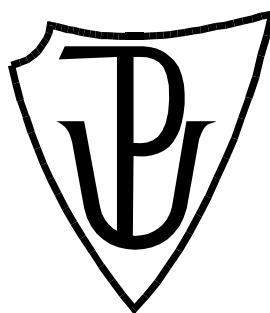


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Testování různých metod pro mikroskopické pozorování
prvotních fází interakcí rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.)
s bakteriemi *Sinorhizobium***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eva Kodadová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2019

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

V Olomouci dne

Poděkování

„Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce, panu doc. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za jeho vedení, čas a odborné rady. Také bych chtěla poděkovat Bc. Michaele Jarošové za podporu, rady a spolupráci při přípravě rostlinného materiálu. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. a kolektivu Oddělení buněčné biologie za možnost práci vypracovat, za příjemnou atmosféru a vlídný přístup.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Eva Kodadová
Název práce	Testování různých metod pro mikroskopické pozorování prvotních fází interakcí rostlin vojtěšky (<i>Medicago sativa</i> L.) s bakteriemi <i>Sinorhizobium</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Pro studium biologických procesů v rostlinách je důležitý vývoj metod umožňující mikroskopické pozorování živých systémů v čase. Pro tyto metody je stěžejní nastavení optimálních podmínek pro pozorovaný organismus během snímání. Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací přípravy mikroskopického preparátu pro pozorování interakcí rostliny vojtěšky (*Medicago sativa* L.) a půdních bakterií rodu *Sinorhizobium* a následné dokumentace počátečních fází těchto interakcí.

Klíčová slova	Světelná mikroskopie, mikroskopie živých organismů, <i>Medicago sativa</i> , hlízková symbióza
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname	Eva Kodadová
Title	Testing of different methods for microscopic documentation of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) interactions with <i>Sinorhizobium</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

When studying biological processes of plants it is important to develop methods that enable us to make high-quality microscopic imaging of living organisms continuously in time. It is important to set optimal growing conditions for the observed organism while imaging. In this bachelor thesis optimization and testing of samples on microscopic preparations is performed. This allows us to study interactions of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Sinorhizobium* genus.

Keywords	Light microscopy, live cell imaging, <i>Medicago sativa</i> , plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	<i>Medicago sativa</i>	2
2.1.1	Obecná charakteristika	2
2.1.2	Zemědělský význam <i>Medicago sativa</i>	3
2.2	Symbióza <i>Medicago sativa</i> s půdními rhizobakteriemi	3
2.2.1	Metabolismus dusíku v rostlinách.....	4
2.2.2	Iniciace symbiózy.....	5
2.2.3	Bakteriální infekce a tvorba primordia hlízky.....	6
2.2.4	Infekční vlákno.....	6
2.2.5	Endocytóza a vznik symbiozomů.....	8
2.2.6	Diferenciace hlízky	9
2.3	Mikroskopie živých buněk („live cell imaging“).....	9
2.3.1	Neinvazivní mikroskopické zobrazovací metody	11
2.3.2	Mikroskopické pozorování rostlinného rodu <i>Medicago</i>	12
3	Experimentální část	14
3.1	Materiál	14
3.1.1	Použité chemikálie	14
3.1.2	Použité přístroje	15
3.1.3	Použité roztoky a média	16
3.1.4	Rostlinný materiál	19
3.1.5	Bakteriální materiál	19
3.2	Metody	20
3.2.1	Příprava a povrchová sterilizace semen <i>Medicago sativa</i>	20
3.2.2	Povrchová sterilizace listů pro somatickou embryogenezi	20
3.2.3	Příprava B5H média pro indukci kalusu	21
3.2.4	Příprava B50 média pro formování somatických embryí	21
3.2.5	Příprava MMS média pro klíčení somatických embryí a vývoj rostlin	22
3.2.6	Příprava MS média pro udržování rostlin v <i>in vitro</i> podmínkách.....	22
3.2.7	Příprava tekutého Fahraeus média bez dusíku	22
3.2.8	Příprava pevného Fahraeus média bez dusíku	23
3.2.9	Příprava TY média pro kultivaci <i>Sinorhizobium meliloti</i>	23

3.2.10	Kultivace kultury <i>Sinorhizobium meliloti</i> na TY médiu	24
3.2.11	Příprava kultury <i>Sinorhizobium meliloti</i> v tekutém Fahraeus médiu bez obsahu dusíku	24
3.2.12	Kultivace semen <i>Medicago sativa</i>	24
3.3	Příprava rostlin k mikroskopickému pozorování interakcí <i>Medicago sativa</i> a <i>Sinorhizobium meliloti</i>	25
3.3.1	Příprava preparátu s pevným Fahraeus médiem bez dusíku	25
3.3.2	Příprava preparátu s tekutým Fahraeus médiem bez dusíku za využití lékařské vazelíny	26
3.3.3	Příprava preparátu s tekutým Fahraeus médiem bez dusíku za využití oboustranné lepící pásky	27
4	Výsledky	29
4.1	Optimalizace přípravy preparátů s pevným Fahraeus médiem	29
4.1.1	Zhodnocení vývoje rostlin <i>Medicago sativa</i> divokého typu, kultivar Europe... ..	30
4.1.2	Zhodnocení vývoje rostlin <i>Medicago sativa</i> , kontrolní linie RSY.....	32
4.1.3	Zhodnocení vývoje rostlin <i>Medicago sativa</i> transgenní linie kultivaru RSY... ..	35
4.1.4	Porovnání všech linií <i>Medicag sativa</i>	36
4.1.5	Pozorování interakcí rostlin <i>Medicago sativa</i> se <i>Sinorhizobium meliloti</i> v preparátech s pevným Fahraeus médiem	37
4.2	Pozorování interakcí rostlin <i>Medicago sativa</i> a <i>Sinorhizobium meliloti</i> v preparátech s tekutým Fahraeus médiem	39
4.2.1	Preparáty připravené s využitím lékařské vazelíny.....	40
4.2.2	Preparáty připravené s využitím oboustranné lepící pásky	42
5	Diskuze	47
6	Závěr	49
7	Literatura	50
8	Seznam zkratk	53

CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo zvládnutí laboratorních metod kultivace rostlin vojtěšky *in vitro*, přípravy bakteriálních kultur, metod kokultivace bakterií s rostlinami a přípravy rostlin v interakci s bakteriemi k mikroskopické dokumentaci.

V rámci teoretické části byla vypracována rešerše zaměřená na problematiku:

- zemědělského a biologického významu druhu *Medicago sativa*
- zemědělského a ekologického významu půdních bakterií druhů *Sinorhizobium*
- signálních, vývojových a strukturních aspektů interakcí rostlin *Medicago* s bakteriemi rodu *Sinorhizobium* v procesu tvorby hlízek
- moderních mikroskopických metod neinvazivního studia vývojových procesů rostlin na úrovni buněk, pletiv a orgánů.

V praktické části byly realizovány experimenty zaměřené na:

- studium vývojových procesů rostlin *Medicago sativa in vitro* v kontrolních podmínkách
- optimalizaci kultivačních podmínek rostlin *Medicago sativa* pro řízenou aplikaci bakterií rodu *Sinorhizobium*
- studium interakcí rostlin *Medicago sativa* s bakteriemi rodu *Sinorhizobium*
- mikroskopické sledování prvotních fází symbiotického procesu s vizualizací bakterií rodu *Sinorhizobium* pomocí exprese fluorescenčního markeru.

1 ÚVOD

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je jednou z nejvýznamnějších zemědělských rostlin. Ve velkém množství je využívána jako pícnina pro výkrm hospodářských zvířat, své místo dnes nachází také v potravinovém průmyslu. Velké uplatnění má v osevním postupu. Díky svému dlouhému kořenovému systému a schopnosti vstoupit do hlízkové symbiózy s bakteriemi (rhizobia) vyskytujícími se v půdě je velmi zúrodňující pro zemědělskou půdu. *Medicago sativa* vstupuje do hlízkové symbiózy s bakteriemi *Sinorhizobium* díky jejich schopnosti fixovat vzdušný dusík, kterého je ve většině půd nedostatek. Rostlina na oplátku bakteriím poskytuje živiny a anaerobní prostředí. Výsledkem je vznik kořenových orgánů zvaných noduly, známých také jako hlízky. Rostlina takto získaný dusík účinně využívá, a navíc pak přebytečným akumulovaným dusíkem rostlina obohacuje okolní půdu.

Pro úplné pochopení procesu nodulace, stejně jako jiných biologických procesů, je zapotřebí vyvinout metody, při kterých lze neinvazivně pozorovat biologické děje probíhající v rostlině na mikroskopické úrovni.

Cílem této práce bylo optimalizace metody pro efektivní pozorování prvotních fází interakcí mezi rostlinou *Medicago sativa* a hlízkovými bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* pomocí světelných mikroskopických metod. Za tímto účelem byly optimalizovány a testovány různé způsoby přípravy mikroskopických preparátů. Cílem bylo poskytnout rostlině v mikroskopickém preparátu optimální podmínky k růstu a také optimální podmínky k tomu, aby nastaly interakce s hlízkovými bakteriemi. Optimální příprava mikroskopických preparátů měla posloužit k vývojové dokumentaci rostlin a k pozorování prvotních fází procesu interakce se symbiotickými bakteriemi v čase.

V této práci byly studovány rostliny druhu *Medicago sativa*. Pro práci byl využit divoký typ, kultivar Europe, kontrolní linie kultivaru RSY a transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktu *35S::GFP:ABD2* („actin-binding domain 2“). Pro studium interakcí byly rostliny kokultivovány s bakteriálním druhem *Sinorhizobium meliloti* kódující mRFP. Díky produkci červeného fluorescenčního proteinu bylo možné vizualizovat tyto bakterie a zdokumentovat počáteční fáze interakce s kořenovými vlásky *Medicago sativa* pomocí fluorescenčního mikroskopu a sledovat jejich postup při infekci až do kortikálních vrstev kořene v procesu tvorby kořenových hlízek.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Medicago sativa*

2.1.1 Obecná charakteristika

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.), běžně nazývaná vojtěška, je vytrvalá jetelovina patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Jedná se o autotetraploid. Pochází z oblasti kolem Kaspického moře, západní a střední Asie (Spohn a Golte-Bechtle, 2005). Vojtěška je nejdůležitější a nejrozšířenější krmná luskovina a je celosvětově pěstována na zhruba 32 milionech hektarech v mírných podnebných pásech severní i jižní polokoule (Bouton 2001; Irwin *et al.* 2001). Rozšířená je přes celou Evropu, Středomoří, Střední východ, Čínu a Sibiř. Je to planě rostoucí rostlina vyskytující se na živinami chudých loukách, běžně roste i na vápnatých a výhřevných půdách.

Rostlinné druhy z čeledi bobovité patří mezi dvouděložné rostliny. Jejich květ je složen z pětičetného kalichu a koruny. Koruna je tvořena pavézou, křídly a člunkem. Vojtěška vytváří hlávkovité květenství s modrými až fialovými květy dlouhými asi 1 cm (Obr. 1). Plod je lusk, který je většinou nepukavý a hlemýžďovitě svinutý (Spohn a Spohn, 2007). Její listy jsou podlouhlé a trojčetné se zubovitými nebo pilovitými okraji (Spohn a Golte-Bechtle, 2005).



Obr. 1: Rostlina vojtěška (*Medicago sativa*) (převzato od: Ivar Leideus, https://cs.wikipedia.org/wiki/Tolice_vojt%C4%9B%C5%A1ka#/media/File:Medicago_sativa_-_harilik_lutsern_Keilas.jpg)

2.1.2 Zemědělský význam *Medicago sativa*

Vojtěška je hojně pěstována jako pícnina. Slouží pro výkrm hospodářských zvířat. Využívá se na seno i na siláž, vysazuje se také na pastvinách. Je bohatým zdrojem proteinů, vitamínů, minerálů a vlákniny. Slouží také k produkci biomasy (O'Rourke *et al.*, 2015). Významná byla již od dob rané antiky, kdy se využívala pro výkrm koní ve válkách. Dodnes patří k našim nejvýznamnějším pícninám, pěstuje se v mnoha kultivarech, pro hospodářské účely však především jako kříženec s tolicí srpovitou (Spohn *et al.*, 2015). Své uplatnění má také ve stravování člověka. Její výhonky se používají do salátů, narazíme na ni také v doplňcích stravy anebo v bylinných extraktech (Bouton, 1996).

Významnou roli má vojtěška i v zemědělství při uplatňování osevních postupů. Víceleté jeteloviny jsou pro půdu velmi zúrodnující. Obohacují půdu o dusík díky jejich symbióze s hlízkovými bakteriemi, které mají schopnost fixovat vzdušný dusík. Symbióza je velice efektivní, rostlina tak akumuluje více dusíku, než sama spotřebuje a uvolňuje jej pak do okolní půdy. Obvykle se v osevním postupu nepěstuje na více než 18-22 % plochy, maximální zastoupení je 30-35 %. Mezi opětovným nasazením vojtěšky do osevního postupu musí být tříletý odstup (Šarapatka *et al.*, 2010).

V současném zemědělství se ve velké míře využívají syntetická hnojiva. Podle FAO (2017) v roce 2020 množství celosvětově využívaných hnojiv překročí hranici 200 miliónů tun za rok. Z půdy se tak uvolňují skleníkové plyny jako oxid dusný, které jsou příčinou skleníkového efektu. Využití rostlin obohacujících půdu o živiny přirozenou cestou tak nese velký potenciál do budoucna pro ochranu životního prostředí.

2.2 Symbióza *Medicago sativa* s půdními rhizobakteriemi

Vojtěška je rostlina náležící do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Pro rostliny této čeledi je charakteristická symbióza s hlízkovými bakteriemi obecně nazývanými rhizobia. Příkladem těchto bakterií jsou bakterie z čeledi *Rhizobiaceae*, jako rody *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* a *Azorhizobium* (Perret *et al.*, 2000). Symbióza vede k tvorbě hlízek neboli nodulů na kořenovém systému rostliny. Rhizobia jsou diazotrofní bakterie, které fixují vzdušný dusík a přeměňují jej na amoniak. Ten nadále rostlina využívá jako zdroj dusíku (Timmers *et al.*, 1999). Jednotlivé bakteriální druhy a kmeny interagují s určitou skupinou hostitelských rostlin. Tolice vojtěška je efektivním

symbiotickým hostitelem pro bakteriální druh *Sinorhizobium meliloti* (Fisher a Long, 1992). *Sinorhizobium meliloti* dále interaguje s rostlinou komonicí (*Melilotus*) nebo pískavicí řecké seno (*Trigonella*) za vzniku symbiózy (Gibson *et al.*, 2008).

2.2.1 Metabolismus dusíku v rostlinách

Dusík je čtvrtý nejrozšířenější biogenní prvek. Dostupnost dusíku v půdě je daná celkovým množstvím všech minerálních živin, jejich chemickým stavem a půdním pH. Ve většině půd je ho nedostatek (Schepers a Raun, 2008). Dusík je důležitý pro správné fungování metabolismu a růst rostliny. Je součástí mnoha různých buněčných komponentů, včetně chlorofylu, aminokyselin a nukleových kyselin. Jeho obsah v bylinách je kolem 2-4 %. Při jeho nedostatku listy žloutnou a opadávají. Zakrslost rostlin, malé buňky a ztloustlé buněčné stěny jsou další typické projevy jeho nedostatku v rostlině (Taiz *et al.*, 2015). Zelené rostliny jsou autotrofní a přijímají dusík ve formě anorganických sloučenin, především jako amonné nebo dusičnanové ionty. Ve většině případů je v půdě anorganický dusík přítomen ve formě dusičnanových iontů, protože amoniové ionty jsou oxidačně přeměňovány na dusičnany nitrifikačními bakteriemi přítomnými v půdě. Dusík ve formě amoniových iontů převládá v kyselých půdách a půdách s nízkým obsahem kyslíku (Larcher, 1988).

Dusičnanové ionty přijaté rostlinou musí být redukovány, aby mohly být rostlinou metabolicky využity. Redukce dusičnanů přijatých rostlinou je zprostředkována řadou enzymů a kofaktorů. Zásadní roli hrají enzym nitrátreduktasa redukující dusičnany na dusitany a enzym nitritreduktasa redukující dusitany na amoniové ionty. Tyto enzymy jsou obsaženy především v listech. Přítomnost dusičnanů spouští jejich aktivitu. Redukce těchto iontů je energeticky náročná (Luštinec a Žárský, 2005).

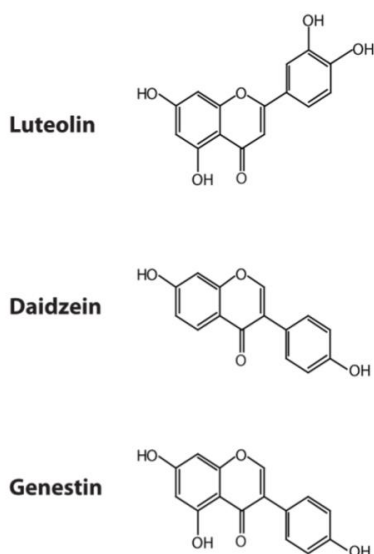
Při nedostatku obsahu dusíku v půdě vstupují některé rostliny do symbiózy s mikroorganismy fixující vzdušní dusík. Tento typ symbiózy zvaný hlízková symbióza je typický především pro rostliny čeledi bobovité, vyskytuje se ale také například u sapanovitých nebo citlivkovitých. Symbiotické mikroorganismy fixující dusík žijí v buňkách hostitele. Jako hostitele volí autotrofní rostliny, u kterých je dostatek živin, jako jsou sacharidy. Díky tomu jsou schopny fixovat vysoké množství dusíku, což je výhodné i pro hostitelskou rostlinu. Fixace vzdušného dusíku zprostředkována mikroorganismy začíná redukčním štěpením molekuly N₂. Tuto reakci katalyzuje nitrogenasový systém. Tento komplex je tvořen dvěma enzymy, z nichž jeden obsahuje

železo a druhý molybden se železem jako aktivátory. energii a elektrony potřebné k redukci dodává respirační systém. Aktivita nitrogenasy má teplotní optimum mezi 20 °C a 30 °C (Larcher, 1988).

