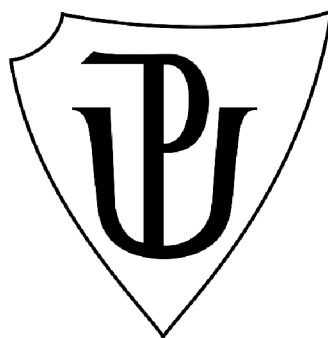


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Mikroskopická analýza tubulinového cytoskeletu
v adventivních kořenech vojtěšky seté (*Medicago sativa*
L.) a příprava nových markerů tubulinu s eGFP
pod různými promotory**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Barbora Hájková**
Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc.**
Konzultantka: **Mgr. Michaela Tichá, Ph.D.**
Rok: 2024

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

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Velké poděkování patří všem zaměstnancům Katedry biotechnologií za jejich ochotu vždy pomoci při práci v laboratoři. Děkuji také vedoucímu práce prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. za jeho důležité opravy této práce a cenné odborné rady, které mi během zpracovávání práce poskytl a také konzultantce práce Mgr. Michaele Tiché, Ph.D. za její čas a pomoc. Tato práce byla podpořena projektem IGA_PrF_2023_015, „Vliv hladiny stresem-indukované mitogen-aktivované protein kinasy na odolnost vojtěšky seté proti oxidativnímu stresu“.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Hájková
Název práce	Mikroskopická analýza tubulinového cytoskeletu v adventivních kořenech vojtěšky seté (<i>Medicago sativa</i> L.) a příprava nových markerů tubulinu s eGFP pod různými promotory
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc.
Konzultantka	Mgr. Michaela Tichá, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Medicago sativa je významná zemědělská plodina, která dokáže symbioticky interagovat s půdními bakteriemi *Rhizobium*. Tyto interakce jsou velmi důležité především díky potenciálu *M. sativa* obohacovat půdu o dusík, který ze symbiózy získává. Celého procesu symbiotické interakce se účastní rostlinný cytoskelet, který podléhá neustálé reorganizaci během jednotlivých fází interakce. Pro studium dynamiky cytoskeletu jsou využívány geneticky-kodované fluorescenční markery, které umožňují jeho vizualizaci *in vivo*. Tyto markery je možné připravit metodami molekulární biologie a transformovat do rostlin, ve kterých je po regeneraci možné cytoskelet vizualizovat. *M. sativa* bývá často regenerována a propagována somatickou embryogenezí, která je velmi časově náročná. Z tohoto důvodu byla pro vegetativní propagaci *M. sativa* v diplomové práci optimalizovaná a ověřená poměrně rychlá a snadná metoda rozmnožování rostlin indukci tvorby adventivních kořenů na stonkových odřezcích. V adventivních kořenech rostlin exprimujících molekulární fluorescenční marker pro mikrotubuly byla provedena mikroskopická analýza organizace mikrotubulů. Také byla potvrzena symbiotická interakce adventivních kořenů s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. Dalším cílem práce byla příprava nových tubulinových markerů s genem *eGFP* pod kontrolou třech konstitutivních promotorů *p35S*, *pEF1 α* a *pUBQ10* pro optimalizaci exprese markerů v transformovaných rostlinných buňkách a zvýšení jejich exprese v symbiotických hlízkách. Nové markery byly ověřeny pomocí tranzientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*. Následnou statistickou analýzou byla zjištěna mnohem vyšší intenzita fluorescence nových markerů oproti dříve připraveným markerům s genem *GFP*.

Klíčová slova	Adventivní kořeny, fluorescenční markery, cytoskelet, <i>Medicago sativa</i> , mikrotubuly, symbióza, <i>Sinorhizobium meliloti</i>
Počet stran	97
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Barbora Hájková
Title	Microscopic analysis of tubulin cytoskeleton in Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) adventitious roots and preparation of new tubulin markers with eGFP under different promotores
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc.
Consultant	Mgr. Michaela Tichá, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Medicago sativa is an important agricultural crop that can symbiotically interact with soil bacteria called rhizobia. This interaction is very useful mainly due to the potential of *M. sativa* to enrich soil with nitrogen obtained from the symbiosis. The entire process of symbiotic interaction involves plant cytoskeleton, which undergoes constant reorganization during different phases of the interaction. To study cytoskeletal dynamics, genetically encoded fluorescent markers enabling its visualization *in vivo* are frequently used. Such markers can be prepared using molecular biology methods and subsequently transformed into plants, where the cytoskeleton can be visualized. *M. sativa* is often regenerated and propagated via somatic embryogenesis, which is very time-consuming and laborious. For this reason, a relatively quick and easy method for vegetative propagation of *M. sativa* plants by inducing the formation of adventitious roots on stem cuttings was optimized and tested in the thesis. Next, microscopic analysis of microtubule organization and dynamics was performed in adventitious roots of plants expressing molecular fluorescent marker for microtubules. Additionally, a symbiotic interaction of adventitious roots with *Sinorhizobium meliloti* was observed. Another aim of the thesis was to prepare new tubulin markers containing *eGFP* gene under the control of three constitutive promoters *p35S*, *pEF1 α* and *pUBQ10* to optimize expression of these markers in transformed alfalfa cells and tissues and also to enhance expression in symbiotic nodules. New markers were verified using transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. Subsequent statistical analysis revealed a much higher fluorescence intensity of the new markers compared to previously-prepared markers with the *GFP* gene.

Keywords	Adventitious roots, cytoskeleton, fluorescent markers, <i>Medicago sativa</i> , microtubules, <i>Sinorhizobium meliloti</i> , symbiosis
Number of pages	97
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Indukce tvorby adventivních kořenů.....	3
2.2	Techniky pletivových kultur a transformační techniky rostlin.....	4
2.2.1	Techniky pletivových kultur vojtěšky pro biotechnologické aplikace.....	4
2.2.2	Transformační techniky vojtěšky.....	5
2.2.2.1	Transformace rostlin pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.2.2.2	Transformace protoplastů elektroporací.....	8
2.2.2.3	Transformace buněk bombardováním částic.....	9
2.2.2.4	Transformace <i>in planta</i>	10
2.3	Promotory genů.....	10
2.3.1	Základní charakteristika promotorů genů eukaryotických organismů.....	10
2.3.2	Promotory genů využívané pro přípravu transgenních rostlin.....	11
2.3.2.1	Konstitutivní promotory.....	12
2.3.2.2	Inducibilní promotory.....	12
2.3.2.3	Pletivově specifické promotory.....	12
2.3.3	Promotory využívané pro studium symbiotických interakcí mezi rostlinami a mikroby.....	13
2.4	Rostlinný cytoskelet.....	14
2.4.1	Charakterizace mikrotubulů.....	14
2.4.2	Charakterizace aktinových filament.....	16
2.5	Organizace cytoskeletu během symbiotické interakce.....	17
2.5.1	Reorganizace cytoskeletu v brzkých fázích symbiotické interakce.....	18
2.5.1.1	Reorganizace mikrotubulů.....	18
2.5.1.2	Reorganizace aktinových filament.....	18
2.5.2	Role cytoskeletu při tvorbě hlízek.....	19
2.5.2.1	Cytoskelet v determinovaných hlízkách.....	21
2.5.2.2	Cytoskelet v nedeterminovaných hlízkách.....	21
2.6	Metody kvantitativní analýzy mikrotubulů.....	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál.....	27
3.1.1	Chemikálie.....	27
3.1.2	Roztoky a média.....	27
3.1.3	Restrikční endonukleázy.....	33
3.1.4	Primery.....	33
3.1.5	Přístrojové vybavení.....	34
3.1.6	Software.....	35
3.1.7	Kity.....	35
3.1.8	Biologický materiál.....	35
3.2	Metody.....	38
3.2.1	Příprava kultivačních médií.....	38
3.2.2	Rozmnožování rostlin <i>M. sativa</i> metodou zakořenění stonkových odřezků.....	38
3.2.3	Inokulace adventivních kořenů bakteriemi <i>S. meliloti</i>	39
3.2.4	„Golden Gate“ klonování.....	40
3.2.4.1	Amplifikace genu <i>eGFP</i>	40
3.2.4.2	Plán klonování transkripčních jednotek úrovně 1.....	41
3.2.4.3	Plán klonování konstruktů úrovně 2.....	41

3.2.4.4	Příprava konstruktů úrovně 0, 1 a 2.....	42
3.2.5	Transformace chemokompetentních bakterií <i>E. coli</i>	43
3.2.6	Kultivace bakterií <i>E. coli</i> a selekce kolonií nesoucích požadovaný konstrukt.....	43
3.2.7	Izolace plazmidové DNA z bakterií <i>E. coli</i>	44
3.2.7.1	Izolace pomocí roztoků P1, P2, P3.....	44
3.2.7.2	Izolace pomocí „QIAprep Spin Miniprep“ kitu	44
3.2.8	Restrikční štěpení a agarózová elektroforéza.....	45
3.2.9	Transformace chemokompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i>	46
3.2.10	Ověření úspěšnosti transformace pomocí „Colony PCR“	46
3.2.11	Tranzientní transformace listů <i>N. benthamiana</i>	47
3.2.12	Pozorování a kvantitativní analýza intenzity fluorescence v mikroskopu	48
3.2.13	Sterilizace listů <i>M. sativa</i>	48
3.2.14	Somatická embryogeneze <i>M. sativa</i>	48
3.2.15	Transformace listových explantátů <i>M. sativa</i>	49
3.2.16	Příprava preparátů pro mikroskopii	49
3.2.17	Podmínky snímání	50
4	VÝSLEDKY	51
4.1	Mikroskopická analýza adventivních kořenů <i>M. sativa</i>	51
4.1.1	Potvrzení fluorescence u adventivních kořenů <i>M. sativa</i> s markery pro mikrotubuly	51
4.1.2	Mikroskopická analýza orientace mikrotubulů v adventivních kořenech	53
4.1.3	Dynamika kortikálních mikrotubulů v adventivních kořenech linie GFP-MBD	58
4.1.4	Mikroskopické pozorování adventivních kořenů při symbiotické interakci se <i>S. meliloti</i>	59
4.1.5	Mikroskopie symbiotických kořenových hlízek při spontánní symbióze v půdě.....	62
4.2	Příprava fluorescenčních markerů tubulinu alfa.....	65
4.2.1	PCR amplifikace genu <i>eGFP</i> a klonování do úrovně 0.....	65
4.2.2	Ověření transkripčních jednotek úrovně 1	66
4.2.3	Ověření multigenových konstruktů úrovně 2 restrikčním štěpením	68
4.2.4	Ověření úspěšnosti transformace konstruktů úrovně 2 do <i>A. tumefaciens</i> pomocí „Colony PCR“.....	70
4.2.5	Ověření exprese konstruktů tranzientní transformací listů <i>N. benthamiana</i> a porovnání intenzity fluorescence	71
4.2.6	Transformace <i>M. sativa</i> a regenerace transgenních rostlin.....	75
5	DISKUSE	76
6	ZÁVĚR	80
7	LITERATURA	82
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	96

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Vypracování literární rešerše na témata:

1. Indukce tvorby adventivních kořenů.
2. Transgenoze rostlin se zaměřením na *Medicago sativa*.
3. Všeobecný popis promotorů genů. Promotory využívané pro přípravu transgenních rostlin.
4. Promotory při studiu symbiotických interakcí luštěnin se symbiotickými bakteriemi.
5. Organizace cytoskeletu během symbiotických interakcí *M. sativa* s bakteriemi rodu *Sinorhizobium*.
6. Metody kvantitativní analýzy mikrotubulů.

Experimentální část:

1. Ověření metody zakořenění stonkových odřezků *M. sativa* pro indukci tvorby adventivních kořenů.
2. Mikroskopická analýza adventivních kořenů transgenních linií *M. sativa* s tubulinovými markery a studium organizace mikrotubulů.
3. Mikroskopie adventivních kořenů *M. sativa* během symbiotické interakce se *Sinorhizobium meliloti*.
4. Příprava fluorescenčních markerů pro tubulin alfa s eGFP pod kontrolou 3 různých typů konstitutivních promotorů.
5. Tranzientní transformace rostlin *Nicotiana benthamiana* pro ověření nových fluorescenčních markerů pro tubulin alfa s eGFP pod kontrolou 3 různých typů konstitutivních promotorů.

1 ÚVOD

Adventivní kořeny rostlinám poskytují značné výhody. Mohou se vyvíjet v průběhu běžného růstu nebo pomáhají při vystavení stresu. Proces jejich tvorby je závislý na změnách ve fytohormonech (Druege et al., 2016). V zahradnictví a rostlinné produkci je schopnosti rostlin tvořit adventivní kořeny využíváno pro jejich vegetativní propagaci. Jedná se především o zakořeňování stonkových odřezků, čímž se dají poměrně rychle a snadno množit různé druhy rostlin. Tato metoda by mohla usnadnit proces propagace významné plodiny *M. sativa* pro výzkumné účely, protože pro svou reprodukci vyžaduje opylování hmyzem. V laboratorních podmínkách bývá *M. sativa* nejčastěji množena a regenerována pomocí časově náročné a pracné metody somatické embryogeneze (Tichá et al., 2020; Abarca, 2021).

M. sativa symbioticky interaguje s bakteriemi rodu *Rhizobium* či *Sinorhizobium*. Během symbiotické interakce dochází k internalizaci bakterií přes kořenové vlásky do kortikálních buněk kořene, ze kterých se vytváří symbiotické hlízky. V těchto specializovaných orgánech bakterie fixují vzdušný dusík a přeměňují jej na využitelnou formu dusíku pro rostlinu. *M. sativa* díky této interakci může obohacovat půdu o dusík, což zlepšuje kvalitu půdy dalším pěstovaným plodinám (Jhu & Oldroyd, 2023). Pro celý proces symbiotické interakce je nezbytná reorganizace rostlinného cytoskeletu. Ten se skládá z aktinových filament a mikrotubulů, s nimiž interagují asociované proteiny (Timmers, 2008). Studium cytoskeletu během symbiotických interakcí může být uskutečněno na fixovaných nebo živých preparátech, které navíc umožňují studium dynamiky cytoskeletu. Pro vizualizaci cytoskeletu v živých buňkách jsou využívány především cytoskeletální molekulární markery, jimiž jsou fúzní proteiny. Ty bývají sestaveny z domény proteinu vážící se na cytoskelet či přímo z cytoskeletálního proteinu (tubulin nebo aktin), který je fúzován s fluorescenčním proteinem, jež zprostředkuje vizualizaci cytoskeletu ve fluorescenčním mikroskopu (Yoon et al., 2002). Tyto markery, vytvořené pomocí genového inženýrství, mohou být exprimovány pod různými typy promotorů. Nejčastěji jsou využívány promotory konstitutivní kvůli jejich neustálé aktivitě, což umožňuje vizualizaci cytoskeletu v celé rostlině při všech fázích jejího vývoje (Park et al., 2010).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo ověření metody zakořeňování stonkových odřezků pro snadné a rychlé rozmnožení transgenických rostlin *M. sativa* exprimujících markery cytoskeletu. Vytvořené adventivní kořeny u rostlin s fluorescenčním markerem

pro mikrotubuly „GREEN FLUORESCENT PROTEIN-MICROTUBULE-BINDING DOMAIN“ (GFP-MBD) byly použity pro mikroskopickou analýzu, kde bylo provedeno studium organizace a dynamiky mikrotubulů. Tento molekulární marker se skládá z domény vážící se na mikrotubuly pocházející ze savčího proteinu „MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 4“ (MAP4), která je fúzovaná se zeleným fluorescenčním proteinem (Marc et al., 1998). Adventivní kořeny byly také inokulovány symbiotickými bakteriemi *S. meliloti* pro ověření, zda tyto kořeny dokáží s bakteriemi interagovat stejně, jako kořeny primární.

Dalším cílem práce byla příprava nových markerů pro tubulinový cytoskelet s genem kódující „enhanced GREEN FLUORESCENT PROTEIN“ (eGFP) namísto dříve použitého genu kódující starší verzi GFP pro žádané zvýšení intenzity fluorescence markerů. Markery byly připraveny se třemi konstitutivními promotory, a s to promotorem *35S* (*p35S*), promotorem genu „*ELONGATION FACTOR 1 α* “ (*pEF1 α*) a promotorem genu „*UBIQUITIN 10*“, (*pUBQ10*). Exprese markerů byla ověřena tranziентní transformací listů *Nicotiana benthamiana*. Intenzita fluorescence markerů byla následně porovnána a statisticky vyhodnocena. Markery vykazující očekávanou lokalizaci a nejvyšší intenzitu fluorescence byly stabilně transformovány do *M. sativa*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Indukce tvorby adventivních kořenů

Pojem adventivní kořeny zahrnuje všechny kořeny rostliny, které vznikají z nekořenových pletiv. K jejich tvorbě dochází během běžného vývoje rostliny i ve stresových podmínkách, nejčastěji při poranění, zaplavení či nedostatku nutrientů. Indukce tvorby adventivních kořenů ze stonkových odřezků je často využívána pro vegetativní rozmnožování rostlin. (Steffens & Rasmussen, 2016; Druege, 2020).

Vývoj adventivních kořenů začíná přibližně 24h dlouhou indukční fází. V prvních hodinách dochází k přechodným změnám v koncentracích různých hormonů. U stonkových či hypokotylových odřezků dochází v reakci na poranění k rychlému přechodnému zvýšení množství jasmonové kyseliny a ethylenu (Druege et al., 2016). Také dochází ke zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, ROS), které jsou důležitými signálními molekulami (Quan et al., 2008). U některých druhů rostlin byla popsána rychlá indukce tvorby kalusu (Iwase et al., 2011). Jako odpověď na signalizaci pomocí jasmonové kyseliny a ethylenu dochází ke změně v transkripci genů pro biosyntézu auxinu, což vede k lokálnímu zvýšení jeho koncentrace. (Druege et al., 2014). Jelikož u odřezků dojde k přerušení polárního transportu auxinu do kořene, hromadí se auxin z výhonku u základny odřezku (Druege, 2020; Jing et al., 2020). Hladina cytokininů je naopak postupně snížena, čímž dochází k iniciaci růstu adventivních kořenů. Tyto procesy spolu s metabolickými změnami jsou výsledkem ztráty vody a minerálů běžně dodávaných kořeny a slouží k podpoře zahájení dělení buněk pro tvorbu adventivních kořenů a zároveň zajišťují uzavření rány. (Ahkami et al., 2009; Abarca, 2021).

Zdrojem adventivních kořenů jsou buňky lokalizované vedle cévních svazků či přímo v nich. Dle typu explantátu se může jednat o buňky podobné pericyklu, (pro)kambium či vodivé parenchymatické buňky, které mají schopnost obnovit proliferaci kapacitu v reakci na specifické podněty (Jing et al., 2020). Buňky, jež jsou zdrojem budoucího adventivního kořene podstoupí proces reprogramování, který je kontrolován faktory závislými na auxinu. První dělení buněk je typicky antiklinální, jež formuje zakládající buňky meristému (Abarca, 2021). Orientace roviny buněčného dělení následně závisí na předchozí polarizaci buňky řízené cytoskeletem (Díaz-Sala, 2019; Druege et al., 2019).

Meristém je následně formován v iniciační fázi vývoje adventivního kořene. Kompetentní buňky reagují na zvýšenou koncentraci auxinu produkovaného endogenně

či aplikovaného exogenně. Buněčným dělením vzniknou meristemické centra zvané meristemoidy či kořenové iniciály (Roberts & Schum, 2003; Abarca, 2021).

V další fázi vývoje adventivních kořenů vznikají kořenová primordia a potřeba auxinu se snižuje. Nakonec adventivní kořeny prorůstají kortexem a epidermis a stanou se z nich funkční kořeny, jež mohou nahradit kořen primární (Roberts & Schum, 2003).

Proces tvorby adventivních kořenů může trvat pár dní až několik týdnů v závislosti na typu explantátu, fyziologickém a vývojovém stádiu donorové rostliny a okolních podmínkách. Při formování pletiv kořene se signální dráhy mění a dochází ku příkladu k obnovení produkce většího množství cytokininů (Xu, 2018; Druege 2020; Abarca, 2021).

2.2 Techniky pletivových kultur a transformační techniky rostlin

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.), známá také jako vojtěška nebo nářečně lucerka, je jednou z nejvíce pěstovaných plodin s velkým významem v udržitelném zemědělství především díky její nutriční hodnotě. Jedná se o víceletou dvouděložnou rostlinu, která se řadí do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Jelikož má vojtěška tetraploidní genom a zároveň je cizosprašná, není její výzkum snadný. Jako modelová rostlina proto bývá využívána především příbuzná luštěnina *Medicago truncatula* s diploidním genomem, která však v zemědělství nemá tak velký význam. Zavedení prospěšných genů do rostlin vojtěšky vyžaduje biotechnologické metody, včetně genetické transformace a techniky pletivových kultur (Tichá et al., 2020).

2.2.1 Techniky pletivových kultur vojtěšky pro biotechnologické aplikace

Jednou z velmi úspěšných metod pro propagaci a regeneraci rostlin je somatická embryogeneze. Tato metoda však není vhodná pro všechny druhy rostlin a její účinnost se může lišit mezi kultivary (Bingham et al., 1975; Atanassov & Brown, 1984; Vasil, 1988). Pro vojtěšku byla první úspěšná somatická embryogeneze popsána v publikaci Saunders & Bingham (1972). Díky totipotenci rostlinných buněk je možné indukovat tvorbu somatických embryí z různých částí rostliny. Často se jako explantáty využívají části listů, jejichž povrch je sterilizován (Tichá et al., 2020). Vzniklá somatická embrya jsou podobná zygotickým, avšak postrádají suspensor a některá vývojová stádia, která jsou charakteristická pro embrya zygotická (Fras et al., 2008).

Nepřímá somatická embryogeneze probíhá přes indukci kalusu, ve kterém se buňky dediferencují a neorganizovaně dělí. Tvorba kalusu bývá indukována aplikací exogenních

rostlinných hormonů, nejčastěji se jedná o kombinaci auxinu, například 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina) a cytokininu, ku příkladu kinetin. Kombinace těchto hormonů zvyšuje proliferaci (hojné množení) buněk kalusu (Novak & Konečná, 1982; Kępczyńska & Kępczyński, 2023). Tvorba somatických embryí z kalusu je následně indukována na kultivačním médiu bez přídavku hormonů. Každé primární somatické embryo vzniká z jedné buňky explantátu. Mohou však vznikat také embrya sekundární, která vznikají z již vytvořených embryí (Raemakers et al., 1995). U plně vyvinutých somatických embryí je nejdříve indukován růst kořene a následně se vyvíjí stonk s listy na médiu s obsahem vitaminů a aminokyselin. Celá rostlina je regenerována v *in vitro* podmínkách a po dosažení určité velikosti může být přesunuta do *in vivo* podmínek. Dospělé rostliny jsou plně schopny vytvářet květy, produkovat semena a další generace rostlin (Tichá et al., 2020).

Regenerace rostlin pomocí přímé somatické embryogeneze se liší od nepřímé vynecháním stádia kalusu, tudíž je méně časově náročná. U vojtěšky se tak může celý proces somatické embryogeneze zkrátit až o 40 dní (Denchev et al., 1991). Tvorba embryoidů (shluků buněk, ze kterých vznikají somatická embrya) může být také iniciována z mezofylových protoplastů vojtěšky, ideálně izolovaných z mladých listů kvůli rychlejšímu dělení buněk (Kao & Michayluk, 1980).

Největší problém spojovaný s efektivitou somatické embryogeneze u řady druhů z rodu *Medicago* je nedostatek plně vyvinutých somatických embryí a jejich schopnost produkovat vitální rostliny. Pomalejší regenerace a růst rostlin, které pochází ze somatických embryí, jsou způsobeny nižším množstvím zásobních proteinů a aminokyselin v těchto embryích (Lai & McKersie, 1994; Tichá et al., 2020). Nepřítomnost endospermu musí být vhodně kompenzována složením kultivačních médií, což hraje klíčovou roli při úspěšnosti somatické embryogeneze (Amini et al., 2016). Významnou roli v tomto procesu má také světlo, přičemž je potřebné celé spektrum pro správný vývoj somatických embryí (Anandarajah & McKersie, 1992).

2.2.2 Transformační techniky vojtěšky

Genetická transformace je proces přenosu cizorodé DNA do hostitelské buňky, jež může být zprostředkován biologickými či fyzikálními metodami. Pomocí regenerace je následně vytvořen transgenní organismus, který má nové vlastnosti. Celý proces transformace se tudíž skládá ze dvou hlavních kroků: doručení biomolekul do buněk a následná regenerace transgenních rostlin (Xu et al., 2022). U rostlin, konkrétně

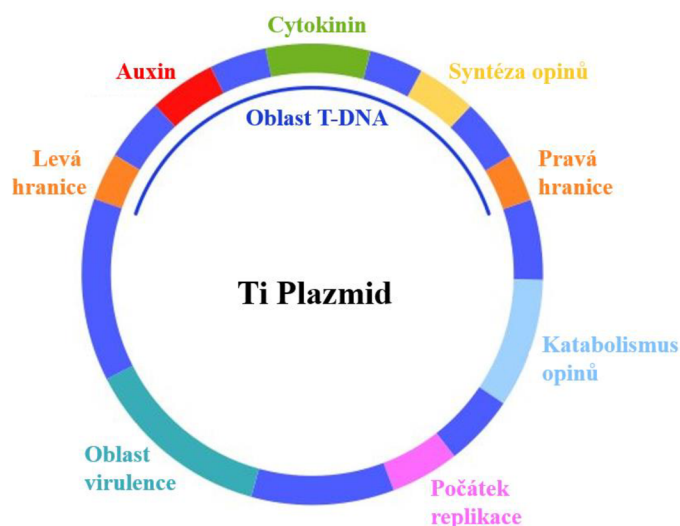
zemědělských plodin může být genetická transformace využita především pro zlepšení odolnosti vůči abiotickému a biotickému stresu nebo zvýšení úrody. Metody využívané pro doručení požadovaného transgenu či jiné molekuly do buněk se rozdělují na přímé a nepřímé. U metod přímých je transgen přímo vnesen do buňky pomocí mikroinjekce, elektroporace či biolistiky. U metod nepřímých je transgen do buňky doručen pomocí vektoru, například bývá využíván Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens* nebo Ri plazmid *A. rhizogenes*. Ačkoliv již bylo vyvinuto mnoho transformačních metod, neexistuje jedna univerzální metoda pro všechny druhy rostlin a účinná transformace a regenerace některých druhů rostlin zůstává stále velkou výzvou (Ramkumar et al., 2020; Su et al., 2023).

Pro transformaci vojtěšky je nejčastěji využívána nepřímá transformační metoda s využitím *A. tumefaciens* (Samac & Austin-Phillips, 2006; Weeks et al., 2008). Pro úspěšnou transformaci je nutné zvolit vhodný genotyp, který má dobré regenerační vlastnosti jako je Regen SY nebo Regen S (Kirti, 2008). Tyto genotypy ale nemají velké široké využití v zemědělství kvůli slabšímu výnosu (Weeks et al., 2008). Vojtěška byla již také úspěšně transformována s využitím elektroporace (Harrison et al., 1991) nebo biolistické metody (Huang & Zhang, 1999).

2.2.2.1 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens je půdní bakterie, která přirozeně napadá kořenový systém dvouděložných rostlin a způsobuje tvorbu tumorů (Smith & Townsend, 1907). Do genomu hostitelských rostlin dokáže vložit část svého tumor-indukujícího (Ti) plazmidu nazývanou T-DNA oblast, zobrazenou na **Obrázku (Obr.) 1**. Tato část plazmidu obsahuje onkogeny kódující enzymy pro syntézu cytokininů a auxinů, které způsobují rychlé dělení buněk, což vede k tvorbě tumorů. Také se zde nachází geny kódující opinovou syntázu, klíčového enzymu pro biosyntézu nízkomolekulárních látek opinů. Vytvořené opiny jsou následně v *Agrobacterium* katabolizovány a slouží bakterii jako zdroj uhlíku a dusíku (Matveeva & Otten, 2021). T-DNA je ohraničena 25 bp dlouhými repetitivními sekvencemi zvanými pravá hranice („right border“, RB) a levá hranice („left border“, LB) (Zupan & Zambryski, 1995; Gelvin, 2003; Christie & Gordon, 2014).

Na Ti plazmidu se mimo T-DNA také nachází geny virulence (*Vir*), které nejsou přenášeny do genomu hostitelské rostliny, ale kódují enzymy zodpovědné za přenos T-DNA do rostlinných buněk (**Obr. 1**) (Stachel et al., 1985, 1986; Sheng & Citovsky, 1996).



Obrázek 1. Schéma rozložení genů pro biosyntézu hormonů a opinů na Ti plazmidu *A. tumefaciens*.

V genovém inženýrství se mezi hraniční sekvence v Ti plasmidu vkládá gen zájmu. Původní T-DNA oblast je pro toto použití upravena tak, aby neobsahovala geny pro syntézu auxinů a cytokininů, tudíž aby při použití plazmidu nedocházelo k tvorbě nádorů. Takto upravený vektor se nazývá odzbrojený (Zambryski et al., 1983; Wood et al., 2001). Jeho využití je však omezené kvůli jeho nadměrné velikosti a nemožnosti se replikovat v *Escherichia coli*, proto z něj byly vyvinuty kointegrační klonovací vektory a binární vektory (Lee & Gelvin, 2008). Kointegrační vektory fungují na bázi rekombinace homologních úseků klonovacího vektoru namnoženého v *E. coli* obsahující gen zájmu, počátek replikace a selekční markery spolu s odzbrojeným Ti plazmidem v *Agrobacteriu*. Díky homologním úsekům je klonovací vektor začleněn do Ti plasmidu za vzniku kointegračního plazmidu (Fraley et al., 1985; Lee & Gelvin, 2008). Binární vektorový systém vznikl vytvořením dvou menších vektorů z Ti plasmidu, přičemž pomocný plazmid obsahuje geny virulence a binární vektor obsahuje T-DNA úsek, kam je možné vložit geny určené k přenosu (Hoekema et al., 1983). Součástí binárního vektoru jsou dále mnohonásobná klonovací oblast („multiple cloning site“, MCS), počátek replikace pro *E. coli* a *A. tumefaciens*, rostlinný a bakteriální selekční marker, reporterové geny a komponenty pro regulaci genové exprese v rostlinách. Binární vektory poskytují mnoho výhod oproti vektorům kointegračním, proto jsou v současnosti hojněji využívány. Jejich aplikace jsou rozmanité, využívají se pro tranzientní a permanentní expresi genů (Spiegel et al., 2022; Azizi-Dargahlou et al., 2023), mRNA umlčení

(„silencing“) cílových genů pomocí RNA interference (Yan et al., 2012) a editaci rostlinného genomu pomocí metody CRISPR/Cas9 (Xing et al., 2014). Pro vyšší efektivitu byly později vytvořeny superbinární vektory, jež obsahují další geny virulence a slouží pro zvýšení efektivitu transformace plodin odolných vůči *Agrobacterium*, jako jsou obilniny (Jin et al., 1987; Komari, 1990; Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996).

Metoda pro úspěšnou transformaci vojtěšky pomocí *A. tumefaciens* využívá somatickou embryogenezi. Ze somatických embryí lze získat až 80–100 % transformovaných rostlin obsahujících T-DNA z *A. tumefaciens*. Transformované rostliny zregenerují za 9–14 týdnů po kultivaci spolu (ko-kultivaci) s bakteriemi. Celý proces transformace pomocí *Agrobacteria* zahrnuje několik kroků, jako je příprava explantátů, příprava inokula, infekce explantátů, ko-kultivace, eliminace *Agrobacteria*, selekce transgenních rostlin a jejich analýza (Samac & Austin-Phillips, 2006; Azizi-Dargahlou & Pouresmaeil, 2023).

2.2.2.2 Transformace protoplastů elektroporací

Elektroporace je rychlá a jednoduchá metoda, která funguje na principu aplikace vysokého napětí do suspenze rostlinných buněk, což vede k depolarizaci membrány a následné tvorbě pórů. Ty umožňují transport nepropustných molekul například DNA, RNA či proteinů. Při použití optimální délky pulsu se membrána poté opět navrátí do původního stavu (Kotnik et al., 2019; Ozyigit, 2020).

Efektivita metody je závislá především na délce elektrického impulsu. Aby nedošlo k příliš rychlému obnovení integrity cytoplazmatické membrány, měl by impuls být delší než 100 μs (Turgut-Kara et al., 2010). Účinnost ovlivňuje také počet pulsů, síla napětí, složení pufru pro elektroporaci či koncentrace plazmidu použitého při transformaci (Kosturkova, 1993). Mezi výhody metody se řadí nízká cena a velký počet transformovaných buněk, přičemž většinou dojde k přenosu pouze jednoho plazmidu do buňky (Bates, 1999; Kar et al., 2018).

