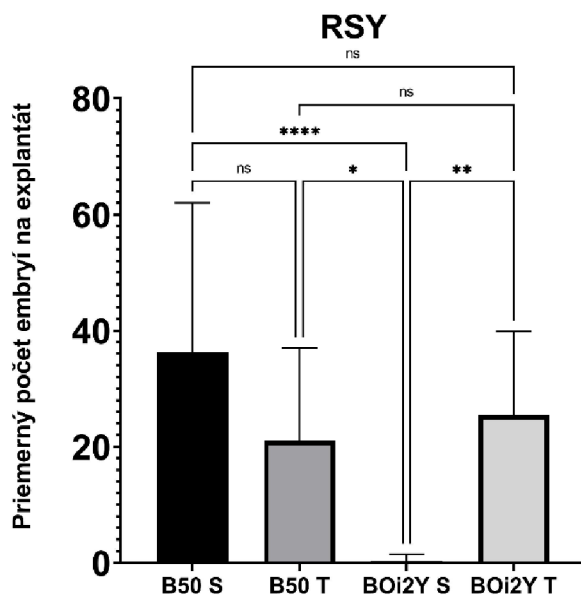
Somatické embryá boli z B50 a BOi2Y médií presunuté na MMS médium, podporujúce tvorbu koreňov. Po indukcii koreňa boli rastliny presunuté na MS médium, určeného na ďalší vývoj a udržiavanie mladých rastlín. Na MS médiu došlo k rastu aj nadzemnej, a aj koreňovej časti regenerovaných rastlín (Obr. 11).



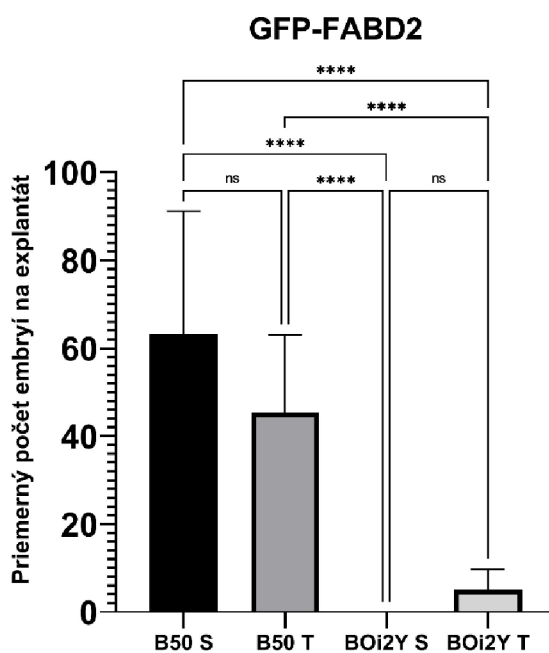
Obrázok 9. Vývoj rastlín *M. sativa* na MS médiu: RSY línia v prechádzajúcom svetle (A), RSY línia vo fluorescenčnom svetle k vizualizácii GFP (B), GFP-FABD2 línia v prechádzajúcom svetle (C), GFP-FABD2 línia vo fluorescenčnom svetle k vizualizácii GFP (D), *SIMKK RNAi* línia v prechádzajúcom svetle (E), *SIMKK RNAi* vo fluorescenčnom svetle k vizualizácii GFP (F). Mierka – 2000 μm .