2.2.2 Iniclace symbiózy

Při potřebě dusíku rostliny do okolního prostředí vylučují signální látky, které koordinují expresi bakteriálních genů potřebných pro zpuštění procesu nodulace. Jedná se o fenolické látky ze skupiny flavonoidů produkované fenylypropanoidovou dráhou, které se u jednotlivých rostlin liší specifickými modifikacemi kostry nebo postranních řetězců (Long, 1989). Mezi tyto látky se řadí například luteolin, daidzein a genestin (Gibson *et al.*, 2008). Exprese nodulačních (nod) genů v bakterii je kontrolována transkripčními faktory NodD, jejichž funkci reguluje přítomnost signálních látek z rostlin, ale také další bakteriální geny, jako například *NoIR* (Cren *et al.*, 1995).

Nodulační geny jsou buď obecné, nebo určují specifitu k hostiteli. Obecné nodulační geny se vyskytují u všech rhizobií a jsou nezbytné pro indukci a průběh nodulace (Horváth *et al.*, 1986). Příkladem je *nodABC*. Nodulační geny určující specifitu k hostiteli slouží k determinaci hostitele a u různých druhů rhizobií se liší. U *Sinorhizobium meliloti* je příkladem těchto genů *nodH* a *nodPG* (Govers *et al.*, 1987). U rhizobií s více než jedním možným hostitelským druhem se vyskytuje několik různorodých setů genů specifických k hostiteli (Fisher a Long, 1992).



Obr. 2: Chemická struktura luteolinu, daidzeinu a genestinu (podle Gibson *et al.*, 2008)

Nod geny kódují enzymy účastníci se syntézy Nod faktorů. Nod faktory rozeznávají hostitele a způsobují morfologické změny v kořenech rostlin. Nod faktory všech rhizobií jsou z chemického hlediska lipochitinové oligosacharidy. Jejich modifikace determinují specifitu jednotlivých druhů bakterií k hostiteli. Zásadní roli v rozeznání Nod faktorů kořenovými epidermálními buňkami mají membránové LysM receptorům podobné kinasy. Ty spouští symbiotickou signalizační dráhu (Ibáñez *et al.*, 2016).

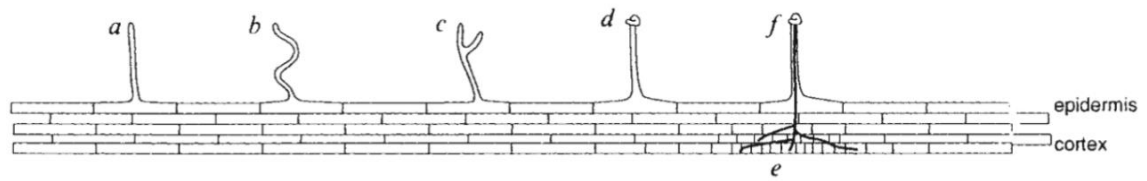
2.2.3 Bakteriální infekce a tvorba primordia hlízky

Při tvorbě hlízky se spouští dva současně probíhající koordinované procesy. Bakteriální infekce probíhající v epidermálních buňkách kořene a tvorba primordia budoucí hlízky v kortexu kořene. Pro úspěšný průběh infekce musí rhizobia prorůst epidermální vrstvou kořene a přes kortikální vrstvu se dostat až k rozvíjejícímu se primordiu hlízky. I když se rhizobia mohou dostat do kořenového pletiva prasklinami nebo mezerami mezi epidermálními buňkami, zásadní způsob internalizace rhizobií probíhá přes kořenové vlásky (Gage, 2004). Mechanismus bakteriální infekce se liší u různých druhů rostlin. U modelových luskovin jako jsou *Medicago truncatula* nebo *Medicago sativa* infekce bakterií probíhá přes kořenové vlásky za tvorby specializované intracelulární struktury zvané infekční vlákno.

Iniciace tvorby hlízkového primordia je prvním morfologickým projevem interakce mezi rhizobakteriemi a rostlinou na kořenu. Po rozeznání bakterií rostlinou dochází k aktivnímu buněčnému dělení ve vnitřním kortexu hostitelské rostliny. U vojtěšky byla pozorována aktivace buněk vnitřního kortexu již 18-24 hodin po inokulaci s rhizobakteriemi. Tyto buňky nejprve prošly antiklinálním buněčným dělením a následovně periklinálním buněčným dělením za vzniku nového primordia hlízky (Timmers *et al.*, 1999).

2.2.4 Infekční vlákno

Po rozeznání specifických Nod faktorů rostlinou se bakterie přichytí na povrch kořenového vlásku. Aktivace signalizační dráhy vede k lokalizované inhibici růstu vrcholu kořenového vlásku a způsobuje jeho deformaci. Ta se projevuje zkroucením kořenového vlásku, nafouknutím jeho vrcholu nebo jeho rozvětvením.



Obr. 3: Počáteční fáze interakce mezi kořenovými vlásky a rhizobakteriemi (podle Fisher a Long, 1992)

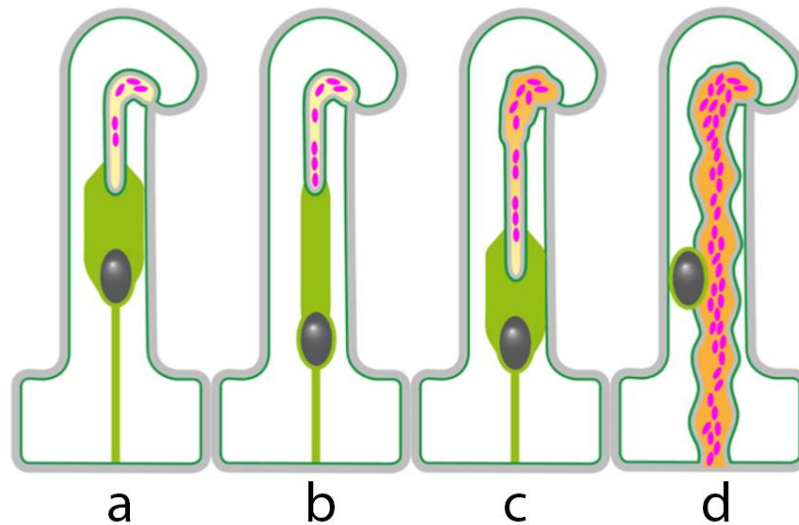
Vrchol kořenového vlásku se následně kolem přichycené bakterie začne stáčet (jednotlivé fáze deformace kořenového vlásku jsou znázorněny na Obr. č. 3). Tyto deformace slouží jako morfologické indikátory při identifikaci prvotních fází interakce rostliny s bakteriemi rodu *Sinorhizobium* (Fisher a Long, 1992).

Rhizobia pronikají do kořenového vlásku za lokální hydrolyzy jeho buněčné stěny, přičemž se buněčná stěna a plasmatická membrána invaginují směrem dovnitř (Ibáñez *et al.*, 2016; Gage, 2004). Tvoří se apoplastický prostor označovaný jako infekční kapsa, ve které se rhizobia dále množí. V infekční kapse, která se vytvořila ve stočeném vrcholu kořenového vlásku, vznikají kolonie zvané fokální infekce (Geurts *et al.*, 2005).

Invaginovaná buněčná stěna se začíná produkovat směrem dovnitř kořenového vlásku a tvoří se tak infekční vlákno. Infekční vlákno je tubulární struktura, v jehož dutině se nachází glykoproteinový matrix. Zde se nadále množí bakterie. Skrze infekční vlákno prostupují bakterie ze stočeného vrcholu kořenového vlásku pletivem až ke kortikální vrstvě kořene (Timmers *et al.*, 1999; Oldroyd *et al.*, 2011).

Dalším stěžejním krokem pro prodlužování infekčního vlákna je tvorba radiálně orientované kuželovité struktury zvané cytoplazmatický most. Cytoplazmatický most udává směr růstu infekčního vlákna, které skrze něj prorůstá, z toho důvodu je také nazývaný pre-infekční vlákno (Obr. 4 a). Cytoplazmatický most je polarizovaný cytoplazmatický shluk (van Brussel *et al.*, 1992).

Růst infekčního vlákna je spojen s rozsáhlou reorganizací mikrotubulového cytoskeletu a vyžaduje aktivní přísun membránových vezikulů. Klíčovou roli také hraje pozice jádra v buňce kořenového vlásku. Cytoplazmatický most spojuje buněčné jádro s rostoucím koncem infekčního vlákna a migrace jádra směrem k bazální části buňky řídí postup infekčního vlákna v kořenovém vlásku (Obr. 4 b-c) (Timmers *et al.*, 1999).



Obr. 4: Cytoplasmatický most spojující jádro s rostoucím infekčním vláknem v kořenovém vlásku (podle Fournier *et al.*, 2008).

Kromě cytoplasmatického mostu je na jádro vždy napojeno také tenké cytoplasmatické vlákno, které jej spojuje s bazální částí buňky. Když infekční vlákno prostoupí do bazální části buňky kořenového vlásku, jádro opustí pozici před jeho rostoucím vrcholem a ustoupí stranou (Obr. 4 d) (Fournier *et al.*, 2008).

Když se infekční vlákno přiblíží k nejbližší kortikální buňce, spustí se reorganizace této sousední buňky a celý proces se opakuje. Tímto způsobem infekční vlákno prostoupí do okolních buněk a bakteriální infekce se rozšiřuje až do kortexu (Oldroyd *et al.*, 2011).

2.2.5 Endocytóza a vznik symbiozomů

Ve chvíli, kdy infekční vlákno dosáhne až k buňce vnitřního kortexu, která má být infikovaná bakteriemi, se začnou z jeho stěny uvolňovat kapičky, které obsahují bakterie obalené amorfní hmotou identickou s matrixem vyplňujícím infekční vlákno (Rae *et al.*, 1992). Rhizobiální buňky se dostávají do přímého kontaktu s membránou hostitelské rostlinné buňky. Následně dochází k endocytóze, rhizobiální buňka se obaluje plasmatickou membránou a cytoplasmou hostitele a stává se z ní symbiotický cytoplasmatický kompartment neboli symbiozom (Brewin, 2004; Jones *et al.*, 2007).

Když je bakterie uzavřena v symbiozomu a je jí poskytnuto prostředí bez kyslíku, je schopna diferenciovat se do formy zvané bakteroid, která je schopna fixovat vzdušný

dusík (Vasse *et al.*, 1990). Dochází zde k biosyntéze enzymů nitroenasového komplexu zprostředkávajících fixaci dusíku (Fischer, 1994). V rhizobiích se nachází regulační kaskády citlivé na kyslík, které řídí expresi nitroenasového komplexu a mikroaerobních respiračních enzymů potřebných k poskytnutí energie a redukujících donorů pro nitroenasu. Tato kaskáda je indukována nízkou přítomností kyslíku, proto je potřeba poskytnout bakteriím prostředí bez kyslíku, to vnitřní prostředí v rámci hlízky poskytuje (Witty *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 2007).

2.2.6 Diferenciace hlízky

Bakteriální infekce a tvorba hlízkového primordia jsou dva koordinované procesy vedoucí k tvorbě zralých hlízek tím, že se mladé hlízkové primordium postupně diferencuje. Jak již bylo zmíněno, vnitřní pletiva hlízek poskytují anaerobní prostředí pro symbiotické bakterie (Franssen *et al.*, 1992).

Hlízky se podle jejich morfologie dělí do dvou tříd, na determinované a nedeterminované. Determinované hlízky mají meristém odvozený od buněk vnějšího kortexu a nedeterminované hlízky mají meristém odvozený od buněk vnitřního kortexu. Liší se také v délce meristematické aktivity. Většina rostlin mírného pásma včetně rostlin rodu *Medicago* tvoří nedeterminované hlízky. Nedeterminované hlízky se dále vyskytují u tropických luskovin a u *Lotus japonicus* (Gibson *et al.*, 2008).

2.3 Mikroskopie živých buněk („live cell imaging“)

Vývoj multicelulárních organismů je dynamický proces, při kterém se buňky aktivně dělí (proliferují), rostou, a následně diferencují za tvorby specializovaných tkání. Tyto procesy, souhrnně zvané morfogeneze, jsou regulovány komplexními mechanismy, zabezpečujícími následnost jednotlivých dějů v přesně stanoveném čase a prostoru. Zkoumání těchto procesů je zásadní pro pochopení vývoje a morfogeneze rostlin. Podrobné studium těchto procesů není možné pouze za využití statických analýz na biochemické a genetické úrovni, ani za využití statických fixovaných preparátů. Ty nám umožňují pouze lokální pozorování rostlinných tkání v konkrétní vývojové fázi (Sappl a Heisler, 2013). Proto jsou pro dynamické studium biologických vývojových procesů, a to nejen u rostlin, neustále vyvíjeny a zdokonalovány nové dokumentační metody. Velký rozvoj zaznamenal i vývoj takových snímacích metod, které nám

umožňují detailní pozorování vývoje celého organismu. Mikroskopie živých buněk nám poskytuje možnosti lepšího pochopení různých molekulárních interakcí probíhajících na buněčné úrovni v mnohobuněčných komplexních organismech. Mikroskopie živých buněk je proto moderní a stále častěji využívaný soubor metod pro vývojovou mikroskopickou dokumentaci živých organismů, což umožňuje studium různých biologických procesů při jejich vývoji v reálném čase (Berthet a Maizel, 2016).

Nejzásadnější a zároveň největší výzvou pro mikroskopii živých buněk je zajištění optimálních růstových podmínek a co nejpřesnější simulace přirozeného prostředí pro studovaný organismus. Rostliny jsou obzvláště citlivé na vystavení stresovým podmínkám, načež se v jejich důsledku snaží fyziologicky se adaptovat. Jakýkoliv nepřirozený zásah do optimálních fyziologických podmínek pak znehodnotí výsledky studia, které se snaží popsat biologické procesy rostlin v jejím přirozeném stavu (Reddy *et al.*, 2007; Berthet a Maizel, 2016).

Prvním krokem úspěšného mikroskopického pozorování je kultivace rostliny a příprava rostlinného preparátu, ve kterém bude mít rostlina zajištěné optimální růstové podmínky a ve kterém bude možné neinvazivně pozorovat průběh studovaných biologických procesů. Druhým krokem pro úspěšné pozorování živého organismu je zvolení vhodných neinvazivních zobrazovacích metod. U takových metod musí být zabezpečen dostatečný pozorovací prostor pro zachování optimálního prostorového a časového rozlišení při snímání a není potřeba zkoumané rostliny fyzikálně ani chemicky stabilizovat (fixovat) (von Wangenheim *et al.*, 2014; Maizel *et al.*, 2011).

Omezením při pozorování živých rostlin může být fakt, že nejsme schopni dosáhnout stejně dobrého rozlišení, jako při pozorování fixovaných preparátů. Důvodem je velikost a tloušťka pozorovaného organismu, neprůhlednost jednotlivých pletiv a orgánů, jako i pohyb různých buněčných kompartmentů v dynamickém systému studovaného živého organismu (Huiskens a Stainier, 2009).

I přes enormní rozvoj a zavádění metod mikroskopie živých buněk do praxe jsou fixované preparáty tkání stále stěžejní pro rostlinou biologii. I když jsme schopni zobrazovat různé struktury v živé rostlině pomocí rozličných fluorescenčních značení, fixované preparáty nám umožňují ověření získaných výsledků a mnohdy vedou k objevům v oblasti strukturních detailů, které jsou v živé rostlině kvůli jejím dynamickým procesům obtížně pozorovatelné. Mikroskopie živých buněk je navíc obvykle limitovaná hloubkou průniku paprsku jenom na buňky nacházející se na rostlinném povrchu, jako jsou epidermální buňky, trichomy a kořenové vlásky

(Dyachok *et al.*, 2016). Výjimku tvoří specializované mikroskopické metody, jako například multifotonová fluorescenční mikroskopie nebo „light-sheet“ fluorescenční mikroskopie.

2.3.1 Neinvazivní mikroskopické zobrazovací metody

Pro úspěšné pozorování živých organismů je potřeba zvolit takové metody, které nenarušují přirozené biologické procesy a jsou schopné je zachytit v co nejlepším rozlišení v reálném čase a při co nejmenší možné míře fototoxicity. Vhodné jsou mikroskopické metody s vysokým prostorovým rozlišením. Prostorové rozlišení závisí na objektivu, zvětšení a numerické apertuře. Obecně platí, že čočky s vyšší numerickou aperturou mohou poskytnout větší prostorové rozlišení. Mezi takové metody se řadí mikroskopie v širokém poli, konfokální laserová skenovací mikroskopie, konfokální mikroskopie s rotujícím diskem, multifotonová fluorescenční mikroskopie a „light-sheet“ fluorescenční mikroskopie (von Wangenheim *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018).

Mikroskopie v širokém poli („wide-field“ mikroskopie) zahrnuje všechny mikroskopické techniky, při kterých je celé zorné pole na vzorku osvětleno současně použitým světelným zdrojem. Při mikroskopii širokého pole můžeme zvýšit úroveň prostorového rozlišení tak, že k potlačení přebytečného světelného signálu mimo rovinu zaostření využijeme počítačových metod dekonvoluce (von Wangenheim *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018).

Konfokální laserová skenovací mikroskopie je charakteristická vysokým kontrastem a rozlišením. Pomocí této metody jsme schopni potlačit signál vycházející z oblastí mimo rovinu zaostření. Umožňuje také snímání sérií optických řezů, které lze poté složit za vzniku trojrozměrného obrazu (Pawley, 2006; Komis *et al.*, 2018).

Konfokální mikroskopie s rotujícím diskem je specifický typ konfokální mikroskopie, při které světlo pro excitaci fluorescence v pozorovaném vzorku prochází několika clonami na rotujících discích. Snímání touto metodou je proto vysokorychlostní (Komis *et al.*, 2018).

Multifotonová mikroskopie využívá snímání pomocí světla s nízkou energií, tudíž fluorofory i hluboko ve snímaných pletivech nejsou dostatečně excitovány. V bodě zaostření však dochází k excitaci fluoroforu dvěma nebo třemi fotony, jejichž energie se sčítá a je tedy dostačující pro excitaci fluoroforu (von Wangenheim *et al.*, 2014).