Metoda elektroporace byla v roce 1993 využita na úspěšnou transformaci protoplastů *M. sativa* a protoplastů odvozených z meristému *M. varia*. Při použití jednoho pulsu s délkou 1500 μs a intenzitě elektrického pole 750 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ bylo získáno 34 % úspěšně stabilně transformovaných regenerovaných rostlin, které i po selekci zůstaly vitální (Kosturkova, 1993).

2.2.2.3 Transformace buněk bombardováním částic

Transformace buněk bombardováním částic či biolistická metoda se využívá pro studium přechodné exprese genu, produkci transgenních rostlin i inokulaci rostlinných buněk virovými patogeny (Briddon et al., 1998; Taylor & Fauquet, 2002). Celý proces se uskutečňuje v zařízení zvaném genová pistole, jež obsahuje vysokotlakou a nízkotlakou komoru a uprostřed trhací disk. Při postupném zvyšování tlaku je trhací disk protržen jako následek přetlaku hélia, což vede k uvolnění vlny plynu. Ta pohání makronosič, na kterém se nachází kovové nosné částice o průměru do 1,5 μm tvořené platinou, zlatem nebo wolframem. Tyto mikročástice jsou pokryty DNA, jež je určena pro transformaci rostlinných buněk. Makronosič kvůli tlakové vlně narazí na stopovací síto a mikročástice jsou uvolněny směrem k cílovému pletivu, které je umístěno na Petriho misce ve vakuu. Mikročástice pronikají do buněk bez většího poškození a v cytoplazmě následně dochází k uvolnění transgenů (Sanford et al., 1993; Rivera et al., 2012).

S využitím této metody je možné transformovat listy, suspenze buněk, embrya, kalus, meristémy, a dokonce i pyl a mikrospory. Metoda se využívá hlavně u rostlin odolných k jiným metodám transformace, především u obilnin. Mimo rostliny je také možné transformovat bakterie, houby i živočišné buňky (Sanford et al., 1993; Rivera et al., 2012). U vojtěšky byla transformace bombardováním částic využita pro transformaci pylu, kdy byl samčí sterilní květ opylován připraveným transgenním pylem pro produkci fertilních semen. Úspěšnost byla 30 % po vyklíčení semen (Ramaiah & Skinner, 1997). Dále byl transformován kalus (Pereira & Erickson, 1995) a chloroplasty vojtěšky (Wei et al., 2011), efektivita transformace byla však ve všech případech malá.

Jelikož je využíváno velký početných nosných částic s DNA, tato metoda umožňuje současnou transformaci velkého množství buněk najednou (Sanford et al., 1987). S tím však přichází komplikace spojené s možným dodáním více kopií genů do jedné buňky, což může vést k umlčení genu nebo změně genové exprese (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Kohli et al., 2003; Rivera et al., 2012). V některých případech může nastat také poškození buněk (Demirer et al., 2019). Mezi další nevýhody metody patří vyšší cena a nemožnost přenosu DNA větší než 10 kb kvůli zvýšenému riziku zničení větších molekul během nastřelení (Anami et al., 2013; Keshavareddy et al., 2018).

2.2.2.4 Transformace *in planta*

Produkce transformovaných rostlin na bázi pletivových kultur je poměrně velká překážka pro úspěšnou transformaci mnoha odolných plodin. Při metodě transformace *in planta* pletivové kultury nejsou využívány, což naznačuje samotný pojem „*in planta*“, jež v překladu znamená „v rostlině“ (Ahmad Jan et al., 2016). Velmi často využívanou *in planta* metodou je technika namáčení nezralých květných pupenů „floral dip“, jež bývá často využívaná pro stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana* (Bent, 2006). Nezralé květné pupeny *A. thaliana* jsou máčeny do suspenze *A. tumefaciens* s cílem transformovat vyvíjející se gyneceum (Desfeux et al., 2000).

U *M. sativa* bývají nařezávány tři dny staré semenáčky v oblasti apikálního meristému stonku, které jsou následně inkubovány v suspenzi *A. tumefaciens* nesoucí gen určený pro transformaci za současného vortexování. Semenáčky se následně přenáší na ko-kultivační médium obsahující DMSO a poté na médium podporující jejich růst. Úspěšnost této metody je poměrně nízká, přibližně 7 % transformantů v T1 generaci (Weeks et al., 2008).

2.3 Promotory genů

Promotor je DNA sekvence, která kontroluje iniciaci transkripce a podílí se na regulaci exprese genů. Nachází se v blízkosti místa začátku transkripce genu a poskytuje vazebná místa pro RNA polymerázu a transkripční faktory (Porto et al., 2014). U eukaryotických organismů je známo několik typů RNA polymeráz. RNA polymeráza I slouží pro syntézu prekurzoru rRNA, RNA polymeráza II syntetizuje prekurzory pro mRNA, RNA polymeráza III tvoří prekurzory tRNA, 5S-rRNA a miRNA (Lodish et al., 2000). U rostlin se také nachází RNA polymeráza IV a V, jejichž produkty jsou zapojeny v umlčování genů (Haag & Pikaard, 2011).

2.3.1 Základní charakteristika promotorů genů eukaryotických organismů

Promotor je strukturně rozdělen na proximální a distální regiony, které obsahují *cis* elementy, na něž se váží proteiny známé jako *trans* faktory (Klug & Cummings, 2003; Peremarti et al., 2010; Porto et al., 2014). Proximální oblast se nachází blízko místa začátku transkripce („transcription start site“, TSS) a její rozsah je přibližně od -250 do +250 nukleotidů. Součástí této oblasti je jádrový promotor, který je lokalizován přibližně v rozsahu -50 až +50 nukleotidů od TSS a zprostředkovává iniciaci transkripce (Butler & Kadonaga, 2002; Haberle & Stark, 2018). V tomto regionu je přítomen

iniciátor, který pokrývá oblast TSS, přičemž od adeninu v jeho sekvenci (A_{+1}) jsou určovány polohy ostatních elementů. Elementy se mohou nacházet před TSS, což je označováno „-X“ či „upstream“, nebo za TSS, označované jako „+X“, či „downstream“ (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010; Biřas et al., 2016). Dalším elementem jádrového promotoru je TATA box, který se nachází přibližně 25–30 bp „upstream“ od TSS a jeho konsensuální sekvence o délce přibližně 8 bp sestává z A a T nukleotidů (Lewin, 2000). „Downstream“ promotorový element (DPE) je element vyskytující se především v promotorech bez TATA boxu s přesnou polohou 28–32 bp „downstream“ od TSS. Součástí proximální oblasti mohou být také například element rozpoznávaný transkripčním faktorem IIB, B rozpoznávací element (BRE), CAAT a GC box. Elementy jsou obvykle konzervované, avšak neexistují žádné univerzální, jež by byly přítomny u všech organismů (Griffiths et al., 2000; Butler & Kadonaga, 2002; Juven-Gershon & Kadonaga 2010; Porto et al., 2014; Biřas et al., 2016).

Míra transkripce určitého genu může být zvýšena či snížena v závislosti na ovlivnění promotoru elementy lokalizovanými ve větší vzdálenosti od jádrového promotoru. Obvykle se jedná o vzdálenost stovky až tisíce bp „upstream“ či „downstream“ od TSS a mohou se také nacházet v intronech (Peremarti et al., 2010). Tyto elementy se nazývají distální a nemusí mít fixovanou pozici ve vztahu k promotoru (Lodish et al., 2000; He et al., 2010; Bulger & Groudine, 2011). Do distálních elementů se řadí aktivátory („enhancery“) a represory („silencery“), přičemž aktivátory bývají více zastoupeny. Proteiny působící na tyto elementy jsou kombinovány tak, aby exprese probíhala pouze na požadovaných místech a ve specifickém časovém rámci (Riethoven, 2010; Kolovos et al., 2012).

2.3.2 Promotory genů využívané pro přípravu transgenních rostlin

Promotory genů využívané v rostlinné biotechnologii se mohou lišit svou efektivitou, místem a časovým obdobím působení. Konstitutivní promotory bývají aktivní během všech vývojových stádií ve všech pletivech rostliny. Pletivově-specifické promotory jsou aktivní pouze v určitých pletivech rostliny nebo určitých vývojových stádiích a promotory indukibilní vyžadují specifický stimul pro jejich aktivaci (Porto et al., 2014; Biřas et al., 2016).

2.3.2.1 Konstitutivní promotory

Geny pod kontrolou konstitutivních promotorů se aktivně přepisují během celého vývoje organismu (Park et al., 2010), proto bývají tyto promotory velmi často využívány v genovém inženýrství u rostlin pro expresi transgenů (Potenza et al., 2004). Konstitutivní promotory jsou vhodné především pro expresi selekčních markerových genů, například genů pro rezistenci na herbicidy. Jejich použití je však omezené poměrně nízkým počtem použitelných konstitutivních promotorů pro expresi transgenů v rostlinách. Často se jedná o promotory z jiných zdrojů než z rostlin, jako je promotor genu „*NOPALINE SYNTHASE*“ (*NOS*) z *A. tumefaciens* (Bevan et al., 1983) nebo *35S* promotor viru mozaiky květáku („Cauliflower Mosaic Virus“, CaMV) (Odell et al., 1985; Benfey & Chua, 1990). Jejich neustálá aktivita je zajištěna absencí represoru v rostlinách pro cizorodý typ promotoru. U některých rostlinných druhů je však jejich efektivita nižší (Christensen et al., 1992; Park et al., 2010), proto se alternativně využívají konstitutivní promotory přímo z rostlin. V tomto případě se jedná o promotory tzv. „housekeeping“ neboli esenciálních genů, které jsou neustále exprimovány v každé buňce a kódují proteiny pro její běžné fungování (Han et al., 2015). Příkladem mohou být konstitutivní promotory polyubikvitinových genů (Lu et al., 2008) a aktinu 2 z rýže (He et al., 2009), beta-karoten hydroxylasy z *A. thaliana* (Liang et al., 2009), či histonu H2B z kukuřice (Rasco-Gaunt et al., 2003). Nevýhoda použití konstitutivních promotorů spočívá většinou ve stálé expresi genu, což může interferovat s ostatními procesy v buňkách (Misra & Ganesan, 2021).

2.3.2.2 Inducibilní promotory

Promotory inducibilní poskytují výhodu v regulaci exprese genů. Obsahují sekvenci, která je identifikovaná stres-responzivními transkripčními faktory pro aktivaci genové exprese (Jaglo et al., 2001). Způsobují tedy přechodnou expresi genu založenou na určitém stimulu. Využívány bývají pro expresi genů, které zvyšují toleranci rostliny na stres při působení abiotického i biotického stresu (Rai et al., 2009; van Essen et al., 2010).

2.3.2.3 Pletivově specifické promotory

Některé typy virových, mikrobiálních či rostlinných promotorů jsou aktivní při expresi genů pouze v určitých orgánech či pletivech. Jelikož jsou však regulační systémy u jednotlivých druhů rostlin jedinečné, jsou žádanější pletivově specifické promotory ze

stejného či fylogeneticky příbuzného rostlinného druhu (Tyagi, 2001; Lim et al., 2012; Misra & Ganesan, 2021).

Mnoho stresových faktorů, kam se řadí sucho, osmotický stres, slanost půdy, akumulace těžkých kovů nebo nedostatek živin, je nejdříve vnímáno kořeny rostlin. Jelikož je zdravý kořenový systém klíčový pro správný růst a vývoj celé rostliny, je mnoho studií zaměřeno právě na nadexpresi genů v kořenech rostlin za použití kořenově specifických promotorů za účelem zlepšení růstu a odolnosti vůči stresovým podmínkám (Misra & Ganesan, 2021). Pro vývoj rostlin tolerantních na choroby bývají často využívány listově specifické promotory. Zvýšení produkce, nutriční kvality či fortifikace farmaceutických látek zajišťují promotory, které jsou aktivní v semenech rostlin. Ku příkladu promotor *β-conglycininu* ze sóji je využíván pro zvýšení obsahu aminokyselin obsahujících síru v sójových bobech (Kim et al., 2014).

2.3.3 Promotory využívané pro studium symbiotických interakcí mezi rostlinami a mikroby

Pro studium symbiotických interakcí mezi rostlinami a mikroby jsou hojně využívány fluorescenční markery, které umožňují vizualizaci molekul v živých buňkách. Jelikož při interakcích bobovitých rostlin s hlízkovými bakteriemi dochází k tvorbě nových specializovaných orgánů (hlízek), aktivita promotorů využívaných pro expresi markeru se v nich může lišit.

V publikaci Auriac a Timmers (2007) byla porovnána aktivita dvou konstitutivních promotorů, *p35S* a *pEF1α* při symbiotické interakci *M. truncatula* se *S. meliloti*. Aktivita promotora byla porovnána za použití reportérového genu β -glukuronidázy (GUS) a lokalizace fluorescence z GFP, jehož gen byl pod kontrolou zmíněných promotorů (Auriac & Timmers, 2007).

Promotor *35S* je aktivní ve všech pletivech kořene *M. truncatula* i při symbiotické interakci. U buněk hlízky se však jeho aktivita v některých zónách výrazně snižuje. V meristematické zóně hlízky nebyla zjištěna žádná aktivita promotoru *35S* a velmi slabá aktivita byla pozorována v zóně infekční. *35S* promotor je pravděpodobně v těchto částech hlízky umlčován rhizobiální infekcí. Naopak silnou expresi poskytoval promotor *35S* v zóně fixace dusíku a ve vodivých pletivech hlízky (Auriac & Timmers, 2007). Podobné výsledky byly také popsány u *M. sativa*, kde *35S* promotor vykazuje velmi malou nebo žádnou aktivitu v symbiotických hlízkách (Samac et al., 2004).

Promotor *EF1 α* z *A. thaliana* byl charakterizován jako silný konstitutivní promotor (Axelos et al., 1989). Jeho aktivita v kořenech *M. truncatula* je srovnatelná s 35S promotorem, jelikož poskytuje poměrně silnou expresi genů ve všech pletivech. Rozdílná aktivita oproti 35S promotoru se však ukazuje v symbiotických hlízkách. Bylo zjištěno, že promotor *EF1 α* vykazuje vysokou aktivitu ve všech zónách hlízky. Z tohoto důvodu se jeví jako velmi vhodný pro studium symbiotických interakcí a procesu tvorby hlízek (Auriac & Timmers, 2007).

Ve vícerých výzkumných pracích bylo ukázáno, že konstitutivní promotor *UBQ10* z *A. thaliana* poskytuje uniformní expresi v celé rostlině (Geldner et al., 2009; Grefen et al., 2010; Dyachok et al., 2014). Promotor *UBQ10* je aktivní při symbiotických interakcích v kořenech i symbiotických hlízkách u *M. truncatula* (Limpens et al., 2009; Ivanov & Harrison, 2014). Díky aktivitě v hlízkách je tedy pravděpodobné, že protein exprimovaný pod tímto promotorem fúzovaný s fluorescenčním proteinem bude dobře pozorován během symbiotických interakcí mezi rostlinami a půdními bakteriemi.

2.4 Rostlinný cytoskelet

Rostlinný cytoskelet je dynamická síť proteinových filament, která je nedílnou součástí všech rostlinných buněk. Podílí se na esenciálních procesech v buňkách, mezi které patří udržování tvaru buňky, intracelulární transport či buněčné dělení (Staiger, 2000; Wasteneys & Galway, 2003). Cytoskelet rostlin se skládá ze dvou hlavních strukturních polymerů, mikrotubulů a aktinových filament, které během buněčného cyklu mění svou organizaci (Timmers, 2008).

2.4.1 Charakterizace mikrotubulů

Mikrotubulus je dutý válec o průměru přibližně 24 nm, který je ve většině eukaryotických buněk tvořen 13 lineárními protofilamentami složených z pomylelizovaných heterodimerů α - a β - tubulinu (Ledbetter & Porter, 1964). K polymerizaci, tudíž sestavení mikrotubulu dochází v přítomnosti Mg^{2+} a GTP v mikrotubulových organizačních centrech, přičemž celý proces je regulován proteiny asociovanými s mikrotubuly (Lian et al., 2021). Mikrotubuly bývají obvykle více dynamické na „plus“ konci, který je zakončen β podjednotkou tubulinu. Tento konec je preferován pro polymerizaci i depolymerizaci. Druhý, tzv. „mínus“ konec je zakončen α podjednotkou a bývá méně dynamický. Dynamika mikrotubulů je popisována na základě čtyř kritérií: míra růstu

a zkracování, frekvence záchrany (přechod ze zkracování do růstu) a frekvence katastrofy (přechod z růstu do rychlé depolymerizace) (Timmers, 2008; Hashimoto, 2015).

Mikrotubuly se účastní především buněčného dělení a růstu buněk. Kortikální mikrotubuly se podílí na udržování tvaru buněk, jelikož udávají paralelní směr depozice mikrofibril celulózy, z nichž je sestavována buněčná stěna (Paredes et al., 2006; Li et al., 2015c). Mikrotubuly jsou také přítomny v kořenových vláscích, kde mají důležitou roli při jejich růstu, vývoji a interakcích s okolním prostředím (Sieberer et al., 2002).

V rostlinných buňkách existuje pět základních seskupení mikrotubulů. Jedná se o interfázní seskupení sestávající z kortikálních mikrotubulů, pre-profázní svazek, dělicí vřetenko, fragmoplast a perinukleární seskupení. Pre-profázní svazek se tvoří těsně před začátkem dělení buňky a jeho pozice určuje budoucí rovinu dělení. Po jeho rozpadu následuje tvorba dělicího vřetenka, které slouží k připojení chromozomů, jejich rozdělení a přesunutí k opačným koncům buňky (karyokineze). Ke konci dělení buňky se mezi dvěma nově tvořenými jádry vytváří fragmoplast, který napomáhá sestavení buněčné přepážky (cytokineze) (Motta & Schnittger, 2021). Kortikální mikrotubuly mívají v prodlužujících se buňkách příčnou orientaci a v dospělých diferencovaných buňkách bývá uspořádání spíše šikmé či podélné. Jejich uspořádání může být však i náhodné, například na rozhraní M/G1 fáze v meristemických buňkách. Perinukleární mikrotubuly se vyskytují před a na konci dělení buňky (Cyr & Palevitz, 1995; Kost & Chua, 2002).

V kořenových vláscích u luštěnin se organizace kortikálních mikrotubulů liší u různých druhů. Kortikální mikrotubuly v rostoucích kořenových vláscích mohou být uspořádány náhodně a dosahovat až do špičky vlásku (Vassileva et al., 2005) nebo mohou vykazovat různé orientace v jednotlivých částech vlásku. U *M. sativa* byla u rostoucích vlásků pozorována podélná orientace kortikálních mikrotubulů v bazální části vlásku, síťově axiální uspořádání v subapikální části a ve špičce vlásku se vůbec nevyskytují (Weerasinghe et al., 2003). U vlásků, které dokončují růst vykazují kortikální mikrotubuly síťovou axiální organizaci a dosahují až do špičky vlásku. V dospělých kořenových vláscích se kortikální mikrotubuly vyskytují jako dlouhé podélné svazky, shromažďující se ve špičce vlásku (Sieberer et al., 2002; Vassileva et al., 2005; Perrine-Walker et al., 2014).

Endoplazmatické mikrotubuly jsou nezbytné pro rostoucí kořenové vlásky, kde se nachází v husté cytoplazmě mezi jádrem a špičkou kořenového vlásku. U *M. truncatula* a *Lotus japonicus* byly endoplazmatické mikrotubuly pozorovány v hustém seskupení

kolem jádra. Při ukončení růstu vlásku postupně úplně mizí (Sieberer et al., 2002; Weerasinghe et al., 2003; Perrine-Walker et al., 2014).

V buňkách pericyklu jsou kortikální mikrotubuly orientovány paralelně a šikmo k ose prodlužování buňky. Jsou propojeny s perinukleární sítí kortikálních mikrotubulů. V buňkách kortexu kořene bývají mikrotubuly orientovány paralelně, kolmo či šikmo k ose prodlužování buňky (Timmers et al., 1999; Blancaflor et al., 2001).

2.4.2 Charakterizace aktinových filament

Aktin se v rostlinných buňkách vyskytuje ve formě monomerů (globulární G-aktin), oligomerů a aktinových filament (filamentový F-aktin; Volkmann & Baluška, 1999). Průměr aktinové filamenty je přibližně 7 nm a je tvořena ze dvou vláken, přičemž každé je tvořeno z aktinových monomerů. Vlákna jsou uspořádána do pravotočivé helikální struktury. Dynamika aktinu je na obou koncích odlišná. Na „plus“ či „ostnatém“ konci dochází k rychlejší polymerizaci aktinu, zatímco na „mínus“ neboli „špičatém“ konci dochází k pomalejší polymerizaci a rychlejší depolymerizaci aktinu. Při sestavení filamenty dochází nejdříve ke spojení tří monomerů G-aktinu (nukleaci) a následně dochází k elongaci filamenty. Rychlost elongace je závislá na koncentraci dostupných monomerů v buňce. Polymerizace filament probíhá na základě hydrolyzy ATP. Dynamiku aktinu regulují aktin-vázající proteiny, které řídí aktivitu podjednotek, počet míst pro nukleaci, rychlost tvorby filament a organizaci mikrofilament do struktur vyššího řádu (Wegner & Engel, 1975; Staiger, 2000; Lian et al., 2021). Aktinové filamenty bývají nejčastěji sestavovány do svazků či sítí, tyto seskupení jsou velmi dynamické a podléhají stále reorganizaci (Li et al., 2015a).

Dynamika aktinu je velmi důležitá v mnoha buněčných procesech, jako je dělení buňky, proudění cytoplazmy, vezikulární transport a pohyb organel. Také hraje významnou roli při růstu kořenů a kořenových vlásků (Baluška et al., 2000; Šamaj et al., 2004; García-González & van Gelderen, 2021).

Aktinové filamenty v kořenových vláscích u luštěnin vykazují typickou organizaci. Během růstu kořenového vlásku bývají v bazální a subapikální části pozorovány tlusté svazky aktinových filament v podélné orientaci. Směrem ke špičce vlásku vytvářejí filamenty jemné svazky nebo se vyskytují jako jednotlivá vlákna. V samotné špičce rostoucího vlásku se většinou aktinové filamenty nenachází. U kořenových vlásků, které ukončují růst naopak dosahují svazky aktinových filament až ke špičce vlásku (Miller et al., 1999). V dospělých kořenových vláscích bývají typicky aktinové filamenty sestaveny

do svazků, které procházejí podélně až ke špičce vlásku. Jádra bývají ve vláscích obklopena tenkými vlákny aktinu, které se spojují se silnějšími svazky vycházejícími radiálně od jádra (Allen et al., 1994; Allen & Bennett, 1996; Cárdenas et al., 1998; Miller et al., 1999; Yokota et al., 2009).

V epidermálních buňkách kořene se aktinové filameny nachází v podobě jemné sítě, lemující plazmatickou membránu. Jemná vlákna protínají silnější svazky obklopující jádro. V kortikálních buňkách se jemná síť aktinových filamentpropojuje s tlustšími svazky filament (Genre & Bonfante, 2002).

2.5 Organizace cytoskeletu během symbiotické interakce

Mezi jednu z nejvíce studovaných symbiotických procesů patří interakce mezi bobovitými rostlinami a bakteriemi rodu *Sinorhizobium*. Tato interakce je zkoumána především kvůli jejímu potenciálu zvýšit výtěžky plodin s nižší potřebou aplikace syntetických hnojiv (Jhu & Oldroyd, 2023). Při symbióze dochází ke vzniku specializovaných orgánů v kořenech rostliny, tzv. hlízek či nodulů. Bakterie v hlízkách získávají energii rozkladem produktů fotosyntézy rostliny a zároveň přeměňují atmosférický dusík na amoniak, redukovanou formu dusíku, který je asimilován rostlinou. Tvorba hlízek (nodulace) začíná molekulárním dialogem mezi symbiotickými partnery, což má za následek dělení buněk pericyklu a kortexu kořene, kde je později formováno primordium hlízky. V reakci na symbiotické bakterie se také mění tvar kořenových vlásků a dochází k jejich zatáčení pro zachycení rhizobií. Ty se dostávají přes kořenový vlásek do primordiálních buněk hlízek pomocí infekčního vlákna, kde jsou následně uvolněny a po internalizaci do buněk se mění v symbiozomy. Rostoucí hlízky vytváří meristém, který zajišťuje dělení a růst buněk, které se postupně diferencují v infekční a fixační zóně hlízky a odumírají v senescenční zóně. Rhizobia se postupně diferencují na dusík-fixující bakteroidy (Timmers et al., 1999; Timmers, 2000; Brewin, 2004; Roy et al., 2020; Gao et al., 2024).

Tato symbiotická interakce je plně závislá na dynamice cytoskeletu v buňkách. K jeho reorganizaci dochází ve všech fázích symbiózy (Sutton et al., 2011). Cytoskelet zprostředkovává zatočení kořenového vlásku, pomáhá při tvorbě infekčního vlákna a také se účastní při diferenciaci buněk a vývoji symbiotické hlízky (Timmers, 2008). Reorganizace cytoskeletu je studována po aplikaci rhizobií anebo nodulačních (nod) faktorů, což jsou látky (lipochitooligosacharidy), produkované rhizobiemi, které jsou

vnímány rostlinnými receptory. Samotné nod faktory spouští morfologické změny v kořenových vláscích, proto se využívají pro studium změn v organizaci cytoskeletu v začátcích symbiotické interakce (Heidstra et al., 1994).

2.5.1 Reorganizace cytoskeletu v brzkých fázích symbiotické interakce

2.5.1.1 Reorganizace mikrotubulů

Ke změnám v organizaci mikrotubulů typicky dochází ve všech brzkých stádiích symbiotické interakce. Při interakci *Medicago* se *Sinorhizobium* dochází ke změnám v organizaci mikrotubulů v buňkách pericyklu a vnitřním kortexu, kde je formováno primordium hlízky. Největší změny v organizaci mikrotubulů však nastávají v kořenových vláscích během formování infekčního vlákna. Husté svazky endoplazmatických mikrotubulů se podílí na zatočení vlásku kolem bakterií. Následně dochází k tvorbě pre-infekčního vlákna, kdy se orientace endoplazmatických mikrotubulů mění z paralelní na náhodnou a kortikální mikrotubuly se začínají rozpadat. Endoplazmatické mikrotubuly mají při infekci v kořenovém vlásku nepostradatelný význam, jelikož spojují jádro se špičkou kořenového vlásku a zároveň se akumulují podél mikrokolonií bakterií nacházející se v zatočeném vlásku a pomáhají s růstem infekčního vlákna. Mikrotubuly jsou později organizovány do podélné sítě obklopující infekční vlákno (Timmers et al., 1999, Sieberer et al., 2005; Perrine-Walker et al., 2014).

U kořenových vlásků *M. sativa* depolymerizují kortikální mikrotubuly i endoplazmatické mikrotubuly již během 10 minut po aplikaci nod faktorů. K jejich regeneraci následně dochází přibližně po 1 hodině (Weerasinghe et al., 2003). Výzkum Sieberer et al. (2005) ukazuje mírně odlišné procesy u *M. truncatula*, kde aplikace nod faktorů způsobuje zkrácení subapikálních endoplazmatických mikrotubulů v rostoucích kořenových vláscích, a naopak u kortikálních mikrotubulů nedochází k viditelným změnám (Sieberer et al., 2005). V kořenových vláscích *L. japonicus* dochází po aplikaci nod faktorů ke zkrácení a změně orientace kortikálních mikrotubulů z paralelní podél vlásků na náhodnou, a zároveň se stávají méně dynamické (Vassileva et al., 2005; Hlaváčková et al., 2023).

2.5.1.2 Reorganizace aktinových filament

Aktinový cytoskelet se při symbiotické interakci podílí na tvorbě pre-infekčního vlákna, indukcii dělení buněk v kortexu kořene a pomáhá s internalizací bakterií do buněk

(Bakhuizen, 1988; Timmers et al., 1999). V zatočeném kořenovém vlásku u *Vicia hirsuta* dochází k fragmentaci aktinových filament a nahromadění aktinu v místě zatočení a vstupu bakterií (Ridge, 1992). U *M. sativa* a *Phaseolus vulgaris* je po 15 minutách od aplikace nod faktorů u rhizobií pozorován rychlý rozpad podélných svazků aktinových filament. Tento rozpad doprovází snížení počtu a délky aktinových filament, akumulace aktinu v určitých místech na špičce kořenového vlásku a její deformace. Aktinový cytoskelet se obnovuje přibližně po 1 hodině od aplikace nod faktorů (Allen & Bennett, 1996; Cárdenas et al., 1998). Naopak u kořenových vlásků *Vicia sativa* ošetřených nod faktory dochází ke dvojnásobnému navýšení počtu aktinových filament a změně v jejich uspořádání (De Ruijter et al., 1999).

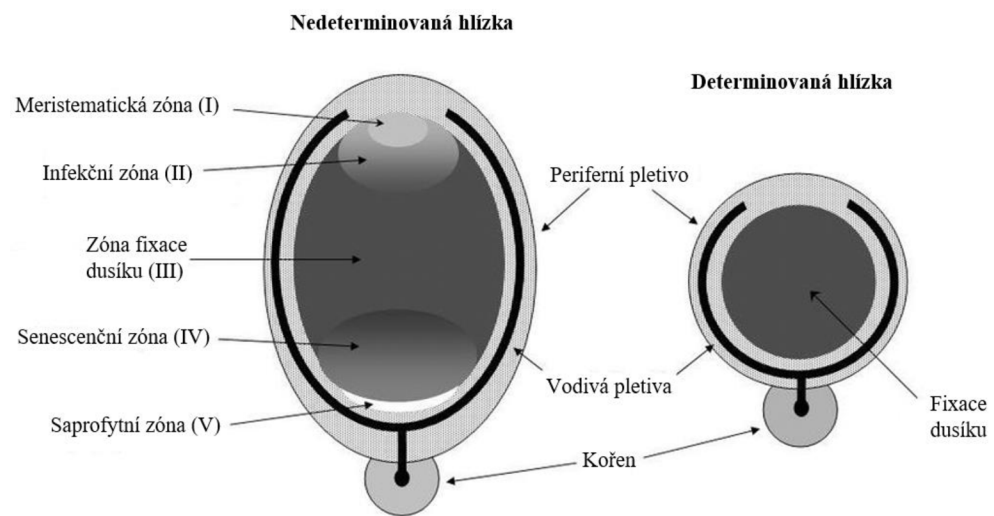
Deformace spojené s aplikací nod faktorů zahrnují bobtnání a reorientaci špiček kořenových vlásků. V bobtnajících špičkách vlásků *V. sativa* je orientace aktinových filament náhodná (Miller et al., 1999). U druhu *P. vulgaris* dochází po aplikaci nod faktorů ke zvýšení počtu plus konců aktinových filament na špičce kořenových vlásků tam, kde dochází k uchycení rhizobií a zahájení tvorby infekčního vlákna. U vlásků s již iniciovaným infekčním vláknem jsou plus konce aktinových filament lokalizovány v oblasti této iniciace (Zepeda et al., 2014; Hlaváčková et al., 2023).

2.5.2 Role cytoskeletu při tvorbě hlízek

Hlízky luštěnin lze rozdělit na základě rozdílu ve vaskularizaci a perzistenci jejich meristému na determinované a nedeterminované (**Obr. 2**) (Lodwig & Poole, 2003). Determinované hlízky se vyskytují u *L. japonicus*, *Glycine max* či *P. vulgaris*. Jejich tvar bývá sférický a vznikají z buněk vnějšího kortexu kořene. Tento typ hlízek má omezenou životnost, hlízky časem ztrácí schopnost být neustále infikovány bakteriemi a po dosažení zralosti ztrácí meristemickou aktivitu. V symbiozomu těchto hlízek se nachází několik bakteroidů, které jsou velmi životaschopné (Ferguson et al., 2010; Oldroyd et al., 2011; Tejada-Jiménez et al., 2015). Hlízky nedeterminované jsou typické pro *M. sativa*, *M. truncatula* či *P. sativum*. Jejich tvar je oválný nebo větvený a mají původ z buněk vnitřního kortexu kořene, které přiléhají k endodermis. Jsou neustále infikovány původními bakteriemi a mají trvalý meristém. Bakteroidy v těchto hlízkách jsou méně životaschopné a v symbiozomu se nachází vždy pouze jeden (Ferguson et al., 2010; Popp & Ott, 2011; Tejada-Jiménez et al., 2015).

Aktivita meristému nedeterminované hlízky vede k vývoji oválného tvaru hlízky. Tato může být rozdělena až na 5 zón diferenciovaných od distální části (vrcholu) po proximální

část (báze hlízky v kořenu, ze kterého vyrůstá) (**Obr. 2**). Jedná se o zóny: meristemická kde probíhá buněčné dělení (I), infekční, kde začíná diferenciace buněk a jejich interakce s rhizobii v infekčních vláknech (II), fixační, kde probíhá fixace dusíku v internalizovaných bakterioidech (III), senescentní, jež vzniká přibližně po pěti týdnech od počátku infekce a dochází v ní k degradaci bakteroidů spolu s buňkami hostitele (IV). Poslední je zóna saprofytní (V), ve které se nachází odumřelé buňky hostitelské rostliny, jež jsou kolonizovány rhizobii z apoplastu hlízek (Timmers et al., 2000).