4.4 Kvantitatívne vyhodnotenie embryogénneho potenciálu

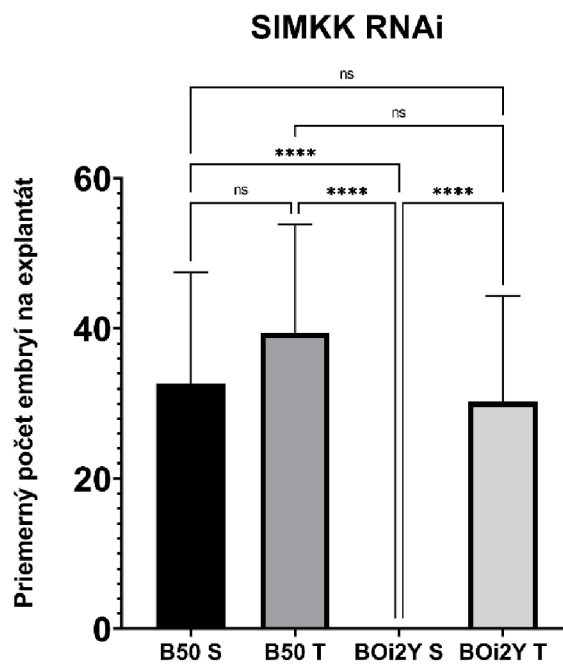
Kvalitatívne výsledky pozorovaní boli doplnené o kvantitatívne vyhodnotenia embryogénneho potenciálu *in vitro* kultúr *M. sativa*. Na základe týchto analýz bolo zistené, že embryogénny potenciál sa líšil v závislosti od línie, ale aj od spôsobu kultivácie a indukcie somatickej embryogenézy. Kvantitatívne vyhodnotenie potvrdilo, že s výnimkou ojedinelých (celkovo štyroch) somatických embryí u línie RSY kultivovanej na BOi2Y médiu za štandardných svetelných podmienok, u ostatných sledovaných línií za týchto podmienok k tvorbe somatických embryí vôbec nedošlo. Tento kultivačný variant tým pádom vykazuje aj najväčší štatisticky významný rozdiel v porovnaní s ďalšími tromi spôsobmi kultivácie (Obr. 12, 13, 14). V prípade kontrolnej línie RSY sa vykazovala kultivácia na B50 médiu pri štandardných svetelných podmienkach, a na BOi2Y médiu pri modifikovaných podmienkach (tma) najoptimálnejšie výsledky (Obr. 12). Línia GFP-FABD2 vykazovala najvyššiu mieru tvorby somatických embryí na B50 médiu v štandardných svetelných podmienkach a aj za tmy, pričom však alternatívny spôsob kultivácie na BOi2Y médiu ukazoval nižšiu efektivitu tvorby somatických embryí (Obr. 13). U línie *SIMKK RNAi* nevykazovala efektivita tvorby somatických embryí na takmer všetkých typoch kultivačných médií, za rôznych kultivačných podmienok, žiadne štatisticky významné rozdiely, pravdaže s výnimkou média BOi2Y pri kultivácii za štandardných svetelných podmienok (Obr. 14).



Obrázok 10. Graf zobrazujúci porovnanie priemerného počtu vytvorených somatických embryí v prepočte na explantát u línie RSY pri rôznych kultivačných podmienkach - modifikované podmienky (tma; T), štandardné svetelné podmienky (S). „ns“ znamená bez rozdielu, štatisticky významný rozdiel označujú hviezdičky pri $p < 0,05$, ktorý bol stanovený One-way ANOVA testom a Turkey's multiple comparisons testom. N=12.



Obrázok 13. Graf zobrazujúci porovnanie priemerného počtu vytvorených somatických embryí v prepočte na explantát u línie GFP-FABD2 pri rôznych kultivačných podmienkach - modifikované podmienky (tma; T), štandardné svetelné podmienky (S). „ns“ znamená bez rozdielu, štatisticky významný rozdiel označujú hviezdičky pri $p < 0,05$, ktorý bol stanovený One-way ANOVA testom a Turkey's multiple comparisons testom. N=12.



Obrázok 14. Graf zobrazujúci porovnanie priemerného počtu vytvorených somatických embryí v prepočte na explantát u línie *SIMKK RNAi* pri rôznych kultivačných podmienkach - modifikované podmienky (tma; T), štandardné svetelné podmienky (S). „ns“ znamená bez rozdielu, štatisticky významný rozdiel označujú hviezdičky pri $p < 0,05$, ktorý bol stanovený One-way ANOVA testom a Turkey's multiple comparisons testom. N=12.