„Light-sheet“ fluorescenční mikroskopie je v současné době jedna z nejpokrokovějších metod pro studium biologických procesů jak v rostlinných buňkách, tak v živočišných. Při této metodě získáváme jednotlivé optické řezy pomocí tenkého listu laserového světla, které osvětluje celou plochu zobrazovaného zorného pole najednou. Signál je tak detekován pouze v rovině ostroži. Tato metoda je vhodná pro mikroskopování živých organismů zejména proto, že zobrazování je velice rychlé a nízké hodnoty záření způsobují velice nízkou úroveň fototoxicity, protože světlo pro excitaci dopadá do vzorku jenom v rovině zaostření (Berthret a Maizel, 2016; Komis *et al.*, 2018; Ovečka *et al.*, 2018).

2.3.2 Mikroskopické pozorování rostlinného rodu *Medicago*

Důležitým předpokladem pro dlouhodobé neinvazivní pozorování živých organismů je optimalizace přípravy mikroskopických preparátů. Postupy přípravy jsou odlišné v případě, že rostlinu chceme snímat jednorázově, a odlišné v případě, kdy je naším cílem stejný vzorek pozorovat dlouhodobě. Preparát se živou rostlinou musí být připraven tak, aby byly zabezpečeny optimální růstové podmínky. Rostlina musí být ve stabilním prostředí napodobujícím přirozené podmínky, musí mít dostatečný příjem živin a nesmí být vystavena stresovým podmínkám.

Rostlinný druh *Medicago truncatula* je modelová rostlina pro luskoviny využívaná v biologickém výzkumu. Jako modelový organismus byla zvolena zejména díky svému malému diploidnímu genomu, který je v současnosti plně sekvencován. Je samosprašná, rychle se regeneruje a velmi rychle plodí semena. Má také blízký fylogenetický vztah s většinou druhů luskovin včetně vojtěšky (Cook, 1999). Může být úspěšně kultivována na řadě nosičů a substrátů, jako je vlhký papír, agar, tekuté médium, půda a inertní substráty v odpovídajících kultivačních systémech (Barker *et al.*, 2006).

Byla vytvořena řada protokolů pro přípravu mikroskopických preparátů pro pozorování *Medicago truncatula*. Častým postupem je příprava komůrky s meziprostorem s využitím podložního a krycího mikroskopického sklíčka, ve které má studovaný kořen dostatečný prostor. Jedním z nich je protokol pro přípravu preparátů ze semenáčků *Medicago truncatula* pro jednorázové snímání kořenového systému (podle Dyachok *et al.*, 2016). Rostliny staré 2-3 dny, které dosahují délky 3-4 cm, byly umístěny na podložní sklíčko, na kořeny bylo nanášeno malé množství vody a poté s použitím lepidla s vakuovou izolací byla vytvořena komůrka uzavřená krycím sklem

připravená k mikroskopickému pozorování. Takovéto preparáty umožňují studium biologických procesů v živé rostlině, ale pouze okamžitě po přípravě preparátu. Dlouhodobá kultivace a pozorování rostliny v tomto systému nejsou možné.

Pro mikroskopické pozorování *Medicago sativa* je možná obdobná příprava preparátu s využitím systému podložní a krycí sklíčko za tvorby „komůrky“. Samotný růst kořene a průběh buněčného dělení byl u vojtěšky úspěšně studován pomocí „light-sheet“ mikroskopie (Vypelová *et al.*, 2017). Řada experimentů zabývajících se symbiózou mezi *Medicago sativa* a rhizobakteriemi však vycházela z protokolu přípravy preparátu podle Gage *et al.* (1996). Pro dokumentaci infekčního vlákna po dobu 48 hodin vytvořili preparát s využitím BNM média, do kterým zalili semenáček *Medicago sativa* na podložním sklíčku. Na médium inokulovali bakterie *Sinorhizobium* a preparát překryli dialyzační membránou. Stejného systému využili například Cheng a Walker (1998) s drobnými modifikacemi, kdy nahradili BNM médium Jensenovým agarem.

Pro studium interakcí *Medicago sativa* a rhizobakterií při hlízkové symbióze je možné využití také fixovaných preparátů. Příkladem je experiment, který provedli Jordan *et al.* (1963). Rostliny *Medicago sativa* kultivovali na pevném médiu inokulovaném se *Sinorhizobium meliloti*. Po vytvoření mladých hlízek byl z hlízek vytvořen fixovaný preparát, který umožnil pozorování intracelulárních infekčních vláken.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- 1000X Gamborg's vitamin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- 70 % etanol (PENTA)
- 96 % etanol (PENTA)
- Adenin (SIGMA-ALDRICH)
- Agaróza s nízkou teplotou tání (SIGMA-ALDRICH)
- CaCl_2 (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- Gamborg B5 medium - Basal salt mixture (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Gellan Gum (SIGMA-ALDRICH)
- H_3BO_3 (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Hypochlorid sodný (SIGMA-ALDRICH)
- KH_2PO_4 (SIGMA-ALDRICH)
- Kinetin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- KNO_3 (SIGMA-ALDRICH)
- KOH (SIGMA-ALDRICH)
- Kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- L-glutamin (SIGMA-ALDRICH)
- L-glutathion (SIGMA-ALDRICH)
- L-prolin (SIGMA-ALDRICH)
- L-serin (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- Na_2EDTA (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- NaOH (SIGMA-ALDRICH)
- Sacharóza (SIGMA-ALDRICH)

- Sterilizovaná destilovaná voda
- Sterilizovaná kohoutková voda
- Tween 20 (SIGMA-ALDRICH)
- ZnSO₄ · H₂O (SIGMA-ALDRICH)

3.1.2 Použité přístroje

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Waga Elektroniczen)
- Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)
- Digitální fotoaparát (D5000, Nikon)
- Elektromagnetická míchačka (MSH-420, BOECO, Germany)
- Epifluorescenční mikroskop (Axio Imager M2, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)
- Fluorescenční stereomikroskop s kontinuálním zvětšením Axio Zoom. V16 (operační program Zen Blue 2011, Zeiss)
- Fytotron (WEISS Gallenkamp)
- Chladničky laboratorní (Electrolux, Space Plus, Gorenje, Liebherr)
- Laboratorní předvážky (S1502, BEL-Engineering)
- Laminární box (MERCY)
- Mikrovlnná trouba (MGE21, HITACHI)
- Orbitální inkubátor s třepačkou (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan)
- pH metr stolní (PC 2700)
- Spektrofotometr (SmartSpec Plus, BIORAD)
- Termoblok (ThermoStat C, Eppendorf)
- Vortex (MIXER, Labnet International, Inc.)

3.1.3 Použité roztoky a média

Sterilizační roztok pro povrchovou sterilizaci semen

6,6 ml 10% hypochlorid sodný

3,4 ml 70% etanol

50 µl 0,05% Tween 20

Vše smícháno ve sterilní 15 ml falkonce.

Zásobní roztok aminokyselin

6,65 g glutamin

0,83 g serin

0,083 g L-glutathion

0,004 g adenin

V kádince doplněno do 250 ml dH₂O, poté sterilizováno filtrací přes 0,2 µm bakteriologický filtr. Uchováváno v lednici při teplotě 4 °C.

Zásobní roztok kinetinu (0.1 mg.ml⁻¹)

1 mg kinetin

2 ml 1 M NaOH

Přeneseno do 15 ml falkony, vortexováno, následně doplněno do 10 ml H₂O, opět vortexováno. Sterilizováno filtrací přes 0,2 µm bakteriologický filtr. Uchováváno v mrazícím boxu při -20 °C.

Zásobní roztok kyseliny 2,4-D (2,4-dichlorofenoxyoctové, 1.0 mg.ml⁻¹)

10 mg 2,4-D

8 ml H₂O

1,5 ml 1 M NaOH

0,5 ml 70 % etanol

Přeneseno do 15 ml falkony, vortexováno, následně doplněno do 10 ml H₂O, opět vortexováno. Sterilizováno filtrací přes 0,2 µm bakteriologický filtr. Uchováváno v mrazícím boxu při -20 °C.

Pevné B5H médium k indukci kalogenézy

3.1 g.l ⁻¹	Gamborg's B5 basal salt mixture
1.0 ml.l ⁻¹	1000X Gamborg's vitamin
0.5 g.l ⁻¹	prolin
0.5 g.l ⁻¹	KNO ₃
0.25 g.l ⁻¹	MgSO ₄ ·7H ₂ O
30 g.l ⁻¹	sacharóza
4,5 g.l ⁻¹	Gellan Gum

MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 1 M KOH), sterilizováno autoklávováním.

Po sterilizaci autoklávováním bylo přidáno:

30 ml.l ⁻¹	roztok aminokyselin
1.0 mg.l ⁻¹	2,4-D (250 µl zásobního roztoku 2,4-D na 250 ml média)
0.1 mg.l ⁻¹	kinetin (250 µl zásobního roztoku kinetinu na 250 ml media)

Pevné B50 médium k indukci somatické embryogeneze

3.1 g.l ⁻¹	Gamborg's B5 basal salt mixture
1.0 ml.l ⁻¹	1000X Gamborg's vitamin
0.5 g.l ⁻¹	prolin
0.5 g.l ⁻¹	KNO ₃
0.25 g.l ⁻¹	MgSO ₄ ·7H ₂ O
30 g.l ⁻¹	sacharóza
4,5 g.l ⁻¹	Gellan Gum

MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 1 M KOH), sterilizováno autoklávováním.

Po sterilizaci autoklávováním bylo přidáno:

30 ml.l ⁻¹	roztok aminokyselin
-----------------------	---------------------

Pevné Fahraeus médium bez N₂

Makronutrienty	Zásobní roztoky:	Z toho do pracovního roztoku:
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,232 g/10ml	(1 ml/l)
KH ₂ PO ₄	0,953 g/10ml	(1 ml/l)
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,712 g/10ml	(2 ml/l)
Fe-EDTA: FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,056 g/10ml	(2,5 ml/l)
	Na ₂ EDTA	0,074 g/10ml (2,5 ml/l)

Mikronutrienty	Zásobní roztoky:	Z toho do pracovního roztoku:
MnSO ₄ . H ₂ O	0,01 g/10 ml	(100 µl/l)
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,015 g/10 ml	(100 µl/l)
ZnSO ₄ . H ₂ O	0,017 g/10 ml	(100 µl/l)
H ₃ BO ₃	0,01 g/10 ml	(100 µl/l)
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,011 g/10 ml	(100 µl/l)
 Mikroagar	 13 g/l	

Úprava pH na 6,5 (upraveno pomocí 1 M a 0,1 M HCl), sterilizováno autoklávováním.

Po sterilizaci autoklávováním přidáno:

CaCl₂ 1,1098 g/10 ml

Tekuté Fahraeus médium bez N₂

Makronutrienty	Zásobní roztoky:	Z toho do pracovního roztoku:
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,232 g/10ml	(1 ml/l)
KH ₂ PO ₄	0,953 g/10ml	(1 ml/l)
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	0,712 g/10ml	(2 ml/l)
Fe-EDTA: FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,056 g/10ml	(2,5 ml/l)
Na ₂ EDTA	0,074 g/10ml	(2,5 ml/l)

Mikronutrienty	Zásobní roztoky:	Z toho do pracovního roztoku:
MnSO ₄ . H ₂ O	0,01 g/10 ml	(100 µl/l)
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,015 g/10 ml	(100 µl/l)
ZnSO ₄ . H ₂ O	0,017 g/10 ml	(100 µl/l)
H ₃ BO ₃	0,01 g/10 ml	(100 µl/l)
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,011 g/10 ml	(100 µl/l)

Pro přípravu Fahraeus média bez dusíku jsou jako první připraveny zásobní roztoky, ty slouží jako zdroje pro pracovní roztoky. Úprava pH na 6,5 (upraveno pomocí 1 M a 0,1 M HCl), sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci autoklávováním přidáno:

CaCl₂ 1,1098 g/10 ml

3.1.4 Rostlinný materiál

- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar Europe
- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar RSY, kontrolní linie, rostliny pocházející ze semen
- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar RSY, kontrolní linie indukované *in vitro* procesem somatické embryogeneze
- *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktu 35S::*GFP:ABD2* („actin-binding domain 2“), u níž jsou značena aktinová vlákna, rostliny pocházející ze semen
- *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktu 35S::*GFP:ABD2* („actin-binding domain 2“), u níž jsou značena aktinová vlákna, indukované *in vitro* procesem somatické embryogeneze

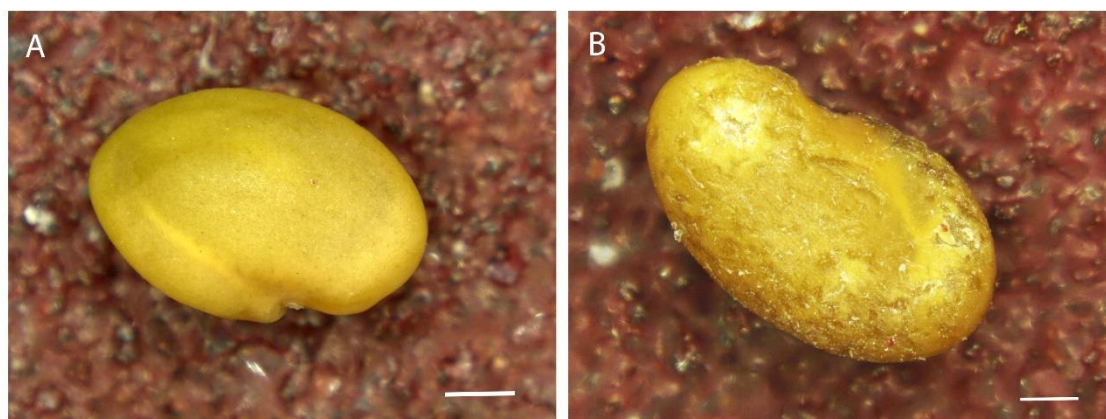
3.1.5 Bakteriální materiál

- Kmen *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 obsahující plazmid pHC60 (tetR), kódující mRFP

3.2 Metody

3.2.1 Příprava a povrchová sterilizace semen *Medicago sativa*

U semen *Medicago sativa* kontrolní linie kultivaru RSY a *Medicago sativa* transgené linie kultivaru RSY s expresí konstruktu *35S::GFP:ABD2* bylo před sterilizací semen provedeno tření semen pomocí brusného papíru (skarifikace) pro překonání dormance semen a zvýšení klíčivosti.



Obr. 5: Semena *Medicago sativa* kontrolní linie RSY. (A) Neopracované semeno v přirozeném stavu, (B) semeno s povrchem narušeným pomocí brusného papíru. Měřítko je 500 μm .

Ve sterilním laminárním boxe jsme odebrali požadovaný počet semen *Medicago sativa* ze zásobní mikrozkuřavky Eppendorf, která byla uchovávána v ledničce, do nové mikrozkuřavky. Pomocí pipety byl k semenům přenesen 1 ml 70 % etanolu na dobu 30 sekund za mírného protřepávání. Etanol byl pipetou odebrán a byl přidán 1 ml sterilizačního roztoku (10 % hypochlorid sodný, 70 % etanol, kapka Tween 20). Sterilizace sterilizačním roztokem probíhala po dobu 3 minut za mírného protřepávání. Poté byl sterilizační roztok odebrán. Následně byla semena promývána sterilní MiliQ vodou 5x po dobu 2 minut za mírného protřepávání. Nakonec se k semenům přidal 1 ml sterilní MiliQ vody a semena se nechala imbibovat v ledničce (4 °C) přes noc.

3.2.2 Povrchová sterilizace listů pro somatickou embryogenezi

Z rostlin *Medicago sativa* rostoucích v půdě ve fytotronech byly odebrány vitální a dobře vyvinuté listy. Ve sterilním laminárním boxu byly listy přeneseny do falkony

s obsahem 0,1 % sterilního roztoku Tween 20 na dobu 1 minutu za mírného protřepávání. Poté byly listy přeneseny do falkony se sterilizačním roztokem a promývány po dobu 5 minut za mírného protřepávání. Nakonec byly listy přeneseny do falkony se 70 % etanolem a promývány po dobu 1 minutu za mírného protřepávání.

V laminárním boxu se rozložily tři sterilní Petriho misky a do každé byla nalita sterilní MiliQ voda. Listy byly promyty v každé z nich, nakonec se umístily na sterilní filtrační papír a pomocí skalpelu příčně rozřezány na polovinu. Nařezané listy byly umístěny na B5H médium.

3.2.3 Příprava B5H média pro indukci kalusu

Do plastové kádinky o objemu 1 litr byla přidána směs vitamínů (Gamborg's B5 basal salt mixture a1000x Gamborg vitamíny ze zásobního roztoku), KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, prolin, sacharóza a Gellan Gum. Objem byl doplněný do 1 litru MiliQ vodou. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a médium bylo mícháno na elektronické míchače. Následně bylo pH upraveno na 5,7.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se nádoby s médiem nechaly vychladnout na teplotu kolem 50 °C. Do každé nádoby s 250 ml média byly přidány aminokyseliny a hormony (2,4-D a kinetin). Médium bylo ve sterilním laminárním boxu rozlito do 10 Petriho misek a nechalo se vychladit. Explantáty byly na tomto médiu kultivovány přibližně 3 týdny.

3.2.4 Příprava B50 média pro formování somatických embryí

Do plastové kádinky o objemu 1 litr byla přidána směs vitamínů (Gamborg's B5 basal salt mixture a1000x Gamborg vitamíny ze zásobního roztoku), KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, prolin, sacharóza a Gellan Gum. Objem byl doplněný do 1 litru MiliQ vodou. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a médium bylo mícháno na elektronické míchače. Následně bylo pH upraveno na 5,7.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se nádoby s médiem nechaly vychladnout na teplotu kolem 50 °C. Do každé nádoby s 250 ml média byly přidány aminokyseliny. Médium bylo ve sterilním laminárním boxu rozlito do 10 Petriho misek

a nechalo se vychladit. Embryogenní shluky byly na tomto médiu kultivovány 2-3 týdny.

3.2.5 Příprava MMS média pro klíčení somatických embryí a vývoj rostlin

Do plastové kádinky o objemu 1 litr byla přidána směs vitamínů (MS basal salt mixture a1000x Nitsch a Nitsch vitamíny ze zásobního roztoku), myoinositol, sacharóza a Gellan Gum. Objem byl doplněný do 1 litru MiliQ vodou. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a médium bylo mícháno na elektronické míchačce. Následně bylo pH upraveno na 5,7.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se nádoby s médiem nechaly vychladnout na teplotu kolem 50 °C. Médium bylo ve sterilním laminárním boxu rozlito do 10 Petriho misek a nechalo se vychladit. Somatická embrya byla na tomto médiu kultivována po dobu 2-3 týdnů.