Obrázek 2. Model a popis nedeterminované a determinované hlízky. Upraveno podle Terpolilli (2009).

2.5.2.1 Cytoskelet v determinovaných hlízkách

Při vývoji hlízky většinou aktinové filamenty nezaujímají specifickou orientaci a jsou orientovány náhodně s výjimkou infikovaných buněk zralých hlízek, kde jsou orientovány paralelně a příčně k podélné ose buňky. Mikrotubuly jsou během brzkého vývoje hlízky organizovány paralelně a příčně, v pozdějších fázích je orientace spíše náhodná. V meristematických buňkách mladých hlízek se nachází náhodně orientované kortikální mikrotubuly, které tvoří hustou síť. Endoplazmatické mikrotubuly se akumulují kolem infekčních vláken a obklopují infekční kapky s bakteriemi (Whitehead et al., 1998; Kitaeva et al., 2022).

Rozdíl v organizaci mikrotubulů u různých druhů luštěnin bývá patrný v oblasti, kde je fixován dusík a u neinfikovaných buněk. U *L. japonicus* a *P. vulgaris* jsou neinfikované buňky podlouhlé s pravidelně uspořádanými kortikálními mikrotubuly, neinfikované buňky *G. max* a *G. soja* jsou sférické a kortikální mikrotubuly zde nejsou pravidelně uspořádané. Dusík fixující buňky obsahují paralelně orientované kortikální mikrotubuly, které jsou kolmé k podélné ose buňky. Endoplazmatické mikrotubuly bývají uspořádané do sítě podél symbiozomů a směřují od středu k periférii buněk (Whitehead et al., 1998; Kitaeva et al., 2022).

2.5.2.2 Cytoskelet v nedeterminovaných hlízkách

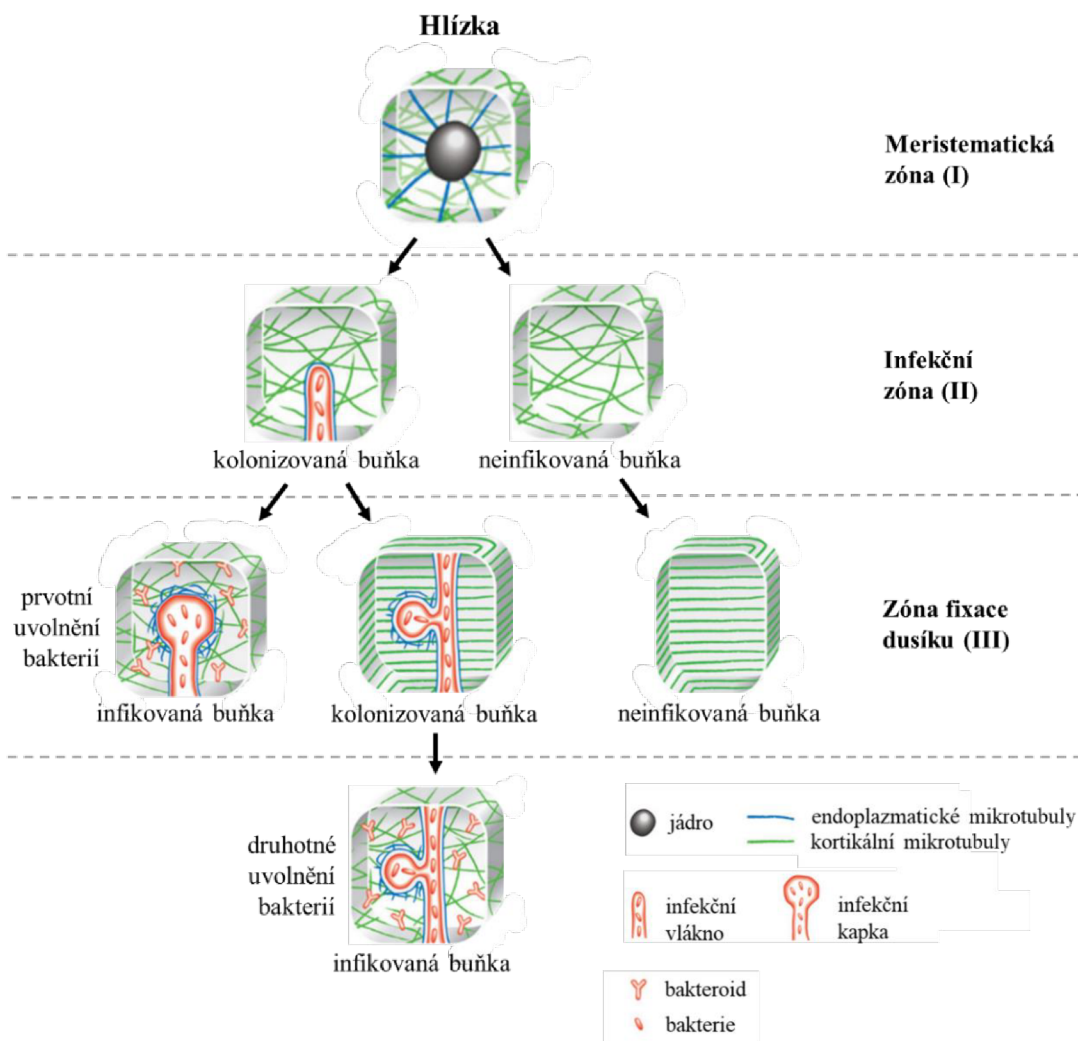
V meristematických buňkách hlízky bývají aktinové filamenty organizovány jako perinukleární síť asociovaná s cytoplazmatickými vlákny a kortexem buňky. V infekční zóně probíhá fragmentace aktinových filament na kratší vlákna až částice a v zóně fixace dusíku jsou aktinové filamenty velmi fragmentovány. Fragmenty a částice aktinových filament jsou typické pro infikované buňky, kde jsou přilehlé ke zralým symbiozomům a spolu se sítí aktinových filament obklopují uvolněné bakterie (Zhang et al., 2019). Fedorova et al. (2007) zjistili, že se v buňkách nachází také síť tenkých aktinových filament, které obklopují jádro a asociují se symbiozomy (Fedorova et al., 2007).

Kortikální mikrotubuly bývají v meristematických buňkách hlízky organizovány do neuspořádaných svazků. Perinukleární mikrotubuly zde obklopují jádro a směřují k periférii buňky (**Obr. 3**). U neinfikovaných buněk hlízky zůstává v infekční zóně náhodná orientace mikrotubulů, zatímco v zóně fixace dusíku se zde nachází dlouhé paralelní svazky kortikálních mikrotubulů, které jsou kolmé k podélné ose buňky. Endoplazmatické mikrotubuly se v neinfikovaných buňkách nenachází, protože jejich

předpokládaná role je při internalizaci rhizobií (Kitaeva et al., 2016, Kitaeva et al., 2021; Tsyganova et al., 2021; Hlaváčková et al., 2023).

U nově infikovaných buněk se v infekční zóně kortikální mikrotubuly vyskytují ve formě tlustých svazků, které jsou nepravidelně uspořádány. Endoplazmatické mikrotubuly u infikovaných buněk obklopují infekční vlákna spolu s jeho výrůstky, tzv. infekčními kapkami. Jedná se o struktury, ze kterých jsou uvolňovány bakterie do buněk hlízky, kde se diferenciují na bakteroidy fixující dusík. U buněk obsahující symbiozomy jsou mikrotubuly lokalizovány podél nich (**Obr. 3**) (Kitaeva et al., 2016; Kitaeva et al., 2021; Tsyganova et al., 2021; Hlaváčková et al., 2023).

V zóně fixující dusík mohou být nalezeny rozdíly ve velikosti a tvaru bakteroidů u různých druhů luštěnin. V kolonizovaných buňkách je organizace kortikálních mikrotubulů paralelní, stejně jako u neinfikovaných buněk. Endoplazmatické mikrotubuly stále obklopují infekční vlákna a infekční kapky. V buňkách infikovaných, kde dochází k opětovnému uvolnění bakterií, mění kortikální mikrotubuly svou organizaci na nepravidelnou. Síť endoplazmatických mikrotubulů se nachází v buňce během diferenciacce bakteroidů a bývá s nimi asociována (**Obr. 3**) (Kitaeva & Tsyganov, 2019; Kitaeva et al., 2021; Hlaváčková et al., 2023).



Obrázek 3. Organizace mikrotubulů v jednotlivých zónách infikovaných i neinfikovaných buněk hlízky u *M. truncatula*. Upraveno podle Kitaeva et al. (2015). Endoplazmatické mikrotubuly jsou znázorněny modře, kortikální mikrotubuly zeleně, symbiotické struktury (infekční vlákna, kapky a symbiozomy) červeně.

2.6 Metody kvantitativní analýzy mikrotubulů

Před objevem fluorescenčních proteinů byla pro vizualizaci cytoskeletu často využívána metoda imunozaření pomocí specifických protilátek proti aktinu nebo tubulinu (Hasezawa et al., 1988, 1991; Hasezawa & Nagata, 1991; Eun & Lee, 1997; Fukuda et al., 1998; Hasezawa & Nozaki, 1999), jež nevyžaduje transformaci rostlin. Velkým problémem při využití této metody je však velmi častý rozpad struktury cytoskeletu při fixaci či samotném značení. Je proto poměrně obtížné získat touto metodou spolehlivé výsledky při vizualizaci cytoskeletu (Higaki, 2017). Z tohoto důvodu objev fluorescenčních proteinů výrazně usnadňuje lokalizaci rostlinného cytoskeletu a poskytuje jeho spolehlivou mikroskopickou vizualizaci v živých buňkách. S pomocí

fluorescenčních proteinů lze velmi efektivně studovat organizaci cytoskeletu i jeho dynamiku (Higaki et al., 2007; Ma et al., 2016). Díky pokrokům v mikroskopických metodách lze získat a studovat mnoho snímků cytoskeletu v relativně krátkém čase (Higaki et al., 2010a).

Kvantitativní analýza organizace cytoskeletu je základní výzkumná metoda, přispívající především k objasnění jeho funkce v různých typech rostlinných i živočišných buněk. Využita byla například při studiu pohybu průduchů (Higaki et al., 2010a; Zhao et al., 2011), růstu pylové láčky (Zhao et al., 2011; Su et al., 2014), odpovědi buněk na rostlinné hormony (Lanza et al., 2012; Scheuring et al., 2016), patogeny (Li et al., 2015b; Inada et al., 2016) nebo mechanický stres (Louveaux et al., 2016).

Pomocí analýzy obrazu lze získat několik různých informací z jediného mikroskopického snímku. V první řadě je ale nutné určit, jaký druh charakteristiky se má ze snímku měřit. Dle Higaki (2017) je výhodné měřit čtyři základní vlastnosti, jež výstižně popisují cytoskelet: orientaci, rovnoběžnost, svazkování a hustotu.

Směr orientace cytoskeletu je základní charakteristika. Jelikož je velmi nepravděpodobné, že všechny vlákna cytoskeletu budou orientovány stejným směrem, měří se při analýze všechny úhly na jednotku délky a ze získané distribuce úhlů je následně vypočítaná průměrná hodnota. Orientace může být hodnocena rozdílem mezi průměrným úhlem vláken a buněčným referenčním úhlem, který se liší podle účelu výzkumu. Může jím být například podélná osa buňky (Kimata et al., 2016; Ueda et al., 2010). Měření rozdílů v průměrných úhlech poskytuje také informaci důležitou pro zkoumání vlastnosti rovnoběžnosti mezi dvěma druhy struktur (například kortikální mikrotubuly a celulózové mikrofibrily) (Yoneda et al., 2007).

Rovnoběžnost či paralelnost je úzce spjatá s orientací. Jedná se o index, jež ukazuje variace v rozložení úhlu cytoskeletu na jednotku délky. Při tomto měření není potřeba referenční směr. Měření rovnoběžnosti vláken cytoskeletu je užitečné pro správnou interpretaci středních úhlových dat. Nízké hodnoty rovnoběžnosti ukazují náhodnost orientace cytoskeletu (Higaki, 2017).

Svazkování cytoskeletu bývá často regulováno proteiny vážícími se na cytoskelet (Higaki et al., 2010b). Pro kvantifikaci úrovně svazkování se využívá koeficient šikmosti (skewness) intenzity distribuce získané ze sond s fluorescenčními proteiny (Higaki et al., 2010a,b). Jedná se o statistický parametr, který ukazuje asymetrii distribuce. Při svazkování cytoskeletu se intenzita fluorescence získaná z fúzních fluorescenčních proteinů v místě svazku zvyšuje, dochází tedy ke zvýšení jasů pixelů. Vyšší hodnoty jasů

posouvají distribuci intenzity doleva na horizontální ose (osa zobrazuje intenzitu fluorescence) a dochází ke zvýšení hodnot šikmosti. Tato metoda bývá využívána hlavně pro vyhodnocení svazování aktinových filament (Lanza et al., 2012; Qin et al., 2014; Su et al., 2014; Li et al., 2015b; Inada et al., 2016; Kimata et al., 2016; Scheuring et al., 2016), ale byla využita i pro analýzu mikrotubulů (Louveaux et al., 2016; Ma et al., 2016).

Hustota cytoskeletu znamená množství cytoskeletu na jednotku plochy vybrané oblasti buňky. Její měření bývá využíváno především při potenciálním narušení organizace cytoskeletu v buňce (Higaki et al., 2010a; Takahashi et al., 2017).

V současné době je fluorescenční mikroskopie a fotomikrografie využívána pro zobrazování a popis morfologie buněčných struktur, včetně mikrotubulů. Vzhledem k subjektivitě popisného jazyka však při popisu vykazují tyto metody nevýhody, jako je možná zaujatost pozorovatele a nepřesnost při uvádění detailů. Matematické a počítačem simulované metody mohou poskytnout kvalitnější informace z fluorescenčních snímků obsahujících značené mikrotubuly, jako je intenzita zbarvení, tvar a prostorové uspořádání (Nazeran et al., 1995).

Metoda analýzy mikrotubulů popsaná Lan et al. (2015) je založená na imunofluorescenčním značení mikrotubulů a její analýze. Kombinuje zpracování obrazu se čtyřmi metodami obrazové analýzy při studiu morfologie mikrotubulů: histogramy na úrovni šedé („gray-level histograms“) poskytující informace o intenzitě značení (I), algoritmus matice šedé úrovně společného výskytu („gray-level co-occurrence matrix“), udávající informace o textuře (II) a Eulerovo číslo („Euler number“) (III) s analýzou energie vlnových paketů („wavelet packet energy analysis“) (IV), popisující tvar. Tyto komponenty jsou zkombinovány a vyhodnocení následně probíhá pomocí analýzy hlavních komponent („principal component analysis“). Uvedený postup vede k efektivnímu přístupu pro kvantitativní vyhodnocení fluorescenčně značených mikrotubulů (Lan et al., 2015).

Program pro analýzu mikrotubulů plusTipTracker také poskytuje analýzu fluorescenčně značených mikrotubulů a mikrotubulů-vazebných proteinů na „plus“ (dynamickém) konci mikrotubulů. Software dokáže provádět rekonstrukce trajektorií mikrotubulů, a tudíž umožňuje odvodit jejich dynamiku, která může být analyzována u tisíců mikrotubulů během několika minut (Applegate et al., 2011). Dynamiku mikrotubulů lze také studovat pomocí kymografů. Jedná se o časoprostorové grafy, zobrazující hodnoty intenzity fluorescence podél definované dráhy v určitém čase. Tato analýza využívá data ze série časosběrných snímků, které zachycují růst a zkracování

jednotlivých mikrotubulů značených pomocí fluorescenčních proteinů (Zwetsloot et al., 2018; Zhou et al., 2020).

Pokročilé mikroskopické zobrazování (konfokální, super-rezoluční nebo „Airyscan“ technologie) pomocí laseru a geneticky kódovaných fluorescenčních markerů je v kombinaci s automatizovanou analýzou obrazu velmi účinný nástroj pro výzkum buněčných struktur a mechanismů. Program „CellArchitect“ provádí segmentaci buněk ze snímků z laserové konfokální mikroskopie a zároveň detekuje mikrotubuly v kombinaci s jejich kvantifikací. Tento program byl vyzkoušen na mikrotubulech vizualizovaných pomocí fúzních proteinů GFP-MBD a TUB6-GFP v *A. thaliana*, kdy s jeho pomocí bylo vyhodnoceno působení řady herbicidů na organizaci mikrotubulů. Program dokáže kvantifikovat vzory mikrotubulů podle souvisejících vlastností zahrnující délku, šířku a hustotu (Faulkner et al., 2017).

Pro analýzu mikroskopických snímků nejen mikrotubulů, ale jakýchkoliv buněčných struktur lze využít také program „CytoSpectre“, který je založen na spektrální analýze, což umožňuje kvantifikaci orientace a distribuce struktur. Program využívá Fourierovu transformaci pro odhad síly spektra obrazu a na základě zjištěného spektra vypočítává hodnoty, například průměrnou orientaci a distribuci struktur (Kartasalo et al., 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Bio-Rad: iProof™ HF Buffer, iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase, Phire Buffer, Phire Hot Start II DNA Polymerase.

Duchefa Biochemie: ampicilin, fosfomicin, kanamycin, rifampicin, spektinomycin, tikarcilin, tetracyklin, 1000x Gamborg vitamin solution, 1000x Nitsch & Nitsch vitamin solution, 100x Schenk & Hildebrandt vitamin solution, 2,4-D (2,4-dichlor-fenoxy octová kyselina), adenin, Gamborg's B5 vitamin mixture, Gamborg's B5 basal salt mixture, kinetin, L-glutamin, L-glutathion, L-serin, Murashige Skoog's salt mixture, myoinositol, Nitsch & Nitsch vitamin mixture, Schenk & Hildebrandt basal salt mixture.

Sigma-Aldrich: 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina monohydrát (MES), acetyryngon, agaróza, D-glukóza, dimethylsulfoxid (DMSO), dodecylsírán sodný (SDS), dusičnan draselný (KNO₃), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethanol 70%, ethanol 96%, glycerol, heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄ · 7H₂O), hydroxid sodný (NaOH), hypochlorid sodný (NaClO), chlorid draselný (KCl), kvasničný extrakt, Lauria Bertani (LB) broth médium, LB broth médium s agarem, MES, prolin, sacharóza, trypton, Tween 20.

ThermoFisher Scientific: 10 mmol·l⁻¹ dNTPs, 10x Fast Digest Green Buffer, 10x T4 DNA ligase buffer, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galaktopyranosid (X-Gal), 6x DNA loading dye, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), T4 DNA ligase.

Ostatní: Gellan Gum (Afa Aesar), Midori Green (Nippon Genetics).

3.1.2 Roztoky a média

Roztoky pro izolaci plazmidové DNA

Roztok P1

50 mM Tris/HCl, pH = 8,0

10 mM EDTA

Roztok P2

0,2 M NaOH

1% SDS

Roztok P3

3M octan draselný/kyselina octová, pH = 5,5

Roztoky pro sterilizaci listů *M. sativa*

Roztok 1

70% (v/v) ethanol

Roztok 2

0,1% (w/v) Tween 20

MilliQ H₂O

Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 μm membránový filtr.

Roztok 3

0,05% (w/v) Tween 20

1% (v/v) hypochlorid sodný

MilliQ H₂O

Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 μm membránový filtr.

50x TAE pufr

121 g Tris

28,55 ml kyselina octová

50 ml EDTA (0,5 mol·l⁻¹)

421,45 ml dH₂O

pH = 8,0

1x TAE pufr

10 ml 50x TAE pufr

490 ml dH₂O

Zásobní roztok kinetinu (0,1 mg·ml⁻¹)

1 mg	kinetin
20 µl	1 mol·l ⁻¹ NaOH
10 ml	MilliQ H ₂ O

Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr.

Zásobní roztok 2,4-D (1 mg·ml⁻¹)

10 mg	2,4-D
50 µl	ethanol
150 µl	1 mol·l ⁻¹ NaOH
10 ml	MilliQ H ₂ O

Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr.

Roztok aminokyselin

6,65 g	L-glutamin
0,83 g	L-serin
0,004 g	adenin
0,083 g	L-glutation
250 ml	MilliQ H ₂ O

Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr.

LB (Lauria Bertani) tekuté médium

25 g·l ⁻¹	LB broth médium
	MilliQ H ₂ O

pH = 7,2 (1 mol·l⁻¹ a 0,1 mol·l⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním

LB (Lauria Bertani) tuhé médium

40 g·l ⁻¹	LB broth médium s agarem
	MilliQ H ₂ O

sterilizace média autoklávováním

S.O.C. médium

2% (w/v)	trypton
0,5% (w/v)	kvasničný extrakt
10 mmol·l ⁻¹	NaCl
2,5 mmol·l ⁻¹	KCl
	MilliQ H ₂ O
	pH = 7,5 (1 mmol·l ⁻¹ NaOH), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:
20 mmol·l ⁻¹	D-glukóza
10 mmol·l ⁻¹	MgCl ₂
	Sterilizace média filtrací přes 0,22 µm membránový filtr.

Ko-kultivační médium pro tranzientní transformaci

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

SH médium pro stabilní transformaci

3,2 g·l ⁻¹	Schenk & Hildebrandt základní směs solí
30 g·l ⁻¹	sacharóza
0,5 g·l ⁻¹	MES
	milliQ H ₂ O
	pH = 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:
10 ml·l ⁻¹	100x Schenk & Hildebrandt směs vitamínů

Médium B5H k indukci tvorby kalusů

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

30 g·l ⁻¹	sacharóza
4,5 g·l ⁻¹	Gellan Gum
	MilliQ H ₂ O
	pH = 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:
1 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg vitamíny
1,0 mg·l ⁻¹	2,4-D (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 2,4-D 1,0 mg·ml ⁻¹)
0,1 mg·l ⁻¹	kinetin (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku kinetinu 0,1 mg·ml ⁻¹)
30 ml·l ⁻¹	zásobní roztok aminokyselin

Médium B50 k indukci tvorby embryí

3,1 g·l ⁻¹	Gamborg B5 základní směs solí
0,5 g·l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g·l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0,5 g·l ⁻¹	prolin
30 g·l ⁻¹	sacharóza
4,5 g·l ⁻¹	Gellan gum
	MilliQ H ₂ O
	pH = 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:
1 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg vitamíny
30 ml·l ⁻¹	zásobní roztok aminokyselin

MMS pevné kultivační médium

4,3 g·l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
30 g·l ⁻¹	sacharóza
0,1 g·l ⁻¹	myoinositol
4,5 g·l ⁻¹	Gellan gum
	MilliQ H ₂ O
	pH = 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:
1 ml·l ⁻¹	1000x Nitsch & Nitsch směs vitamínů

MS pevné kultivační médium

4,3 g·l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
30 g·l ⁻¹	sacharóza
4,5 g·l ⁻¹	Gellan Gum
	MilliQ H ₂ O
	pH = 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním.

Tekuté ½ MS médium

2,2 g·l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g·l ⁻¹	sacharóza
	milliQ H ₂ O
	pH = 5,8, sterilizace média autoklávováním.

Tekuté Fahræus médium bez N₂

<u>Makronutrienty:</u>	<u>Zásobní roztok:</u>	<u>Pracovní roztok:</u>
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	123,2 g·l ⁻¹	1 ml·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	95,3 g·l ⁻¹	1 ml·l ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	71,2 g·l ⁻¹	2 ml·l ⁻¹
Fe-EDTA:		2,5 ml·l ⁻¹
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5,6 g·l ⁻¹	
Na ₂ EDTA	7,4 g·l ⁻¹	

<u>Mikronutrienty:</u>	<u>Zásobní roztok:</u>	<u>Pracovní roztok:</u>
MnSO ₄ · H ₂ O	1 g·l ⁻¹	100 µl·l ⁻¹
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,5 g·l ⁻¹	100 µl·l ⁻¹
ZnSO ₄ · H ₂ O	1,7 g·l ⁻¹	100 µl·l ⁻¹
H ₃ BO ₃	1 g·l ⁻¹	100 µl·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	1,1 g·l ⁻¹	100 µl·l ⁻¹

pH = 6,5 (1 mol·l⁻¹ a 0,1 mol·l⁻¹ HCl), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:

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

3.1.3 Restrikční endonukleázy

BpiI, BsaI, EcoRI, PvuII

3.1.4 Primery

Použité primery v **Tabulce (Tab.) 1 a 2** byly navrženy pomocí programu Geneious Prime a syntetizovány firmou Eurofins Genomics. Primery byly doručeny v lyofilizovaném stavu. Po dodání byly rozpuštěny v daném objemu MilliQ H₂O dle manuálu tak, aby finální koncentrace zásobního roztoku byla 100 pmol·μl⁻¹ (100 μmol·l⁻¹). Tyto roztoky byly následně ředěny 10x na pracovní roztoky o výsledné koncentraci 10 pmol·μl⁻¹ (10 μmol·l⁻¹). Primery byly skladovány při -20 °C.

Tabulka 1: Seznam primerů použitých pro amplifikaci *eGFP*.

Název	5' → 3' sekvence
<i>EGFP_GC-F</i>	AAGAAGACTTTTCGatggtgagcaagggcgag
<i>EGFP_GC-R</i>	TTGAAGACAAAGCttactgtacagctcgtcca
<i>EGFP_GC-Fn</i>	AAGAAGACTTCCATatggtgagcaagggcgag
<i>EGFP_GC-Rn</i>	TTGAAGACAACATTcttgtacagctcgtccatgc

EGFP = enhanced GREEN FLUORESCENT PROTEIN; F = forward primer; n = verze pro N-koncovou fúzi; R = reverse primer. Červeně je znázorněno rozpoznávací místo pro enzym BpiI, modře jsou znázorněny 4-nukleotidové přesahy pro zaklonování do akceptoru a zeleně je znázorněn stop kodon. Malými písmeny je značena sekvence, která je komplementární k cílové DNA sekvenci.

Tabulka 2: Seznam primerů použitých pro „Colony PCR“.

Název	5' → 3' sekvence
<i>TUA6_F</i>	ATGAGAGAGTGCATTTTCGATCCA
<i>TUA6x_R</i>	GTATTCCTCTCCTTCATCATCCTCA

F = forward primer; R = reverse primer; *TUA6* = *TUBULIN ALPHA 6*; x = absence stop kodonu.

3.1.5 Přístrojové vybavení

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag; Polsko)
Aparatura pro elektroforézu nukleových kyselin Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad; USA)
Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group; Německo)
Automatické pipety (Eppendorf; Německo)
Centrifuga ROTANTA 460R (Schoeller Instruments; Česko)
Centrifuga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific; Holandsko)
Elektroforetická vana (Bio-Rad; USA)
Elektromagnetická míchačka MSH-420 (Boeco; Německo)
Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp; UK)
Inkubátor s nastavitelnou teplotou (Verkon; Česko)
Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 (Zeiss; Německo)
Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 880 s Airyscan (Zeiss; Německo)
Laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering; Německo)
Magnetická míchačka MSH-420 (Boeco; Německo)
Mikrocentrifuga Microfuge16 (Beckman Coulter; USA)
NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific; USA)
PCR termocyklér T100 Thermal Cycler (Bio-Rad; USA)
pH metr stolní PC 2700 (Eutech instruments; Singapur)
Předvážky S1502 (BEL Engineering; Itálie)
Spektrofotometr Smart Spec™ plus (Bio-Rad; USA)
Sterilní laminární box (Merci; Česko)
Termoblok ThermoStat C (Eppendorf; Německo)
Termocycler StepOnePlus Real Time PCR systém (Applied Biosystems™; USA)
Termocycler T100™ Thermal cycler (Bio-Rad; USA)
Třepačka s nastavitelnou teplotou ES-20 (Biosan; Lotyšsko)
UV transiluminátor Gel Doc™ EZ Imager (program Image Lab 4.0.1., Bio-Rad; USA)
Vortex Microspin FV2400 (Labnet; USA)
Zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad; USA)
Zdroj napětí PowerPac™ Basic (Bio-Rad; USA)
Zoomovací fluorescenční stereomikroskop Axio Zoom.V16 (Zeiss; Německo)

3.1.6 Software

CytoSpectre

Geneious Prime 2023.2

ImageJ 1.54i

ImageLab 4.0.1 a 6.0.1

Microsoft Office 365

Zeiss Zen 2012 (černá edice)

Zeiss Zen 3.6 (modrá edice)

3.1.7 Kity

Thermo Scientific: GeneJET Gel Extraction Kit

Qiagen: QIAprep® Spin Miniprep Kit

3.1.8 Biologický materiál

Rostlinný materiál

- *N. benthamiana* L.
- *M. sativa* kultivar Regen SY (RSY)
- Transgenní rostliny *M. sativa* RSY stabilně exprimující markery tubulinového cytoskeletu *p35S::GFP:MBD* (dále GFP-MBD) a *p35S::tagRFP:TUA6* (dále tagRFP-TUA6)

Rostliny v *ex vitro* podmínkách byly pěstovány v květináčích s půdním substrátem smíchaným s perlitem ve fytotronu s nastavenou teplotou na 21 °C, vlhkostí 71 % a fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma.

Bakteriální materiál

- *E. coli* DH5α (chemokompetentní buňky)
- *E. coli* TOP10 (chemokompetentní buňky)
- *A. tumefaciens* GV3101 (chemokompetentní buňky)
- *S. meliloti* Rm2011 obsahují plazmid pHC60 kódující mRFP

Použité plazmidy

Seznam použitých plazmidů se zaklonovanými inzerty se nachází v **Tab. 3** a seznam akceptorových vektorů je uveden v **Tab. 4**. Bakterie *E. coli* DH5 α nesoucí plazmidy jsou uchovávány ve formě bakteriálních konzerv při -80 °C.

Tabulka 3: Seznam použitých plazmidů se zaklonováním inzertem.

Název	Popis plazmidu	Typ modulu	Rezistence (bakterie)
pICSL13001	Úroveň 0 akceptor nesoucí CaMV <i>p35S</i>	Pro + 5U (f)	spe
pAGM1251	Úroveň 0 akceptor nesoucí <i>pUBQ10</i>	Pro + 5U	spe
pAGM1251	Úroveň 0 akceptor nesoucí <i>pEF1α</i>	Pro + 5U	spe
pICH41308	Úroveň 0 akceptor nesoucí <i>TUA6</i> (f)	CDS	spe
pICH41414	Úroveň 0 akceptor nesoucí 3U + <i>t35S</i>	3U + Ter	spe
pICH47802	Úroveň 1 akceptor nesoucí <i>pNOS::BAR:tNOS</i>		amp
pICH41744	Koncový linker 2	EL-2	spe
pSB90-			
pAGM4723_	Úroveň 2 akceptor nesoucí <i>p35S::GFP:TUA6</i>		kan
<i>virGN_{45D}</i>			
pSB90-			
pAGM4723_	Úroveň 2 akc. nesoucí <i>pEF1α::GFP:TUA6</i>		kan
<i>virGN_{45D}</i>			
pSB90-			
pAGM4723_	Úroveň 2 akc. nesoucí <i>pUBQ10::GFP:TUA6</i>		kan
<i>virGN_{45D}</i>			

3U = 3' nepřekládaná oblast; 5U = 5' nepřekládaná oblast; (f) = fúze s N-koncovým modulem, amp = ampicilin; *BAR* = *BIALAPHOS RESISTANCE*; CaMV *p35S* = promotor CaMV 35S; CDS = kódující sekvence; *EF1 α* = *ELONGATION FACTOR 1 ALPHA*; *GFP* = *GREEN FLUORESCENT PROTEIN*; kan = kanamycin; *NOS* = *NOPALINE SYNTHASE*; p/Pro = protomotor; spe = spektinomycin; t/Ter = terminátor; *TUA6* = *TUBULIN ALPHA 6*; *UBQ10* = *UBIQUITIN 10*; *virGN_{45D}* = gen *VirG* s mutací asparaginu na kyselinu asparagovou v pozici 54.

Tabulka 4: Seznam použitých akceptorových vektorů

Název	Popis plazmidu	Rezistence (bakterie)
pAGM1276	Úroveň 0 akceptor pro <i>eGFP</i> (NT)	spe
pAGM1301	Úroveň 0 akceptor pro <i>eGFP</i> (CT)	spe
pICH47742	Úroveň 1 akceptor, pozice 2, přímá orientace	amp
MOB2155	Úroveň 2 akceptor s modifikovanou rezistencí	spe
pSB90-		
pAGM4723_	Úroveň 2 akceptor pro zvýšenou virulenci <i>A. tumefaciens</i>	kan
<i>virGN_{45D}*</i>		

amp = ampicilin; CT = C-terminální fúze; *eGFP* = *enhanced GREEN FLUORESCENT PROTEIN*; kan = kanamycin; NT = N-terminální fúze; spe = spektinomycin; *virGN_{45D}* = gen *VirG* s mutací asparaginu na kyselinu asparagovou v pozici 54.