5 DISKUSIA

Somatická embryogenéza, ako proces tvorby somatických embryí zo somatických buniek, je široko využívaná na regeneráciu a množenie rôznych rastlinných druhov *in vitro*, vrátane *M. sativa* (Sangra et al., 2019). Na úspešnú indukciu somatickej embryogenézy sú zásadnými faktormi kultivačné médium, fyziologický stav rastliny a explantátov (Iantcheva et al., 2005). V publikovaných štúdiách bolo dokázané, že kombinácia rôznych kultivačných médií má vplyv na rýchlosť kalogenézy, morfológiu kalusov a aj počet vytvorených somatických embryí. Za najvýhodnejšiu kombináciu indukčných a kultivačných médií na tvorbu somatických embryí u *M. sativa* sa javí kombinácia B5H média spoločne s B50 médiom, a použitie SH4K média, ktoré je nasledované BOi2Y médiom (Tian et al., 2002; Sangra et al., 2019). Ďalšie média využiteľné pre somatickú embryogenézu u *M. sativa* sú SH médium, alebo MS2D médium (Fujii et al., 1990; Sangra et al., 2019). V predloženej bakalárskej práci boli testované práve vyššie uvedené dve kombinácie, teda kombinácia B5H a B50 média, a kombinácia SH4K a BOi2Y média. Pri týchto experimentoch bolo zistené, že dôležitý vplyv na priebeh somatickej embryogenézy okrem použitých kultivačných médií mali aj kultivačné podmienky, pri ktorých boli explantáty na týchto médiách kultivované. Médium SH4K a BOi2Y nebolo vhodné na kultiváciu za štandardných podmienok pri striedaní svetla a tmy, pretože s výnimkou jediného explantátu línie RSY, na ktorom sa vytvorilo malé množstvo somatických embryí, pri transgénnych líniách GFP-FABD2 a *SIMKK RNAi* nedošlo k tvorbe somatických embryí, a ani embryogénneho kalusu. Na základe štúdie, kde iniciovali somatickú embryogenézu na kultivačných médiách SH4K a BOi2Y v tme, pričom táto indukcia bola úspešná (Sangra et al., 2019), sme otestovali modifikované podmienky aj v bakalárskej práci. Výsledky preukázali značný rozdiel v efektívite tvorby somatických embryí. Ako prípadná náhrada za SH4K médium sa zdá byť vhodné využitie SH média, pri použití ktorého je možná kultivácia za štandardných svetelných podmienok (Brown & Atanassov, 1985; Fujii et al., 1990).

Jednotlivé kroky somatickej embryogenézy, jej celková úspešnosť, a optimalizácia kultivačných podmienok môžu byť vyhodnocované rôznymi metódami. Vo viacerých štúdiách boli využité kvalitatívne metódy vyhodnocovania v podobe mikroskopických, fotografických a ďalších skriningových metód, ktoré boli následne kombinované s kvantitatívnym vyhodnotením (Varga & Badea, 1992; Sangra et al., 2019). V rámci kvalitatívnych metód je možné vyhodnotiť morfológiu, farbu a štruktúru indukovaného

embryogénneho kalusu a aj samotných somatických embryí (Tian et al., 2002). Ďalšou možnosťou je využitie fenotypových charakteristík už vyvinutých rastlín. Kvantitatívne metódy nachádzajú využitie najmä pri zisťovaní embryogénneho potenciálu, kde sa v spojení so štatistickými analýzami určuje počet vytvorených somatických embryí na explantát, prípadne sa porovnáva počet somatických embryí v rôznych štádiách vývoja v rovnakom čase (Shetty & McKersie, 1993; Piccioni et al., 1996). Vďaka týmto metódam je možné vyhodnotiť línie jednotlivo, a zároveň ich porovnať medzi sebou. Aj keď každá z vyhodnocovacích techník samostatne sprostredkúva dôležité poznatky, využitie kombinácie kvantitatívnych a kvalitatívnych metód prináša presnejšie a objektívnejšie spracovanie výsledkov. Spomedzi metód zmienených v doteraz prevedených štúdiách boli preto pri riešení úloh predkladanej bakalárskej práce zvolené najoptimálnejšie kvalitatívne aj kvantitatívne metódy, ktoré boli využité k charakteristike embryogénneho potenciálu študovaných línií. Získané výsledky môžu byť využité pri optimalizácii kultivačných techník a k ďalším experimentom zameraných na somatickú embryogenézu *M. sativa*, avšak bude nutné potrebné experimenty zopakovať a výsledky overiť pri ďalších analýzach.