3.2.6 Příprava MS média pro udržování rostlin v *in vitro* podmínkách

Do plastové kádinky o objemu 1 litr byla přidána směs MS basal salt mixture, sacharóza a Gellan Gum. Objem byl doplněný do 1 litru MiliQ vodou. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a médium bylo mícháno na elektronické míchačce. Následně bylo pH upraveno na 5,7.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se média v nádobách nechaly vychladnout na teplotu kolem 50 °C. Médium bylo ve sterilním laminárním boxu rozlito do 10 Petriho misek a nechalo se vychladit. Rostliny byly na toto médium pravidelně přesazovány, aby pro ně byl zajištěn dostatečný příjem živin.

3.2.7 Příprava tekutého Fahraeus média bez dusíku

Byly připraveny zásobní roztoky makronutrientů a mikronutrientů. Do plastové kádinky o objemu 1 litr byly pipetou přeneseny makronutrienty a mikronutrienty z předem připravených zásobních roztoků v požadovaném množství. Objem byl doplněný

do 1 litru MiliQ vodou. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a médium bylo mícháno na elektronické míchače. Následně bylo pH upraveno na 6,5.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se tekutá média v nádobách nechaly vychladnout a do každé nádoby s 250 ml média bylo přidáno 25 μl CaCl_2 .

3.2.8 Příprava pevného Fahraeus média bez dusíku

Byly připraveny zásobní roztoky makronutrientů a mikronutrientů. Do plastové kádinky o objemu 1 litr byly pipetou přeneseny makronutrienty a mikronutrienty z předem připravených zásobních roztoků v požadovaném množství. Poté byl přidán mikroagar. Objem byl doplněn do 1 litru MiliQ vodou. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a médium bylo mícháno na elektronické míchače. Následně bylo pH upraveno na 6,5.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se tekutá média v nádobách nechaly vychladnout na teplotu kolem 50 °C a do každé nádoby s 250 ml média bylo přidáno 25 μl CaCl_2 . Médium bylo ve sterilním laminárním boxu rozlito do 10 Petriho misek a nechalo se vychladit a ztuhnout.

3.2.9 Příprava TY média pro kultivaci *Sinorhizobium meliloti*

Do plastové kádinky o objemu 1 litr byl přidán kvasnicový extrakt a trypton. Objem byl doplněn do 1 litru MiliQ vodou. Za stálého míchání bylo přidáno 15 g agarů (pro dosažení konečné koncentrace 1,5 %). Poté se upravilo pH na 7,0.

Médium bylo rozlito do čtyř 500 ml skleněných nádob po 250 ml. Bylo umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry. Po autoklávování se tekutá média v nádobách nechaly vychladnout na teplotu kolem 50 °C a do každé nádoby s 250 ml média bylo přidáno 250 μl tetracyklinu a streptomycinu (zásobní roztoky 50 $\mu\text{g/ml}$) a 25 μl CaCl_2 . Médium bylo ve sterilním laminárním boxu rozlito do 10 Petriho misek a nechalo se vychladit a ztuhnout.

3.2.10 Kultivace kultury *Sinorhizobium meliloti* na TY médiu

Mikrozkumavky Eppendorf s kulturou *S. meliloti* byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -80 °C. Odtud byly vyjmuté a v laminárním boxu se nechaly mírně rozmrazit. Poté byla sterilní bakteriologickou kličkou odebrána část kultury a rozetřena na Petriho misku s připraveným TY selekčním médiem.

Naočkovaná miska se obalila alobalem a byla umístěna do orbitální třepačky s inkubátorem za teploty 30 °C. Kultura byla kultivována po dobu 48 hodin, poté byla umístěna do ledničky (4 °C).

3.2.11 Příprava kultury *Sinorhizobium meliloti* v tekutém Fahraeus médiu bez dusíku

Ve sterilním laminárním boxu bylo do 50 ml sterilní falkony přeneseno 20 ml tekutého Fahraeus média bez obsahu dusíku. Pomocí bakteriologické kličky byla přenesena část z narostlé kultury *S. meliloti* kultivované na TY médiu na Petriho misce. Falkona byla uzavřena Parafilmem a zabalená alobalem.

Připravená falkona s kulturou byla umístěna do orbitální třepačky s inkubátorem. Teplota byla nastavena na 28 °C a rychlost třepání 150 otáček za minutu. Kultura byla kultivována po dobu 18 hodin.

3.2.12 Kultivace semen *Medicago sativa*

Vysterilizovaná semena po imbibici v ledničce (4 °C) přes noc byly ve sterilním laminárním boxu vysypány na sterilní filtrační papír v Petriho misce. Pomocí sterilní pinzety byly umístovány na hranatou Petriho misku s pevným Fahraeus médiem bez dusíku s rozstupem cca 1 cm. Misky byly uzavřené mikropórovou páskou a umístěny do fytotronu s fotoperiodou 16/8 při 21 °C a relativní vzdušní vlhkosti 70 % ve vertikální poloze.

3.3 Příprava rostlin k mikroskopickému pozorování interakcí

Medicago sativa a *Sinorhizobium meliloti*

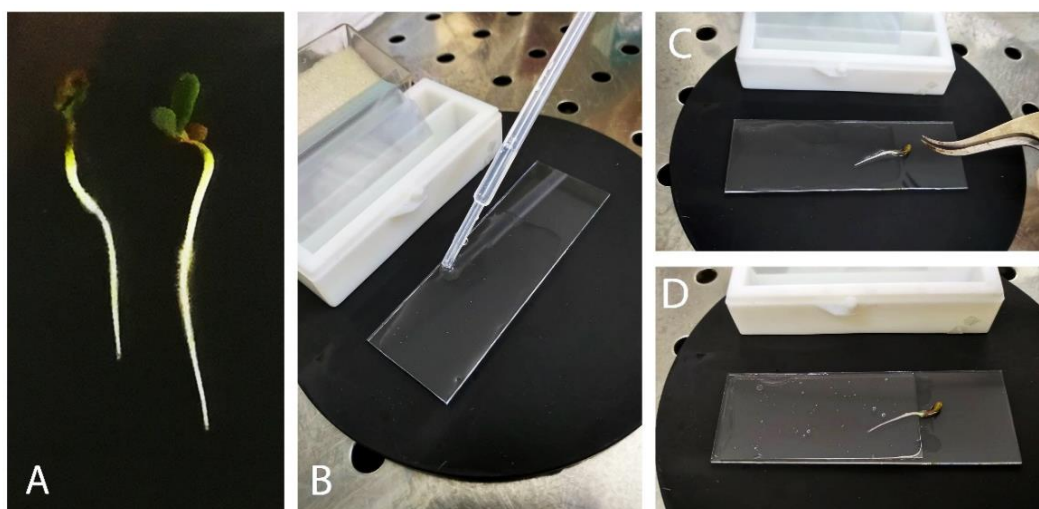
3.3.1 Příprava preparátu s pevným Fahraeus médiem bez dusíku

Pro přípravu mikroskopického preparátu bylo využito Fahraeus médium bez dusíku s využitím 0,5 % agarózy s nízkou teplotou tání jako ztužovacího činidla a 4-denní semenáčky rostliny *Medicago sativa*. Pro pozorování byl využit kultivar Europe, kontrolní linie kultivaru RSY a transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktu 35S:*GFP-ABD2* („actin-binding domain 2“).

Do 2ml mikrozkušavky Eppendorf bylo odváženo 5 mg agarózy a v laminárním boxu byl doplněn 1 ml sterilního Fahraeus média bez dusíku. Médium bylo vortexováno a umístěno do termobloku za teploty 90 °C po dobu 15 minut. Médium bylo opět vortexováno a umístěno do termobloku za teploty 40 °C po dobu 15 minut.

V laminárním boxu bylo podložní sklíčko vydezinfikováno 70 % etanolem. Za pomoci sterilní Pasteurovy pipety byla na podložní mikroskopické sklíčko (76x26 mm) nanášena tenká vrstva připraveného vychladlého média na plochu odpovídající rozměru krycího sklíčka (24x50 mm). Pomocí sterilní pinzety byl na podložní sklíčko přenesen vhodný semenáček *Medicago sativa* kultivovaný na pevném Fahraeus médiu bez dusíku po dobu 4 dní. Na kořen rostliny byly nanášeny 4 kapky média s obsahem *S. meliloti* OD₆₀₀ 0,1. Semenáček byl okamžitě po přenesení jemně přikryt krycím sklíčkem. Médium ve sklíčku se nechalo zatuhnout. Toto množství připraveného média odpovídalo přípravě dvou preparátů.

Byla připravena skleněná kyveta, která byla vydezinfikována 70 % etanolem. Do kyvety bylo přidáno 5 ml média s obsahem *S. meliloti* OD₆₀₀ 0,05. Připravený preparát byl zasunut do kyvety. Do skleněné kyvety byly vždy umístěny maximálně 3 preparáty. Skleněná kyveta byla izolována Parafilmem a po jejím obvodu zakryta černou páskou pro poskytnutí tmavého prostředí. Skleněná kyveta s preparáty byla umístěna do fytotronu.



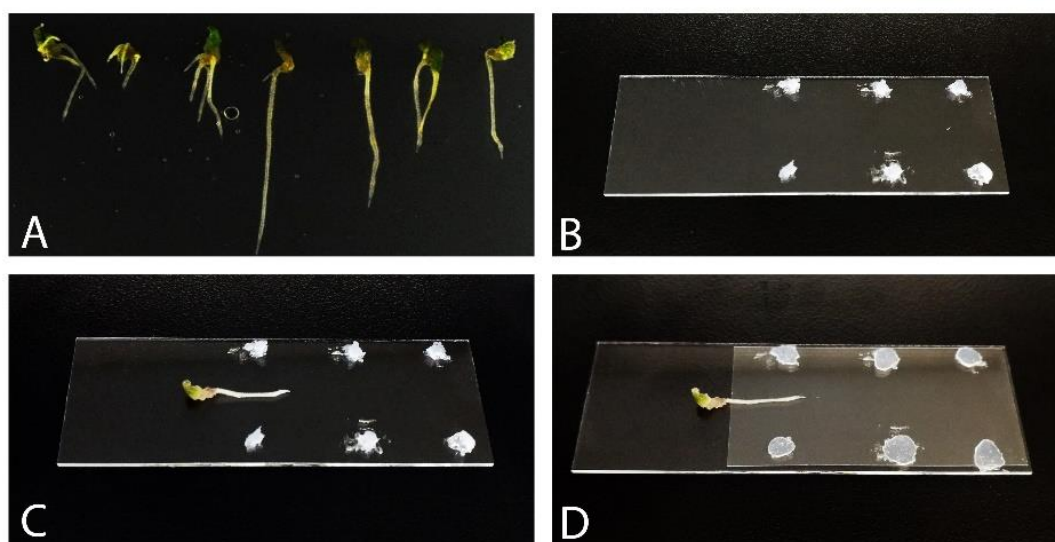
Obr. 6: Příprava mikroskopického preparátu *M. sativa* s pevným Fahraeus médiem bez obsahu dusíku pro sledování kokultivace *M. sativa* a *S. meliloti*. (A) Semenáčky *M. sativa* kultivované na pevném Fahraeus médiu bez dusíku, (B) nanesení Fahraeus média bez dusíku s 0,5 % agarózy na podložní sklíčko, (C) umístění semenáčku do vychladlého média a inokulace médiem s obsahem *S. meliloti*, (D) přikrytí semenáčku v médiu krycím sklíčkem.

3.3.2 Příprava preparátu s tekutým Fahraeus médiem bez dusíku za využití lékařské vazelíny

Pro přípravu mikroskopických preparátů byl využit systém podložního sklíčka a krycího sklíčka spojeného materiálem, který vytvořil prostor pro růst kořenu rostliny, tzv. „komůrku“. Bylo využito tekuté Fahraeus médium bez dusíku s obsahem *S. meliloti*. Rostlinný materiál představovaly 4-denní semenáčky *Medicago sativa* kultivaru Europe, kontrolní linie kultivaru RSY a transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktů *35S::GFP-ABD2* („actin-binding domain 2“).

Jako první spojovací materiál byla zvolena lékařská vazelína. V laminárním boxe bylo vydezinfikováno podložní sklíčko (76x26 mm) pomocí 70 % etanolu. Poté bylo po jeho krajích na ploše odpovídající velikosti krycího sklíčka (24x50 mm) vazelínou pomocí sterilního párátko vytvořeno 6 nosných bodů. Do středu podložního sklíčka bylo nanášeno několik kapek tekutého Fahraeus média bez dusíku obsahující *S. meliloti* OD₆₀₀ 0,05. Do média byl pomocí sterilní pinzety přenesen semenáček *M. sativa*, který byl předem kultivovaný na pevném Fahraeus médiu bez dusíku po dobu 4 dní. Semenáček *M. sativa* byl jemně přikryt krycím sklíčkem a díky polotuhé povaze vazelíny byla vytvořena komůrka odpovídající tloušťce semenáčku.

V laminárním boxu byla připravena hranatá skleněná miska, která byla vydezinfikována pomocí 70 % etanolu. Byla podepřena do úhlu cca 45°. Preparát byl vložen do misky a bylo přidáno takové množství média, aby obklopovalo spodní část kořenu rostliny. Miska byla přikryta a izolována Parafilmem. Její spodní část byla obalena alobalem pro poskytnutí tmavého prostředí a miska byla umístěna do fytotronu.



Obr. 7: Příprava mikroskopického preparátu s komůrkou vytvořenou pomocí vazelíny pro pozorování kokultivace *M. sativa* se *S. meliloti*. (A) Semenáčky *M. sativa* kontrolní linie RSY kultivované na pevném Fahraeus médiu bez dusíku, (B) nanesení 6 nosných bodů vazelíny, (C) umístění semenáčku do kapky tekutého média, (D) přikrytí semenáčku a vytvoření komůrky.

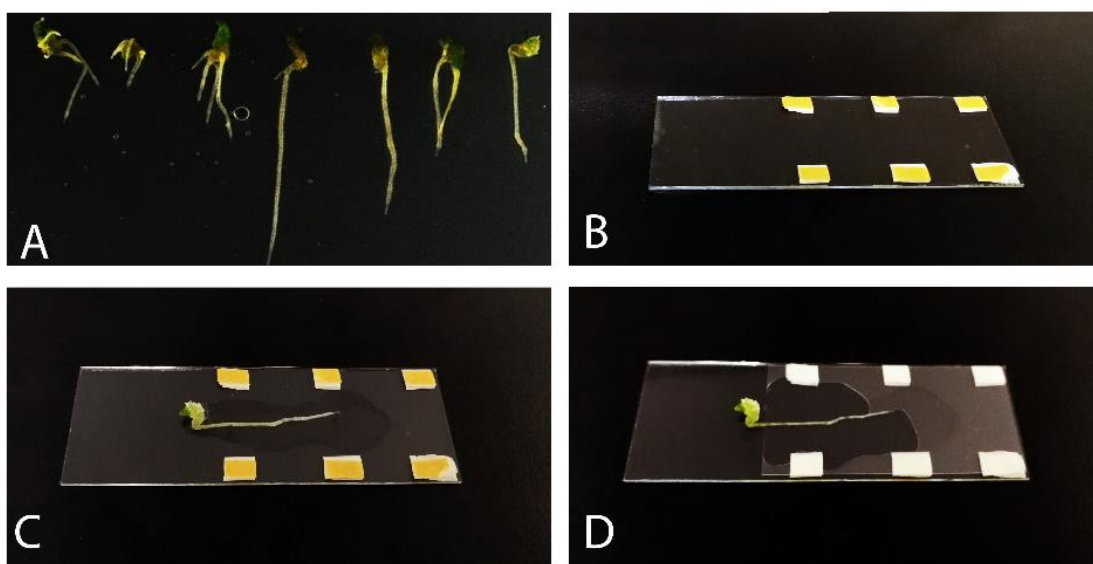
3.3.3 Příprava preparátu s tekutým Fahraeus médiem bez dusíku za využití oboustranné lepicí pásky

Jako alternativní spojovací materiál byla využita oboustranná lepicí páska. Bylo využito tekuté Fahraeus médium bez dusíku s obsahem *S. meliloti*. Rostlinný materiál představovaly 4-denní semenáčky *Medicago sativa* kultivaru Europe, kontrolní linie kultivaru RSY a transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktu *35S:GFP-ABD2* („actin-binding domain 2“).

V laminárním boxe bylo vydezinfikováno podložní sklíčko (76x26 mm) pomocí 70 % etanolu. Poté bylo po jeho krajích na ploše odpovídající velikosti krycího sklíčka (24x50 mm) umístěno 6 nosných bodů tvořených 5 vrstvami oboustranné lepicí pásky. Do středu podložního sklíčka bylo nanášeno několik kapek média obsahujícího

S. meliloti OD₆₀₀ 0,05. Do média byl pomocí sterilní pinzety přenesen semenáček *M. sativa*, který byl předem kultivovaný na pevném Fahraeus médiu bez dusíku po dobu 4 dní. Semenáček *M. sativa* byl přikryt krycím sklíčkem, které se přichytilo oboustrannou lepicí páskou.

V laminárním boxu byla připravena hranatá skleněná miska, která byla vydezinfikována pomocí 70 % etanolu. Byla podepřena do úhlu okolo 45°. Preparát byl vložen do misky a bylo přidáno takové množství média, aby obklopovalo spodní část kořenu rostliny. Miska byla přikryta a izolována Parafilmem. Její spodní část byla obalena alobalem pro poskytnutí tmavého prostředí a byla umístěna do fytotronu.



Obr. 8: Příprava mikroskopického preparátu s komůrkou vytvořenou pomocí oboustranné lepicí pásky pro pozorování kokultivace *Medicago sativa* se *Sinorhizobium meliloti*. (A) Semenáčky *M. sativa* kontrolní linie RSY kultivované na pevném Fahraeus médiu bez dusíku, (B) nanesení 6 nosných bodů oboustranné lepicí pásky, (C) umístění semenáčku do kapky tekutého média, (D) přikrytí semenáčku a vytvoření komůrky.