Použitá antibiotika

Seznam použitých antibiotik a herbicidů a jejich zásobní a použitá koncentrace se nachází v **Tab. 5**.

Tabulka 5: Seznam použitých antibiotik a herbicidů.

Antibiotikum	Zásobní koncentrace (mg·ml⁻¹)	Požadovaná koncentrace (μg·ml⁻¹)
ampicilin	100	50
kanamycin	50	25*/50
rifampicin	50	50
spektinomycin	100	100
tikarcilin	500	500
tetracyklin	50	20
fosfotricin	50	10

* koncentrace použitá pro selekci transformovaných bakterií *A. tumefaciens*

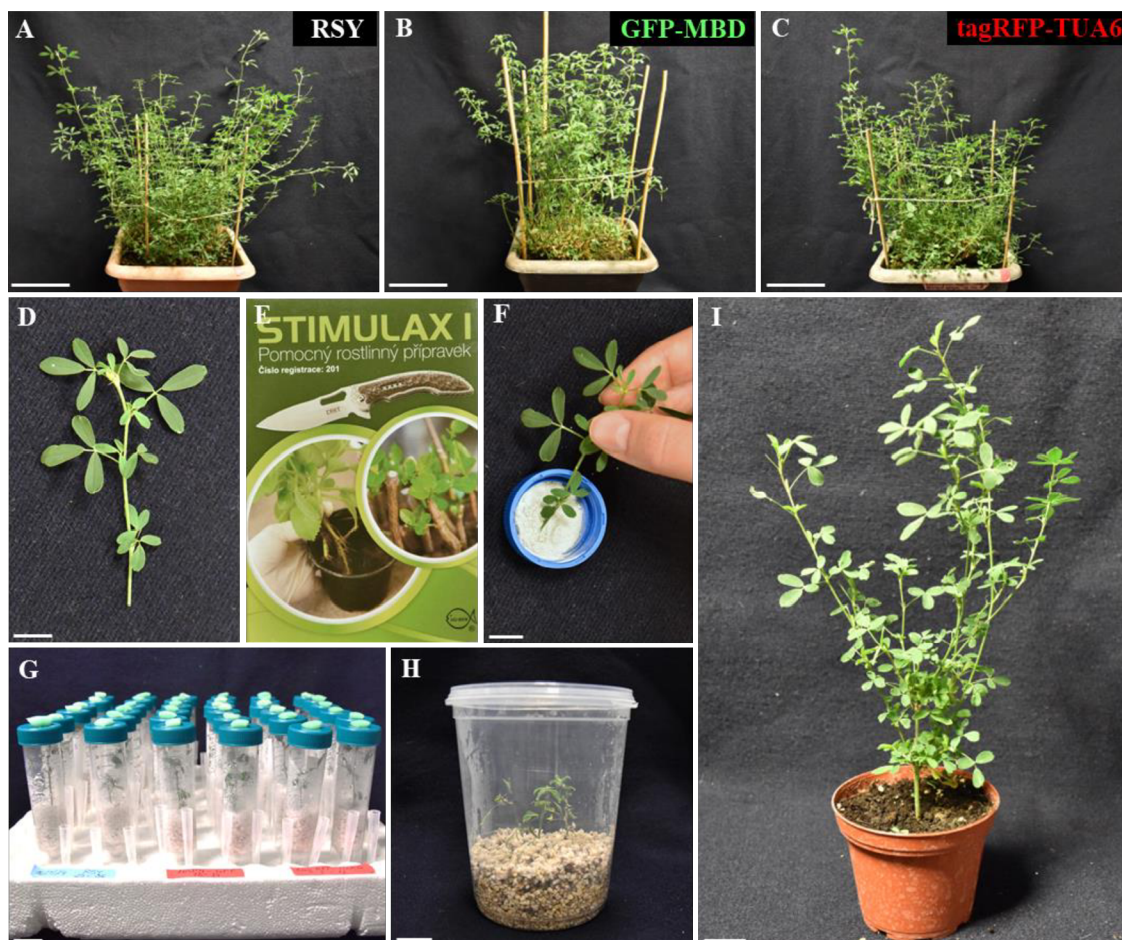
3.2 Metody

3.2.1 Příprava kultivačních médií

Chemikálie potřebné pro přípravu médií byly naváženy na předvážkách a laboratorních váhách. Za použití elektromagnetické míchačky byly chemikálie rozpuštěny v přibližně $\frac{3}{4}$ konečného objemu MilliQ vody. Kyselinami či zásadami bylo upraveno pH a objem média byl poté doplněn MilliQ vodou na finální hodnotu. Připravené médium bylo rozlito do skleněných lahví a sterilizováno autoklávováním. Po jeho vychladnutí přibližně na 60 °C byly přidány chemikálie, které by mohly být autoklávováním degradovány. Tuhá média byla rozlévána do sterilních Petriho misek.

3.2.2 Rozmnožování rostlin *M. sativa* metodou zakořenění stonkových odřezků

Z donorových rostlin *M. sativa* RSY a také z rostlin stabilně exprimujících GFP-MBD a tagRFP-TUA6 (**Obr. 4 A–C**) byly ustříhnuty jednotlivé stonky, které obsahovaly 2–3 nody, ze kterých vyrůstaly listy (**Obr. 4 D**). Ze spodní části stonku byly listy odstraněny a kousek stonku byl obalen v prášku na zakořeňování (STIMULAX I) (**Obr. 4 E,F**). Stonek byl umístěn do sterilního perlitu, který byl předem navlhčen vysterilizovanou vodou (**Obr. 4 G,H**). Plastové pěstební kyblíky či Falcon zkumavky s perlitem a odřezky byly uzavřeny a umístěny do fytotronu, kde byly nastaveny podmínky: 21 °C, vlhkost 71 % a fotoperioda 16 h světlo a 8 h tma. Po cca 10–14 dnech se začaly na konci stonku tvořit adventivní kořeny. Pro delší růst rostlin v perlitu bylo následně přidáno tekuté Fahræus médium bez N₂. Po 3–4 týdnech byly rostliny dále analyzovány nebo přesazeny z perlitu do hlíny a kultivovány ve fytotronu (**Obr. 4 I**).



Obrázek 4. Postup při zakořeňování odřezků *M. sativa*. Donorové rostliny použité pro experiment (A–C), ustřižnutá část rostliny pro zakořeňování (D), prášek s obsahem hormonů pro indukcii tvorby adventivních kořenů (E), obalení spodní části odřezku v zakořeňovacím prášku (F), odřezky umístěné v perlitu v 50ml Falcon zkumavkách (G) či v kyblíku (H), rostlina v hlíně rozmnožená zakořeňováním odřezku po přibližně 2 měsících (I). Měřítka: 10 cm (A–C), 1 cm (D,F), 2 cm (G–I).

3.2.3 Inokulace adventivních kořenů bakteriemi *S. meliloti*

Bakteriální konzervy *S. meliloti* kmen Rm2011 byly kultivovány 48 hodin v tekutém LB médiu při 28 °C a 180 otáček za minutu (RPM) ve tmě, jelikož se jedná o půdní bakterie. Po kultivaci byly bakterie centrifugovány 10 min při 2000 g, LB médium bylo odlito a pelet byl rozsuspendován v tekutém Fahræus médiu bez dusíku. Následně byly bakterie kultivovány 2–4 hodiny a poté byla měřena hodnota optické hustoty vzorku při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Kultura byla naředěna tak, aby finální OD_{600} odpovídalo hodnotě 0,5. Zakořeňené odřezky rostlin po 3–4 týdnech byly inokulovány bakteriemi pomocí sterilní pipety, kterou byla bakteriální suspenze nanášena na kořeny v perlitu. Rostliny byly ponechány ve fytotronu a proces symbiotické interakce byl průběžně mikroskopován.

3.2.4 „Golden Gate“ klonování

3.2.4.1 Amplifikace genu *eGFP*

Sekvence genu *eGFP* byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce („Polymerase chain reaction“, PCR) s využitím iProof DNA polymerázy. Pro amplifikaci byly využity primery v **Tab. 1** s obsahy rozpoznávacích míst pro enzym BpiI a 4-nukleotidovými přesahy pro příslušný akceptorový vektor úrovně 0. Komponenty v **Tab. 6** byly smíchány v mikrozkušavce a reakce byla umístěna do termocykléru s nastaveným programem (**Tab. 7**). Teplota nasedání primerů byla zjištěna pomocí webové aplikace <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>.

Tabulka 6: Složení PCR reakce pro amplifikaci *eGFP* (objem 50 μ l).

Složka reakční směsi	Výsledná koncentrace	Množství (μ l)
templát (DNA)	100 ng	x
5x iProof pufr	1x	10
10 mmol \cdot dm ⁻³ dNTP	200 μ mol \cdot dm ⁻³	1
10 μ mol \cdot dm ⁻³ Forward primer	0,5 μ mol \cdot dm ⁻³	2,5
10 μ mol \cdot dm ⁻³ Reverse primer	0,5 μ mol \cdot dm ⁻³	2,5
iProof polymeráza	1 U	0,5
MilliQ H ₂ O	-	doplnění do 50

Tabulka 7: Teplotní program PCR reakce využívající iProof DNA polymerázu.

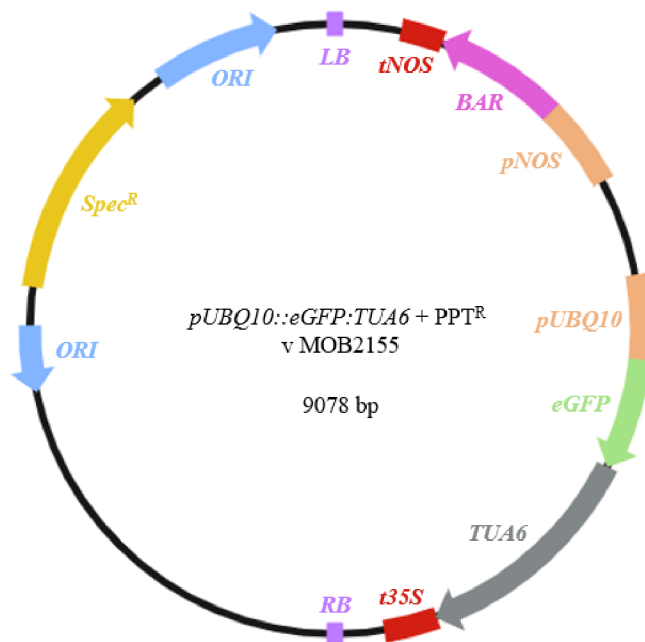
Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů	-	30 s	35
Elongace	72	30 s/kb	
Finální elongace	72	5 min	1

3.2.4.2 Plán klonování transkripčních jednotek úrovně 1

Pro přípravu molekulárních markerů tubulinu do úrovně 1 byly využity tři typy konstitutivních promotorů, a to *p35S*, *pEF1α* a *pUBQ10*. Promotory byly již připraveny v akceptorových vektorech úrovně 0 (pICSL13001 pro *p35S*, pAGM1251 pro *pUBQ10* a *pEF1α*). Jako fluorescenční značka byl zvolen nově amplifikovaný a ověřený gen *eGFP* v akceptoru úrovně 0 pro N-terminální fúzi (pAGM1276). Dále byl použit gen „*TUBULIN ALPHA 6*“ (*TUA6*, z *A. thaliana*, At4g14960.2), jež se nacházel v akceptorovém vektoru úrovně 0 pro N-terminální fúzi (pICH41308). Pro ukončení transkripce byl použit 3' UTR polyadenylační signál/terminátor z CaMV 35S (v pICH41414). Transkripční jednotky úrovně 1 vznikly spojením konstruktů úrovně 0 spolu s akceptorem úrovně 1 (pICH47742), jež zajistil jejich budoucí pozici 2 a přímou orientaci ve finálním akceptorovém vektoru úrovně 2. Byly připraveny následující transkripční jednotky úrovně 1: *p35S::eGFP:TUA6*, *pEF1α::eGFP:TUA6* a *pUBQ10::eGFP:TUA6*.

3.2.4.3 Plán klonování konstruktů úrovně 2

Do akceptoru úrovně 2 byly klonovány dvě transkripční jednotky, a to vždy jedna z variant nově připravených konstruktů úrovně 1 obsahující transkripční jednotku s *TUA6* (přímá orientace, pozice 2) spolu s transkripční jednotkou obsahující gen kódující rezistenci na fosfotricin (PPT) (reverzní orientace, pozice 1). Jako akceptorový vektor byl použit MOB2155 a pSB90-pAGM4723_*virGN*_{54D}. Pro uzavření akceptorového vektoru byl použit koncový linker 2 (pICH41744). Ukázka mapy finálního konstruktů úrovně 2 s transkripční jednotkou *pUBQ10::eGFP:TUA6* a rezistencí na PPT v akceptorovém vektoru MOB2155 se nachází na **Obr. 5**.



Obrázek 5. Mapa multigenového konstruktů úrovně 2 obsahující transkripční jednotky *pUBQ10::eGFP:TUA6* (pozice 2, přímá orientace) a *pNOS::BAR:tNOS* (pozice 1, reverzní orientace) v akceptorovém vektoru MOB2155. *BAR* = *BIALAPHOS RESISTANCE*; *eGFP* = *enhanced GREEN FLUORESCENT PROTEIN*; *LB* = levá hranice; *NOS* = *NOPALINE SYNTHASE*; *ORI* = replikační počátek bakterií; *p* = promotor; *PPT^R* = rezistence na fosfotricin; *RB* = pravá hranice; *Spec^R* = rezistence na spektinomycin; *t* = terminátor; *TUA6* = *TUBULIN ALPHA 6*, *UBQ10* = *UBIQUITIN 10*.

3.2.4.4 Příprava konstruktů úrovně 0, 1 a 2

Markery tubulinového cytoskeletu byly nejdříve navrženy *in silico* v programu „Geneious Prime“. Pro reakci byl nejdříve vypočítán poměr inzertů k akceptoru 2:1, přičemž koncentrace inzertů byla stanovena na 80 fmoles a akceptoru 40 fmoles. Jednotlivé komponenty (**Tab. 8**) byly smíchány v mikrozkušavce a reakce byla umístěna do termocykléru nastaveného na program o různých teplotách (**Tab. 9**). Pro přípravu konstruktů úrovně 1 byl využit restriční enzym BsaI a pro úroveň 0 a 2 byl použit enzym BpiI. Tyto enzymy tvoří 4-nukleotidové přesahy, které jsou následně pomocí T4 DNA ligázy spojeny do akceptorového vektoru.

Tabulka 8: Složení „Golden Gate“ klonovací reakce (celkový objem 20 μ l).

Složka reakční směsi	Výsledná koncentrace	Množství (μ l)
10x T4 pufr	1x	2
0,1% BSA		2
Akceptor	20–40 fmol	x
Inzert(y)	40–100 fmol	x
T4 DNA ligáza	200 U	1
BpiI/BsaI enzym	5 U	1
MilliQ H ₂ O	-	doplnění do 20

Tabulka 9: Teplotní program „Golden Gate“ klonovací reakce.

Krok cyklu	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Aktivace štěpení	37	20 s	1
Štěpení	37	3 min	25x
Ligace	16	4 min	
Inaktivace enzymu	50	10 min	1
Inaktivace ligázy	80	5 min	1

3.2.5 Transformace chemokompetentních bakterií *E. coli*

Zkumavky s 50 μ l alikvoty chemokompetentních bakterií *E. coli* byly vytaženy z mrazáku na -80 °C a ponechány na ledu 10 minut pro rozmrazení. Následně bylo k bakteriím přidáno 1–5 μ l reakce a směs byla inkubována 15–30 min na ledu. Vzorky byly poté umístěny do termobloku nastaveném na 42 °C po dobu 30 s (pro kmen TOP10) anebo 45 s (pro kmen DH5 α). Po uplynutí času byly zkumavky ihned umístěny na led a inkubovány 2 min. Následně bylo přidáno 300 μ l sterilního S.O.C. média a bakterie byly inkubovány horizontálně na třepačce 1,5 h při 37 °C a 200 RPM.

3.2.6 Kultivace bakterií *E. coli* a selekce kolonií nesoucích požadovaný konstrukt

Na sterilní Petriho misky bylo nalito tuhé LB médium s příslušným selekčním antibiotikem (**Tab. 4**) o požadované koncentraci (**Tab. 5**) pro selekci bakterií *E. coli* obsahujících transformovaný konstrukt. Pro rozlišení prázdných vektorů od vektorů se zaklonovaným inzertem u konstruktů úrovně 0 a 1 byla využita modrobílá selekce, proto bylo na LB médium před rozetřením bakterií sterilní hokejkou nanášeno 40 μ l IPTG a 120 μ l X-gal. Pro konstrukty úrovně 2 byla využita červenobílá selekce, jež nevyžaduje přidání induktoru a substrátu na médium. Na připravené LB médium bylo následně rozetřeno 150 μ l transformační směsi bakterií pomocí hokejky. Misky byly inkubovány při 37 °C přes noc. Druhý den bylo do sterilních Falcon zkumavek připraveno 5–10 ml

tekutého LB média se stejným selekčním antibiotikem. Do každé Falcon zkumavky byla přenesena jedna bílá kolonie *E. coli* pomocí sterilního párátko. Odpíchnuté kolonie ve Falcon zkumavkách byly inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C a 200 RPM.

Druhý den bylo odpipetováno 500 µl kultury do sterilních 2ml Eppendorf zkumavek spolu s 500 µl kultury 50% (v/v) glycerolu. Směs byla rozsuspendována a zamrzána v tekutém dusíku. Bakteriální konzervy byly uloženy do mrazáku na -80 °C. Ze zbytku kultury byla izolována plazmidová DNA (pDNA).

3.2.7 Izolace plazmidové DNA z bakterií *E. coli*

3.2.7.1 Izolace pomocí roztoků P1, P2, P3

Z připravených kultur ve Falcon zkumavkách bylo do Eppendorf zkumavek přeneseno 2 ml kultury. Zkumavky byly centrifugovány při pokojové teplotě 3 minuty při 3000 g. Následně byl odlit supernatant a pelet byl rozsuspendován v 250 µl roztoku P1, do něhož byl před použitím přidán 1 µl RNAsy H na 1 ml roztoku. Následně bylo přidáno 250 µl P2 roztoku, zajišťující lýzi buněk a poté bylo přidáno 250 µl P3 roztoku, jež slouží k neutralizaci a vysrážení buněčných stěn. Zkumavky byly centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 10 min při 15000 g. Po dokončení centrifugace bylo přidáno 750 µl isopropanolu pro vysrážení DNA a zkumavky byly ponechány stát při pokojové teplotě na 5 min. Poté byly zkumavky opět centrifugovány 10 min při 15000 g. Supernatant byl odlit, pelet byl rozsuspendován v 1 ml předchlazeného 75% ethanolu a následně byly zkumavky centrifugovány při pokojové teplotě 5 min při 5200 g. Supernatant byl odlit a zkumavky byly ponechány otevřené pro odpaření zbytků ethanolu. Ke vzorkům bylo přidáno 50 µl H₂O bez obsahu DNAsy/RNAsy. Po dokončení izolace byla změřena koncentrace pDNA pomocí NanoDrop-u. Následně byla ověřena pDNA pomocí restričního štěpení a případně sekvenováním. Vzorky byly skladovány v mrazáku při -20 °C.

3.2.7.2 Izolace pomocí „QIAprep Spin Miniprep“ kitu

Z kultur ve Falcon zkumavkách byla izolována pDNA za použití komerčního kitu, který obsahuje chemikálie a postup k izolaci. Zkumavky byly centrifugovány při pokojové teplotě 3 minuty při 3000 g. Supernatant byl odlit a pelet byl rozsuspendován v 250 µl P1 roztoku obsahující RNAsu H. Následně bylo přidáno 250 µl roztoku P2 a nakonec 350 µl roztoku N3. Zkumavky byly centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 10 min

při 15000 g. Supernatant byl poté přenesen do kolonek určených k zachycení pDNA, které byly následně centrifugovány 1 min při 5000 g. Protečená tekutina ve spodní část kolonek byla odlita. Do kolonky bylo přidáno 750 μ l roztoku PE a kolonky byly opět centrifugovány 1 min při 5000 g a protečená tekutina byla opět odlita. Zbytky PE pufru byly odstraněny další centrifugací. Kolonky obsahující pDNA byly přeneseny do čisté zkumavky, kde byla provedena eluce pDNA pomocí 50 μ l PCR H₂O při centrifugaci 1 min a 5000 g. Po dokončení izolace byla změřena koncentrace pDNA pomocí NanoDrop-u. Následně byla ověřena pDNA pomocí restriční štěpení a případně sekvenováním. Vzorky byly skladovány v mrazáku při -20 °C.

3.2.8 Restriční štěpení a agarózová elektroforéza

Připravené konstrukty, které byly izolovány z *E. coli* byly ověřeny pomocí štěpení restričními enzymy, navrhnuté v programu Geneious Prime. Komponenty reakční směsi (**Tab. 10**) byly smíchány v mikrozkuhavce a následně byla směs inkubována 1 hod při 37 °C.

Tabulka 10: Složení reakční směsi restriční štěpení pDNA izolované z *E. coli* (celkový objem 20 μ l).

Složka reakční směsi	Výsledná koncentrace	Množství (μ l)
pDNA	200-300 ng	x
enzym		0,5
10x pufr	1x	2
MilliQ H ₂ O		doplnění do 20

V mikrovlnné troubě byl připraven 1% agarózový gel. 1 g agarózy byl rozpuštěn v 100 ml 1x TAE pufu a do rozpuštěné agarózy byl přidán 1 μ l interkalačního barviva Midori Green po pozdější vizualizaci DNA. Agaróza byla nalita do připravené formy na gel obsahující hřebínek pro vytvoření požadovaného počtu jamek a byla ponechána asi 20 min ve formě, aby úplně zatuhla. Po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany a zalit 1x TAE pufrem. Na konec byl z gelu opatrně vytáhnout hřebínek.

Po uplynutí času restrikčního štěpení bylo k reakcím přidáno barvivo 6x DNA loading dye (2 μ l barviva/10 μ l vzorku). Do první jamky byl nanesen marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Následně byly do dalších jamek pipetovány připravené reakce. Elektrické napětí pro separaci DNA bylo nastaveno na 80–100 V s délkou separace přibližně 40 min. Po dokončení separace byly fragmenty DNA vizualizovány pomocí UV transiluminátoru GelDoc™ EZ Imager.

3.2.9 Transformace chemokompetentních buněk *A. tumefaciens*

Zkumavky s 100 μ l alikvoty chemokompetentních bakterií *A. tumefaciens* (kmen GV3101) byly vybrány z mrazáku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ponechány na ledu 10 minut na rozmrazení. Následně bylo k bakteriím přidáno 5–10 μ l pDNA a směs byla inkubována 30–40 min na ledu. Vzorky byly poté vymrazovány tekutým dusíkem po dobu 5 min. Poté byly vzorky ponechány 15 minut při pokojové teplotě. Následně bylo k buňkám pipetováno 400 μ l sterilního S.O.C. média a bakterie byly inkubovány horizontálně na třepačce 2 h při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 RPM ve tmě. Na sterilní Petriho misky bylo nalito tuhé LB médium s příslušným selekčním antibiotikem (**Tab. 4**) o požadované koncentraci (**Tab. 5**) a rifampicinem o koncentraci $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na médium bylo rozetřeno 150 μ l bakterií sterilní hokejkou. Misky byly inkubovány 2 dny při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve tmě.

3.2.10 Ověření úspěšnosti transformace pomocí „Colony PCR“

Pro ověření úspěšnosti transformace pDNA do *A. tumefaciens* byla použita „Colony PCR“. Komponenty reakční směsi byly (**Tab. 11**) smíchány v mikrozkušavce. Pro ověření přítomnosti transformovaného konstruktů do *A. tumefaciens* byly použity primery pro amplifikaci genu *TUA6* (z *A. thaliana*) (**Tab. 2**). Do reakční směsi bylo přidáno malé množství bakterií z jedné kolonie pomocí sterilní špičky pipety. U negativní kontroly byla použita reakční směs bez kolonie. Připravená reakce byla umístěna do termocykléru s programem uvedeným v **Tab. 12**. Teplota nasedání primerů byla zjištěna individuálně.

Tabulka 11: Složení reakce pro „Colony PCR“ (celkový objem 10 μl).

Složka reakční směsi	Množství (μl)
MilliQ H_2O	5,6
5x Phire pufr	2
10 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dNTPs	0,2
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Forward primer	1
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Reverse primer	1
Phire polymeráza	0,2

Tabulka 12: Teplotní program termocykléru pro „Colony PCR“ s využitím Phire polymerázy.

Krok cyklu	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	5 s	
Nasedání primerů	x	5 s	35x
Prodlužování	72	1 min	
Konečné prodlužování	72	1 min	1

3.2.11 Tranzientní transformace listů *N. benthamiana*

Po ověření kolonií pomocí „Colony PCR“ byly kolonie obsahující gen *TUA6* přeneseny do Falcon zkumavek s 10 ml tekutého LB média s příslušným selekčním antibiotikem (Tab. 3 a 4) o požadované koncentraci (Tab. 5) a rifampicinem o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kultury byly umístěny na třepačku a kultivovány při 28°C , 180 RPM přes noc ve tmě spolu s malým množstvím média s antibiotiky bez bakterií, které následně sloužilo jako „blank“. Druhý den bylo měřeno OD_{600} bakterií, přičemž požadovaná hodnota absorbance byla v rozsahu 0,5–1. Po dosažení optimální absorbance byly připraveny bakteriální konzervy dle postupu v kapitole 3.2.6 a zbytek byl použit na tranzientní transformaci listů *N. benthamiana*.

Minimálně 2 h před samotnou transformací listů *N. benthamiana* byly rostliny zality, aby došlo k otevření průduchů v listech. U připravených kultur bylo počítáno množství kultury tak, aby ve výsledném objemu 2 ml bylo OD_{600} 0,5. Vypočítané množství kultury bylo pipetováno do sterilní 2ml zkumavky. Vzorky byly následně centrifugovány po dobu 6 min při 3000 g a 4°C . Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozsuspendován ve 2 ml kokultivačního média. Připravená bakteriální suspenze byla inkubována 2 hod ve tmě při pokojové teplotě.

Po skončení doby inkubace byla suspenze bakterií infiltrována do abaxiální strany listů *N. benthamiana*. Jako negativní kontrola bylo použito čisté kokultivační médium.

Rostliny byly ponechány ve tmě a druhý den ráno byly přeneseny do fytotronu. Po 48 h od transformace byly listy mikroskopovány.

3.2.12 Pozorování a kvantitativní analýza intenzity fluorescence v mikroskopu

Pro pozorování a kvantitativní vyhodnocení intenzity fluorescence byly použity snímky tranzientně transformovaných listů *N. benthamiana* pořízené na CLSM. Porovnávány byly připravené *TUA6* konstrukty úrovně 2 pro vizualizaci mikrotubulů obsahující *GFP* a *eGFP* pod kontrolou promotorů *p35S*, *pEF1 α* a *pUBQ10*. U každé varianty bylo analyzováno 5 epidermálních buněk. Jejich plocha a intenzita fluorescence byla vypočítána pomocí softwaru ZEN blue. Ze získaných hodnot byla provedena statistická analýza pomocí Studentova T-testu a ANOVA s Tukey HSD testu.

3.2.13 Sterilizace listů *M. sativa*

Zdravé listy, které pocházely z 2–5 nodu rostliny *M. sativa* RSY v *ex vitro* podmínkách byly uštěřeny a dány do Falcon zkumavky s vodou. Listy byly přeneseny do Falcon zkumavky obsahující 70% ethanol na 5–10 sekund. Následně byly listy dány do Falcon zkumavky se sterilním 0,1% roztokem (w/v) Tweenu 20, kde byly ponechány asi 5 minut za neustálého protřepávání. Poté byly listy přesunuty do Falcon zkumavky s 0,05% Tween 20 a 1% (v/v) chlornanem sodným. Listy byly v roztoku protřepávány po dobu 1,5 min a po uplynutí doby byly opatrně vyjmuty, 3x promyty ve sterilní destilované vodě a následně vysušeny na sterilním filtračním papíru.

3.2.14 Somatická embryogeneze *M. sativa*

Listy osušené na filtračním papíru byly pomocí sterilních nůžek odstřiženy od řapíku a nastříhány na polovinu. Části listů byly pomocí sterilní pinzety přeneseny na Petriho misky s nalitým kalus-indukujícím B5H médiem. Misky byly zalepeny páskou a kultivovány přibližně měsíc v kultivační komoře. Přibližně po měsíci se z listů vytvořily kalusy, které byly následně přenášeny na embryogenní B50 médium. Po cca 3 týdnech se na kalusech začaly postupně tvořit somatická embrya, která byla v kotyledonárním stádiu přenášena na MMS médium. Zde byla embrya ponechána přibližně 5–7 dní, aby došlo k indukci růstu primárního kořene. Následně byla embrya s kořeny přenášena na MS médium, kde byly dále kultivovány.

3.2.15 Transformace listových explantátů *M. sativa*

Do Falcon zkumavek s tekutým LB médiem obsahující příslušné selekční antibiotikum (**Tab. 4**) o požadované koncentraci (**Tab. 5**) a rifampicin o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo přidáno 30 μl z hluboce zmrazených glycerolových konzerv *A. tumefaciens* GV3101 nesoucích připravené plazmidy s molekulárními markery pro mikrotubuly. Kultury byly inkubovány přes noc na třepačce při 28 °C, 180 RPM ve tmě. Druhý den bylo měřeno OD₆₀₀ bakterií a následně byly kultury naředěny tak, aby v celkových 15 ml SH roztoku bylo OD₆₀₀ 0,7. Kultury byly centrifugovány při 3 000 g po dobu 5 min. Poté byl odlit supernatant a pelet byl jemně rozsuspendován v 3 ml LB média. Bakteriální suspenze byly smíchány s 12 ml SH média ve sterilních Falcon zkumavkách.

Vysterilizované a nastříhané listy *M. sativa* RSY byly přeneseny do SH média s bakteriemi a následně byly inkubovány vodorovně za stálého kývání na třepačce (20 RPM) při pokojové teplotě 30 min ve tmě. Následně byly listy z SH média osušeny na sterilním filtračním papíru a přeneseny na médium B5H bez přídavku antibiotik pro úspěšnou ko-kultivaci s bakteriemi. Petriho misky byly zapáskovány a přeneseny do kultivační komory, kde byly zakryty filtračním papírem tak, aby nebyly vystaveny přímému světlu.

Po 7 dnech ko-kultivace listů s bakteriemi byly explantáty promyty ve sterilní dH₂O, osušeny na sterilním filtračním papíru a umístěny na médium B5H s fosfotricinem pro selekci transgenních buněk a tikarcilinem pro zamezení růstu *A. tumefaciens* o příslušných koncentracích (**Tab. 5**). Petriho misky byly uzavřeny páskou a kultivovány 3–4 týdny, kdy docházelo k tvorbě kalusů. Kalusy byly následně přeloženy na embryogenní B50 médium s fosfotricinem a tikarcilinem. Po třech a více týdnech došlo k vytvoření somatických embryí, které byly překládány na MMS médium a následně na MS médium. Přenášení na čerstvé MS médium bude následně probíhat přibližně každé 2 týdny pro zajištění dostupnosti živin. Všechny Petriho misky byly kultivovány při 21 °C, 71 % vlhkosti a fotoperiodě 16 h světlo, 8 h tma. Následná selekce transformovaných rostlin bude provedena pomocí pozorování fluorescence a mikrotubulů v CLSM.

3.2.16 Příprava preparátů pro mikroskopii

Při mikroskopickém pozorování tranzientně transformovaných listů *N. benthamiana* byla inokulovaná část listu ustřížena a položena do pár kapek vody na podložní sklíčko a přikryta krycím sklíčkem.

Při pozorování kořenů *M. sativa* byl kořen ustřižen a položen do pár kapek sterilního tekutého ½ MS média či vody a opatrně zakryt krycím sklíčkem. Pro lepší stabilitu preparátu byla vytvořena mikroskopická komůrka, kdy byly na kraje podložního sklíčka nalepeny pásy oboustranné lepicí pásy a po překrytí krycím sklíčkem byly okraje zafixovány kousky parafilmu. Bylo tak také zabráněno rozmáčknutí kořene a zároveň přebytečnému vysychání média.

3.2.17 Podmínky snímání

Pro snímání v CLSM byly použity následující lasery: laser pro mRFP a tagRFP: 561 nm a pro GFP: 488 nm. Použity byly následující filtry: filtr pro mRFP a tagRFP: 581–639 nm, GFP: 493–549 nm.