6 ZÁVER

Bakalárska práca bola rozdelená na teoretickú a praktickú časť. V teoretickej časti bola vypracovaná rešerš zameraná na základný popis *Medicago sativa* L., jej vývoj a dôležité spôsoby využitia tejto významnej plodiny v poľnohospodárstve. V ďalšej časti teoretického úvodu boli popísané transformačné metódy k získavaniu modifikovaných línií, ako aj signálne dráhy podieľajúce sa na regulácii vývojových procesov a v reakciách na stresové podmienky u rastlín, so špeciálnym zameraním na lucernu. Ďalej boli objasnené spôsoby indukcie a získavania rastlín *in vitro* prostredníctvom procesu somatickej embryogenézy, význam vhodného výberu explantátov a zloženia kultivačného média. V poslednej kapitole v rámci teoretickej časti boli popísané metódy vyhodnocovania regeneračného potenciálu pri regenerácii rastlín *in vitro* procesom somatickej embryogenézy.

V prvej fáze praktickej časti boli vykonané experimenty zamerané na indukciu somatickej embryogenézy u kontrolných rastlín lucerny genotypu RSY, a u dvoch línií transgénnych rastlín lucerny, GFP-FABD2 a *SIMKK RNAi*. Tieto experimenty boli prevádzané v *in vitro* podmienkach prostredníctvom somatickej embryogenézy indukovanej buď pri štandardných svetelných podmienkach bežne využívaných v laboratóriách, a na médiách k indukcii somatickej embryogenézy u lucerny bežne využívaných, alebo v tme s indukciou somatickej embryogenézy s využitím alternatívneho zloženia kultivačných médií. Následne boli pozorované výsledky kvantitatívne a kvalitatívne vyhodnotené, pričom bol stanovený embryogénny a regeneračný potenciál uvedených kontrolných a transgénnych línií lucerny v týchto experimentálnych podmienkach. Z dosiahnutých výsledkov je zrejmé, že modifikované svetelné podmienky a alternatívne zloženie indukčných médií má vplyv nielen na morfológiu kalusov, ale aj na embryogénny a regeneračný potenciál testovaných línií *in vitro*. Keďže sa embryogénny potenciál u jednotlivých línií líšil, získané výsledky môžu výrazne prispieť k optimalizácii a k zefektívneniu regeneračných metód využívaných na indukciu somatickej embryogenézy u kontrolných aj transgénnych línií rastlín *M. sativa* na našom pracovisku.