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace přípravy preparátů s pevným Fahraeus médiem

Pro úspěšné kontinuální pozorování interakcí rostlin *Medicago sativa* a hlízkových bakterií *Sinorhizobium meliloti* bylo potřeba optimalizovat přípravu mikroskopických preparátů, ve kterých by byly rostlině poskytnuty optimální růstové podmínky. Prostředí v preparátu s pevným Fahraeus médiem rostlině poskytuje vlhkost, prostor pro růst a potřebné živiny s výjimkou dusíku. Jako médium bylo zvoleno Fahraeus médium bez obsahu dusíku z důvodu primárního cíle daných experimentů, a to pozorování prvotních interakcí mezi rostlinou a bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* v procesu indukce hlízkové symbiózy. Nedostatek dusíku by měl indukovat zvýšený růst rostlinného kořene při snaze k jeho dosažení a také zvýšenou tvorbu kořenových vlásků a snahu rostliny pro vstup do symbiózy s hlízkovými bakteriemi.

Preparát byl zároveň optimalizován s cílem kvalitního mikroskopického snímání, proto byl zvolen systém podložního a krycího mikroskopického sklíčka, který umožňuje kvalitní získávání snímků pomocí světelného mikroskopu. Pevnost média musela být nastavena tak, aby neomezovala růst kořene rostlin a zároveň musela být dostatečná pro udržení integrity celého tohoto systému. Při použití agarózy jako ztužovacího činidla v koncentracích nižších než 0,5 % médium systémem podložního a krycího sklíčka protékalo, rychle vysychalo a neposkytovalo rostlině podporu, kterou ji poskytuje přirozený substrát. Proto byla koncentrace 0,5 % zvolena jako vyhovující.

Konečný protokol pro přípravu preparátu s pevným Fahraeus médiem byl testován na třech rostlinných liniích kokultivovaných se *Sinorhizobium meliloti*:

- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar Europe, kontrolní linie, rostliny pocházející ze semen
- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar RSY, kontrolní linie, rostliny pocházející ze semen
- *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktu 35S::*GFP:ABD2* („actin-binding domain 2“), rostliny pocházející ze semen

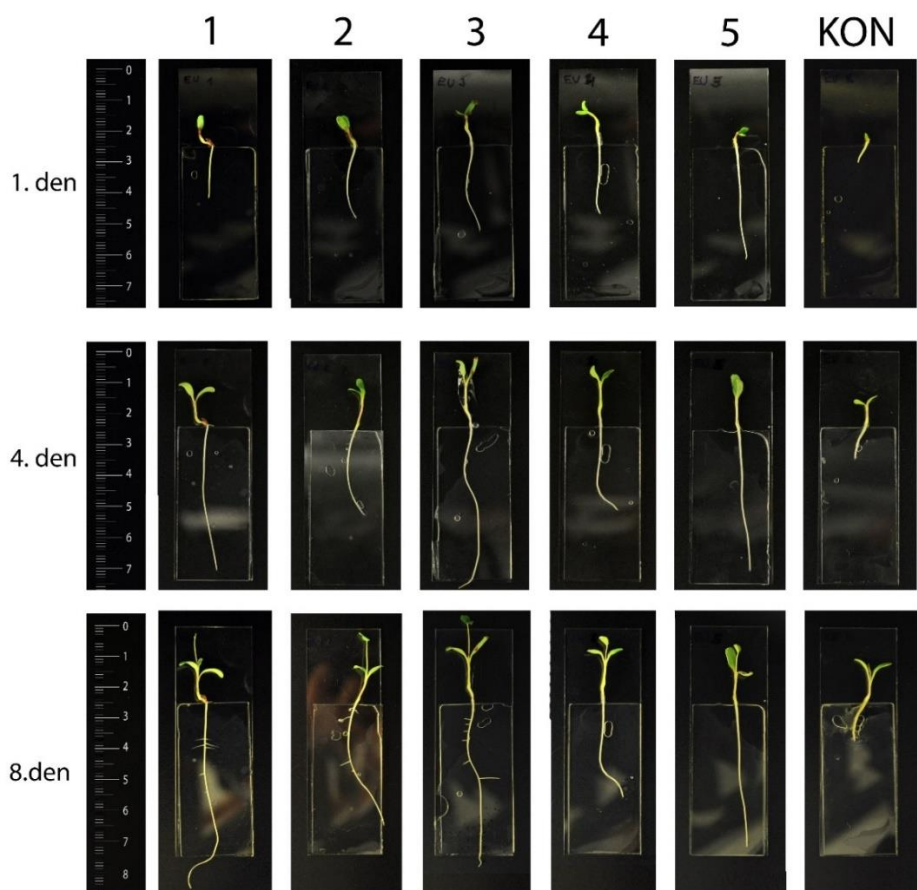
4.1.1 Zhodnocení vývoje rostlin *Medicago sativa* divokého typu, kultivar Europe

Pro testování životaschopnosti rostlin v preparátu a jeho efektivity pro pozorování interakcí mezi rostlinou a bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* byly použity 4-denní rostliny *Medicago sativa* divokého typu, kultivaru Europe. Tyto semenáčky byly předem kultivované na pevném Fahraeus médiu bez obsahu dusíku.

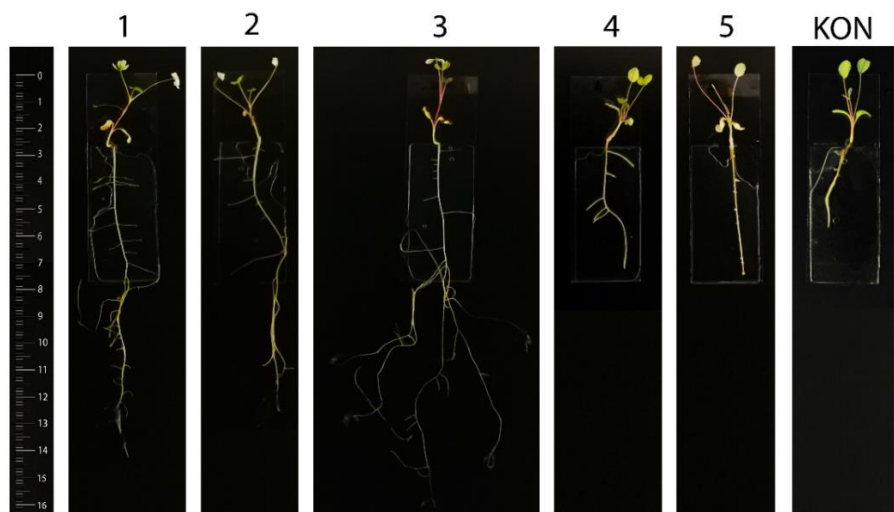
K samotnému experimentu byla připravena vzorová řada 5 vzorků rostlin kokultivovaných se *S. meliloti* a 1 kontrolní vzorek bez přidaných bakterií u každé linie. Pro přípravu preparátu byly voleny semenáčky s rovným kořenem a vyvinutými kořenovými vlásky. Semenáčky byly po vložení do připravovaného preparátu kokultivovány s bakteriemi *S. meliloti*.

Rostliny pozitivně reagovaly na vytvořené prostředí, což se projevilo zaznamenaným růstem kořene. Délka hlavních kořenů všech pozorovaných rostlin byla změřena v den přípravy preparátů a poté měřena 4. a 8. den (Tab. 1). Všechny rostliny pokračovaly ve vývoji po dobu 8 dní od přípravy preparátu (Obr. 9). Poté byly preparáty ponechány bez vnějšího zásahu s výjimkou výměny média na 20. den kokultivace. Preparáty byly zhodnoceny na konci experimentu, tedy na 30. den (Obr. 10). Byla změřena konečná délka hlavního kořene a byl stanoven počet vytvořených hlízek (Tab. 1).

Vzorek číslo 5 pozastavil svůj růst 8 den po nárůstu kořene o 1,1 cm, jako jediný z testované řady ale vytvořil hlízky a to celkově 4 (Obr. 10). Vzorek 4 a kontrolní vzorek, který nebyl kokultivovaný s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, pozastavily svůj růst po nárůstu o 2,5 cm (Obr. 10). Vzorkům 1-3 se v testovaném preparátu dařilo, nárůst hlavního kořene po 30 dnech byl v řádu 7-10 cm a nastalo u nich značné rozvětvení kořenového systému (Obr. 10).



Obr 9: Vývoj rostlin *M. sativa* divokého typu, kultivaru Europe. Rostliny č. 1-5 byly kokultivovány se *S. meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem a zdokumentovány v 1., 4. a 8. den kokultivace. Kontrolní experiment (KON) probíhal bez přítomnosti bakterií. Měřítka je v cm.



Obr 10: Vývoj rostlin *M. sativa* divokého typu, kultivaru Europe. Rostliny č. 1-5 byly kokultivovány se *S. meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem a zdokumentovány na 30. den kokultivace. Kontrolní experiment (KON) probíhal bez přítomnosti bakterií. Měřítka je v cm.

Tabulka 1: Přírůstky délky kořenů rostlin *Medicago sativa* divokého typu, kultivaru Europe (rostliny 1-5 a kontrolní rostlina). Sečtení počtu hlízek vytvořených na rostlinách po 30 dnech. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti*.

	Délka kořene rostlin ve vzorcích číslo 1-5 (v cm)					
	1	2	3	4	5	KON
1. den	1,6	2,4	2,7	2,2	3,6	0,5
4. den	4,5	2,9	5,2	2,8	4,6	1
8. den	6,1	4	5,4	3,1	4,7	1,4
30. den	11,7	10	13,6	4,6	4,7	3,1
Celkový nárůst kořene	10,1	7,6	10,9	2,4	1,1	2,6

Počet hlízek po 30 dnech	0	0	0	0	4	0
---------------------------------	---	---	---	---	---	---

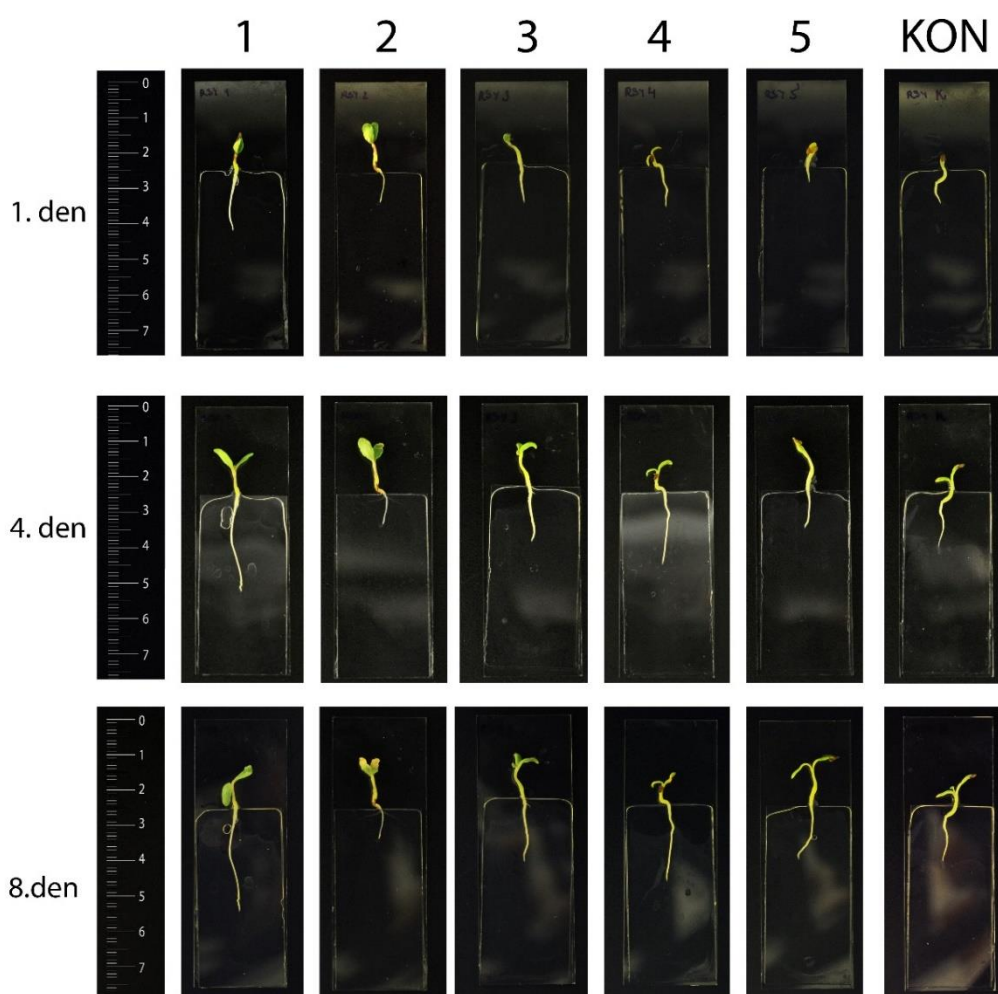
4.1.2 Zhodnocení vývoje rostlin *Medicago sativa*, kontrolní linie RSY

V tomto experimentu byly pro testování životaschopnosti a růstu rostlin v preparátu a jeho vhodnosti pro pozorování interakcí mezi rostlinou a bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* použity 4-denní rostliny *Medicago sativa*, kontrolní linie RSY. Tyto semenáčky byly předem kultivované na pevném Fahraeus médiu bez obsahu dusíku. Byla připravena vzorová řada 5 vzorků rostlin kokultivovaných se *S. meliloti* a 1 kontrolní vzorek bez přidání bakterií. Pro přípravu preparátu byly voleny semenáčky s rovným kořenem a vyvinutými kořenovými vlásky. Semenáčky byly při přípravě preparátu kokultivovány s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*.

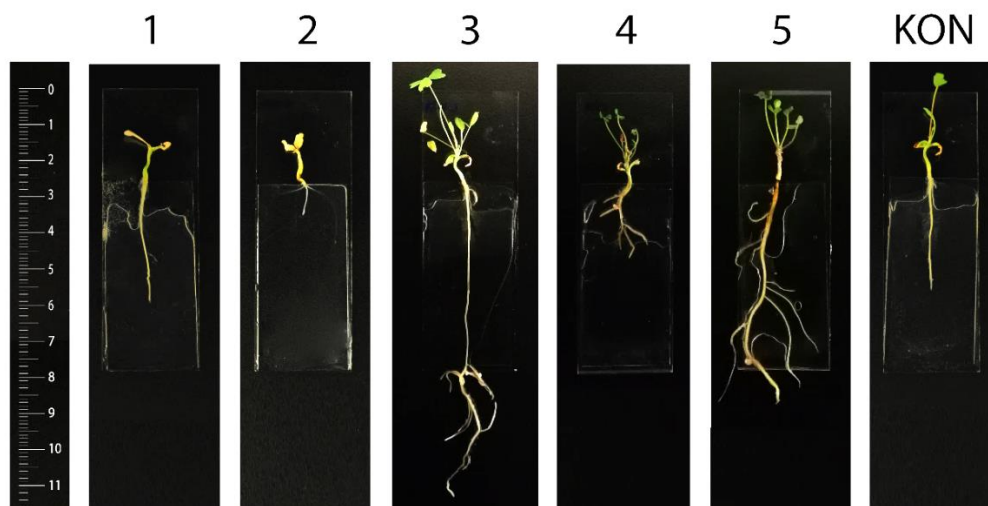
V porovnání s divokým typem kultivaru Europe reagovala kontrolní linie kultivaru RSY znatelně hůř na nastavené podmínky v tomto typu preparátu. Délka hlavních kořenů všech pozorovaných rostlin byla změřena v den přípravy preparátů a poté měřena 4. a 8. den (Tab. 2). Vzorek č. 2 nevykázal žádný nárůst kořene a vzorek č. 1, vzorek č. 4 a kontrolní vzorek, který nebyl kokultivován se *S. meliloti*, projevíly pouze minimální nárůst v řádu 1-2 cm. Pouze vzorky č. 3 a 5 prokázaly znatelnější nárůst kořene a to o 8 cm a 5,7 cm (Obr. 11).

Od 8. dne po přípravě byly preparáty ponechány bez vnějšího zásahu s výjimkou výměny média na 20 den kokultivace. Následně byl experiment ukončen a preparáty

byly zhodnoceny 30 den od začátku kokultivace (Obr. 12). Byla změřena konečná délka hlavního kořene a byl stanoven počet vytvořených hlízek (Tab. 2). Hlízky byly vytvořeny u vzorků č. 3, 4 a 5. U vzorku č. 3 a 4 byla vytvořena 1 hlízka (Obr. 12). Hlízky se vytvořily v místech, kde se médium ve vzorku odpařilo, nebo v místech, kde kořenový systém vyrostl z komůrky preparátů (Obr. 12). To vede k závěru, že se v prostředí preparátu, kde je pevné agarosové médium, k rostlině nedostává dostatek vzdušného kyslíku a dusíku. Ty jsou potřebné pro úspěšné proběhnutí interakce mezi rostlinou a hlízkovými bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*.



Obr 11: Vývoj rostlin *Medicago sativa*, kontrolní linie RSY, kokultivovaných se *S. meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem. Rostliny č. 1-5 kokultivovány se *S. meliloti* byly zdokumentovány v 1., 4. a 8. den kokultivace. Kontrolní experiment (KON) probíhal bez přítomnosti bakterií. Měřítka je v cm.



Obr 12: Vývoj rostlin *Medicago sativa*, kontrolní linie RSY, kokultivovaných se *S. meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem zaznamenaná na 30. den kokultivace. Kontrolní experiment (KON) probíhal bez přítomnosti bakterií. Měřítka je v cm.

Tabulka 2: Přírůstky délky kořenů rostlin *M. sativa*, kontrolní linie RSY. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti*. Sečtení počtu hlízek vytvořených na rostlinách po 30 dnech v preparátu.