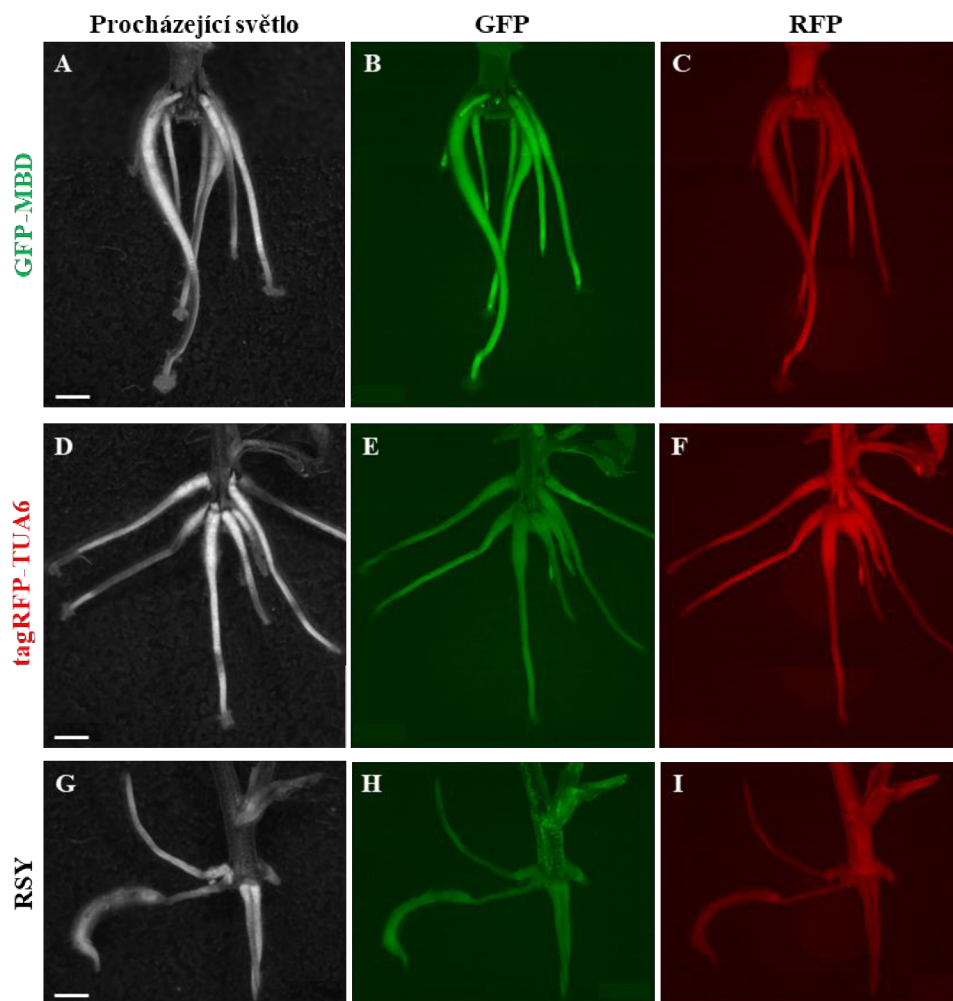
4 VÝSLEDKY

Kapitola Výsledky je rozdělena na dvě části. První část je zaměřena na ověření metody pro vegetativní rozmnožování transgenních rostlin *M. sativa*, které exprimují molekulární markery tubulinového cytoskeletu. Zde jsou prezentovány výsledky mikroskopické analýzy adventivních kořenů, při které byla zkoumána organizace a dynamika mikrotubulů vizualizovaných markerem GFP-MBD. V této části jsou také zahrnuty výsledky z mikroskopie adventivních kořenů při interakci se *S. meliloti*. Druhá část je věnována přípravě a ověření nových markerů tubulinu s genem kódujícím eGFP pod kontrolou třech různých konstitutivních promotorů pomocí metody klonování „Golden Gate“. Tato část zahrnuje také statistické porovnání intenzity fluorescence dříve připravených markerů s *GFP* s nově připravenými markery s *eGFP*. Část věnující se přípravě markerů je zakončena stabilní transformací nově připravených markerů do *M. sativa*.

4.1 Mikroskopická analýza adventivních kořenů *M. sativa*

4.1.1 Potvrzení fluorescence u adventivních kořenů *M. sativa* s markery pro mikrotubuly

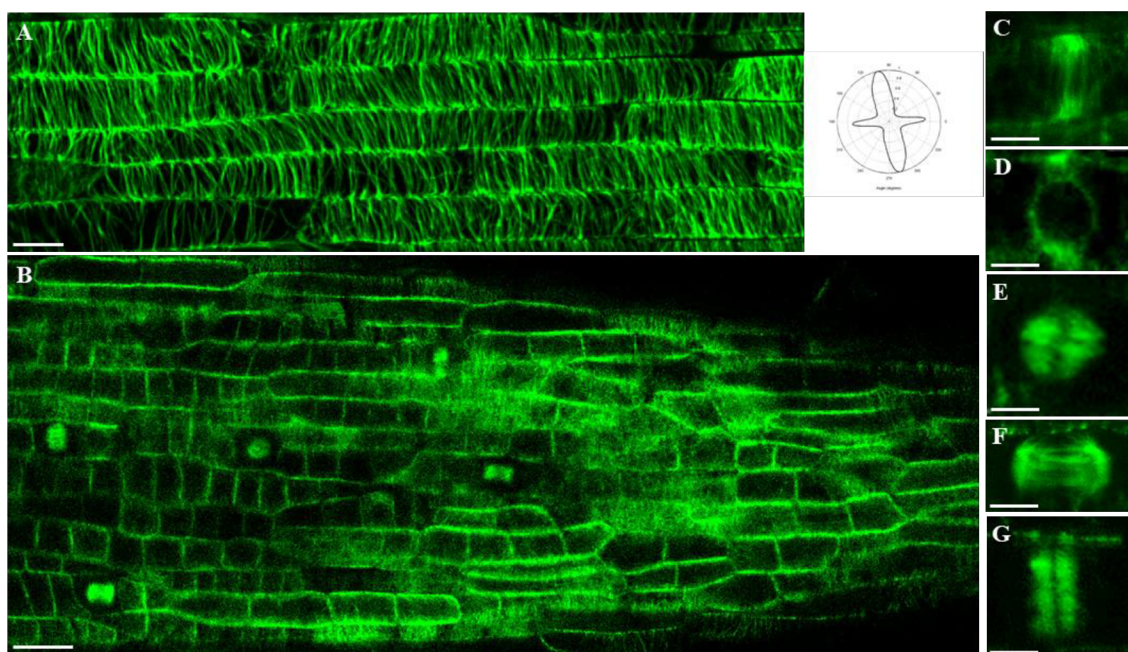
Adventivní kořeny ze stonkových odřezků *M. sativa* byly po 14 dnech od indukce jejich tvorby mikroskopovány pomocí mikroskopu Axio Zoom.V16 pro potvrzení fluorescence u jednotlivých linií stabilně exprimujících molekulární fluorescenční markery pro mikrotubuly. **Obr. 6** představuje přehled reprezentativních snímků adventivních kořenů u linií GFP-MBD, tagRFP-TUA6 a porovnání s kontrolní rostlinou. U rostlin exprimujících marker GFP-MBD byl potvrzen zelený fluorescenční signál a u rostlin exprimujících marker tagRFP-TUA6 byl potvrzen červený fluorescenční signál.



Obrázek 6. Adventivní kořeny na zakořeněných stonkových odřezcích *M. sativa* po 14 dnech v perlitu snímány pomocí Zoom mikroskopu. Rostlina exprimující marker GFP-MBD (A–C), rostlina exprimující marker tagRFP-TUA6 (D–F), kontrolní rostlina RSY (G–I). Rostliny byly foceny v procházejícím světle (A,D,G), v GFP kanálu (B,E,H) a v RFP kanálu (C,F,I). Měřítka: 2 mm.

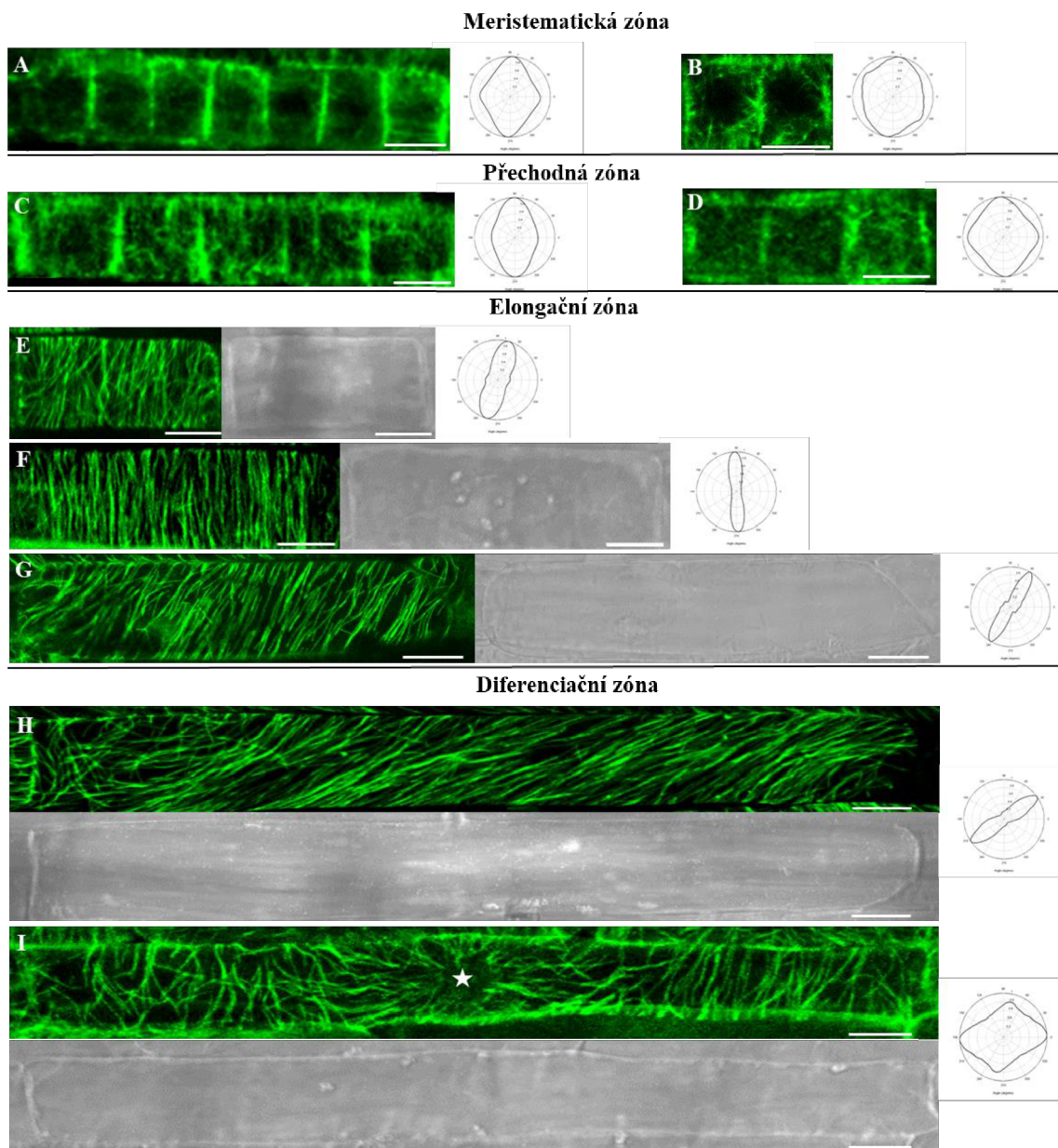
4.1.2 Mikroskopická analýza orientace mikrotubulů v adventivních kořenech

Adventivní kořeny rostlin exprimující molekulární markery pro mikrotubuly byly dále mikroskopovány pomocí konfokálního mikroskopu LSM 710, přičemž byla zkoumána distribuce a orientace mikrotubulů ve všech vývojových zónách adventivních kořenů. Jelikož signál u tagRFP-TUA6 linie byl velmi slabý a difuzní, byla pro analýzu použita pouze linie exprimující marker GFP-MBD. Pro přehlednou ukázkou orientace mikrotubulů v jednotlivých buňkách byly vytvořeny grafy v programu „CytoSpectre“. Na povrchu kořenové špičky, konkrétně v buňkách laterální kořenové čepičky byla pozorována paralelní organizace kortikálních mikrotubulů, které byly orientovány kolmo k ose prodlužování buňky (**Obr. 7 A**). V meristematické zóně kořene bylo možné pozorovat dělící se buňky (**Obr. 7 B**) díky vizualizaci mikrotubulů v jednotlivých stádiích dělení: začátek vývoje pre-profázního svazku (**Obr. 7 C**), pre-profázní svazek (**Obr. 7 D**), metafázní dělicí vřeténko (**Obr. 7 E**), anafázní dělicí vřeténko (**Obr. 7 F**) a fragmoplast v anafázi (**Obr. 7 G**).



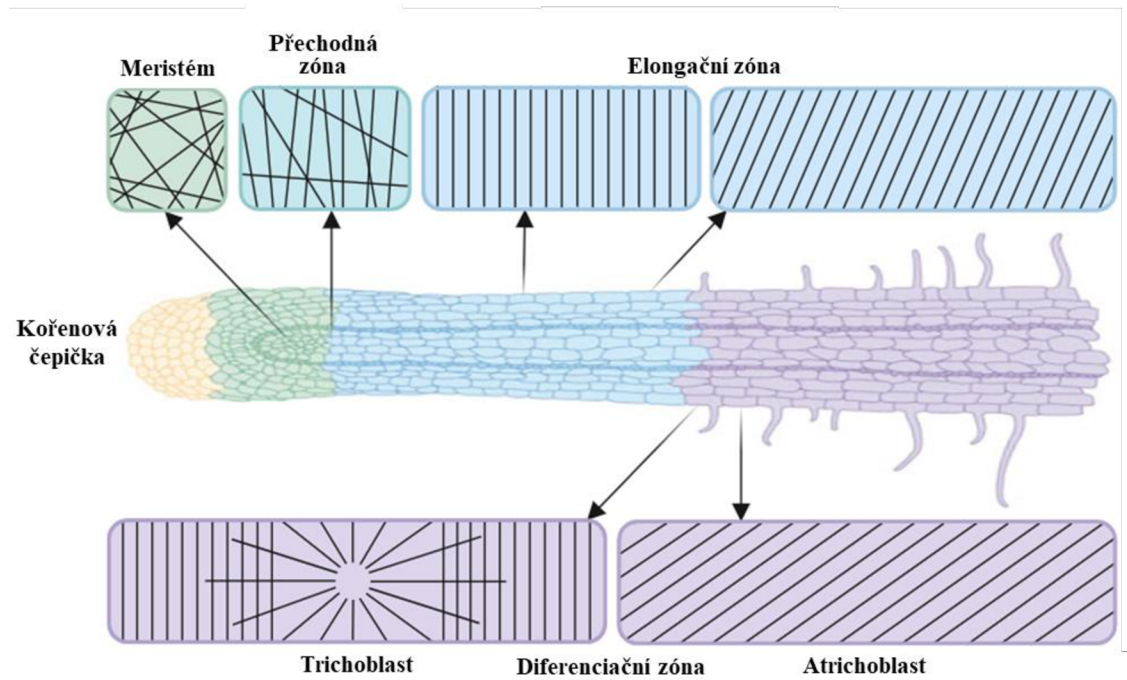
Obrázek 7. Snímky ze špičky adventivního kořene *M. sativa* exprimujícího marker GFP-MBD pořízené pomocí CLSM. Buňky laterální kořenové čepičky s grafem orientace mikrotubulů (**A**), přehled meristematické zóny (**B**), mikrotubuly v dělicích se buňkách ve fázi: pre-profázní svazek (**C**, **D**), metafázní dělicí vřeténko (**E**), anafázní dělicí vřeténko (**F**), fragmoplast v telofázi (**G**). Buňky byly snímány v GFP kanálu. Graf vedle obrázku znázorňuje orientaci kortikálních mikrotubulů. Použitý objektiv: Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27 (**A,C-G**), Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 (**B**); měřítka: 10 μm (**A,B**), 5 μm (**C-G**).

U buněk v interfázi v meristemické zóně a také u buněk v přechodné zóně adventivních kořenů byla pozorována nepravidelná organizace kortikálních mikrotubulů (**Obr. 8 A–D**). U prodlužujících se buněk na začátku elongační zóny adventivních kořenů byly pozorovány kortikální mikrotubuly v paralelní organizaci, orientovány převážně kolmo k ose prodlužování buňky (**Obr. 8 E,F**). U konce elongační zóny byly kortikální mikrotubuly orientovány spíše šikmo (**Obr. 8 G**). V zóně diferenciační se u atrichoblastů (buňky, které nevytvářející kořenový vlásek) kortikální mikrotubuly organizovaly paralelně a šikmo (**Obr. 8 H**), zatímco u trichoblastů (buňky, které vytvářejí kořenový vlásek) byla pozorována orientace kortikálních mikrotubulů kolmo k dlouhé ose buňky a zároveň se tvořily paprsky mikrotubulů v místě, kde se začínal vytvářet kořenový vlásek (**Obr. 8 I**). Z pozorování bylo také zjištěno, že u adventivních kořenů *M. sativa* vyrůstají kořenové vlásky přibližně ze středu trichoblastů.



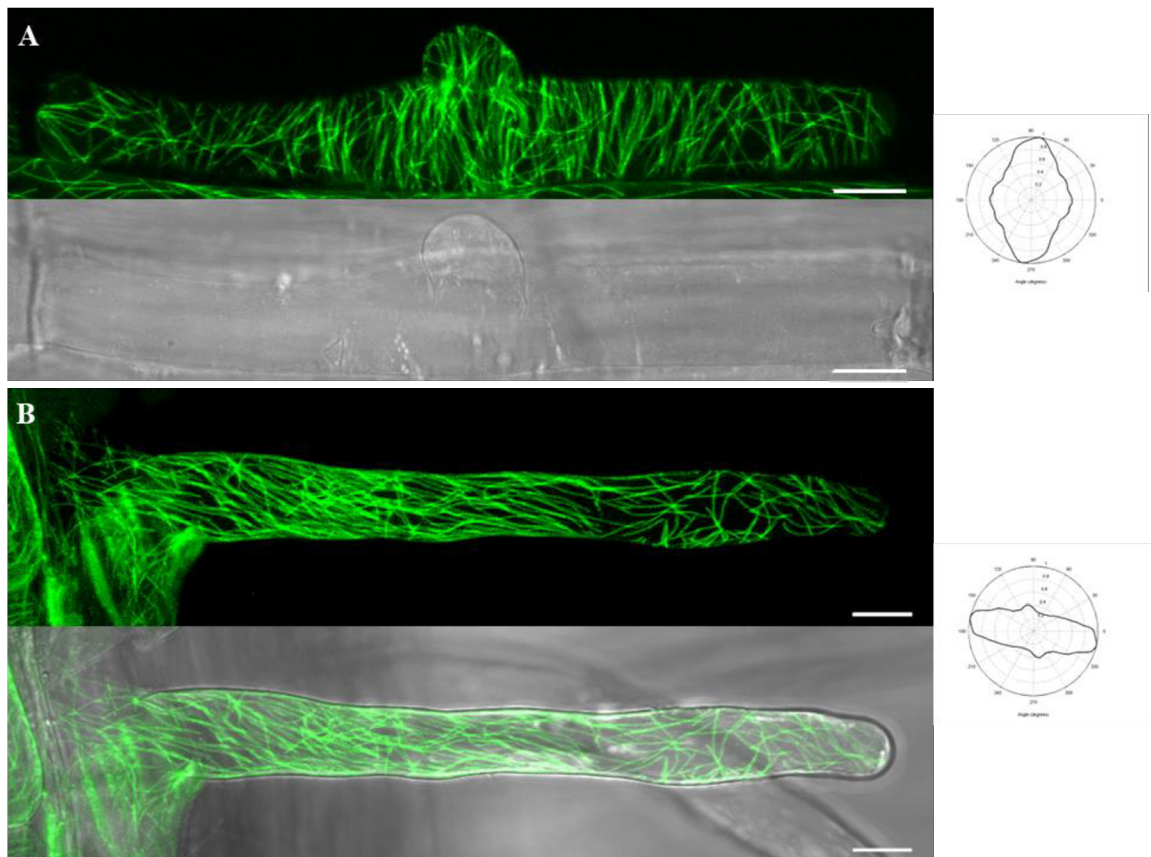
Obrázek 8. Přehledové snímky orientace kortikálních mikrotubulů v jednotlivých zónách adventivního kořene *M. sativa* exprimujícího marker GFP-MBD pořízené pomocí CLSM. Epidermální buňky meristematické zóny (A,B), přechodné zóny (C,D), elongační zóny (E,F,G) a diferenční zóny (atrichoblast v H, trichoblast v I, hvězdička označuje místo iniciace kořenového vlásku). Buňky byly snímány v GFP kanálu a v procházejícím světle. Grafy vedle obrázků znázorňují orientaci kortikálních mikrotubulů. Použitý objektiv: Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27; měřítko: 10 μm .

Na základě pořízených snímků bylo vytvořeno přehledné schéma orientace kortikálních mikrotubulů v jednotlivých vývojových zónách adventivního kořene *M. sativa* (**Obr. 9**). Vývojové zóny adventivního kořene na **Obr. 9** jsou odlišeny barevně pro lepší orientaci. Buňky kořenové čepičky jsou zobrazeny žlutou barvou, meristematická zóna je znázorněna zeleně, zóna elongační je zobrazena modře a diferenciační fialově. Z jednotlivých zón vede šipka k jednotlivým buňkám, ve kterých je černě znázorněna orientace kortikálních mikrotubulů.



Obrázek 9. Schéma organizace mikrotubulů v adventivních kořenech *M. sativa* sestavené na základě pořízených snímků v jednotlivých vývojových zónách kořene. Obrázek byl vytvořen v BioRender.com.

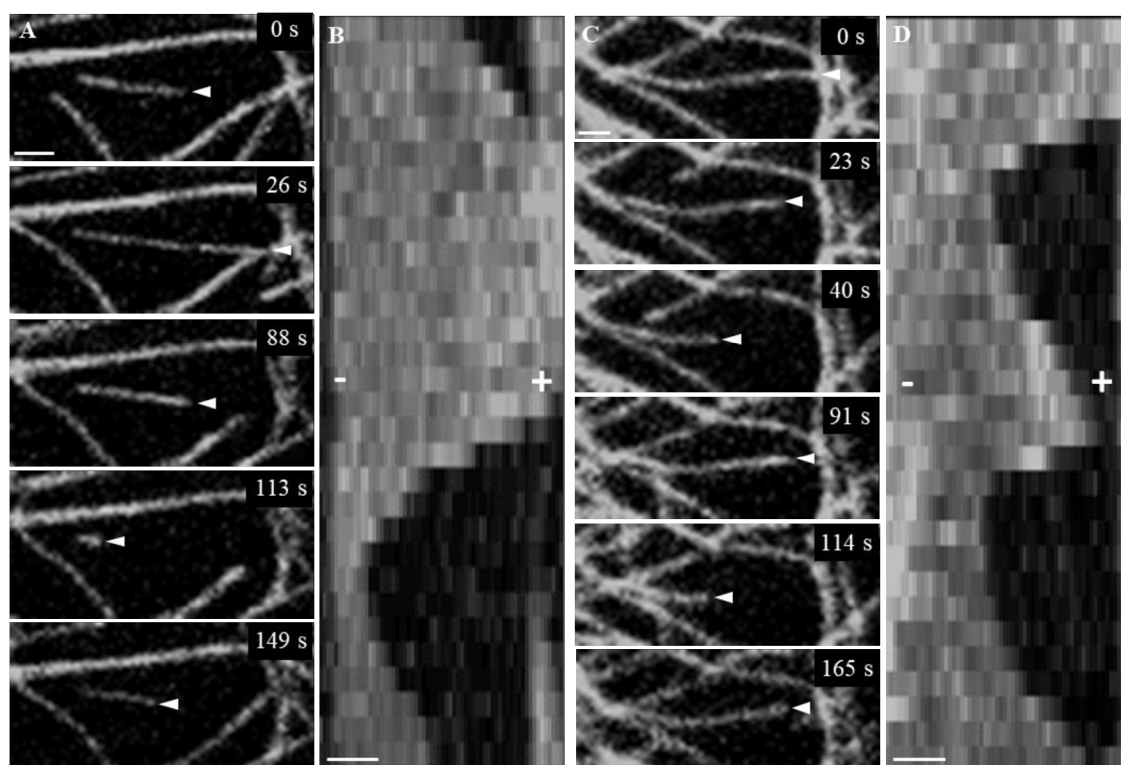
Následně byla zkoumána organizace mikrotubulů v kořenových vláscích adventivních kořenů. Uspořádání kortikálních mikrotubulů v rostoucích kořenových vláscích je zobrazeno na **Obr. 10**. Na začátku růstu vlásku (**Obr. 10 A**) byly mikrotubuly orientovány převážně kolmo k ose prodlužování trichoblastu. U rostoucích kořenových vlásků (**Obr. 10 B**) byly kortikální mikrotubuly v bazální části vlásku orientovány paralelně ve směru jeho růstu a ve špičce vykazovaly spíše síťové a nepravidelné uspořádání.



Obrázek 10. Snímky kortikálních mikrotubulů v kořenových vláscích adventivního kořene *M. sativa* exprimujícího marker GFP-MBD pořízené pomocí CLSM. Začátek růstu kořenového vlásku (**A**), rostoucí kořenový vlásek (**B**). Buňky byly snímány v GFP kanálu a v procházejícím světle. Grafy vedle obrázků znázorňují orientaci kortikálních mikrotubulů. Použitý objektiv: Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27; měřítka: 10 μm (**A**), 20 μm (**B**).

4.1.3 Dynamika kortikálních mikrotubulů v adventivních kořenech linie GFP-MBD

Pro dokumentaci dynamiky kortikálních mikrotubulů v adventivních kořenech *M. sativa* exprimující marker GFP-MBD byly snímány buňky ze začátku diferenciační zóny adventivního kořene v různých časech pomocí konfokálního mikroskopu LSM 710. **Obr. 11 A a 11 C** zobrazují jednotlivé mikrotubuly v buňkách adventivních kořenů *M. sativa*, přičemž jejich více dynamický „plus“ konec je označen bílým trojúhelníkem. Ze snímků byly následně v programu ImageJ za použití pluginu „MultipleKymograph“ sestaveny kymografy (**Obr. 11 B a 11 C**), jež názorně ukazují růst a zkracování mikrotubulů na jejich „plus“ konci. Přibližná rychlost růstu kortikálních mikrotubulů v adventivních kořenech u této linie byla 4 $\mu\text{m}/\text{min}$.

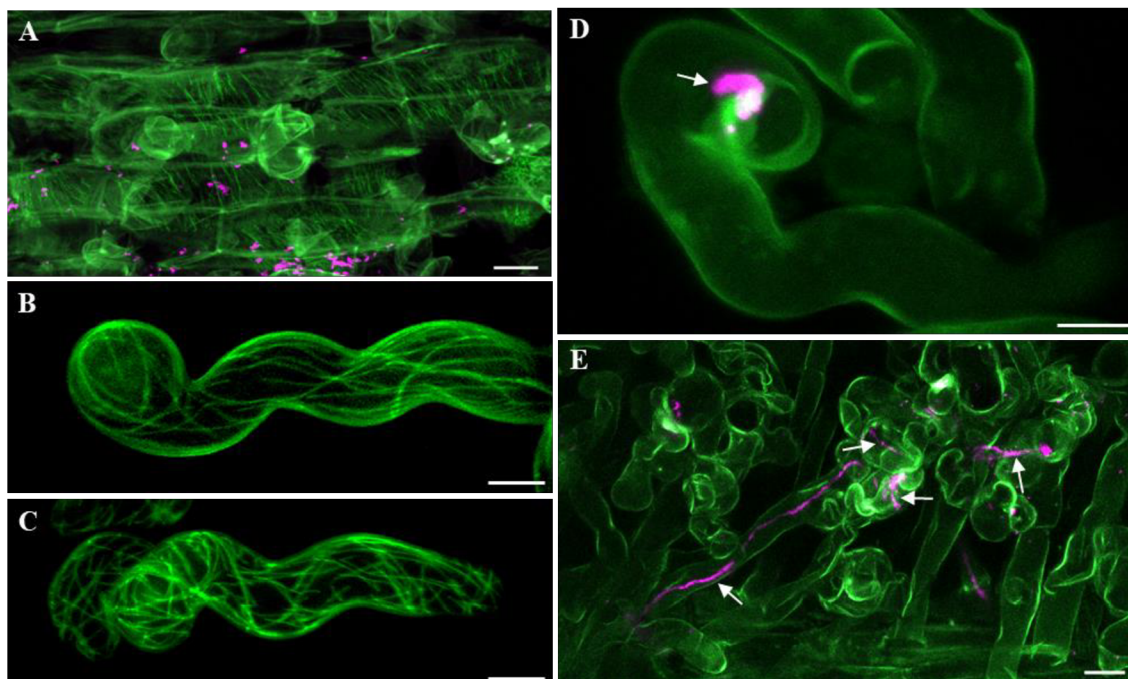


Obrázek 11. Časoběrné 2-D snímky kortikálních mikrotubulů v adventivních kořenech *M. sativa* exprimujících marker GFP-MBD pořízené pomocí CLSM a příslušné kymografy zobrazující jejich dynamický růst a zkracování. Snímky jednotlivých mikrotubulů v určitých časech (s) zobrazující dynamiku na jejich „plus“ konci (bílý trojúhelník) (**A,C**), kymografy s anotacemi „plus“ a „minus“ konců mikrotubulů. (**D,B**). Buňky byly snímány v GFP kanálu. Použitý objektiv: alpha Plan-Apochromat 63x/1.46 Oil Korr M27; měřítko: 1 μm .

4.1.4 Mikroskopické pozorování adventivních kořenů při symbiotické interakci se *S. meliloti*

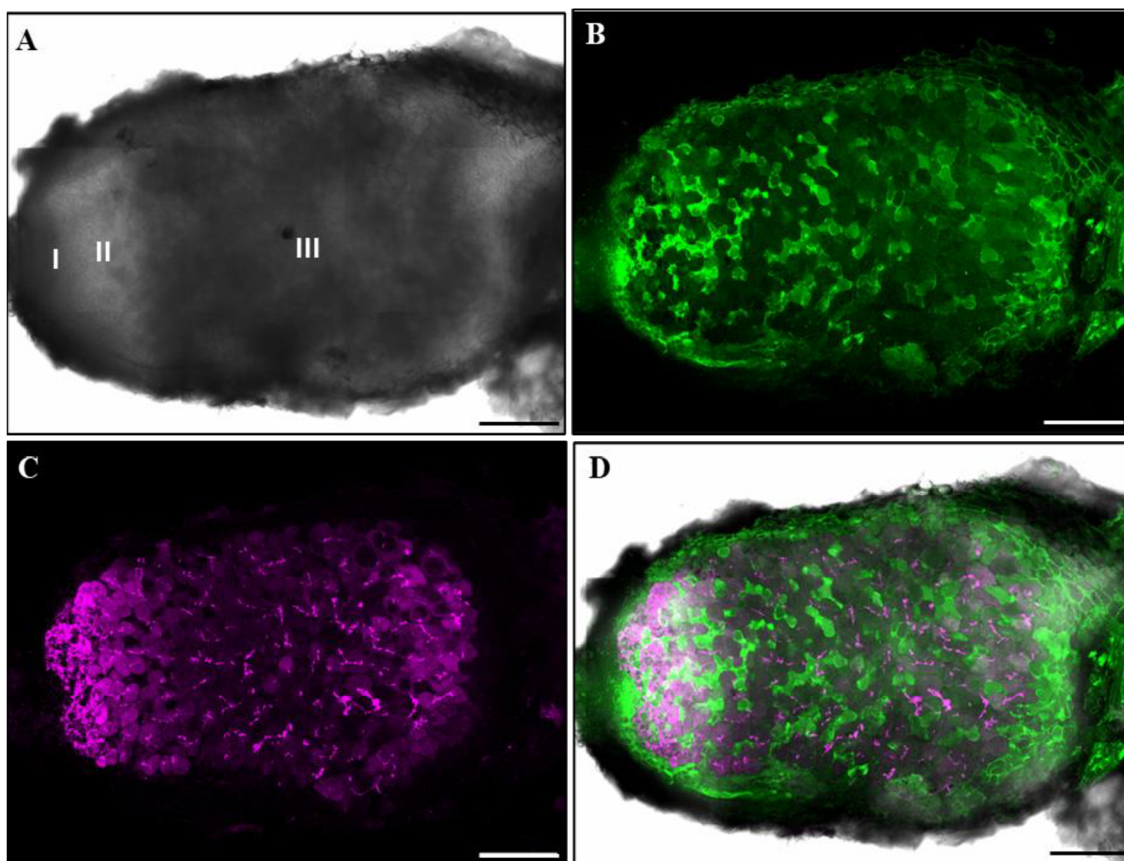
Pro studium brzkých fází symbiotické interakce byla provedena mikroskopická pozorování v určitých časových intervalech po inokulaci adventivních kořenů *M. sativa* exprimujících marker GFP-MBD fluorescenčně-značenými bakteriemi *S. meliloti*. Bakterie byly přidány v tekutém Fahräeus médiu do perlitu, ve kterém se nacházely adventivní kořeny ze zakořeňených stonkových odřezků. Cílem bylo zjistit, zda adventivní kořeny interagují s bakteriemi *S. meliloti* podobně jako kořeny primární nebo laterální. Pro vizualizaci bakterií byl použit kmen *S. meliloti* fluorescenčně-značený pomocí mRFP. Bakterie jsou na obrázcích zobrazeny fialovou barvou.