7 LITERATÚRA

- Abrahamian, P., Kantharajah, A., Abrahamian, P., Kantharajah, A. (2011). Effect of Vitamins on In Vitro Organogenesis of Plant. *American Journal of Plant Sciences*, 2(5), 669–674. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2011.25080>
- Ahlfors, R., Macioszek, V., Rudd, J., Brosché, M., Schlichting, R., Scheel, D., Kangasjärvi, J. (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal*, 40(4), 512–522. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2004.02229.X>
- Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N. A., Al-Qurainy, F. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*, 30(3), 524–540. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.09.006>
- Ahmed, B., Jailani, A., Lee, J. H., Lee, J. (2022). Effect of halogenated indoles on biofilm formation, virulence, and root surface colonization by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chemosphere*, 293, 133603. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.133603>
- Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Voytas, D. F. (2017). Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Challenges. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 149, 1–26. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2017.03.011>
- Bataklijev, T., Georgiev, V., Anachkov, M., Rakovsky, S., Zaikov, G. E. (2014). Ozone decomposition. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 47. <https://doi.org/10.2478/INTOX-2014-0008>
- Bates, G. W. (1995). Chapter 26 Electroporation of Plant Protoplasts and Tissues. *Methods in Cell Biology*, 50(C), 363–373. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61043-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61043-2)
- Beck, M., Komis, G., Ziemann, A., Menzel, D., Samaj, J. (2011). Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 189(4), 1069–1083. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2010.03565.X>
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vyplelová, P., Ovečka, M., Luptovčíak, I., Illés, P., Kuchařová, A., Šamaj, J. (2015). Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00336/ABSTRACT>
- Berthet, B., Maizel, A. (2016). Light sheet microscopy and live imaging of plants. *Journal of Microscopy*, 263(2), 158–164. <https://doi.org/10.1111/JMI.12393>
- Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 31–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Bloodnick Ed. (2021). *Role of Zinc in Plant Culture | PRO-MIX Greenhouse Growing*. <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/role-of-zinc-in-plant-culture/>
- Brown, D. C. W., Atanassov, A. (1985). Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1985 4:2, 4(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/BF00042269>
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., Hirt, H. (2000). Differential Activation of Four Specific MAPK Pathways by Distinct Elicitors *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36734–36740. <https://doi.org/10.1074/JBC.M007418200>
- Chimdessa Emiru. (2020). Composition and Preparation of Plant Tissue Culture Medium. *Journal of Tissue Culture and Bioengineering*. <https://doi.org/10.29011/2688-6502.000020>
- Clarkson, D. T., Hanson, J. B. (1980). The Mineral Nutrition of Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 239–298. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PP.31.060180.001323>
- de Vries, S. C., Weijers, D. (2017). Plant embryogenesis. *Current Biology*, 27(17), R870–R873. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.05.026>
- Desgagnés, R., Laberge, S., Allard, G., Khoudi, H., Castonguay, Y., Lapointe, J., Michaud, R., Vézina, L. P. (1995). Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1995 42:2, 42(2), 129–140. <https://doi.org/10.1007/BF00034229>
- Dudits, D., Bögre, L., Györgyey, J. (1975). Molecular and cellular approaches to the analysis of