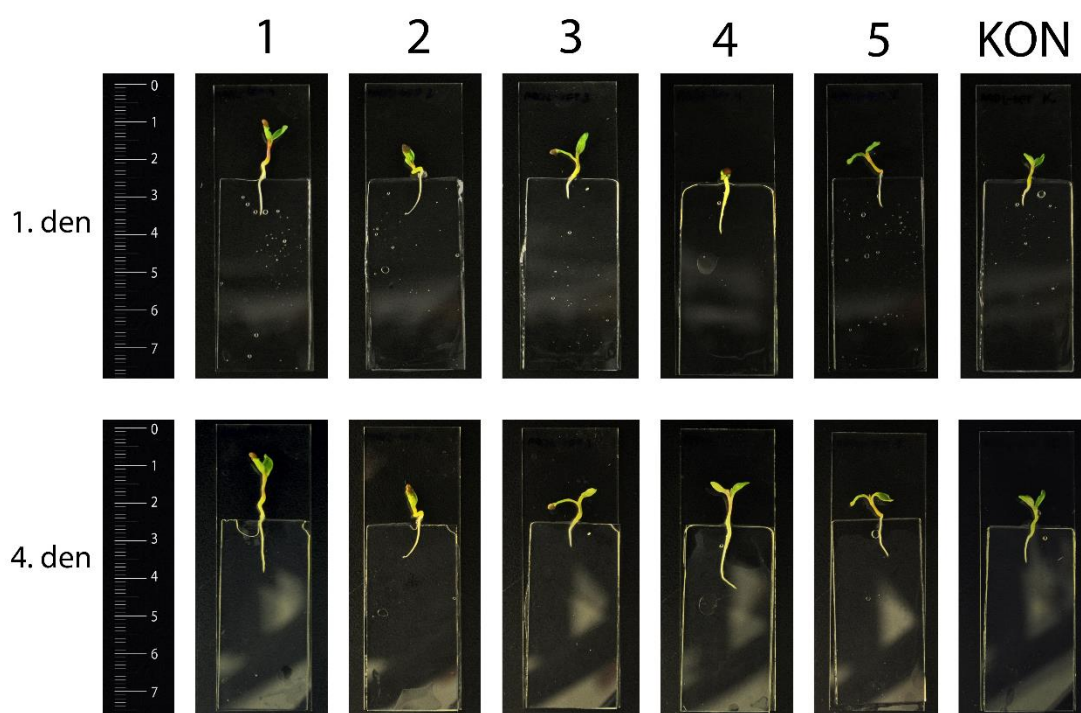
	Délka kořene rostlin ve vzorcích číslo 1-5 (v cm)					
	1	2	3	4	5	Kon
1. den	1,6	1	1	1	0,5	1
4. den	2,8	1	1,2	2	1	1,5
8. den	3	1	1,2	2	1,5	1,5
30. den	3,5	1	9	2,2	6,2	3,1
Celkový nárůst kořene	1,9	0	8	1,2	5,7	2,1

Počet hlízek po 30 dnech	0	0	2	1	1	0
---------------------------------	---	---	---	---	---	---

4.1.3 Zhodnocení vývoje rostlin *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY

Preparát s pevným Fahraeus médiem byl testován i na transgenní linii kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2. Pro zhodnocení růstu a životaschopnosti rostlin v preparátu a jeho efektivity pro pozorování interakcí mezi rostlinou a bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* byly použity 4-denní semenáčky. Tyto semenáčky byly předem kultivované na pevném Fahraeus médiu bez obsahu dusíku. Byla připravena vzorová řada 5 vzorků rostlin kokultivovaných se *S. meliloti* a 1 kontrolní vzorek. Pro přípravu preparátu byly voleny semenáčky s rovným kořenem a vyvinutými kořenovými vlásky.

Rostliny *M. sativa* transgenní linie RSY s produkcí GFP-ABD2 v porovnání s předchozími testovanými kontrolními liniemi reagovala na nastavené podmínky nejhůř. Rostliny vykazovaly jen minimální nárůst kořenů. Po 4. dni všechny pozorované rostliny zastavily svůj růst (Obr. 13) a nebyla pozorována žádná tvorba hlízek (Tab. 3). To může být způsobeno tím, že byly propagovány somatickou embryogenezí.



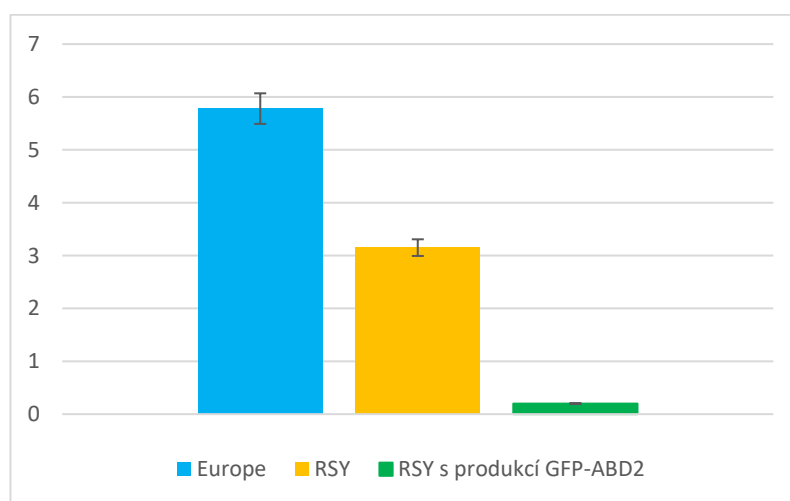
Obr 13: Vývoj rostlin *Medicago sativa*, transgenní linie kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2. Rostliny č. 1-5 kokultivovány se *S. meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem byly zdokumentovány v 1. a 4. den kokultivace. Kontrolní experiment (KON) probíhal bez přítomnosti bakterií. Měřítka je v cm.

Tabulka 3: Přírůstky délky kořenů rostlin *M. sativa*, kultivar RSY s produkcí GFP-ABD2. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti*. Sečtení počtu hlízek vytvořených na rostlinách po 30 dnech v preparátu.

	Délka kořene rostlin ve vzorcích číslo 1-5 (v cm)					
	1	2	3	4	5	Kon
1. den	1	1	0,6	1,4	0,8	0,8
4. den	1,4	1	0,7	1,7	1	1
Celkový nárůst kořene	0,4	0	0,1	0,3	0,2	0,2
Počet hlízek po 30 dnech	0	0	0	0	0	0

4.1.4 Porovnání všech linií *Medicago sativa*

Po zhodnocení preparátů všech tří testovaných linií bylo zjištěno, že nejlépe se v nastavených podmínkách dařilo divokému typu kultivaru Europe. To se projevilo nejvyšším průměrným nárůstem kořenů (Obr. 14). Průměrný nárůst hlavních kořenů u tohoto kultivaru bylo 5,78 cm. U vzorku č. 1, č. 2 a č. 3 jsme také pozorovali mohutný rozvoj kořenového systému. Divoký typ kultivaru RSY také prokázal schopnost růstu v připraveném preparátu, průměrný nárůst hlavního kořene byl 3,15 cm. Pro kultivaci transgenní linie kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2 se preparát ukázal jako nevhodný, průměrný nárůst kořenů byl 0,2 cm.



Obr. 14: Porovnání průměrného nárůstu hlavního kořene *M. sativa* všech testovaných linií. Nárůst měřen v cm.

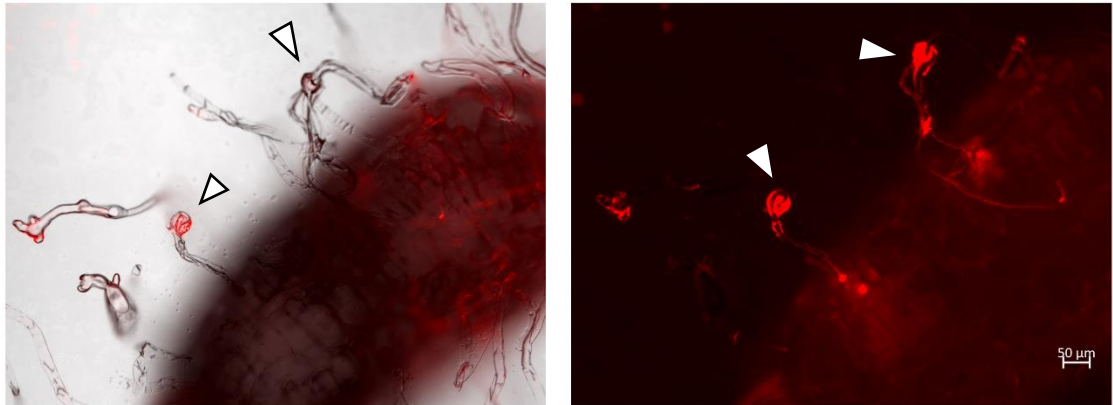
4.1.5 Pozorování interakcí rostlin *Medicago sativa* se *Sinorhizobium meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem

Preparáty s tekutým Fahraeus médiem se prokázaly jako vhodné pro studium vývojových procesů kořene *Medicago sativa* divokého typu kultivaru Europe a kontrolní linie kultivaru RSY, nebyly však příliš vhodné pro pozorování interakcí mezi rostlinami *Medicago sativa* a bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, což bylo hlavním cílem tohoto experimentu. Byla však pozorována tvorba hlízek na kořenovém systému rostliny v případech, kdy agarosové médium v komůrce vytvořené mezi krycím sklíčkem a podložním sklíčkem vyschlo, nebo ve chvíli, kdy kořeny vyrostly ven z preparátu (Obr. 15). To vede k závěru, že rostlina a bakterie nemají v testovaném preparátu dostatečný přísun vzdušného dusíku a kyslíku, což je potřebné pro zahájení jejich interakce a spuštění procesu tvorby hlízek.

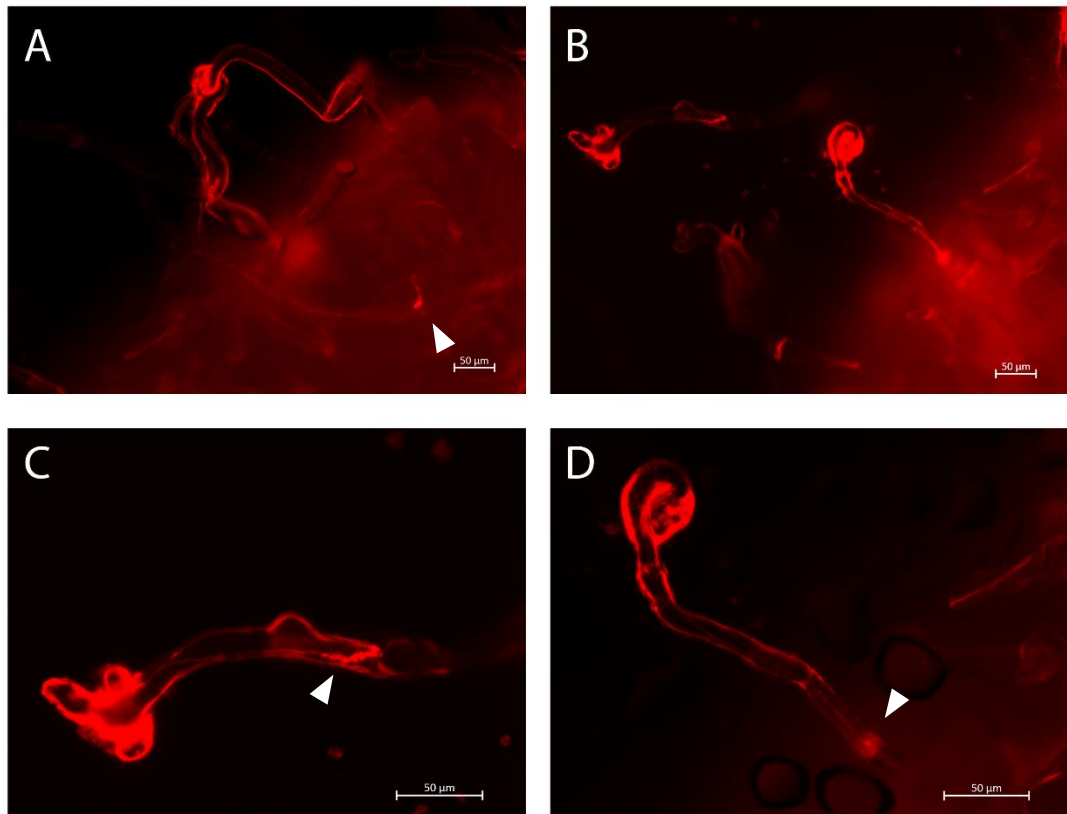
V těchto případech byly pozorovány prvotní fáze interakcí mezi *Medicago sativa* a *Sinorhizobium meliloti*, jako jsou stočení kořenových vlásků (Obr. 16) a tvorba infekčního vlákna, které propagovalo *Sinorhizobium meliloti* produkující mRFP do kortikální vrstvy kořene (Obr. 17). Následně byla pomocí mikroskopického snímání pozorována i tvorba hlízek (Obr. 18).



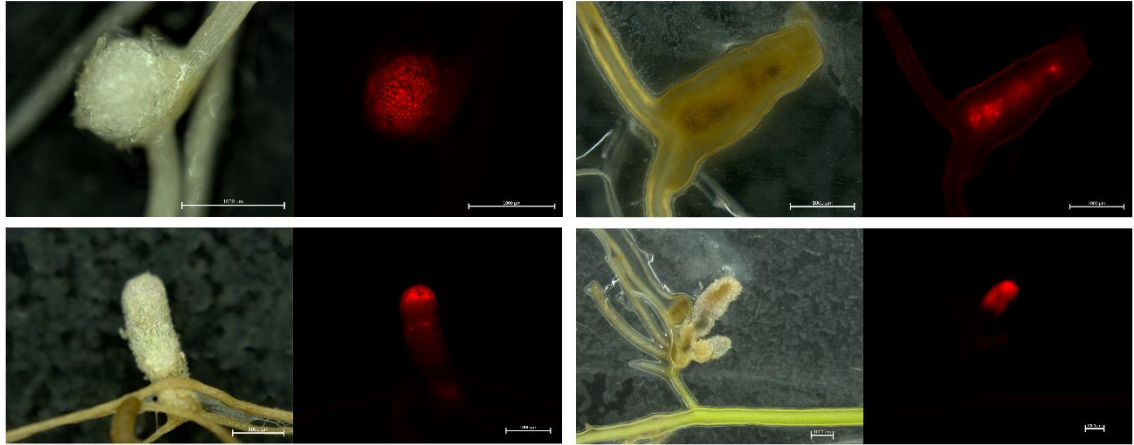
Obr 15: Hlízky (šipka) vytvořené na rostlinách *Medicago sativa* v místech, kde vyschnulo agarosové médium z preparátu. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti* v preparátech s pevným Fahraeus médiem. Měřítko v cm.



Obr. 16: Stáčení kořenových vlásků (šipky) a tvorba infekčních vláken na kořenu *M. sativa*, kultivar Europe, po kokultivaci s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* produkujícími mRFP. Měřítka je 50 µm.



Obr 17: Stáčení kořenových vlásků a tvorba infekčních vláken na kořenu *M. sativa*, kultivar Europe po kokultivaci s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* produkujícími mRFP. (A) Můžeme pozorovat infekční vlákno pronikající do kortikální vrstvy kořene, (C-D) na obou snímcích je viditelný rostoucí vrchol infekčního vlákna. Měřítka je 50 µm.



Obr 18: Hlízky vytvořené na rostlinách *Medicago sativa* v místech, kde vyschnulo agarosové médium z preparátu. Bakterie *S. meliloti* produkující mRFP v bakterioidech hlízek byly vizualizované pomocí fluorescenční mikroskopie (červený mRFP kanál). Měřítka je 1000 μm .

4.2 Pozorování interakcí rostlin *Medicago sativa* a *Sinorhizobium meliloti* v preparátech s tekutým Fahraeus médiem

V prvním experimentu byl testován preparát připraven pro pozorování interakcí mezi rostlinou *Medicago sativa* a hlízkovými bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* v pevném Fahraeus médiu bez obsahu dusíku. Prvotní fáze interakce nebylo možné pozorovat, protože v tomto typu preparátu probíhaly především v místech, kde došlo k úbytku média. Tvorba hlízek jenom na částech kořene, které vyrůstaly z pevného média, vedla k závěru, že interakce v tomto prostředí na celém kořenovém systému neprobíhaly z důvodu nepřístupnosti vzdušného kyslíku a dusíku.

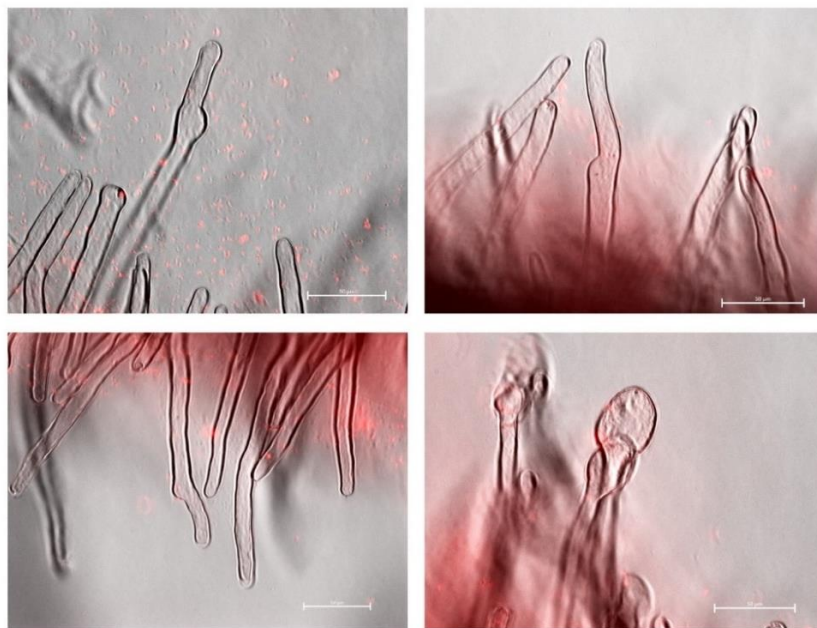
Po vyhodnocení tohoto experimentu jsme proto přistoupili k vylepšení metody pozorování interakcí mezi rostlinou a bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* takovým způsobem, který by kořenům rostlin poskytl potřebný přístup vzduchu. Z toho důvodu byla testována příprava preparátu, který byl založen na systému tvořeném krycím a podložním sklíčkem, které při sobě držely pomocí spojovacího materiálu, který propouštěl jak tekuté médium, tak i dostatek vzduchu ke kořenům rostlin. Preparáty byly uchovávány v šikmé poloze tak, aby médium zalévalo spodní část kořene a vrchní část byla ve styku se vzduchem.