Adventivní kořeny byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu LSM 710. Již jeden den po inokulaci byly bakterie přichyceny na povrch kořene (**Obr. 12 A**). Druhý den byly pozorovatelné změny u kořenových vlásků, které se zvlbnily a zatačely, pravděpodobně v důsledku produkce nod faktorů bakteriemi (**Obr. 12 B,C**). Pátý den od inokulace bylo možné pozorovat zachycené bakterie v infekční kapse zatočených kořenových vlásků a jejich množení za vzniku bakteriálních kolonií (**Obr. 12 D**). Po devíti dnech od aplikace bakterií se v kořenových vláscích nacházely infekční vlákna s bakteriemi, která jsou označena bílými šipkami (**Obr. 12 E**). Bohužel u kořenových vlásků obsahujících bakterie již nebylo možné pozorovat jednotlivé fluorescenčně-značené mikrotubuly.



Obrázek 12. Brzké fáze symbiotické interakce adventivních kořenů *M. sativa* exprimujících marker GFP-MBD s bakteriemi *S. meliloti* značenými pomocí mRFP. Bakterie přichycené na povrch kořene 1 den po inokulaci (A), zatočené kořenové vlásky 2 dny po inokulaci (B,C), zatočený kořenový vlásek kolem kolonie *S. meliloti* (šipka) 5 dní po inokulaci (D), infekční vlákna obsahující bakterie (šipky) v kořenových vláscích 9 dní po inokulaci (E). Buňky byly snímány v GFP a mRFP kanálu. Použitý objektiv: Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27; měřítko: 20 μm (A,E), 10 μm (B,C,D).

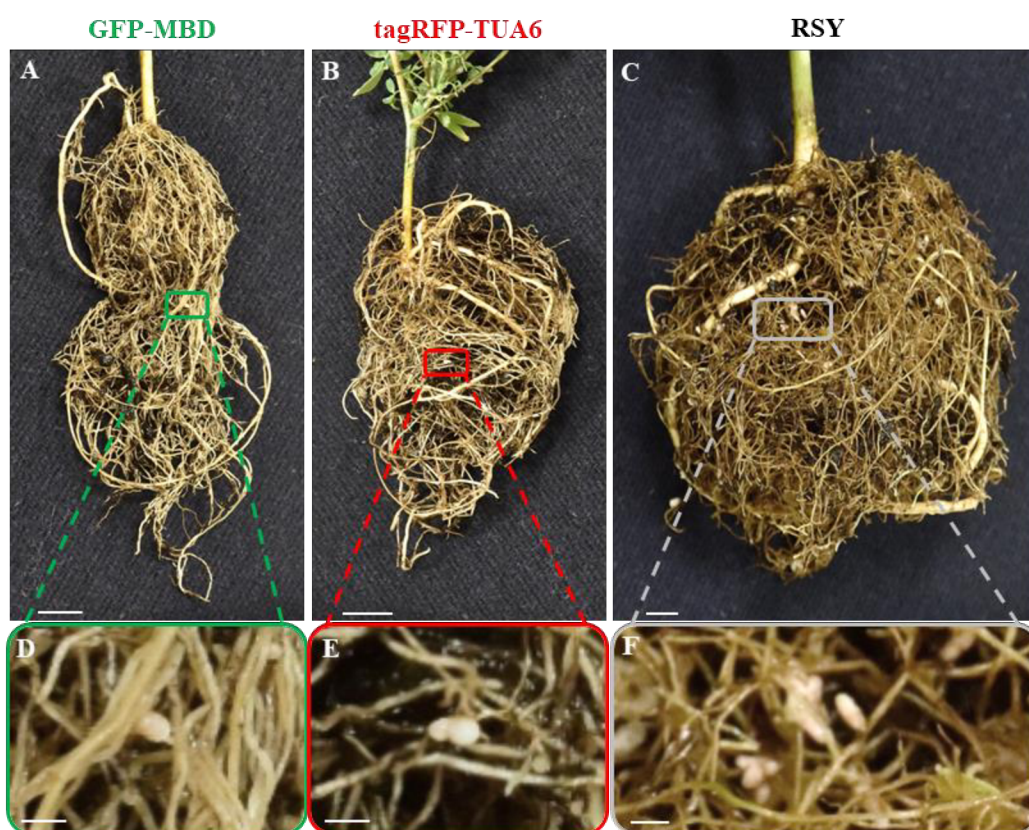
Adventivní kořeny byly následně zkoumány z hlediska výskytu symbiotických kořenových hlízek. Po přibližně 10 dnech od inokulace *S. meliloti* bylo možné na kořenech v perlitu pozorovat vytvářející se hlízky. Po 14 dnech byly tyto hlízky mikroskopovány na konfokálním mikroskopu LSM 710 pro potvrzení exprese markeru GFP-MBD. Hlízky byly růžové, což poukazuje na přítomnost leg-hemoglobinu. Výskyt bakterií *S. meliloti* byl potvrzen mikroskopicky na podélném řezu hlízkou (Obr. 13 A–D). Na Obr. 13 A jsou vyznačeny jednotlivé zóny symbiotické kořenové hlízky: meristematická (I), infekční (II) a fixační (III). Na obrázcích lze pozorovat expresi markeru GFP-MBD, ke které dochází pouze v meristému a neinfikovaných buňkách (Obr. 13 B), což je pravděpodobně způsobeno použitím promotoru 35S v tomto markeru. Infikované buňky jsou vizualizovány díky fluorescenčně-značeným bakteriím *S. meliloti* pomocí mRFP. Bakterie jsou na obrázcích zobrazeny fialově (Obr. 13 C).



Obrázek 13. Přehledový obrázek řezu symbiotické kořenové hlízky na adventivním kořeni *M. sativa* exprimující marker GFP-MBD 14 dní po inokulaci bakteriemi, nasnímaný pomocí funkce dlaždicového skenování na CLSM. Řez kořenovou hlízkou v procházejícím světle s označením jednotlivých zón (I, II a III) (A), v kanálu pro GFP (B), v kanálu pro mRFP (C) a sloučené kanály (D). Použitý objektiv: Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27; měřítko: 200 μm .

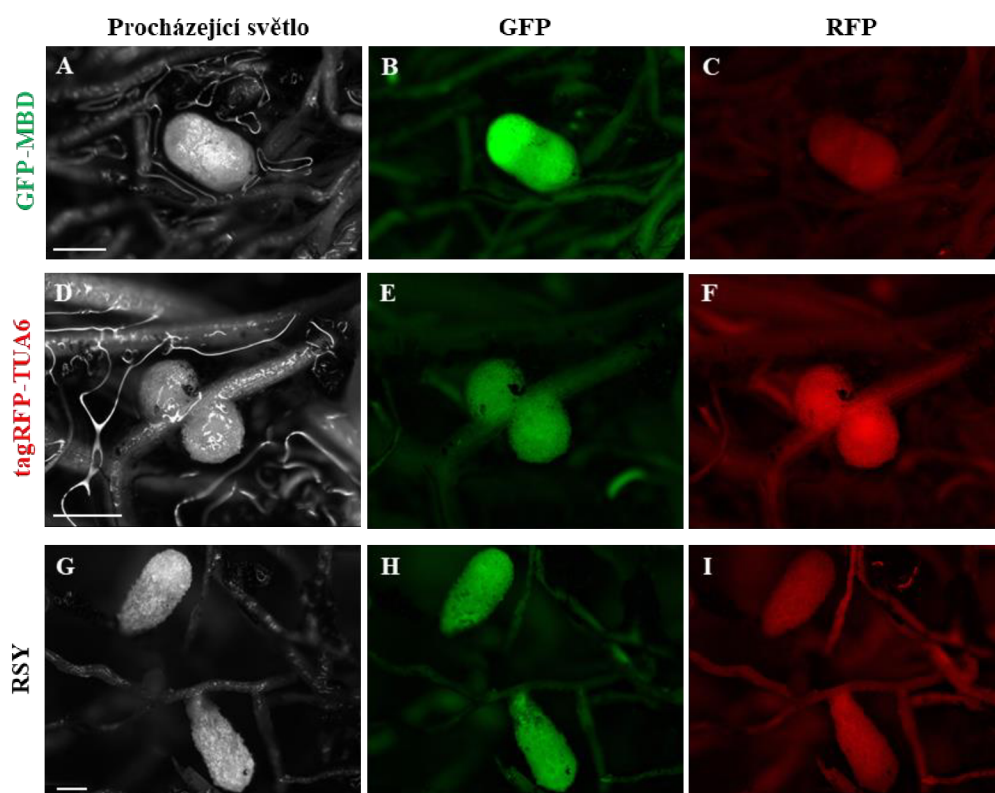
4.1.5 Mikroskopie symbiotických kořenových hlízek při spontánní symbióze v půdě

Zakořeněné stonkové odřezky *M. sativa* bez přídavku fluorescenčně značených rhizobií byly přeneseny z perlitu do půdy. Pro mikroskopii byl použit kořenový systém rostlin exprimující markery GFP-MBD a tagRFP-TUA6 starý přibližně 2 měsíce spolu s kontrolní rostlinou RSY starou přibližně 4 měsíce. Kořeny byly opatrně promyty od hlíny ve vodě a následně mikroskopovány. Na kořenech se nacházely růžové symbiotické hlízkové v různých stádiích vývoje, které vznikly při symbiotické interakci *M. sativa* s rhizobii volně žijícími v půdě (Obr. 14).



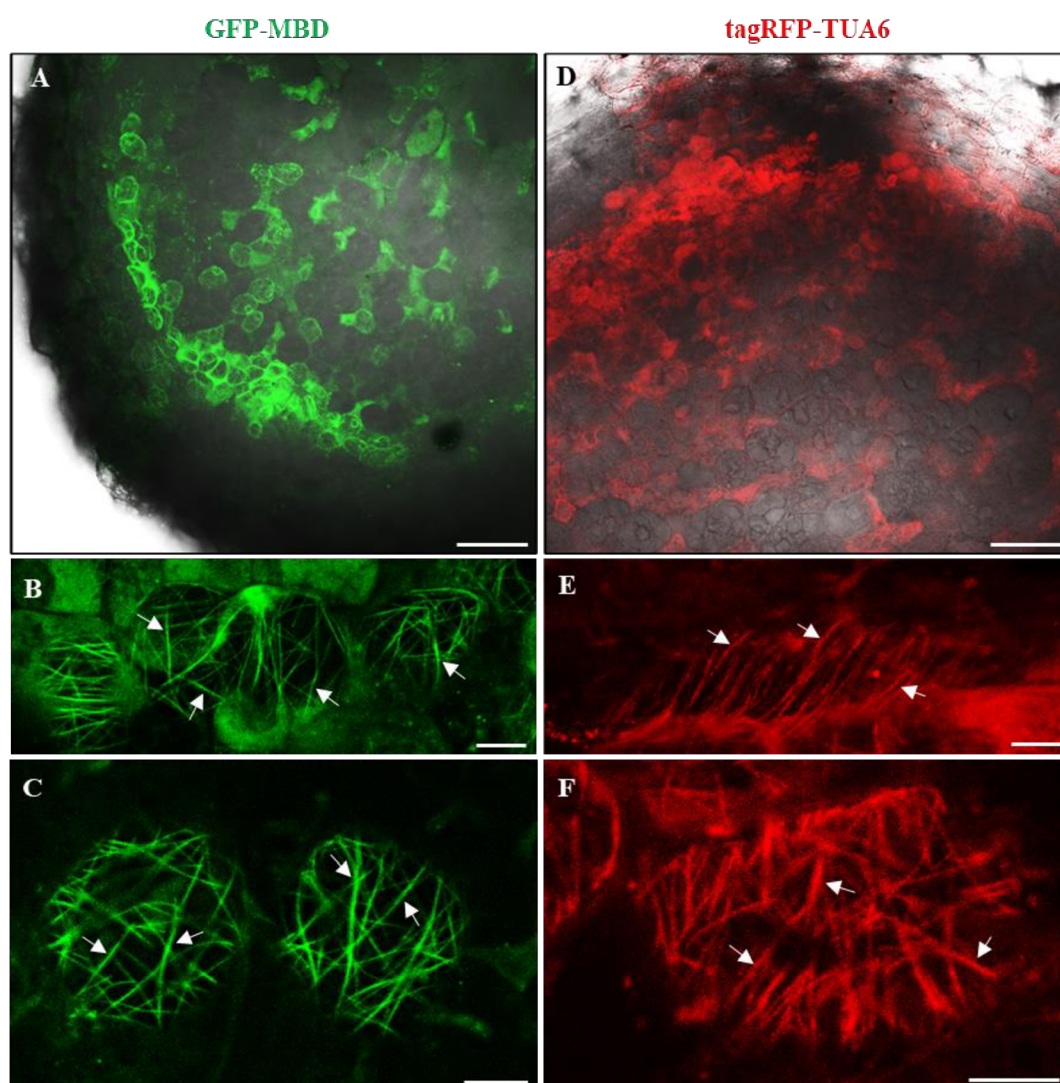
Obrázek 14. Kořenové soustavy rostlin *M. sativa* exprimující markery GFP-MBD, tagRFP-TUA6 a kontrolní rostliny RSY vybrané z půdy a po promytí ve vodě. Kořenové systémy po 2 měsících (A,B) a po 4 měsících (C) růstu zakořeněných stonkových odřezků v půdě. Přibližné symbiotické kořenové hlízkové rostliny s markerem GFP-MBD (D), tagRFP-TUA6 (E) a kontrolní rostliny (F). Měřítka: 1 cm (A–C), 2 mm (D–F).

Symbiotické hlízky na adventivních kořenech v hlíně byly následně mikroskopovány pomocí mikroskopu Axio Zoom.V16 pro potvrzení fluorescenčního signálu u linií s fluorescenčními markery mikrotubulů. Na **Obr. 15** se nachází přehled reprezentativních snímků symbiotických hlízek linií GFP-MBD, tagRFP-TUA6 a porovnání s kontrolní rostlinou RSY. U rostliny exprimující marker GFP-MBD byl potvrzen zelený fluorescenční signál a u rostliny exprimující marker tagRFP-TUA6 byl potvrzen červený fluorescenční signál v hlízkách.



Obrázek 15. Hlízky na kořenech *M. sativa* po 2 měsících v hlíně (A–F) a po 4 měsících v hlíně (G–I) snímány na Zoom mikroskopu. Rostlina exprimující marker GFP-MBD (A–C), tagRFP-TUA6 (D–F), a kontrolní rostlina RSY (G–I). Hlízky foceny v procházejícím světle (A,D,G), v GFP kanálu (B,E,H), a v RFP kanálu (C,F,I). Měřítka: 0,5 mm.

Hlízky na adventivních kořenech z hlíny byly podélně řezány a snímány pomocí mikroskopu LSM 880 s modulem „Airyscan“. U linií GFP-MBD i tagRFP-TUA6 byla opět pozorována exprese markerů pro mikrotubuly pouze v neinfikovaných buňkách (**Obr. 16 A,D**). Pro potvrzení specifity signálu na mikrotubuly byly pořízeny detailní snímky hlízek u rostliny exprimující marker GFP-MBD (**Obr. 16 B,C**) a tagRFP-TUA6 (**Obr. 16 E,F**). Kortikální mikrotubuly v parenchymatických buňkách blízko periferie hlízky jsou označeny bílými šipkami.

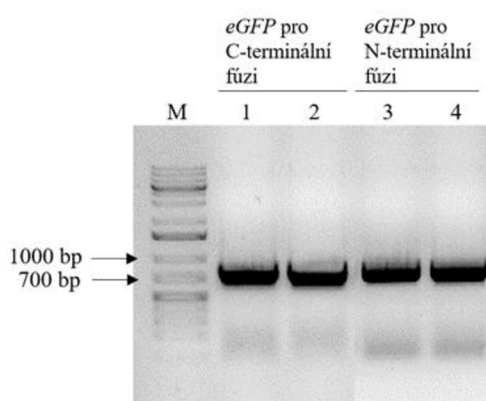


Obrázek 16. Symbiotické hlízky spontánně vytvořené na adventivních kořenech rostlin *M. sativa* snímané pomocí CLSM s modulem „Airyscan“. Přehledový obrázek hlízky u rostliny exprimující marker GFP-MBD (**A**), detailní obrázek s kortikálními mikrotubuly (**B,C**). Přehledový obrázek hlízky u rostliny exprimující marker tagRFP-TUA6 (**D**), detailní obrázek s kortikálními mikrotubuly (**E,F**). Hlízky a buňky byly snímány v přecházejícím světle, GFP a tagRFP kanálu. Mikrotubuly jsou označeny bílými šipkami. Použitý objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27; měřítka: 50 μm (**A,D**), 5 μm (**B,C,E,F**).

4.2 Příprava fluorescenčních markerů tubulinu alfa

4.2.1 PCR amplifikace genu *eGFP* a klonování do úrovně 0

Sekvence *eGFP* byla amplifikována pomocí PCR z templátu *p35S::eGFP:TUB6*. Výsledkem byly produkty ohraničené rozpoznávacími místy pro enzym BpiI a 4-nukleotidové přesahy, jež jsou komplementární k přesahům v akceptoru. Velikost produktu byla ověřena pomocí agaróзовé elektroforézy (**Obr. 17**) a porovnána s *in silico* predikcí. Fragменты o požadované velikosti byly následně izolovány z gelu pomocí GeneJet Gel Extraction kitu.



Obrázek 17. Elektroforetogram zobrazující amplikony *eGFP* pro C- i N-terminální fúzi získané pomocí PCR. Očekávaný výsledek: 1–4 = 725 bp. M = marker.

Ověřené a vyzolované PCR produkty byly pomocí „Golden Gate“ klonování začleněny do akceptorových vektorů úrovně 0 díky komplementárním přesahům. Gen *eGFP* pro C-terminální fúzi byl klonován do akceptorového vektoru pAGM1301 a pro N-terminální fúzi do pAGM1276. Následně byly konstrukty transformovány do chemokompetentních *E. coli*. Buňky byly kultivovány a pozitivní kolonie s obsahem inzertu byly očkovány do tekutého LB média se spektinomycinem o příslušné koncentraci (**Tab. 5**). pDNA byla namnožena v bakteriích a poté byla izolována a úspěšně ověřena pomocí restričního štěpení a sekvenování.

4.2.2 Ověření transkripčních jednotek úrovně 1

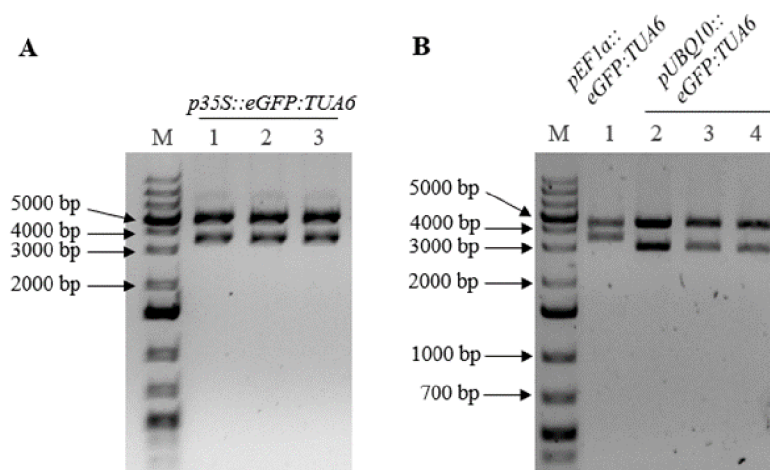
Transkripční jednotky úrovně 1 obsahující *eGFP* byly sestaveny spojením ověřených konstruktů úrovně 0 s akceptorovým vektorem úrovně 1, pICH47742. Přehled připravených konstruktů úrovně 1 se nachází v **Tab. 13**.

Tabulka 13: Přehled nově připravených transkripčních jednotek úrovně 1.

Transkripční jednotka (úroveň 1)	Inzerty (úroveň 0)	Akceptor
<i>p35S::eGFP:TUA6</i>	<i>pICSL13001 (dlouhý p35S)</i> <i>pAGM1276 (eGFP)</i> <i>pICH41308 (TUA6)</i> <i>pICH41414 (t35S)</i>	pICH47742
<i>pEF1a::eGFP:TUA6</i>	<i>pAGM1251 (pEF1a)</i> <i>pAGM1276 (eGFP)</i> <i>pICH41308 (TUA6)</i> <i>pICH41414 (t35S)</i>	
<i>pUBQ10::TUA6:EGFP</i>	<i>pAGM1251 (pUBQ10)</i> <i>pAGM1276 (eGFP)</i> <i>pICH41308 (TUA6)</i> <i>pICH41414 (t35S)</i>	

EF1a = ELONGATION FACTOR 1 ALPHA; *eGFP* = enhanced GREEN FLUORESCENT PROTEIN; *p* = promotor; *p35S* = promotor CaMV 35S; *t* = terminátor; *TUA6* = TUBULIN ALPHA 6; *UBQ10* = UBIQUITIN 10.

Transkripční jednotky úrovně 1 byly transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* a pozitivní kolonie byly následující den očkované do tekutého LB média s ampicilinem o příslušné koncentraci (**Tab. 5**). pDNA byla následně izolována a ověřena pomocí restrikčních enzymů. Pro ověření transkripční jednotky *p35S::eGFP:TUA6* byl použit enzym EcoRI (**Obr. 18 A**) a pro ověření transkripčních jednotek *pEF1α::eGFP:TUA6* a *pUBQ10::eGFP:TUA6* byl použit enzym BpiI (**Obr. 18 B**).



Obrázek 18. Elektroforetogram ověření úspěšnosti klonování transkripčních jednotek úrovně 1 pro N-terminální fúzi *eGFP:TUA6* v pICH47742 s *p35S* (**A**), *pEF1α* a *pUBQ10* (**B**). Restrikční štěpení bylo uskutečněno za použití enzymu EcoRI (**A**) a BpiI (**B**) s očekávanými výsledky: 1–3 = 4673, 3308 bp (**A**); 1 = 4352, 3463 bp, 2–4 = 4352, 2940 (**B**). M = marker.

4.2.3 Ověření multigenových konstruktů úrovně 2 restrikčním štěpením

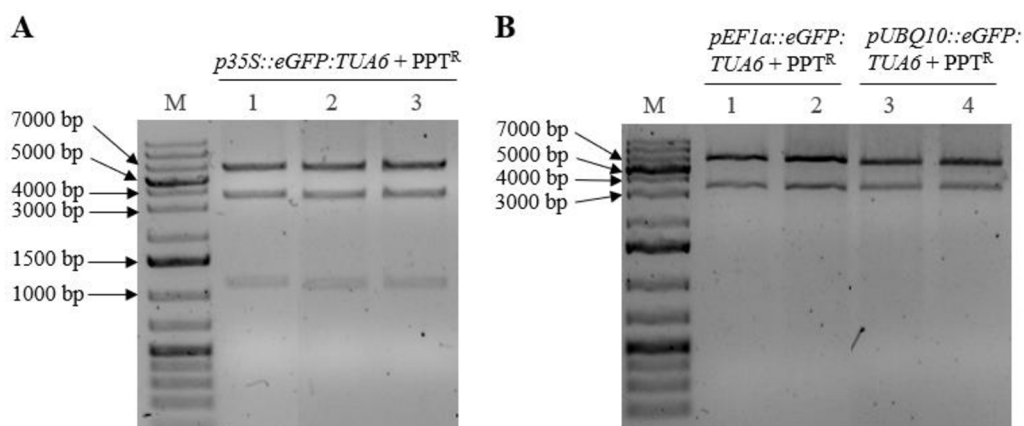
Multigenové konstrukty úrovně 2 byly sestaveny spojením ověřených transkripčních jednotek úrovně 1 s akceptorovým vektorem úrovně 2. Byly využity dva různé akceptory úrovně 2: pSB90-pAGM4723_virGN₅₄D a MOB2155. Přehled připravených konstruktů úrovně 2 se nachází v **Tab. 14**.

Tabulka 14: Přehled nově připravených multigenových konstruktů úrovně 2.

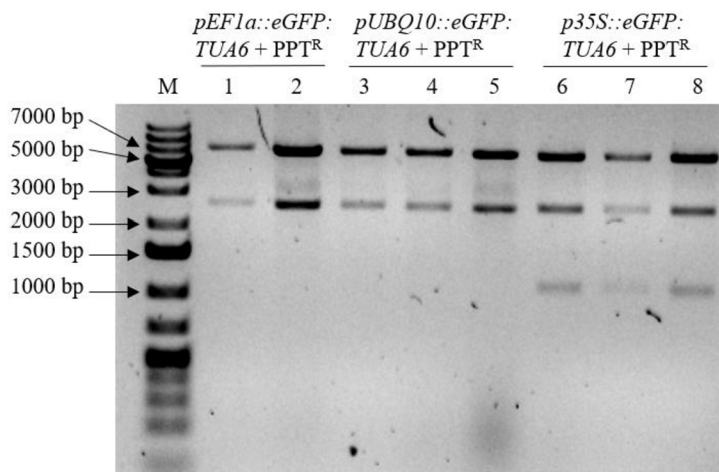
<i>p35S::eGFP:TUA6 + PPT^R</i>	<i>pNOS::BAR:tNOS</i> <i>dlouhý_p35S::eGFP:TUA6</i> <i>pICH41744 koncový linker 2</i>	
<i>pEF1α::eGFP:TUA6 + PPT^R</i>	<i>pNOS::BAR:tNOS</i> <i>pEF1α::eGFP:TUA6</i> <i>pICH41744 koncový linker 2</i>	MOB2155
<i>pUBQ10::eGFP:TUA6 + PPT^R</i>	<i>pNOS::BAR:tNOS</i> <i>pUBQ10::eGFP:TUA6</i> <i>pICH41744 koncový linker 2</i>	
<i>p35S::eGFP:TUA6 + PPT^R</i>	<i>pNOS::BAR:tNOS</i> <i>dlouhý_p35S::eGFP:TUA6</i> <i>pICH41744 koncový linker 2</i>	
<i>pEF1α::eGFP:TUA6 + PPT^R</i>	<i>pNOS::BAR:tNOS</i> <i>pEF1α::eGFP:TUA6</i> <i>pICH41744 koncový linker 2</i>	pSB90-pAGM4723 _virGN ₅₄ D
<i>pUBQ10::eGFP:TUA6 + PPT^R</i>	<i>pNOS::BAR:tNOS</i> <i>pUBQ10::eGFP:TUA6</i> <i>pICH41744 koncový linker 2</i>	

BAR = BIALAPHOS RESISTANCE; EF1α = ELONGATION FACTOR 1 ALPHA; eGFP = enhanced GREEN FLUORESCENT PROTEIN; NOS = NOPALINE SYNTHASE; p = promotor; p35S = promotor CaMV 35S; PPT^R = rezistence na fosfotricin; t = terminátor; TUA6 = TUBULIN ALPHA 6; UBQ10 = UBIQUITIN 10.

Konstrukty úrovně 2 byly transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* a pozitivní kolonie byly následující den očkované do tekutého LB média s obsahem kanamycinu (pro verzi s pSB90-pAGM4723_virGN₅₄D) či spektinomycinu (pro verzi s MOB2155) o příslušných koncentracích (**Tab. 5**). pDNA byla následně izolována a ověřena pomocí restričních enzymů. Pro ověření konstruktů v akceptorovém vektoru pSB90-pAGM4723_virGN₅₄D i v MOB2155 byl použit enzym PvuII (**Obr. 19 a 20**).



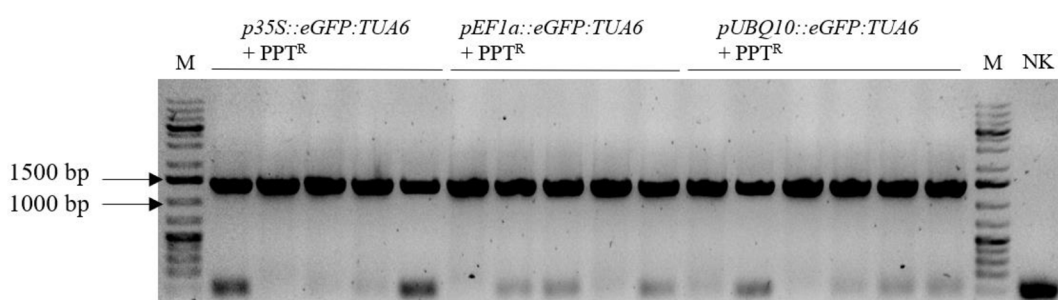
Obrázek 19. Elektroforetogram ověření úspěšnosti klonování multigenových konstruktů úrovně 2 v akceptoru pSB90-pAGM4723_virGN₅₄D s *p35S* (**A**), *pEF1a* a *pUBQ10* (**B**). Restriční štěpení bylo uskutečněno v obou případech za použití enzymu PvuII s očekávanými výsledky: 1–3 = 6192, 3418, 1082 bp (**A**); 1,2 = 7093, 3418 bp, 3,4 = 6570, 3418 (**B**). M = marker.



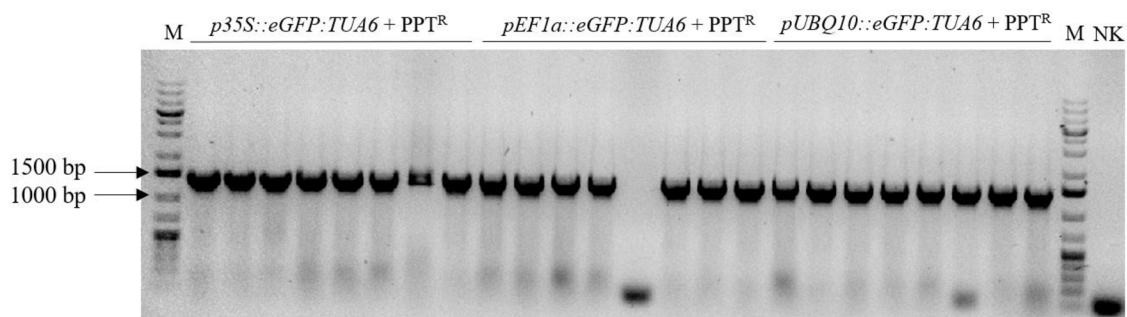
Obrázek 20. Elektroforetogram ověření úspěšnosti klonování multigenových konstruktů úrovně 2 v akceptoru MOB2155. Restriční štěpení bylo uskutečněno za použití enzymu PvuII s očekávanými výsledky: 1,2 = 7121, 2480 bp, 3–5 = 6598, 2480 bp, 6–8 = 6220, 2480, 1082. M = marker.

4.2.4 Ověření úspěšnosti transformace konstruktů úrovně 2 do *A. tumefaciens* pomocí „Colony PCR“

Konstrukty úrovně 2, které byly ověřeny restriční štěpením, byly transformovány do chemkompetentních bakterií *A. tumefaciens* (kmen GV3101). Po transformaci byly buňky rozetřeny na tuhé LB médium s obsahem kanamycinu (pro verzi s pSB90-pAGM4723_ virGN₅₄D) či spektinomycinu (pro verzi s MOB2155) a rifampicinu o příslušných koncentracích (Tab. 5). Po kultivaci byla z vybraných kolonií provedena „Colony PCR“ (Obr. 21 a 22) pro amplifikaci genu *TUA6*. V případě negativní kontroly byla použita reakční směs bez kolonie.



Obrázek 21. Elektroforetogram vzorků z „Colony PCR“ pro ověření úspěšnosti transformace multigenových konstruktů úrovně 2 v akceptoru pSB90-pAGM4723_ virGN₅₄D do *A. tumefaciens*. Očekávaný výsledek: 1368 bp. M = marker, NK = negativní kontrola.