- plant embryo development from somatic cells in vitro. *Journal of Cell Science*, 99, 473–482.
- Dürrenberger, M. B., Handschin, S., Conde-Petit, B., Escher, F. (2001). Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *LWT - Food Science and Technology*, 34(1), 11–17. <https://doi.org/10.1006/FSTL.2000.0739>
- Ebert, J. (2007). *Alfalfa's bioenergy appeal*. <http://www.ethanolproducer.com/articles/3247/alfalfas-bioenergy-appeal/>
- Fehér, A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science*, 0, 536. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00536>
- Fujii, J. A. A., Slade, D., Olsen, R., Ruzin, S. E., Redenbaugh, K. (1990). Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science*, 72(1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90190-Y](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90190-Y)
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. In vitro, 12(7), 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF02796489>
- Garcês, H., Sinha, N. (2009). The 'Mother of Thousands' (*Kalanchoë daigremontiana*): A Plant Model for Asexual Reproduction and CAM Studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb.emo133. <https://doi.org/10.1101/PDB.EMO133>
- Gaspar, T., Keveks, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 1996 32:4, 32(4), 272–289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. De. (2008). The Components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 1, 65–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Hájková, J. (2015). *Tolice Vojtěška - Medicago sativa - PŘÍRODA.cz*. <https://www.priroda.cz/clanky.php?detail=2758>
- He, X., Wang, C., Wang, H., Li, L., Wang, C. (2020). The Function of MAPK Cascades in Response to Various Stresses in Horticultural Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 952. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00952/BIBTEX>
- Hettenhausen, C., Schuman, M. C., Wu, J. (2015). MAPK signaling: A key element in plant defense response to insects. *Insect Science*, 22(2), 157–164. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12128>
- Hrabě, F. (2004). *Trávy a jetelovino-trávy v zemědělské praxi*. Vydavatelství ing. Petr Baštan.
- Hui, S. W. (1995). Effects of Pulse Length and Strength on Electroporation Efficiency. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 48, 29–40. <https://doi.org/10.1385/0-89603-328-7:29>
- Iantcheva, A., Vlahova, M., Atanassov, A. (2005). Somatic Embryogenesis in Genera: an Overview. *Plant Cell Monographs*, 2, 285–304. https://doi.org/10.1007/7089_025
- Ibaraki, Y., Kaneko, Y., Kurata, K. (1998). Evaluation of embryogenic potential of cell suspension cultures by texture analysis.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal*, 24(5), 655–665. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2000.00913.X>
- Jhansi Rani, S., Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 879–883. <https://doi.org/10.1016/J.JOPR.2013.08.008>
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 2006 444:7117, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Key, S., Ma, J. K. C., Drake, P. M. W. (2008). Genetically modified plants and human health. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 101(6), 290. <https://doi.org/10.1258/JRSM.2008.070372>
- Kizeková, M. (2020). *Predpoklady úspešného pestovania lucerny siatej - Naše Pole*. <https://nasepole.sk/predpoklady-uspesneho-pestovania-lucerny-siatej/>
- Komis, G., Olga Šamajová, O., Ovečka, M., Jozef Šamaj, J. J. (2018). *Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817>
- Ligterink, W., Hirt, H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: Versatile signaling tools. *International Review of Cytology*, 201, 209–275.

- [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)01004-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)01004-X)
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 38(5), 800–809. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2004.02085.X>
- Loewus, F. A., Murthy, P. P. N. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00150-8)
- Loyola-Vargas, V. M., Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2009.04.003>
- Matsumoto, T. K., Gonsalves, D. (2012). Biolistic and other non-Agrobacterium technologies of plant transformation. *Plant Biotechnology and Agriculture*, 117–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00008-0>
- 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. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00077/BIBTEX>
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., Williams, E. G. (1990). Applications of Somatic Embryogenesis and Embryo Cloning. *Developments in Crop Science*, 19(C), 67–101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88883-9.50008-X>
- Minz, A., Sinha, A. K., Kumar, R., Kumar, B., Deep, K. P., Kumar, S. B. (2018). A Review on Importance of Cobalt in Crop Growth and Production. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7, 2978–2984.
- Nakagami, H., Kiegerl, S., Hirt, H. (2004). OMTK1, a Novel MAPKKK, Channels Oxidative Stress Signaling through Direct MAPK Interaction *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26959–26966. <https://doi.org/10.1074/JBC.M312662200>
- Nickoloff, J. A., Reynolds, R. J. (1992). Electroporation-mediated gene transfer efficiency is reduced by linear plasmid carrier DNAs. *Analytical Biochemistry*, 205(2), 237–243. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90429-B](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90429-B)
- Ovečka, M., Takáč, T., Komis, G., Vadovič, P., Bekešová, S., Doskočilová, A., Smékalová, V., Luptovčiak, I., Šamajová, O., Schweighofer, et al. (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. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU115>
- Ovečka, M., von Wangenheim, D., Tomančák, P., Šamajová, O., Komis, G., Šamaj, J. (2018). Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nature Plants* 2018 4:9, 4(9), 639–650. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0238-2>
- Pereira, L. F., Erickson, L. (1995). Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 14(5), 290–293. <https://doi.org/10.1007/BF00232030>
- Piccioni, E., Rosellini, D., Falcinelli, M., Standardi, A. (1996). Micropropagation of mother plants of lucerne (*Medicago sativa* L.) for somatic embryogenesis. *Euphytica* 1996 89:2, 89(2), 193–200. <https://doi.org/10.1007/BF00034605>
- Pitzschke, A., Hirt, H. (2009). Disentangling the Complexity of Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling. *Plant Physiology*, 149(2), 606. <https://doi.org/10.1104/PP.108.131557>
- Radoeva, T., Weijers, D. (2014). A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*, 19(11), 709–716. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2014.06.009>
- Radović, J., Sokolović, D., Marković, J. (2009). ALFALFA-MOST IMPORTANT PERENNIAL FORAGE LEGUME IN ANIMAL HUSBANDRY. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(6), 465–475.
- Ramaiah, S. M., Skinner, D. Z. (1997). Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science*, 73(8), 674–682.