4.2.1 Preparáty připravené s využitím lékařské vazelíny

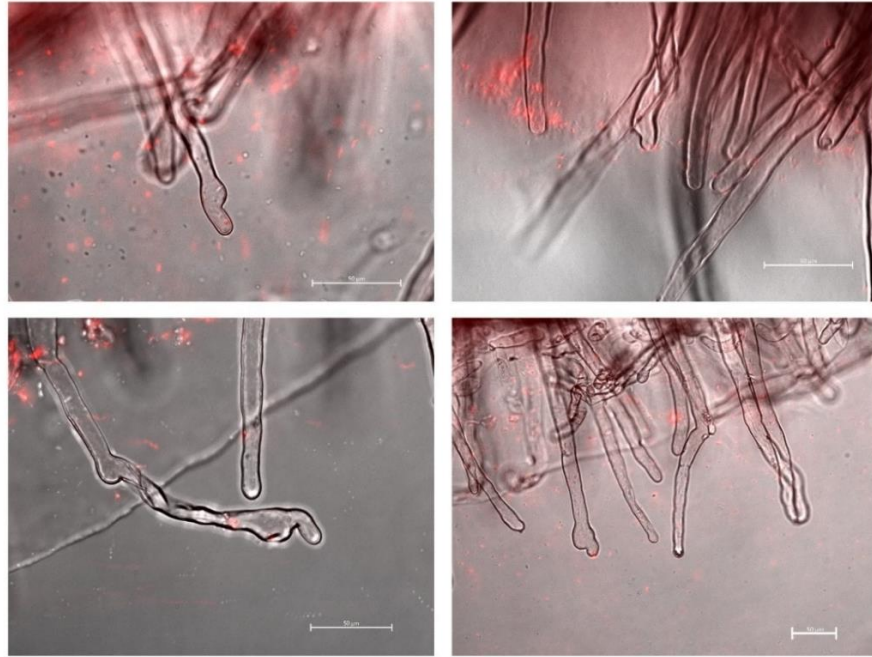
Jako spojovací materiál byla zvolena lékařská vazelína. Preparát byl testovaný na třech rostlinných liniích kokultivovaných s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*:

- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar Europe, kontrolní linie, rostliny pocházející ze semen
- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar RSY, kontrolní linie, indukované *in vitro* procesem somatické embryogeneze, rostliny pocházející ze somatických embryí
- *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktů *35S::GFP:ABD2* indukované *in vitro* procesem somatické embryogeneze, rostliny pocházející ze somatických embryí

24 h po přípravě preparátů proběhlo první mikroskopické snímání interakcí mezi bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* s produkcí mRFP a rostlinami *Medicago sativa*. Po 48 hodinách byly pozorovány prvotní fáze interakcí. Ve střední části kořene byly zaznamenány typické projevy prvotních fází těchto interakcí, jako jsou deformace a zakrucování vrcholů kořenových vlásků u kultivaru Europe (Obr. 19) a u kontrolní linie kultivaru RSY (Obr. 20). Preparáty transgenní linie kultivaru RSY produkující ABD2-GFP nebyly reprodukovatelné.

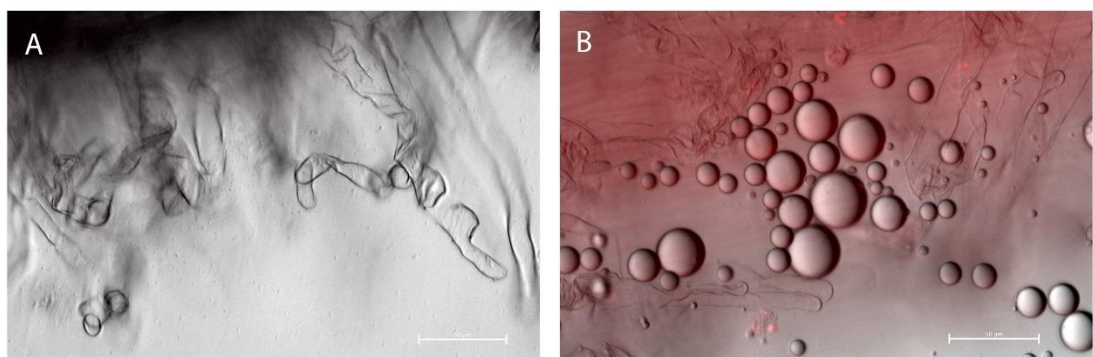


Obr 19: Kořenové vlásky *M. sativa* divokého typu, kultivar Europe, v preparátu s tekutým Fahraeus médiem po 48 h kokultivace. Rostliny byly kokultivovány se *S. meliloti* s produkcí mRFP. Kořenové vlásky se začaly deformovat v důsledku interakcí s bakteriemi. Měřítka jsou 50 μm .



Obr 20: Kořenové vlásky *M. sativa* kontrolní linie RSY v preparátu s tekutým Fahraeus médiem po 48 h kokultivace. Rostliny byly kokultivovány se *S. meliloti* s produkcí mRFP. Kořenové vlásky se začaly deformovat v důsledku interakcí s bakteriemi. Měřítka jsou 50 μm .

Při mikroskopickém snímání 72 h po zahájení kokultivace bylo zjištěno, že lékařská vazelína není vhodným spojovacím materiálem, jelikož do média v prostředí preparátu nadměrně uvolňovala tukové kapičky (Obr. 21). Byla tím zásadně ovlivněna chemická a fyzikální stabilita prostředí, fyziologické procesy v rostlinách a v bakteriích přítomných v médiu. Protože kořenové prostředí by mělo poskytovat co nejlepší podmínky pro optimální růst nejen pro rostlinu a bakterie, ale i vhodné prostředí pro průběh interakcí, tato metoda přípravy preparátů se jeví jako nevhodná.



Obr 21: Kořenové vlásky *M. sativa* v preparátu s tekutým Fahraeus médiem. (A) Zjevně poškozené kořenové vlásky *Medicago sativa* kontrolní linie RSY po 72 h kokultivace v preparátu. (B) Tukové kapičky uvolněné z lékařské vazelíny narušující prostředí preparátu. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti* s produkcí mRFP. Měřítka jsou 50 μm .

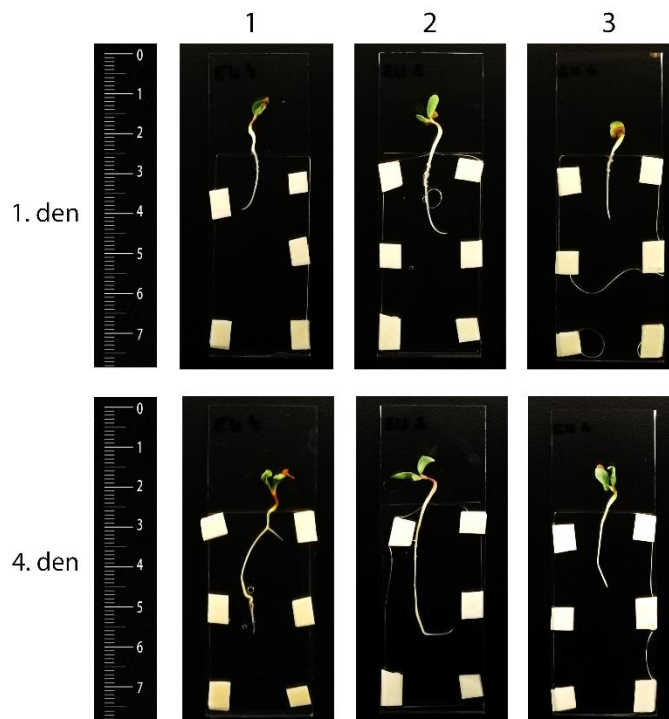
4.2.2 Preparáty připravené s využitím oboustranné lepicí pásky

Vzhledem k tomu, že vazelína nebyla vhodná pro využití k přípravě preparátů, protože ovlivňovala fyziologické prostředí rostliny uvolňováním tukových kapiček, musel být pro přípravu preparátu zvolen jiný spojovací materiál. Oboustranná lepicí páska byla vybrána díky tomu, že byla dostatečně stabilní a že určitý počet vrstev pásky umožňoval vytvoření komůrky o různé tloušťce tak, aby vyhovovala velikosti kořenu rostliny.

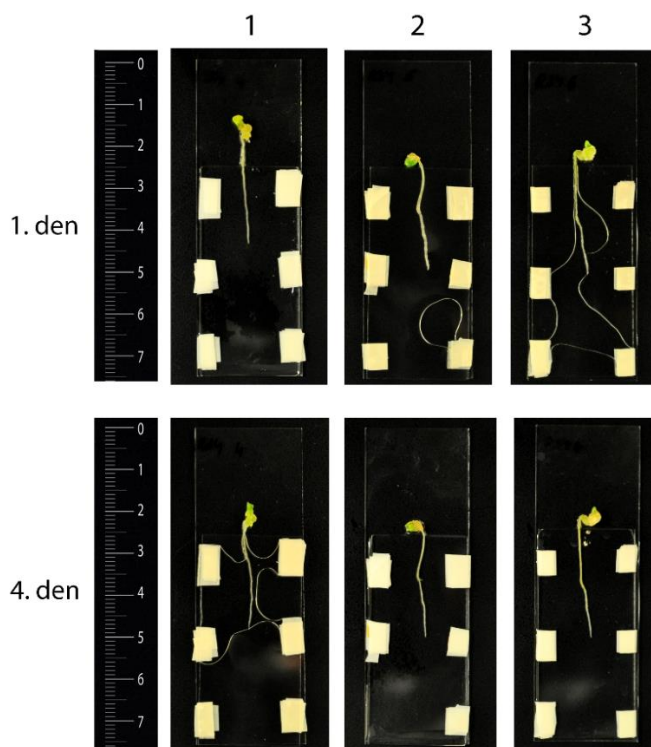
Preparáty byly testované na třech rostlinných liniích kokultivovaných s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* s produkcí mRFP:

- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar Europe, kontrolní linie, rostliny pocházející ze semen
- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar RSY, kontrolní linie, indukované *in vitro* procesem somatické embryogeneze, rostliny pocházející ze somatických embryí
- *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY s expresí konstruktů 35S::*GFP:ABD2* („actin-binding domain 2“), u níž jsou značena aktinová vlákna, indukované *in vitro* procesem somatické embryogeneze, rostliny pocházející ze somatických embryí

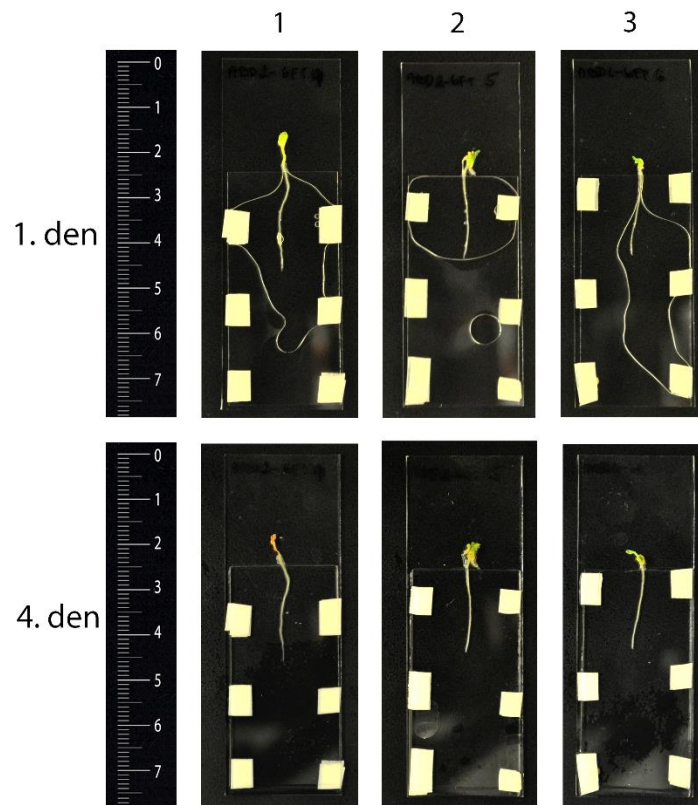
Rostliny v preparátu byly snímány po dobu 5 dní. Podmínky v preparátu se neprojevily jako vhodné pro dlouhodobé sledování vzhledem k minimálnímu nárůstu kořenů. Udržel ale po dobu 5 dní rostlinu a její kořenové vlásky vitální. Vývoj kořene v preparátu byl zdokumentován 1. a 4. den od přípravy preparátu (Obr. 22, 23, 24).



Obr 22: Vývoj rostlin *Medicago sativa* divokého typu, kultivaru Europe, v preparátech s tekutým Fahraeus médiem. Rostliny byly kokultivovány se *S. meliloti* a dokumentovány na 1. a 4. den kokultivace. Měřítka v cm.

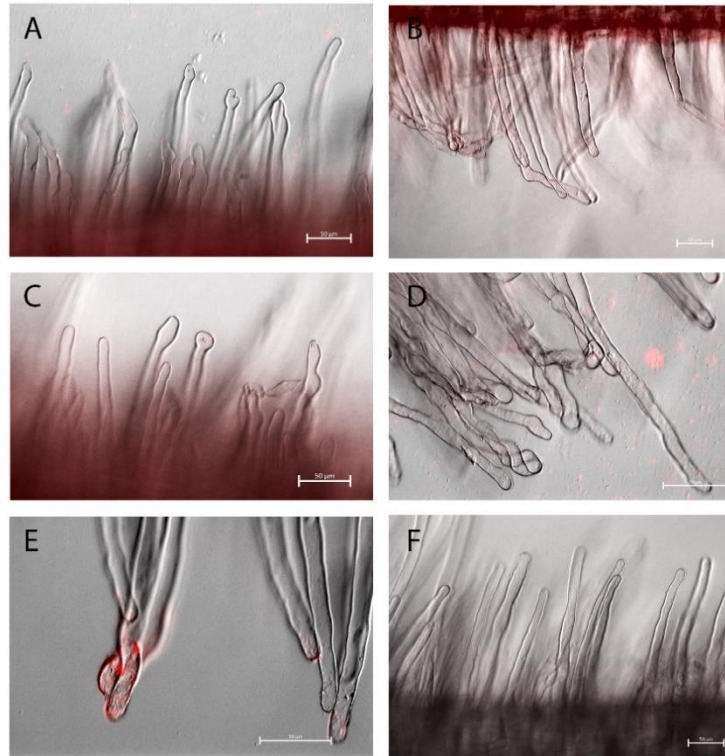


Obr 23: Vývoj rostlin *Medicago sativa* divokého typu, kultivaru RSY, v preparátech s tekutým Fahraeus médiem. Rostliny byly kokultivovány se *S. meliloti* a dokumentovány na 1. a 4. den kokultivace. Měřítka v cm.

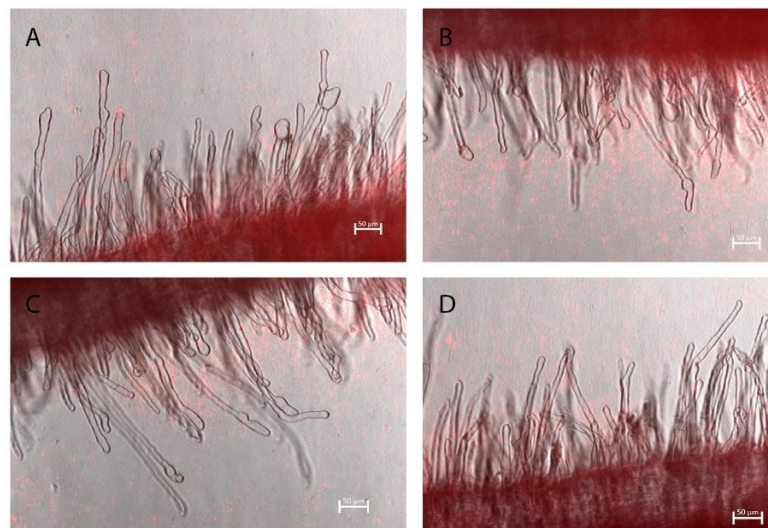


Obr 24: Vývoj rostlin *Medicago sativa* transgenní linie kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2 v preparátech s tekutým Fahraeus médiem. Rostliny byly kokultivovány se *S. meliloti* a dokumentovány na 1. a 4. den kokultivace. Měřítko v cm.

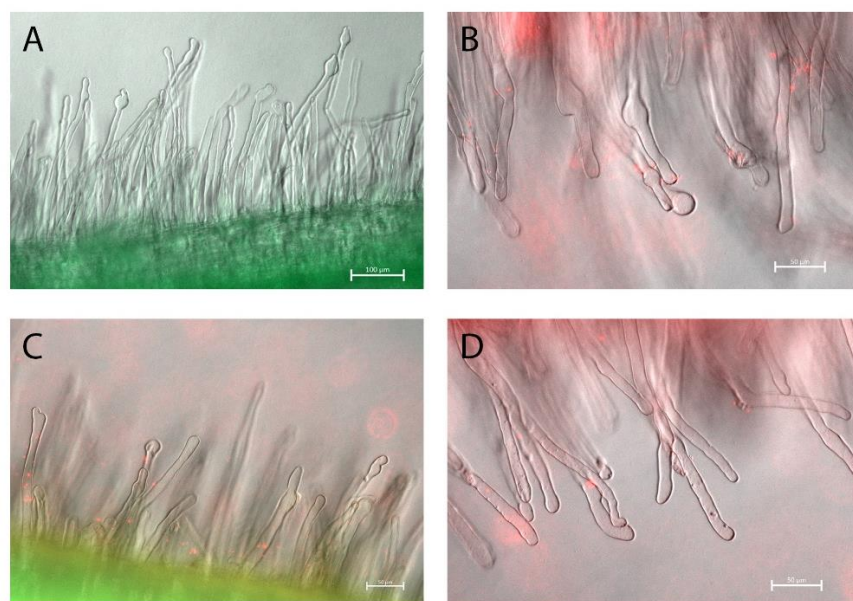
Rostliny *Medicago sativa* kokultivovány s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* byly poprvé pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu po 24 h. První interakce byly pozorovány po 48 h u kontrolní linie RSY (Obr. 25) a u transgenní linie kultivaru RSY (Obr. 27). Interakce se projevily typickými deformacemi kořenových hlaviček. Výsledky z preparátu divokého typu kultivaru Europe nebyly reprodukovatelné. Interakce byly opět pozorovány po 96 h od přípravy preparátu (Obr. 26, 28). Bylo pozorováno vyšší množství deformací kořenových vlásků v reakci na přítomnost bakterií. Žádná tvorba infekčního vlákna nebyla pozorována.