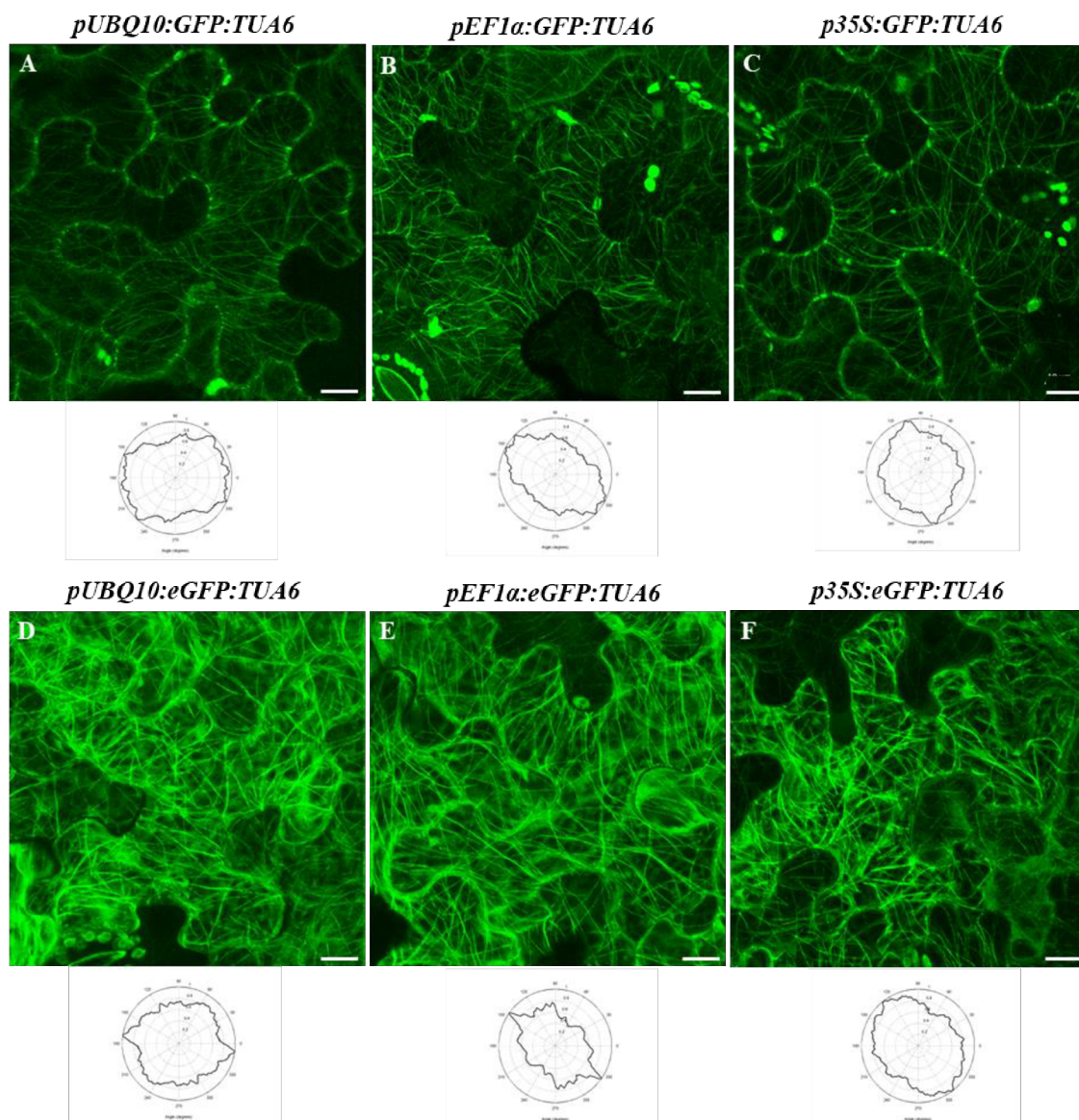


Obrázek 22. Elektroforetogram vzorků z „Colony PCR“ pro ověření úspěšnosti transformace multigenových konstruktů úrovně 2 v akceptoru MOB2155 do *A. tumefaciens*. Očekávaný výsledek: 1368 bp. M = marker, NK = negativní kontrola.

4.2.5 Ověření exprese konstruktů tranzientní transformací listů *N. benthamiana* a porovnání intenzity fluorescence

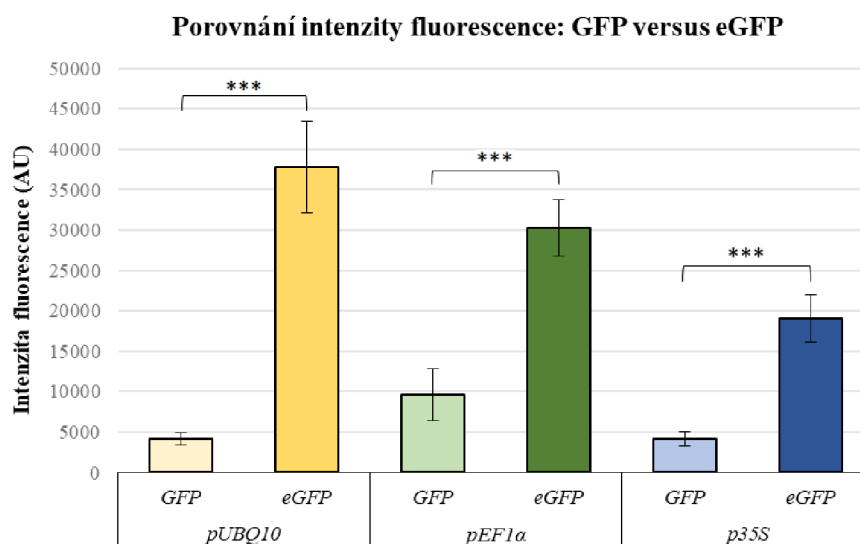
Kolonie *A. tumefaciens*, u kterých byla ověřena přítomnost genu *TUA6* byly použity pro tranzientní transformaci listů *N. benthamiana*, čímž byla otestována exprese připravených konstruktů. Listy byly snímány 36 h po transformaci pomocí konfokálního mikroskopu LSM 710. Expese všech nově připravených konstruktů úrovně 2 byla úspěšně ověřena.

Následně byla pro porovnání konstruktů provedena tranzientní transformace nově připravených konstruktů úrovně 2 obsahující *eGFP* v akceptorovém vektoru pAGM4723_*virGN*₅₄D spolu s dříve připravenými konstrukty obsahující *GFP* ve stejném vektoru. Epidermální buňky listů *N. benthamiana* byly snímány pomocí CLSM po 36 h od transformace za stejných podmínek při snímání. Na **Obr. 23** se nachází přehled analyzovaných epidermálních buněk, přičemž z každé varianty byl vybrán jeden reprezentativní obrázek. Pod obrázky z CLSM se nachází grafy vytvořené programem „Cytospectre“, jež zobrazují orientaci kortikálních mikrotubulů v těchto buňkách.



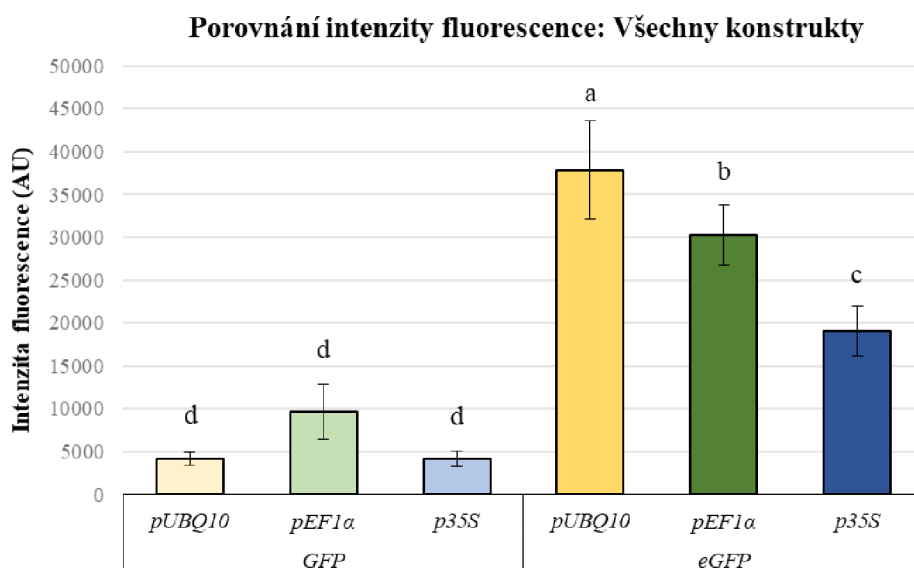
Obrázek 23. Tranzientně transformované epidermální buňky listů *N. benthamiana* exprimující multigenové konstrukty úrovně 2 snímané pomocí CLSM spolu s grafy zobrazujícími orientaci mikrotubulů. Konstrukt *pUBQ10::GFP:TUA6* (A), *pEF1a::GFP:TUA6* (B), *p35S::GFP:TUA6* (C), *pUBQ10::eGFP:TUA6* (D), *pEF1a::eGFP:TUA6* (E), *p35S::eGFP:TUA6* (F). Buňky byly snímány v GFP kanálu. Použitý objektiv: Plan-Apochromat 20x/0,8 M27; měřítka: 10 μm .

Intenzita fluorescence byla porovnána a statisticky vyhodnocena u jednotlivých variant konstruktů. U všech třech variant konstruktů byl potvrzen statisticky signifikantní rozdíl mezi verzí s *GFP* a s *eGFP* (**Obr. 24**), konstrukty s *eGFP* tedy poskytují prokazatelně vyšší intenzitu fluorescence. U konstruktů s *eGFP* byla zjištěna 9,2x vyšší intenzita fluorescence u varianty s *pUBQ10*, 3,2x vyšší intenzita u varianty s *pEF1α* a 4,6x vyšší intenzita u varianty s *p35S* v porovnání s verzemi obsahujícími *GFP*.



Obrázek 24. Graf porovnávající intenzitu fluorescence GFP oproti eGFP u konstruktů úrovně 2, obsahujících *GFP:TUA6* a *eGFP:TUA6* pod kontrolou promotorů *pUBQ10/pEF1α/p35S*. Hvězdičky značí signifikantní rozdíly v intenzitě fluorescence ($p < 0.001$). Pro statistické hodnocení byl využit Studentův T-test.

Také byl analyzován rozdíl intenzity fluorescence u všech konstruktů mezi sebou. (**Obr. 25**). U verzí s *eGFP* byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi všemi třemi variantami. V porovnání s verzemi obsahující *GFP* byl také zjištěn signifikantní rozdíl. U nově připravených markerů s *eGFP* byla nejvyšší intenzita fluorescence u konstruktů s *pUBQ10* a nejnižší u konstruktů s *35S*.



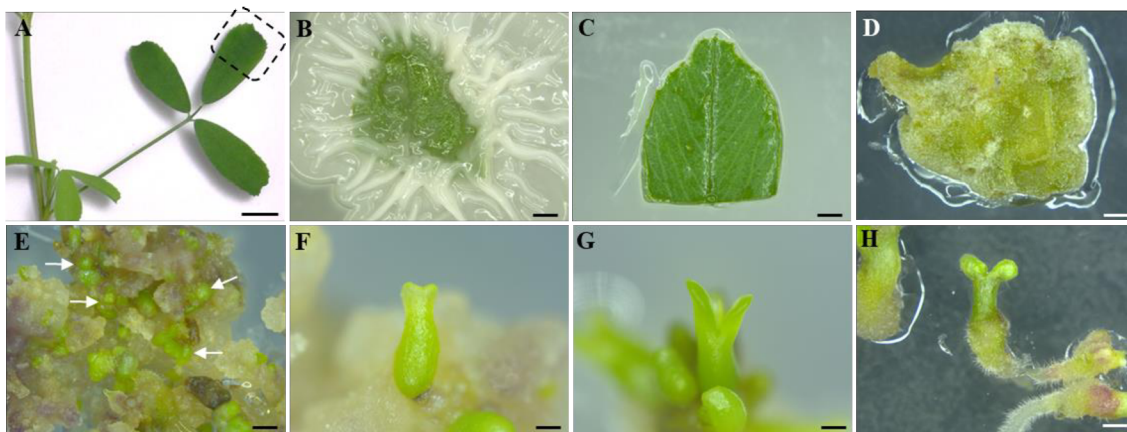
Obrázek 25. Graf porovnávající intenzitu fluorescence u konstruktů úrovně 2, obsahujících *GFP:TUA6* a *eGFP:TUA6* pod kontrolou promotorů *pUBQ10/pEF1α/p35S*. Písmena indikují statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými verzemi ($p < 0.05$). Pro statistické hodnocení byl použit ANOVA s Tukey HSD test.

4.2.6 Transformace *M. sativa* a regenerace transgenních rostlin

Bakteriální kultury *A. tumefaciens* nesoucí připravené konstrukty úrovně 2 ověřené tranzientní expresí, byly použity pro stabilní transformaci *M. sativa* genotypu RSY dle protokolu Samac & Austin-Phillips (2006).

Pro transformaci byly použity listy rostliny *M. sativa* RSY (**Obr. 26 A**). Přibližně 3 dny po inokulaci listů bakteriemi bylo možné pozorovat bakteriální infekci způsobenou *A. tumefaciens* na B5H médiu bez přídavku antibiotik. Po 7 dnech kultivace (**Obr. 26 B**) byly listy od bakterií promyty a umístěny na B5H médium s antibiotiky (**Obr. 26 C**). Kalus u transformovaných listů se začal tvořit po 3–4 týdnech po odmytí bakterií (**Obr. 26 D**). U kontrolních explantátů, které transformovány nebyly se kalus začal tvořit dříve, již přibližně po 2 týdnech po umístění na B5H médium.

Po přenesení transformovaných i kontrolních kalusů na B50 médium indukující tvorbu somatických embryí docházelo k tvorbě prvních somatických embryí přibližně 3 týdny po přenosu (**Obr. 26 E,F**). Somatická embrya byla v kotyledonárním stádiu (**Obr. 26 G**) přenesena na pevné MMS médium, které podporuje tvorbu kořenů a vývoj embryí (**Obr. 26 H**). Po vytvoření kořenů budou následně klíčící rostliny přeneseny na MS médium, kde budou udržovány. Starší rostliny budou selektovány pomocí konfokální mikroskopie.



Obrázek 26. Proces transformace *M. sativa* a regenerace rostlin somatickou embryogenezí. List *M. sativa* použitý pro inokulaci *A. tumefaciens* (A), listový explantát 7 dní po inokulaci *A. tumefaciens* (B), listový explantát po promytí od bakterií (C), vyvíjející se kalus na B5H médiu (D), embryogenní kalus na B50 médiu se somatickými embryi v globulárním stádiu (E, šipky) somatické embryo v pozdním srdčitém (F) a v kotyledonárním stádiu (G), somatické embryo s vyvíjejícím se kořenem na MMS médiu (H). Měřítka: 0,5 cm (A), 2 mm (B–H).

5 DISKUSE

Cílem první úlohy v experimentální části diplomové práce bylo ověřit novou metodu pro rozmnožování transgenních rostlin *M. sativa* zakořeněním stonkových odřezků. Tvorba adventivních kořenů byla indukována obalením konce stonkových odřezku v zakořeňovacím prášku STIMULAX I s následujícím složením: kyselina β -indolyloctová (indol-3-octová, IAA) 0,06%, kyselina α -naftyloctová (1-naftyloctová, NAA) 0,06% a kyselina β -indolyl-máselná (indol-3-máselná, IBA) 0,05%. Jedná se o auxiny, jejichž zvýšená koncentrace při poranění rostliny indukuje tvorbu adventivních kořenů. Auxiny jsou také nezbytné pro regulaci růstu kořenů a tvorbu kořenů laterálních (Druege et al., 2014; Roychoudhry & Kepinski, 2022). Konkrétně IAA byla potvrzena jako významný regulátor tvorby adventivních kořenů ve všech vývojových fázích rostlin (Pacurar et al., 2014; Guan et al., 2015).

Metoda zakořenění stonkových odřezků byla použita pro vegetativní rozmnožení rostlin *M. sativa*, které stabilně exprimovaly markery pro mikrotubuly: GFP-MBD a tagRFP-TUA6 a pro kontrolní rostlinu RSY. Adventivní kořeny vytvořené přímo z vnitřních pletiv stonku vykazovaly fluorescenční signál o podobné intenzitě a lokalizaci jako u donorových rostlin, jež byly získané pomocí somatické embryogeneze. Bylo tak potvrzeno, že se i v indukovaných adventivních kořenech markery pro mikrotubuly dále exprimují a transgenní rostliny tak neztrácí požadované vlastnosti. V porovnání s rozmnožováním *M. sativa* pomocí somatické embryogeneze je tento proces velmi rychlý a snadný. Získání plně vyvinuté rostliny pomocí somatické embryogeneze trvá přibližně 2–3 měsíce (Sangra et al., 2019), zatímco zakořenění stonkových odřezků trvalo přibližně 14 dní. Výhodou této metody kromě krátkého času je také velká efektivita, jelikož ze 40 zakořeněných stonkových odřezků nevytvořily kořeny pouze 3 rostliny. Při práci navíc není nutné dodržovat plně sterilní podmínky, přitom ani po měsíci kultivace rostlin v perlitu nebyla pozorována žádná nežádoucí infekce nebo jiná kontaminace rostlinného materiálu.

Rostliny v perlitu pouze s vodou vydržely plně vitální přibližně 2 týdny. Pro zajištění dostupnosti živin v perlitu bylo přidáno sterilní tekuté Fahræus médium do perlitu místo vody, což výrazně zlepšilo vitalitu rostlin. Při tvorbě adventivních kořenů ze stonků *M. sativa* nebyla pozorována žádná tvorba kalusu, na rozdíl od *A. thaliana*, kde se adventivní kořeny většinou vyvíjí z tzv. mikrokalusu (Gonin et al., 2019). Primordia adventivních kořenů jsou tvořeny de-diferenciací buněk pericyklu, (pro)kambia nebo

parenchymatických buněk vodivých pletiv (záleží na druhu rostliny a stáří odřezku), po kterém následuje dělení buněk a jejich diferenciaci na jednotlivé pletiva kořenů (Guan et al., 2019; Jing et al., 2020).

Pro přehled uspořádání mikrotubulů u adventivních kořenů *M. sativa* byla provedena mikroskopická analýza v jednotlivých vývojových zónách, přičemž bylo v každé zóně kořene nasnímáno několik buněk s fluorescenčně značenými mikrotubuly díky markeru GFP-MBD. Mitotické mikrotubuly v meristematické zóně kořene (pre-profázní svazek, dělicí vřeténko a fragmoplast) vykazovaly charakteristickou organizaci a orientaci, což zajišťuje správný růst kořene (Vyplelová, 2017). Kortikální mikrotubuly v elongační zóně pomáhají při prodlužování buněk, jelikož regulují dopravu podjednotek celulózy syntázy do plazmatické membrány a udávají směr orientace celulózových mikrofibril, z nichž je sestavována buněčná stěna (Li et al., 2015c).

Účast mikrotubulů v iniciaci růstu kořenového vlásku potvrzuje výzkum *A. thaliana* linií se sníženou expresí α -tubulinu (Bao et al., 2001). Na adventivních kořenech *M. sativa* bylo místo iniciace kořenových vlásků pozorováno ve středu buňky na rozdíl od *A. thaliana*, kde vyrůstají polárně na spodní straně buňky (Ryan et al., 2001). Ještě před samotným vytvořením kořenového vlásku bylo díky specifické paprskovité organizaci mikrotubulů možné pozorovat, kde se vlásek vytvoří. Při začátku tvorby vlásku byly mikrotubuly orientovány kolmo k dlouhé ose buňky, což bylo pozorováno i u *M. truncatula* v publikaci od Sieberer et al. (2002).

U adventivních kořenů *M. sativa* s markerem GFP-MBD byla zjištěna rychlost růstu mikrotubulů na „plus“ konci přibližně 4 $\mu\text{m}/\text{min}$. U *A. thaliana* s GFP-TUA6 markerem byla v práci Komis et al. (2017) pozorována rychlost růstu mikrotubulů na „plus“ konci 7,4 $\mu\text{m}/\text{min}$. MBD z MAP4 proteinu obsahuje oblast bohatou na prolin a oblast bohatou na serin a prolin, které se společně silně vážou na mikrotubuly a indukují jejich svazkování. Zbytek domény je tvořen repeticemi, jež zvyšují sílu vazby na mikrotubuly pravděpodobně stabilizací heterodimerů tubulinu (Marc et al., 1998). Nejspíš kvůli stabilizačním vlastnostem použité domény mohlo docházet ke zpomalení dynamiky mikrotubulů v adventivních kořenech *M. sativa* s markerem GFP-MBD.

Při inokulaci adventivních kořenů *M. sativa* byla potvrzena jejich schopnost symbioticky interagovat s bakteriemi *S. meliloti*. Na začátku symbiotické interakce *M. sativa* se *S. meliloti* bylo možné pozorovat reorganizaci mikrotubulů v kořenových vláscích. Z předchozích výzkumů je již známo, že mikrotubuly pomáhají se zatačením vlásku a obklopení bakterie při počátku interakce (Sieberer et al., 2005, Hlaváčková et

al., 2023). Na adventivních kořenech bylo mimo deformace kořenových vlásků pozorované také zachycení bakterií na vláscích, růst infekčních vláken, a kořeny byly schopny vytvářet symbiotické hlízky. Na primárních kořenech se primordia symbiotických hlízek začínají vytvářet již kolem pátého dne po inokulaci. Po přibližně 7 dnech od inokulace je již v hlízkách plně vyvinutá meristemická a infekční zóna a vyvíjí se zóna, kde později dochází k fixaci dusíku (Arrighi et al., 2008). Bílé vyvíjející se hlízky byly pozorovány i na adventivních kořenech. Po 10–14 dnech od inokulace by se již v hlízkách měly nacházet plně diferenciované bakteroidy a dochází k fixaci dusíku (Maunoury et al., 2010). Na adventivních kořenech byly po 14 dnech pozorovány růžové hlízky, jejichž barva je způsobená přítomností leghemoglobinu. Jedná se o molekulu, která váže a pufruje koncentraci kyslíku v hlízkách, což je nezbytné pro správné fungování nitrogenasy, enzymu účastníci se fixace dusíku (Soupène et al., 1995, Gibson et al., 2008). U řezu hlízky na adventivním kořenu snímaného 14 dní po inokulaci byla již pozorována plně vyvinutá zóna fixace dusíku. U adventivních kořenů byly tedy pozorovány stejné fáze symbiotické interakce, jako u primárních kořenů bobovitých rostlin. Symbiotická interakce navíc proběhla přímo v perlitu, kam byly přidány fluorescenčně-značené bakterie *S. meliloti*. Zároveň byla tvorba hlízek pozorována i v půdě, kde adventivní kořeny *M. sativa* interagovaly s přirozeně se vyskytujícími rhizobiemi.

Na řezech hlízek vytvořených po inkubaci s fluorescenčními bakteriemi i s bakteriemi přirozeně se vyskytujícími v půdě byla pozorována exprese markeru GFP-MBD a tagRFP-TUA6 v meristému a v buňkách, jež nebyly infikovány bakteriemi. Pravděpodobně je to způsobeno umlčením promotoru *35S*, pod kterým byl marker exprimován, v buňkách hlízek, které obsahují symbiotické bakterie. Velmi podobné výsledky exprese za použití *35S* promotoru byly již pozorovány u *M. sativa* (Samac et al., 2004) a *M. truncatula* (Auriac & Timmers, 2007). Vzhledem k těmto poznatkům byly následně připraveny markery tubulinového cytoskeletu s dalšími dvěma konstitutivními promotory, *pEF1α* a *pUBQ10*, u kterých byla v předchozích studiích potvrzena aktivita v symbiotických hlízkách (Auriac & Timmers, 2007; Limpens et al., 2009; Ivanov & Harrison, 2014). Jelikož se u *pEF1α* a *pUBQ10* jedná o promotory esenciálních genů pocházejících z rostlin, na rozdíl od *p35S*, nemusely by tyto promotory být umlčovány v bakteriemi-infikovaných buňkách hlízky, kde dochází k velkým transkripčním změnám a exprese mnoha genů je aktivována či utlumena (Mergaert et al., 2020). Pro expresi markerů pouze v symbiotických hlízkách by se také daly použít pletivově-specifické

promotory, které jsou aktivovány při vývoji hlízky, jako jsou například promotory genů některých proteinů podobných kalmodulinu, promotor genu kódující NODULIN-22 (Liu et al., 2006) či „EARLY NODULE-SPECIFIC PROTEIN 8“ (ENOD8) (Dickstein et al., 2002; Mergaert et al., 2020).

Nově připravené markery s TUA6 a eGFP byly klonovány pomocí „Golden Gate“ klonování, které využívá restriční enzymy typu II charakteristické štěpením mimo jejich rozpoznávací místo (Engler et al., 2008). V rámci bakalářské práce byly markery s TUA6 připraveny, avšak v kombinaci s GFP. Tyto markery bohužel vykazovaly poměrně nízkou intenzitu fluorescence kvůli použité sekvenci *GFP* z „Golden Gate“ kitu. Z tohoto důvodu byly markery klonovány znova, tentokrát s genem pro eGFP, jež může poskytnout až 35x vyšší intenzitu fluorescence (Li et al., 1997). Geny *eGFP* a *GFP* se liší dvěma bodovými mutacemi Phe64→Leu a Ser65→Thr (Heim, & Tsien, 1996; Brejc et al., 1997). Při statistickém porovnání intenzity fluorescence dvou verzí markerů byla zjištěna až 9,2x vyšší intenzita fluorescence u fúzního proteinu eGFP s TUA6. Jako nejvíce efektivní promotor se u nově připravených markerů ukázal *pUBQ10*.

Při přípravě finálních konstruktů úrovně 2 obsahujících jednu z transkripčních jednotek *p35S::eGFP:TUA6*, *pEF1α::eGFP:TUA6* a *pUBQ10::eGFP:TUA6* spolu s konstruktem pro rezistenci na fosfinitricin byly využity dva akceptorové vektory, a to MOB2155 a pSB90-pAGM4723_ *virGN*₅₄D, který obsahuje bodovou mutaci asparaginu na kyselinu asparagovou v pozici 54. Tato mutace by měla zvýšit expresi konstruktů 2–10x (Mortensen et al., 2019). Při tranzientní expresi konstruktů v obou použitých akceptorech úrovně 2 však nebyl pozorován rozdíl intenzity fluorescence u chimerního proteinu obsahujícího eGFP.

Úspěšně ověřené fluorescenční markery s fúzním proteinem eGFP-TUA6 byly stabilně transformované do *M. sativa* a po regeneraci budou rostliny selektovány pomocí média s přídavkem herbidicu fosfinitricin. Selekcí poskytuje klonovaná transkripční jednotka *pNOS::BAR:tNOS*. Jelikož selekce nemusí vždy proběhnout se stoprocentní spolehlivostí, budou rostliny selektovány také pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie, kde budou pomocí markeru eGFP-TUA6 vizualizovány mikrotubuly. Rostliny stabilně exprimující tyto markery budou využity především pro studium symbiotických interakcí a bude v nich porovnána exprese markerů pod různými promotory.

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byl popsán vznik adventivních kořenů u rostlin, díky kterým lze rychle a účinně vegetativně propagovat různé rostlinné druhy. Dále byly představeny techniky pletivových kultur rostlin se zaměřením na *M. sativa* pro biotechnologické aplikace a metody transformace rostlin. Popsána byla také struktura promotorů genů spolu s uvedením různých typů promotorů, jež se využívají pro přípravu transgenních rostlin a studium symbiotických interakcí. Dalším tématem byl rostlinný cytoskelet, kde byly charakterizovány jeho součásti a popsána organizace během symbiotické interakce bobovitých rostlin s bakteriemi rodu *Sinorhizobium*. V poslední části byly zmíněny metody pro kvantitativní analýzu mikrotubulů.

Experimentální část byla zaměřena na mikrotubuly v *M. sativa* a skládala se ze dvou hlavních částí. V části první byla optimalizovaná a ověřená metoda pro rozmnožování transgenních rostlin *M. sativa* pomocí zakořenění stonkových odřezků. U vytvořených adventivních kořenů *M. sativa* exprimujících markery GFP-MBD a tagRFP-TUA6 byl potvrzen fluorescenční signál pocházející z fluorescenčních proteinů, jež jsou součástí těchto markerů. Následně byla podrobně analyzována organizace mikrotubulů v adventivních kořenech linie GFP-MBD za použití konfokální fluorescenční mikroskopie. Pro studium dynamiky mikrotubulů v této linii byly vytvořeny kymografy, ze kterých byla zjištěna snížená dynamika mikrotubulů, pravděpodobně kvůli stabilizačnímu účinku použité domény proteinu MAP4 v markeru. Jelikož adventivní kořeny vykazují mírně odlišnou morfologii než kořeny primární, byly také inokulovány symbiotickými bakteriemi *S. meliloti* pro testování, zda dokáží symbioticky interagovat. Bylo zjištěno, že symbiotická interakce probíhá stejně jako u kořenů primárních. Pozorovány byly všechny stádia interakce včetně tvorby symbiotických hlízek. Interakce byly navíc pozorovány přímo v perlitu, jež byl použit jako zakořeňovací substrát. Také byly pozorovány spontánní symbiotické interakce adventivních kořenů v půdě, kde se nacházely pouze přirozeně se vyskytující rhizobia. V řezech symbiotických hlízek byl nalezen charakteristický vzor exprese markerů GFP-MBD a tagRFP-TUA6 pod kontrolou 35S promotoru. Markery byly exprimovány pouze v meristému a neinfikovaných buňkách hlízky, pravděpodobně z důvodu umlčení *p35S* bakteriální infekcí.

Z důvodu nerovnoměrné exprese markerů při použití 35S promotoru bylo ve druhé části cílem připravit nové markery tubulinu pod dvěma dalšími konstitutivními

promotory, *pEF1 α* a *pUBQ10*, které jsou dle předchozích výzkumů aktivní v specializovaných symbiotických orgánech. Markery byly připraveny pomocí „Golden Gate“ klonování a obsahovaly konstitutivní promotory *p35S/pEF1 α /pUBQ10* fúzané s *eGFP* a *TUA6* geny. Konstrukty byly klonovány do úrovně 2, přičemž do finálního akceptoru byla přidána také transkripční jednotka pro rezistenci na fosfotricin. Exprese markerů byla ověřena tranzientní transformací listů *N. benthamiana*. Nakonec byla provedena porovnávací statistická analýza intenzity fluorescence u nově připravených markerů s *eGFP* a markerů připravenými v rámci bakalářské práce, kde byl použit gen *GFP* z „Golden Gate“ kitu. U markerů obsahující *eGFP* byla zjištěna prokazatelně vyšší intenzita fluorescence, proto byly tyto markery stabilně transformovány do *M. sativa*. V budoucnu bude provedena selekce transgenních rostlin nesoucích připravený marker eGFP-TUA6 pod kontrolou tří různých promotorů a tyto linie budou analyzovány při symbiotických interakcích se *S.meliloti*.