- Rashmi, R., Sarkar, M., Vikramaditya. (1997). CULTIVATION OF ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L). *Ancient Science of Life*, 17(2), 117.
- Reddy, G. V., Gordon, S. P., Meyerowitz, E. M. (2007). Unravelling developmental dynamics: transient intervention and live imaging in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:6, 8(6), 491–501. <https://doi.org/10.1038/nrm2188>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.PLREV.2012.06.002>
- Saad, A. I. M., Elshahed, A. M. (2012). Plant Tissue Culture Media. *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50569>
- Sahoo, P. J. (2018). (17) (PDF) *Organogenesis and somatic embryogenesis - In vitro mutant selection for biotic and abiotic stresses*. https://www.researchgate.net/publication/332465054_Organogenesis_and_somatic_embryogenesis_-_In_vitro_mutant_selection_for_biotic_and_abiotic_stresses
- Samac, D. A. (1995). Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 43(3), 271-277.
- Samac, D. A., Austin-Phillips, S. (2006). Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 301–312. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:301>
- Šamaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., et al. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal*, 21(13), 3296–3306. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF349>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.12.002>
- Samuel, M. A., Ellis, B. E. (2002). Double Jeopardy Both Overexpression and Suppression of a Redox-Activated Plant Mitogen-Activated Protein Kinase Render Tobacco Plants Ozone Sensitive. *The Plant Cell*, 14(9), 2059–2069. <https://doi.org/10.1105/TPC.002337>
- 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). <https://doi.org/10.3390/PLANTS8080278>
- Shetty, K., McKersie, B. D. (1993). Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 88(2), 185–193. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90090-M](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90090-M)
- Shi, J., An, H. L., Zhang, L., Gao, Z., Guo, X. Q. (2010). GhMPK7, a novel multiple stress-responsive cotton group C MAPK gene, has a role in broad spectrum disease resistance and plant development. *Plant Molecular Biology*, 74(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S11103-010-9661-0/FIGURES/13>
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>
- Subki, A., Ardi, A., Abidin, Z., Norhana, Z., Yusof, B. (2018). The Role of Thiamine in Plants and Current Perspectives in Crop Improvement. *B Group Vitamins - Current Uses and Perspectives*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79350>
- Sukharev, S. I., Klenchin, V. A., Serov, S. M., Chernomordik, L. V., Chizmadzhev YuA. (1992). Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophysical Journal*, 63(5), 1320. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81709-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81709-5)
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants. <https://doi.org/10.4161/Psb.5.11.13020>, 5(11), 1370–1378. <https://doi.org/10.4161/PSB.5.11.13020>
- Teige, M., Scheickl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., & Hirt, H. (2004). The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 15(1), 141–152. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.06.023>