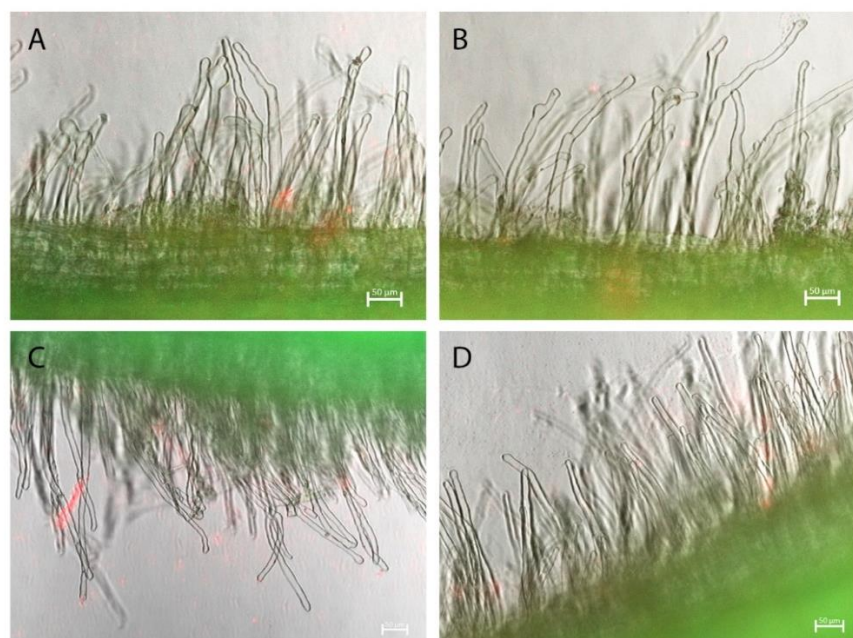
Obr 25: Kořenové vlásky *Medicago sativa* kontrolní linie RSY. Rostliny byly kokultivovány se *S. meliloti* produkujícími mRFP po dobu 48 h. Můžeme pozorovat deformace kořenových vlásků způsobené interakcí s bakteriemi. (A-E) Kořenové vlásky snímané ve vrchní a střední části kořene, (F) kořenové vlásky snímané ve spodní části kořene vykazují menší množství deformací způsobených interakcemi s bakteriemi. Měřítka je 50 µm.



Obr 26: Kořenové vlásky *Medicago sativa* kontrolní linie RSY. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti* produkujícími mRFP po dobu 96 h. Můžeme pozorovat deformace kořenových vlásků způsobené interakcí s bakteriemi. (A-C) Kořenové vlásky snímané ve vrchní a střední části kořene, (D) kořenové vlásky snímané ve spodní části kořene vykazují menší množství deformací způsobených interakcemi s bakteriemi. Měřítka je 50 µm.



Obr 27: Kořenové vlásky *Medicago sativa*, transgenní linie kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti* produkujícími mRFP po dobu 48 h. Můžeme pozorovat deformace kořenových vlásků způsobené interakcemi s bakteriemi. (A-B) Kořenové vlásky snímané ve vrchní a střední části kořene, zřejmý je vysoký počet interagujících vlásků, (C-D) kořenové vlásky snímané ve spodní části kořene vykazují menší množství deformací způsobených interakcemi s bakteriemi. Měřítko je 50 μm



Obr 28: Kořenové vlásky *Medicago sativa*, transgenní linie kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2. Rostliny kokultivovány se *S. meliloti* produkujícími mRFP po dobu 96 h. Můžeme pozorovat deformace kořenových vlásků způsobené interakcemi s bakteriemi. (A-B) Kořenové vlásky snímané ve vrchní a střední části kořene, (C-D) kořenové vlásky snímané ve spodní části kořene vykazují menší množství deformací způsobených interakcemi s bakteriemi. Měřítko je 50 μm .

5 DISKUZE

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací přípravy preparátů pro mikroskopické pozorování interakcí mezi rostlinami *Medicago sativa* a hlízkovými bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* vedoucí k hlízkové symbióze. Preparáty byly testovány za využití rostlin divokého typu kultivaru Europe, kontrolní linie divokého typu kultivaru RSY a transgenní linie kultivaru RSY s produkcí GFP-ABD2 („actin-binding domain 2“), u níž jsou značena aktinová vlákna.

Byl optimalizován postup přípravy preparátů, při kterých bylo využito systému podložního a krycího sklíčka s pevným Fahraeus médiem. Jednou z prvních metod pro pozorování infekce rostlin rhizobiálními bakteriemi byla příprava preparátu podle Fahraeus (1957). Při svém experimentu Fahraeus studoval interakci mezi jetelem plazivým (*Trifolium repens*) a bakteriemi *Rhizobium trifolii*. Na podložní sklíčko nanas 0,3-0,4% agar inokulovaný bakteriemi. Semenáček jetele plazivého vložil kořenem na agar a přikryl krycím sklíčkem. Obdobnou přípravu mikroskopického preparátu při svém experimentu využil Gage *et al.* (1998), když na podložní sklíčko nanas vrstvu BNM média zpevněné agarosou. Do média přenesl semenáček *Medicago sativa* a na semenáček naočkoval bakteriální kulturu *Sinorhizobium meliloti*. Preparát byl překryt dialyzační membránou. Tento postup pro přípravu preparátu s drobnými modifikacemi využili také například Cheng a Walker (1998).

V preparátech optimalizovaných v této práci byla možná dlouhodobá kultivace rostlin *Medicago sativa* divokého typu kultivaru Europe. Za účelem pozorování interakcí s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* produkujícími mRFP byla bakteriální kultura naočkována na semenáčky rostlin a zhotovený preparát byl kultivován ve skleněné kyvetě se zastíněnou spodní částí, na jejímž dně se také nacházela bakteriální kultura. Předpokladem přípravy tohoto preparátu bylo kontinuální pozorování vývoje prvotních fází interakcí v čase. V tomto preparátu byly pozorovány pouze reakce kořenových vlásků na přítomnost hlízkových bakterií projevující se deformací jejich hlaviček. Další fáze interakcí, jako stáčení hlaviček kořenových vlásků a tvorba infekčních vláken, byly pozorovány pouze v místech, kde pevné Fahraeus médium vyschnulo, nebo v místech, kde kořen vyrostl z preparátu. To vede k závěru, že v testovaném preparátu neměl kořen rostliny přístup k vzdušnému dusíku a kyslíku, které jsou pro průběh procesu tvorby hlízek nutné.

Aby byl rostlině při jejím vývoji v preparátu poskytnut přístup ke vzduchu pro umožnění procesu tvorby hlízek, byl zvolen odlišný přístup k přípravě mikroskopického preparátu. Bylo využito systému podložního a krycího sklíčka, který vytvořil tzv. „komůrku“ za pomoci spojovacího materiálu. V tomto preparátu bylo přítomné tekuté Fahraeus médium, které zaplavovalo spodní část kořenu rostliny, aby byla rostlině poskytnuta vláha a živiny. Vrchní část kořene měla přístup ke vzduchu, zároveň však byl kořen v preparátu chráněn vůči nadměrnému vysychání. Obdobnou přípravu vzorku použila ve své diplomové práci Kovalčíková (2017). Mikroskopické snímání bylo prováděno kontinuálně pro pozorování vývoje interakcí mezi *Medicago sativa* a hlízkovými bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* produkujícími mRFP. Byly pozorovány reakce rostlin na přítomnost bakterií demonstrovány typickými deformacemi kořenových vlásků. Bylo zjištěno, že vyšší množství reakcí na přítomnost bakterií probíhalo ve vrchní části kořene, která byla během kultivace ve styku se vzduchem. Při kontinuální kokultivaci byl očekáván výskyt dalších fází interakcí, jako je stočení kořenových vlásků a tvorba infekčního vlákna. Tyto fáze v tomto preparátu ovšem nebyly pozorovány. Důvodem může být stále sub-optimální prostředí poskytnuté rostlinám, u takto mladých rostlin je navíc indukce interakcí vedoucí k procesu tvorby hlízek obtížná.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla charakterizována rostlina *Medicago sativa* a byly nastíněny oblasti jejího využití. Byl zdůrazněn její význam v zemědělství, kde se využívá v osevním postupu díky její schopnosti vstoupit do hlízkové symbiózy s rhizobakteriemi. Tyto bakterie poskytují rostlině dusík, který fixují ze vzduchu. Akumulovaný dusík využívají pro metabolické procesy a také jím obohacují i okolní půdu. Byl popsán kompletní proces vstupu rostliny a bakterií do této symbiózy od prvotních fází interakce až po tvorbu hlízek, ve kterých bakterie v rámci rostliny přebývají. Teoretická část také pojednává o rozvíjejících se metodách mikroskopie živých organismů a popisuje neinvazivní mikroskopické zobrazovací metody.

V experimentální části byly popsány metody kultivace rostlin *Medicago sativa* a metody kultivace bakteriálního druhu *Sinorhizobium meliloti*. Práce se zabývala optimalizací dvou typů mikroskopických preparátů pro pozorování interakcí rostlin *Medicago sativa* a bakterií *Sinorhizobium meliloti* produkující mRFP a jejich následným testováním. Preparáty byly vyhodnoceny z hlediska schopnosti rostliny optimálně se vyvíjet v rámci poskytnutých růstových podmínek a také z hlediska efektivity pozorování těchto interakcí.

Preparát připravený za využití pevného Fahraeus média byl vyhodnocen jako nevhodný pro pozorování interakcí mezi rostlinou a hlízkovými bakteriemi, prokázal však potenciál pro využití při jiných experimentech spojených se studiem biologických procesů *Medicago sativa*. Preparát připravený za využití tekutého Fahraeus média nám umožnil pozorování deformací kořenových vlásků v reakci na přítomnost hlízkových bakterií. Bylo pozorováno větší množství interakcí na vrchní části kořene, která byla ve styku se vzduchem. Preparát připravený za využití tekutého Fahraeus média se však také prokázal jako neefektivní pro pokročilé pozorování prvotních fází interakcí s bakteriemi rhizobia, jako jsou stočení kořenového vlásku a tvorba infekčního vlákna.

7 LITERATURA

- Barker, D., Pfaff, T., Moreau, D., Groves, E., Ruffel, S., Lepetit, M., Whitehand, S., Maillet, F., Nair, R., Journet, E.P. (2006): Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. In: Etienne-pascal Journet (Coordinateur), U. Mathesius (Coordinateur), *Medicago truncatula handbook*. The samuel Roberts Noble Fondation , Ardmore, USA.
- Berthet B., Maizel A. (2016): Light sheet microscopy and live imaging of plants. *Journal of Microscopy* **263**, 158-164.
- Bouton J.H. (1996): New uses for alfalfa and other 'old' forage legumes. Janick J. ed., *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, VA, 251-259.
- Bouton J.H. (2001): Alfalfa. In: *Proceedings XIX International Grassland Congress*. (Gomide J.A., Mattos W.R.S., d'Silva S.C. eds.), FEALQ, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil, 545–547.
- Cook D.R. (1999): *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 301-304.
- Cren M., Kondorosi A., Kondorosi E. (1995): NoIR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factors synthesis. *Molecular biology* **15**, 733-747.
- Dyachok J., Paez-Garcia A., Cheol-Min Y., Palanichelvam K., Blancaflor E.B. (2016): Fluorescence Imaging of the Cytoskeleton in Plant Roots. *Methods in Molecular Biology* **1365**, 139-153.
- FAO (2017): *World fertilizer trends and outlook to 2020: Summary report*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Řim, Itálie, 38.
- Fisher R.F., Long S.R. (1992): *Rhizobium* – plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
- Fournier J., Timmers A.C.J., Björn J.S., Jauneau A., Chabaud M., Barker D.G. (2008): Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hair of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *Plant Physiology* **148**, 1985-1995.
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C., Bisseling T. (1992): Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology* **19**, 89-107.
- Gage D.J. (2004): Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing *Rhizobia* during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280-300
- Gage D.J., Bobo T., Long S.J. (1996): Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and Alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Bacteriology* **178**, 7159-7166.
- Geurts R, Fedorova E, Bisseling T. (2005): Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 346–52.
- Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C. (2008): Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics* **42**, 413-441.
- Govers F, Nap J.P., van Kammen A., Bisseling T. (1987): Nodulins in the developing root nodule. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**, 309-322.
- Horváth B., Kondorosi E., John M., Schmidt J., Torok I., Gyorgypal Z., Barabas I., Wieneke U., Schell J., Kondorosi A. (1986): Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* **46**, 335-343.
- Huisken J., Stainier D.Y. (2009): Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* **136**, 1963-1975.
- Cheng a Walker (1998): Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **180**, 5183-5191.
- Ibáñez F., Wall L., Fabra A. (2016): Starting points of plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany* **68**, 1905-1918.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. (2007): How rhizobial symbiont invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature reviews* **5**, 619-633.

- Jordan D.C., Grinyer I., Coulter W.H. (1963): Electron microscopy of infection threads and bacteria in young root nodules of *Medicago sativa*. *Journal of Bacteriology* **86**, 125-137.
- Komis G., Novák D., Ovečka M., Šamajová O., Šamaj J. (2018): Advances in imaging plant cell dynamics. *Plant Physiology* **176**, 80-93.
- Kovalčíková Z. (2017): *Podíl mitogen-aktivovaných proteinkináz (MAPK) na signalizaci biotických interakcí u vojtěšky*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Larcher W. (1988): *Fyziologická ekologie rostlin*. 1st ed., Academia, Praha, 368.
- Long S.R. (1989): Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* **56**, 203-214.
- Long S.R. (1996): *Rhizobium Symbiosis: Nod Factors in Perspective*. *The Plant Cell* **8**, 1885-1898.
- Luštinec J., Žárský V. (2005): *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1st ed., Karolinum, Praha, 259.
- Maizel A., von Wangenheim D., Federici F., Haseloff J. a Stelzer E.H.K. (2011): High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *The Plant Journal* **68**, 377–385.
- O'Rourke J.A., Fu F., Bucciarelli B., Yang S.S., Samac D.A., *et al.* (2015): The *Medicago sativa* gene index 1.2: a web-accessible gene expression atlas for investigating expression differences between *Medicago sativa* subspecies. *BMC Genomics* **16**, 502.
- Oldroyd G.E.D., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. (2011): The rules of engagement in the legume rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45**, 119–144.
- Ovečka M., von Wangenheim D., Tomančák P., Šamajová O., Komis G., and Šamaj J. (2018): Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nature Plants* **4**, 639-650.
- Pawley J. (2006): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3rd ed., Springer Science+Business Media, New York, 985.
- Perret X., Staehelin Ch., Broughton W.J. (2000): Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Reviews* **64**, 180-201.
- Reddy, G.V., Gordon, S.P. & Meyerowitz, E.M. (2007): Unravelling developmental dynamics: transient intervention and live imaging in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 491–501.
- Sappl, P.G., Heisler, M.G. (2013): Live-imaging of plant development: latest approaches. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 33–40.
- Schepers J.S., Raun W.R. (2008): *Nitrogen in Agricultural Systems*. 1st ed., American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI, 935.
- Spohn M., Golte-Bechtle M. (2005): *Co tu kvete? Květena Střední Evropy*. 1st ed., Knižní klub, Praha, 400.
- Spohn M., Spohn R. (2007): *Plané rostliny*. 1st ed., Knižní klub, Praha, 320.
- Spohn M., Spohn R., Golte-Bechtle M. (2015): *Co tu kvete? Originální průvodce přírodou*. 1st ed., Knižní klub, Praha, 496.
- Šarapatka B. (2010): *Agroekologie: východiska pro udržitelné zemědělské hospodaření*. 1st ed., Bioinstitut, o. p. s., Olomouc, 440.
- Taiz L., Zeiger E., Moller I.M., Murphy A. (2015): *Plant Physiology and Development*. 1st ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 261.
- Timmers A.C.J., Auriac M.C., Truchet G. (1999): Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617–3628.
- van Brussel A.A.N., Bakhuizen R., van Spronsen P.C., Spaink H.P., Tak T., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1992): Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of Rhizobium. *Science* **257**, 70-72.
- Vasse J., De Billy E., Camut S., Truchet G. (1990): Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**, 4295-4306.
- von Wangenheim D., Daum G., Lohmann J.U., Stelzer E.K., Maizel A. (2014): Live imaging of Arabidopsis development. *Methods Mol. Biol.* **1062**, 539-550.

- Vyplelová P., Ovečka M., Šamaj J. (2017): Alfalfa root growth rate correlates with progression of microtubules during mitosis and cytokinesis as revealed by environmental light-sheet microscopy. *Frontiers in Plant Science* **8**:1870.
- Witty J.F., Minchin F.R., Shot L., Sheehy J.E. (1986): Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Plant Cell Biology* **3**, 275-315.

8 SEZNAM ZKRATEK

μm	mikrometr
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
B5H médium	indukce kalusu
B5O médium	indukce somatické embryogeneze
BNM médium	Bourgin and Nitsch médium
cm	centimetr
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
GFP-ABD2	„aktin vazebná doména 2“ se zeleným fluorescenčním proteinem
h	hodiny
kon	kontrola
LysM receptor	receptor Lysin Motif domény
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
mg	miligram
ml	mililitr
MMS médium	médium pro indukci vývoje kořenů
mRFP	monomerní červený fluorescenční protein
MS médium	Murashige and Skoog médium
NF/Nod faktor	nodulační faktor
Nod gen	nodulační gen
NodABC	nodulační gen ABC
NodD	nodulační faktor D
nodH	nodulační gen H
nodPG	nodulační gen PG
NoIR	nodulační gen IR
Obr.	obrázek
OD₆₀₀	optická hustota
pH	vodíkový exponent
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SE	somatická embryogeneze
Tab.	tabulka
tetR	tetracyklin rezistentní
TY médium	Tryptone and yeast extract médium