- Teng, X., Li, F., Lu, C. (2020). Visualization of materials using the confocal laser scanning microscopy technique. *Chemical Society Reviews*, 49(8), 2408–2425. <https://doi.org/10.1039/C8CS00061A>
- Teuber, L. R., & Brick, M. A. (1988). Alfalfa and Alfalfa Improvement. In *Alfalfa and Alfalfa Improvement* (Vol. 29, Issue Morphology and anatomy). The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America.
- Tian, L., Brown, D. C. W., Watson, E. (2002). Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2002 38:3, 38(3), 279–284. <https://doi.org/10.1079/IVP2001286>
- 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. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1814689>
- Varga, P., Badea, E. M. (1992). In vitro plant regeneration methods in alfalfa breeding. *Euphytica* 1992 59:2, 59(2), 119–123. <https://doi.org/10.1007/BF00041262>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233–249.
- Wang, J., Pan, C., Wang, Y., Ye, L., Wu, J., Chen, L., Zou, T., Lu, G. (2015). Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. *BMC Genomics*, 16(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1621-2/FIGURES/14>
- Wei, Z., Liu, Y., Lin, C., Wang, Y., Cai, Q., Dong, Y., Xing, S. (2011). Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnology Letters*, 33(12), 2487–2494. <https://doi.org/10.1007/S10529-011-0709-2/FIGURES/4>
- West, M. A. L., Harada, J. J. (1993). Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell*, 5, 1361–1369. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1361>
- Xu, J., Zhang, S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 20(1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2014.10.001>
- Yan, B., Hou, Y. (2018). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Effect of Soil Magnesium on Plants: a Review Effect of Soil Magnesium on Plants: a Review. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 170, 22168. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/170/2/022168>
- Yeh, C. M., Chien, P. S., Huang, H. J. (2007). Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 659–671. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERL240>
- Yoneyama, K., Natsume, M. (2010). Allelochemicals for Plant–Plant and Plant–Microbe Interactions. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 4, 539–561. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00105-2>
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145–156. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>
- Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Seyed, A. M., Malboobi, M. A., Habashi, A. A. (2009). Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. *Agriculture & Environment*, 7(4), 567–572.
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L., An, L. (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5–6), 274–283. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2006.06.004>
- Zhou, T., Yang, X., Guo, K., Deng, J., Xu, J., Gao, W., Lindsey, K., Zhang, X. (2016). ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in Cotton. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(6), 2108–2124. <https://doi.org/10.1074/MCP.M115.049338/ATTACHMENT/7660E053-6AF7-40CB-A629-ADDE8FC1462D/MMC1.ZIP>
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.08.029>
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher

Plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1411. <https://doi.org/10.1105/TPC.5.10.1411>
Zóbel, A. M. (1989). Origin of Nodes and Internodes in Plant Shoots. I. Transverse Zonation of Apical Parts of the Shoot on JSTOR. *Annals of Botany*, 63, 201–208.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	2,4-dichlórfenoxoctová kyselina
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopisi thaliana</i>
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	tetrahydrát dusičnanu vápenatého
Et-OH	etanol
FeNaEDTA	etyléndiamintetraoctan sodno-železitý
GUS	histochemická metóda
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	peroxid vodíka
H ₃ BO ₃	kyselina boritá
JA	kyselina jasmónová
K ₂ SO ₄	síran draselný
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
KI	iodid draselný
KNO ₃	dusičnan draselný
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L.
MAP2K	mitogén-aktivovaná proteínkinázakináza
MAP3K	mitogén-aktivovaná proteínkinázakinázakináza
MAPK	mitogén-aktivovaná proteínkináza
MAPKK	mitogén-aktivovaná proteínkinázakináza
MAPKKK	mitogén-aktivovaná proteínkinázakinázakináza
MEKK	mitogén-aktivovaná proteínkinázakinázakináza
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	heptahdrát síranu horečnatého

MKK2	mitogén-aktivovaná proteínkinázakináza 2
MnSO ₄ · H ₂ O	hydrát síranu horečnatého
NaOH	hydroxid sodný
NH ₄ NO ₃	dusičnan amónny
O ₃	ozón
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových kationov
ROS	reaktívne formy kyslíka
SA	kyselina salicylová
SIMK	stresom indukovaná mitogén-aktivovaná proteínkináza
SIPK	salicylátová proteínkináza
t-dna	transferová DNA
UV	ultrafialové žiarenie
WIPK	proteínová kináza indukovaná poranením
YDA	mitogén-aktivovaná proteínkinázakináza
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	heptahdrát síranu zinočnatého