7 LITERATURA

- Abarca, D. (2021). Identifying molecular checkpoints for adventitious root induction: are we ready to fill the gaps?. *Frontiers in Plant Science*, 12, 621032. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621032>.
- Ahkami, A. H., Lischewski, S., Haensch, K. T., Porfirova, S., Hofmann, J., Rolletschek, H., Melzer, M., Franken, P., Hause, B., Druge, U., Hajirezaei, M. R. (2009). Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*, 181(3), 613–625. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02704.x>.
- Ahmad Jan, S., Khan Shinwari, Z., Hussain Shah, S., Shahzad, A., Amir Zia, M., Ahmad, N. (2016). In-planta transformation: recent advances. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11085–11091. <https://www.researchgate.net/publication/301655045>.
- Allen, N. S., Bennett, M. N. (1996). Electro-optical imaging of F-actin and endoplasmic reticulum in living and fixed plant cells. Scanning Microscopy. *Scanning Microscopy*, 10, 12–21. <https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol1996/iss10/14/>.
- Allen, N. S., Bennett, M. N., Cox, D. N., Shipley, A., Ehrhardt, D. W., Long, S. R. (1994). Effects of Nod Factors on Alfalfa Root Hair Ca⁺⁺ and H⁺ Currents and on Cytoskeletal Behavior. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, 107–113. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0177-6_16.
- Amini, M., Deljou, A., Nabiabad, H. S. (2016). Improvement of in vitro embryo maturation, plantlet regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(3), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0374-y>.
- Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., Van Lijsebettens, M. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(6–8), 483–494. <https://doi.org/10.1387/IJDB.130232MV>.
- Anandarajah, K., McKersie, B. D. (1992). Influence of plating density, sucrose and light during development on the germination and vigour of *Medicago sativa* L. somatic embryos after desiccation. *Seed Science Research*, 2(3), 133–140. <https://doi.org/10.1017/S0960258500001252>.
- Applegate, K. T., Besson, S., Matov, A., Bagonis, M. H., Jaqaman, K., Danuser, G. (2011). plusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *Journal of Structural Biology*, 176(2), 168–184. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2011.07.009>.
- Arrighi J. F., Godfroy O., de Billy F., Saurat O., Jauneau A., Gough C. (2008). The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9817–9822. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710273105>.
- Atanassov, A., Brown, D. C. W. (1984). Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3(2), 149–162. <https://doi.org/10.1007/BF00033736>.
- Auriac, M. C., Timmers, A. C. J. (2007). Nodulation studies in the model legume *Medicago truncatula*: advantages of using the constitutive *EF1alpha* promoter and limitations in detecting fluorescent reporter proteins in nodule tissues. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(9), 1040–1047. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1040>.
- Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C., and Lescure, B. (1989). The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 alpha: Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219,106–112. <https://doi.org/10.1007/BF00261164>.
- Azizi-Dargahlou, S., Pouresmaeil, M. (2023). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Plant Transformation: A Review. *Molecular Biotechnology*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00788-x>
- Azizi-Dargahlou, S., Ahmadabadi, M., Valizadeh Kamran, R. (2023). Biolistic Transformation and Expression of Functional Chymosin from a Codon-Optimized Synthetic Bovine Gene in

- Tobacco Plants. *Journal of Medicinal Plants and By-Product*, 12(3), 209–215. <https://doi.org/10.22092/JMPB.2022.356717.1425>.
- Bakhuizen, R. (1988): *The Plant Cytoskeleton in the Rhizobium-Legume Symbiosis*. [PhD Thesis]. Leiden University, The Netherlands.
- Baluška, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Šamaj, J., Chua, N. H., Barlow, P. W., Volkmann, D. (2000). Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology*, 227(2), 618–632. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9908>.
- Bao, Y., Kost, B., Chua, N. H. (2001). Reduced expression of α -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *The Plant Journal*, 28(2), 145–157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01142.x>.
- Bates, G. W. (1999). Plant transformation via protoplast electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 111, 359–366. <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:359>.
- Benfey, P. N., Chua, N.-H. (1990). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*, 250(4983), 959–966. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.250.4983.959>.
- Bent, A. (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology*, 343, 87–103. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:87/COVER>.
- Bevan, M., Barnes, W. M., Chilton, M. dell. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research*, 11(2), 369–385. <https://doi.org/10.1093/NAR/11.2.369>.
- Bilas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 269–287. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1057-7>.
- Bingham, E. T., Hurley, L. V., Kaatz, D. M., Saunders, J. W. (1975). Breeding Alfalfa Which Regenerates from Callus Tissue in Culture. *Crop Science*, 15(5), 719–721. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1975.0011183X001500050032X>.
- Blancaflor, E. B., Zhao, L., Harrison, M. J. (2001). Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma*, 217, 154–165. <https://doi.org/10.1007/BF01283396>.
- Brejč, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormö, M., Remington, S. J. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2306–2311. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2306>.
- Brewin, N. J. (2004). Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4), 293–316. <https://doi.org/10.1080/07352680490480734>.
- Briddon, R. W., Liu, S., Pinner, M. S., Markham, P. G. (1998). Infectivity of African cassava mosaic virus clones to cassava by biolistic inoculation. *Archives of Virology*, 143(12), 2487–2492. <https://doi.org/10.1007/S007050050478>.
- Bulger, M., Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*, 144(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.024>.
- Butler, J. E. F., Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & development*, 16(20), 2583–2592. <https://doi.org/10.1101/gad.1026202>.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P. K., Quinto, C. (1998). Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals. *Plant Physiology*, 116(3), 871–877. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.871>.
- Cyr, R. J., Palevitz, B. A. (1995). Organization of cortical microtubules in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(1), 65–71. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80046-8](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80046-8).
- De Ruijter, N. C. A., Bisseling, T., Emons, A. M. C. (1999). *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(9), 829–832. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.9.829>.

- Demirer, G. S., Zhang, H., Matos, J. L., Goh, N. S., Cunningham, F. J., Sung, Y., Chang, R., Aditham, A. J., Chio, L., Cho, et al. (2019). High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nature Nanotechnology*, 14(5), 456–464. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0382-5>.
- Denchev, P., Velcheva, M., Atanassov, A. (1991). A new approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Reports*, 10, 338–341. <https://doi.org/10.1007/BF00193154>.
- Desfeux, C., Clough, S. J., Bent, A. F. (2000). Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the *Arabidopsis* Floral-Dip Method. *Plant Physiology*, 123(3), 895–904. <https://doi.org/10.1104/PP.123.3.895>.
- Díaz-Sala, C. (2019). Molecular dissection of the regenerative capacity of forest tree species: special focus on conifers. *Frontiers in Plant Science*, 9, 418219. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01943>.
- Dickstein, R., Hu, X., Yang, J., Ba, L., Coque, L., Kim, D. J., Cook, D. R., Yeung, A. T. (2002). Differential expression of tandemly duplicated *Enod8* genes in *Medicago*. *Plant Science*, 163(2), 333–343.
- Druege, U. (2020). Overcoming physiological bottlenecks of leaf vitality and root development in cuttings: a systemic perspective. *Frontiers in Plant Science*, 11, 555250. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00907>.
- Druege, U., Franken, P., Hajirezaei, M. R. (2016). Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 7, 186360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00381>.
- Druege, U., Franken, P., Lischewski, S., Ahkami, A. H., Zerche, S., Hause, B., Hajirezaei, M. R. (2014). Transcriptomic analysis reveals ethylene as stimulator and auxin as regulator of adventitious root formation in petunia cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 5, 494. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00494>.
- Druege, U., Hilo, A., Pérez-Pérez, J. M., Klopotek, Y., Acosta, M., Shahinnia, F., Zerche, S., Franken, P., Hajirezaei, M. R. (2019). Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. *Annals of botany*, 123(6), 929–949. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy234>.
- Dyachok, J., Sparks, J. A., Liao, F., Wang, Y. S., Blancaflor, E. B. (2014). Fluorescent protein-based reporters of the actin cytoskeleton in living plant cells: Fluorophore variant, actin binding domain, and promoter considerations. *Cytoskeleton*, 71(5), 311–327. <https://doi.org/10.1002/cm.21174>.
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one*, 3(11), e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>.
- Eun, S. O., Lee, Y. (1997). Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiology*, 115(4), 1491–1498. <https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1491>.
- Faulkner, C., Zhou, J., Evrard, A., Bourdais, G., MacLean, D., Häweker, H., Eckes, P., Robatzek, S. (2017). An automated quantitative image analysis tool for the identification of microtubule patterns in plants. *Traffic*, 18(10), 683–693. <https://doi.org/10.1111/tra.12505>.
- Fedorova, E. E., de Felipe, M. R., Pueyo, J. J., Lucas, M. M. (2007). Conformation of cytoskeletal elements during the division of infected *Lupinus albus* L. nodule cells. *Journal of experimental botany*, 58(8), 2225–2236. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm083>.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7909.2010.00899.X>.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Eichholtz, D. A., Flick, J. S., Fink, C. L., Hoffmann, N. L., Sanders, P. R. (1985). The SEV System: A New Disarmed Ti Plasmid Vector System for Plant Transformation. *Bio/Technology*, 3(7), 629–635. <https://doi.org/10.1038/nbt0785-629>.
- Fras, A., Smolen, B., Maluszynska, J. (2008). Vascularization of zygotic and Somatic embryos of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(2), 43–48. https://abcbot.pl/pdf/50_2/043-048-Fras.pdf.

- Fukuda, M., Hasezawa, S., Asai, N., Nakajima, N., Kondo, N. (1998). Dynamic organization of microtubules in guard cells of *Vicia faba* L. with diurnal cycle. *Plant and cell physiology*, 39(1), 80–86. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029293>.
- Gao, J., Liang, W., Liu, C., Xie, F., Murray, J. D. (2024). Unraveling the rhizobial infection thread. *Journal of Experimental Botany*, erae017. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae017>.
- García-González, J., van Gelderen, K. (2021). Bundling up the Role of the Actin Cytoskeleton in Primary Root Growth. *Frontiers in Plant Science*, 12, 777119. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.777119/BIBTEX>.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y. D., Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *The Plant Journal*, 59(1), 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03851.x>.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>.
- Genre, A., Bonfante, P. (2002). Epidermal cells of a symbiosis-defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organisation in the presence of a mycorrhizal fungus. *Protoplasma*, 219(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.1007/S007090200004>.
- Gibson K. E., Kobayashi H., Walker G. C. (2008): Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>.
- Gonin, M., Bergougnoux, V., Nguyen, T. D., Gantet, P., Champion, A. (2019). What makes adventitious roots?. *Plants*, 8(7), 240. <https://doi.org/10.3390/plants8070240>.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal*, 64(2), 355–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x>.
- Griffiths, A. J. F., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. Gelbart, W. M. (2000). Regulation of gene transcription. *Modern Genetic Analysis* (3rd edition). W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Guan, L., Murphy, A. S., Peer, W. A., Gan, L., Li, Y., Cheng, Z. M. (2015). Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(5), 506–521. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831>.
- Guan, L., Tayengwa, R., Cheng, Z., Peer, W. A., Murphy, A. S., Zhao, M. (2019). Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. *BMC plant biology*, 19, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2002-9>.
- Haag, J. R., Pikaard, C. S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), 483–492. <https://doi.org/10.1038/nrm3152>.
- Haberle, V., Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>.
- Han, Y., Kim, Y., Hwang, O., Kim, J. (2015). Characterization of a small constitutive promoter from *Arabidopsis* translationally controlled tumor protein (AtTCTP) gene for plant transformation. *Plant cell reports*, 34, 265–275. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1705-5>.
- Harrison, M. J., Choudhary, A. D., Dubery, I., Lamb, C. J., Dixon, R. A. (1991). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 8. Cis-elements and trans-acting factors for the quantitative expression of a bean chalcone synthase gene promoter in electroporated alfalfa protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 16(5), 877–890. <https://doi.org/10.1007/BF00015079/METRICS>.
- Hasezawa, S., Nagata, T. (1991). Dynamic Organization of Plant Microtubules at the Three Distinct Transition Points During the Cell Cycle Progression of Synchronized Tobacco BY-2 Cells. *Botanica Acta*, 104(3), 206–211. <https://doi.org/10.1111/J.1438-8677.1991.TB00218.X>.

- Hasezawa, S., Nozaki, H. (1999). Role of cortical microtubules in the orientation of cellulose microfibril deposition in higher-plant cells. *Protoplasma*, 209(3), 98–104. <https://doi.org/10.1007/BF01415705>.
- Hasezawa, S., Hogetsu, T., Syono, K. (1988). Rearrangement of Cortical Microtubules in Elongating Cells derived from Tobacco Protoplasts — A Time-course Observation by Immunofluorescence Microscopy —. *Journal of Plant Physiology*, 133(1), 46–51. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80082-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80082-8).
- Hasezawa, S., Marc, J., Palevitz, B. A. (1991). Microtubule reorganization during the cell cycle in synchronized BY-2 tobacco suspensions. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 18(2), 94–106. <https://doi.org/10.1002/CM.970180204>.
- Hashimoto, T. (2015). Microtubules in Plants. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 13. <https://doi.org/10.1199/tab.0179>.
- He, C., Lin, Z., McElroy, D., Wu, R. (2009). Identification of a rice Actin2 gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. *Plant Biotechnology Journal*, 7(3), 227–239. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00393.x>.
- He, H. H., Meyer, C. A., Shin, H., Bailey, S. T., Wei, G., Wang, Q., Zhang, Y., Xu, K., Ni, M., Lupien, M., et al. (2010). Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nature Genetics*, 42(4), 343–347. <https://doi.org/10.1038/ng.545>.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H. P., van Kammen, A., Bisseling, T. (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol*, 105, 787–797.
- Heim, R., Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current biology*, 6(2), 178–182. [10.1016/s0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00450-5).
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2), 271–282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.6020271.x>.
- Higaki, T. (2017). Quantitative evaluation of cytoskeletal organizations by microscopic image analysis. *Plant Morphology*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.5685/PLMORPHOL.29.15>.
- Higaki, T., Goh, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Kadota, Y., Hasezawa, S., Sano, T., Kuchitsu, K. (2007). Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: *In vivo* imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*, 48(10), 1414–1425. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm109>.
- Higaki, T., Kojo, K. H., Hasezawa, S. (2010b). Critical role of actin bundling in plant cell morphogenesis. *Plant Signaling and Behavior*, 5(5), 484–488. <https://doi.org/10.4161/psb.10947>.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N., Hasezawa, S. (2010). Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 61(1), 156–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04032.x>.
- Hlaváčková, K., Šamaj, J., Ovečka, M. (2023). Cytoskeleton as a roadmap navigating rhizobia to establish symbiotic root nodulation in legumes. *Biotechnology Advances*, 69, 108263. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108263>.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303(5913), 179–180. <https://doi.org/10.1038/303179a0>.
- Huang, M., Zhang, L. (1999). Association of the movement protein of alfalfa mosaic virus with the endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulb scales. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(8), 680–690. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.8.680>.
- Christensen, A. H., Sharrock, R. A., Quail, P. H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18(4), 675–689. <https://doi.org/10.1007/BF00020010>.

- Christie P. J., Gordon J. E. (2014): The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Plasmid biology*, 455–472. <https://doi.org/10.1128/9781555817732.ch22>.
- Inada, N., Higaki, T., Hasezawa, S. (2016). Quantitative analyses on dynamic changes in the organization of host *Arabidopsis thaliana* actin microfilaments surrounding the infection organ of the powdery mildew fungus *Golovinomyces orontii*. *Journal of Plant Research*, 129(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/S10265-015-0769-9>.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea Mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14(6), 745–750. <https://doi.org/10.1038/nbt0696-745>.
- Ivanov, S., Harrison, M. J. (2014). A set of fluorescent protein-based markers expressed from constitutive and arbuscular mycorrhiza-inducible promoters to label organelles, membranes and cytoskeletal elements in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 80(6), 1151–1163. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12706>.
- Iwase, A., Ohme-Takagi, M., Sugimoto, K. (2011). WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12), 1943–1945. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18266>.
- Jaglo, K. R., Kleff, S., Amundsen, K. L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J. Z., Deits, T., Thomashow, M. F. (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant physiology*, 127(3), 910–917. <https://doi.org/10.1104/pp.010548>.
- Jhu, M. Y., Oldroyd, G. E. D. (2023). Dancing to a different tune, can we switch from chemical to biological nitrogen fixation for sustainable food security?. *PLoS Biology*, 21(3), e3001982. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3001982>.
- Jin, S. G., Komari, T., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1987). Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *Journal of Bacteriology*, 169(10), 4417–4425. <https://doi.org/10.1128/JB.169.10.4417-4425.1987>.
- Jing, T., Ardiansyah, R., Xu, Q., Xing, Q., Müller-Xing, R. (2020). Reprogramming of cell fate during root regeneration by transcriptional and epigenetic networks. *Frontiers in Plant Science*, 11, 508491. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00317>.
- Juven-Gershon, T., Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>.
- Kao, K. N., Michayluk, M. R. (1980). Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Alfalfa. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 96(2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(80\)80051-1](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(80)80051-1).
- Kar, S., Loganathan, M., Dey, K., Shinde, P., Chang, H. Y., Nagai, M., Santra, T. S. (2018). Single-cell electroporation: current trends, applications and future prospects. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 28(12), 123002. <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aae5ae>.
- Kartasalo, K., Pölönen, R. P., Ojala, M., Rasku, J., Lekkala, J., Aalto-Setälä, K., Kallio, P. (2015). CytoSpectre: A tool for spectral analysis of oriented structures on cellular and subcellular levels. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0782-y>.
- Kępczyńska, E., Kępczyński, J. (2023). Hormonal regulation of somatic embryogenesis in *Medicago* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 155(3), 613–625. <https://doi.org/10.1007/S11240-023-02593-5/FIGURES/3>.
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., Ramu, V. S. (2018). Methods of Plant Transformation-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(7), 2656–2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>.
- Kim, W. S., Jez, J. M., Krishnan, H. B. (2014). Effects of proteome rebalancing and sulfur nutrition on the accumulation of methionine rich δ -zein in transgenic soybeans. *Frontiers in Plant Science*, 5, 118681. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00633/ABSTRACT>.
- Kimata, Y., Higaki, T., Kawashima, T., Kurihara, D., Sato, Y., Yamada, T., Hasezawa, S., Berger, F., Higashiyama, T., Ueda, M. (2016). Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric

- cell division in *Arabidopsis* zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(49), 14157–14162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613979113>.
- Kirti P. B. (2008): *Handbook of New Technologies for Genetic Improvement of Legumes*. CRC press, Florida, USA.
- Kitaeva, A. B., Tsyganov, V. E. (2019). Influence of mutation in the gene Sym26 of the garden pea (*Pisum sativum* L.) on the organization of tubulin cytoskeleton in nodules. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 54(5), 1014–1023. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1014eng>.
- Kitaeva, A. B., Demchenko, K. N., Tikhonovich, I. A., Timmers, A. C. J., Tsyganov, V. E. (2015). Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: Bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytologist*, 210(1), 168–183. <https://doi.org/10.1111/nph.13792>.
- Kitaeva, A. B., Gorshkov, A. P., Kirichuk, E. A., Kusakin, P. G., Tsyganova, A. V., Tsyganov, V. E., Allakhverdiev, S. (2021). General patterns and species-specific differences in the organization of the tubulin cytoskeleton in indeterminate nodules of three legumes. *Cells*, 10(5), 1012. <https://doi.org/10.3390/cells10051012>.
- Kitaeva, A. B., Gorshkov, A. P., Kusakin, P. G., Sadovskaya, A. R., Tsyganova, A. V., Tsyganov, V. E. (2022). Tubulin Cytoskeleton Organization in Cells of Determinate Nodules. *Frontiers in Plant Science*, 13, 823183. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.823183/FULL>.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. (2003). *Concepts of genetics* (No. Ed. 7). Pearson Education, Inc.
- Kohli, A., Twyman, R. M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E., Christou, P. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant molecular biology*, 52, 247–258. <https://doi.org/10.1023/A:1023941407376>.
- Kolovos, P., Knoch, T. A., Grosveld, F. G., Cook, P. R., Papantonis, A. (2012). Enhancers and silencers: An integrated and simple model for their function. *Epigenetics & Chromatin*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-1>.
- Komari, T. (1990). Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9(6), 303–306. <https://doi.org/10.1007/BF00232856>.
- Komis, G., Luptovčiak, I., Ovečka, M., Samakovli, D., Šamajová, O., Šamaj, J. (2017). Katanin effects on dynamics of cortical microtubules and mitotic arrays in *Arabidopsis thaliana* revealed by advanced live-cell imaging. *Frontiers in plant science*, 8, 259341. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00866>.
- Kost, B., Chua, N. H. (2002). The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell*, 108(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00634-1).
- Kosturkova, G. (1993). Expression of foreign genes following electroporation of *Medicago* protoplasts. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 7(2), 43–46. <https://doi.org/10.1080/13102818.1993.10818692>.
- Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., Miklavcic, D. (2019). Membrane Electroporation and Electroporabilization: Mechanisms and Models. *Annual Review of Biophysics*, 48, 63–91. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-052118-115451>.
- Lai, F. M., McKersie, B. D. (1994). Regulation of storage protein synthesis by nitrogen and sulfur nutrients in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science*, 103(2), 209–221. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90209-7).
- Lan, X., Li, L., Hu, J., Zhang, Q., Dang, Y., Huang, Y. (2015). A Quantitative Method for Microtubule Analysis in Fluorescence Images. *Microscopy and Microanalysis*, 21(6), 1582–1590. <https://doi.org/10.1017/S1431927615015202>.
- Lanza, M., Garcia-Ponce, B., Castrillo, G., Catarecha, P., Sauer, M., Rodriguez-Serrano, M., Páez-García, A., Sánchez-Bermejo, E., Tc, M., Leo del Puerto, Yet al. (2012). Role of Actin Cytoskeleton in Brassinosteroid Signaling and in Its Integration with the Auxin Response in Plants. *Developmental Cell*, 22(6), 1275–1285. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.008>.
- Ledbetter, M. C., Porter, K. R. (1964). Morphology of microtubules of plant cells. *Science*, 144(3620), 872–874. <https://doi.org/10.1126/science.144.3620.872>.

- Lee, L. Y., Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <https://doi.org/10.1104/PP.107.113001>.
- Lewin, B., 2000. *Genes VII*. Oxford University Press, New York, US.
- Li, J., Blanchoin, L., Staiger, C. J. (2015a). Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 415–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040327>.
- Li, J., Henty-Ridilla, J. L., Staiger, B. H., Day, B., Staiger, C. J. (2015). Capping protein integrates multiple MAMP signalling pathways to modulate actin dynamics during plant innate immunity. *Nature Communications*, 6(1), 7206. <https://doi.org/10.1038/ncomms8206>.
- Li, S., Lei, L., Yingling, Y. G., Gu, Y. (2015c). Microtubules and cellulose biosynthesis: the emergence of new players. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.002>.
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R., Huang, C. C. (1997). Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28545–28549. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28545>.
- Lian, N., Wang, X., Jing, Y., Lin, J. (2021). Regulation of cytoskeleton-associated protein activities: Linking cellular signals to plant cytoskeletal function. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 241–250. <https://doi.org/10.1111/JIPB.13046>.
- Liang, Y. S., Bae, H. J., Kang, S. H., Lee, T., Kim, M. G., Kim, Y. M., Ha, S. H. (2009). The *Arabidopsis* beta-carotene hydroxylase gene promoter for a strong constitutive expression of transgene. *Plant Biotechnology Reports*, 3(4), 325–331. <https://doi.org/10.1007/S11816-009-0106-7>.
- Lim, C. J., Lee, H. Y., Kim, W. B., Lee, B. S., Kim, J., Ahmad, R., Kim, H. A., Yi, S. Y., Hur, C. G., Kwon, S. Y. (2012). Screening of Tissue-Specific Genes and Promoters in Tomato by Comparing Genome Wide Expression Profiles of *Arabidopsis* Orthologues. *Molecules and Cells*, 34, 53–59. <https://doi.org/10.1007/S10059-012-0068-4>.
- Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., Bisseling, T. (2009). *Medicago* N-2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell*, 21, 2811–2828.
- Liu, J., Miller, S. S., Graham, M., Bucciarelli, B., Catalano, C. M., Sherrier, D. J., Samac, D. A., Ivashuta, S., Fedorova, M., Matsumoto, P., et al. (2006). Recruitment of novel calcium-binding proteins for root nodule symbiosis in *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, 141(1), 167–177.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). Photosynthetic Stages and Light-Absorbing Pigments. *Molecular Cell Biology* (4th Edition), W. H. Freeman, New York.
- Lodwig, E., Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(1), 37–78. <https://doi.org/10.1080/713610850>.
- Louveaux, M., Rochette, S., Beauzamy, L., Boudaoud, A., Hamant, O. (2016). The impact of mechanical compression on cortical microtubules in *Arabidopsis*: a quantitative pipeline. *The Plant Journal*, 88(2), 328–342.
- Lu, J., Sivamani, E., Li, X., Qu, R. (2008). Activity of the 5' regulatory regions of the rice polyubiquitin rubi3 gene in transgenic rice plants as analyzed by both GUS and GFP reporter genes. *Plant Cell Reports*, 27(10), 1587–1600. <https://doi.org/10.1007/S00299-008-0577-Y>.
- Ma, Q., Sun, J., Mao, T. (2016). Microtubule bundling plays a role in ethylene-mediated cortical microtubule reorientation in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *Journal of Cell Science*, 129(10), 2043–2051. <https://doi.org/10.1242/jcs.184408>.
- Maunoury N., Redondo-Nieto M., Bourcy M., Van de Velde W., Alunni B., Laporte P., Durand P., Agier N., Marisa L., Vaubert D., et al. (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* 5(3), e9519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009519>.
- Marc, J., Granger, C. L., Brincat, J., Fisher, D. D., Kao, T. H., McCubbin, A. G., Cyr, R. J. (1998). A GFP–MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *The Plant Cell*, 10(11), 1927–1939. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.11.1927>.

- Matveeva, T., Otten, L. (2021). Opine biosynthesis in naturally transgenic plants: Genes and products. *Phytochemistry*, 189, 112813. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2021.112813>.
- Mergaert, P., Kereszt, A., Kondorosi, E. (2020). Gene expression in nitrogen-fixing symbiotic nodule cells in *Medicago truncatula* and other nodulating plants. *The Plant Cell*, 32(1), 42–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00494>.
- Miller, D. D., De Ruijter, N. C. A., Bisseling, T., Mie, A., Emons, C. (1999). The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *The Plant Journal*, 17(2), 141–154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00358.x>.
- Misra, S., Ganesan, M. (2021). The impact of inducible promoters in transgenic plant production and crop improvement. *Plant Gene*, 27, 100300. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100300>.
- Mortensen, S., Bernal-Franco, D., Cole, L. F., Sathitloetsakun, S., Cram, E. J., Lee-Parsons, C. W. T. (2019). EASI transformation: An efficient transient expression method for analyzing gene function in *Catharanthus roseus* seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00755>.
- Motta, M. R., Schnittger, A. (2021). A microtubule perspective on plant cell division. *Current Biology*, 31(10), 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.087>.
- Nazeran, H., Rice, F., Moran, W., Skinner, J. (1995). Biomedical image processing in pathology: a review. *Australas Phys Eng Sci Med*, 18(1), 26–38.
- Novak, F. J., Konečná, D. (1982). Somatic Embryogenesis in Callus and Cell Suspension Cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 105(3), 279–284. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(82\)80022-6](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(82)80022-6).
- Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313(6005), 810–812. <https://doi.org/10.1038/313810A0>.
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>.
- Ozyigit, I. I. (2020). Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 3195–3210. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05343-4>.
- Pacurar, D. I., Perrone, I., Bellini, C. (2014). Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia plantarum*, 151(1), 83–96. <https://doi.org/10.1111/ppl.12171>
- Paredes, A. R., Somerville, C. R., Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779), 1491–1495. <https://doi.org/10.1126/science.1126551>.
- Park, S. H., Yi, N., Kim, Y. S., Jeong, M. H., Bang, S. W., Choi, Y. Do, Kim, J. K. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2459. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERQ076>.
- Pereira, L. F., Erickson, L. (1995). Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 14(5), 290–293. <https://doi.org/10.1007/BF00232030>.
- Peremarti, A., Twyman, R. M., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Farré, G., Sabalza, M., Miralpeix, B., Dashevskaya, S., Yuan, D., Ramessar, K., Christou, P., Zhu, C., Bassie, L., Capell, T. (2010). Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Molecular Biology*, 73(4), 363–378. <https://doi.org/10.1007/S11103-010-9628-1>.
- Perrine-Walker, F. M., Lartaud, M., Kouchi, H., Ridge, R. W. (2014). Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Protoplasma*, 251(5), 1099–1111. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0618-z>.
- Popp, C., Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.016>.

- Porto, M. S., Pinheiro, M. P. N., Batista, V. G. L., Dos Santos, R. C., De Albuquerque Melo Filho, P., De Lima, L. M. (2014). Plant promoters: An approach of structure and function. *Molecular Biotechnology*, 56(1), 38–49. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>.
- Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 1–22. <https://doi.org/10.1079/IVP2003477>.
- Qin, T., Liu, X., Li, J., Sun, J., Song, L., Mao, T. (2014). *Arabidopsis* microtubule-destabilizing protein 25 functions in pollen tube growth by severing actin filaments. *Plant Cell*, 26(1), 325–339. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119768>.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of integrative plant biology*, 50(1), 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>.
- Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., Visser, R. G. F. (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*, 81(1), 93–107. <https://doi.org/10.1007/BF00022463>.
- Rai, M., He, C., Wu, R. (2009). Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. *Transgenic Research*, 18(5), 787–799. <https://doi.org/10.1007/S11248-009-9263-2>.
- Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). Alternative methods of plant transformation - A short review. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7(3), 849–858.
- Ramaiah, S. M., Skinner, D. Z. (1997). Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science*, 73(8), 674–682. <https://www.jstor.org/stable/24100429>.
- Ramkumar, T. R., Lenka, S. K., Arya, S. S., Bansal, K. C. (2020). A Short History and Perspectives on Plant Genetic Transformation. *Methods in Molecular Biology*, 2124, 39–68. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_3/COVER.
- Rasco-Gaunt, S., Liu, D., Li, C. P., Doherty, A., Hagemann, K., Riley, A., Thompson, T., Brunkan, C., Mitchell, M., Lowe, K., et al. (2003). Characterisation of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. *Plant Cell Reports*, 21(6), 569–576. <https://doi.org/10.1007/S00299-002-0552-Y>.
- Ridge, R. W. (1992). A Model Of Legume Root Hair-Growth And *Rhizobium* Infection. *Symbiosis*, 14(1–3), 359–373.
- Riethoven, J. J. M. (2010). Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. *Methods in Molecular Biology*, 674, 33–42. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6_3.
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>.
- Roberts, A. V., Schum, A. (2003). Cell, tissue and organ culture| Micropropagation. *Encyclopedia of Rose Science* 57–66. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00124-5>.
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>.
- Roychoudhry, S., Kepinski, S. (2022). Auxin in root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(4), a039933. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039933>
- Ryan, E., Steer, M., Dolan, L. (2001). Cell biology and genetics of root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 215, 140–149. <https://doi.org/10.1007/BF01280310>.
- Samac, D. A., Austin-Phillips, S. (2006). Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods in Molecular Biology*, 343, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:301>.
- Samac, D. A., Tesfaye, M., Dornbusch, M., Saruul, P., Temple, S. J. (2004). A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*, 13(4), 349–361. <https://doi.org/10.1023/B:TRAG.0000040022.84253.12>.

- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D., Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, 5(1), 27–37. <https://doi.org/10.1080/02726358708904533>.
- Sanford, J. C., Smith, F. D., Russell, J. A. (1993). Optimizing The Biolistic Process for Different Biological Applications. *Methods in Enzymology*, 217(C), 483–509. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17086-K](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17086-K).
- Sangra, A., Shahin, L., Dhir, S. K. (2019). Long-term maintainable somatic embryogenesis system in alfalfa (*Medicago sativa*) using leaf explants: embryogenic sustainability approach. *Plants*, 8(8), 278. <https://doi.org/10.3390/plants8080278>.
- Saunders, J. W., Bingham, E. T. (1972). Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue 1. *Crop Science*, 12(6), 804–808. <https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183x001200060026x>.
- Sheng, J., Citovsky, V. (1996). *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell*, 8(10), 1699. <https://doi.org/10.1105/TPC.8.10.1699>.
- Scheuring, D., Löffke, C., Krüger, F., Kittelmann, M., Eisa, A., Hughes, L., Smith, R. S., Hawes, C., Schumacher, K., Kleine-Vehn, J. (2016). Actin-dependent vacuolar occupancy of the cell determines auxin-induced growth repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(2), 452–457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517445113>.
- Sieberer, B. J., Ketelaar, T., Esseling, J. J., Emons, A. M. C. (2005). Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist*, 167(3), 711–719. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01506.x>.
- Sieberer, B. J., Timmers, A. C. J., Lhuissier, F. G. P., Emons, A. M. C. (2002). Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiology*, 130(2), 977–988. <https://doi.org/10.1104/pp.004267>.
- Smith, E. F., Townsend, C. O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25(643), 671–673. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.25.643.671>.
- Soupeñe E., Foussard M., Boistard P., Truchet G., Batut J. (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(9), 3759–3763.
- Spiegel, H., Schillberg, S., Nölke, G. (2022). Production of recombinant proteins by *agrobacterium*-mediated transient expression. *Recombinant Proteins in Plants: Methods and Protocols*, 89–102. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2241-4_6.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047), 624–629. <https://doi.org/10.1038/318624a0>.
- Stachel, S. E., Nester, E. W., Zambryski, P. C. (1986). A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(2), 379–383. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.2.379>.
- Staiger, C. J. (2000). Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual review of plant biology*, 51, 257–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.257>.
- Steffens, B., Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant physiology*, 170(2), 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>.
- Su, H., Zhu, J., Cai, C., Pei, W., Wang, J., Dong, H., Ren, H. (2014). FIMBRIN1 Is Involved in Lily Pollen Tube Growth by Stabilizing the Actin Fringe. *The Plant Cell*, 24(11), 4539–4554. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099358>.
- Su, W., Xu, M., Radani, Y., Yang, L. (2023). Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10646. <https://doi.org/10.3390/IJMS241310646>.
- Sutton, M. A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., Grinsven, H. van, Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature*, 472(7342), 159–161. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003034>.
- Šamaj, J., Baluška, F., Menzel, D. (2004). New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends in Plant Science*, 9(5), 217–220. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.008>.
- Takahashi, M., Umetsu, K., Oono, Y., Higaki, T., Blancaflor, E. B., Rahman, A. (2017). Small acidic protein 1 and SCFTIR1 ubiquitin proteasome pathway act in concert to induce 2,4-

- dichlorophenoxyacetic acid-mediated alteration of actin in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal*, 89(5), 940–956. <https://doi.org/10.1111/tpj.13433>.
- Taylor, N. J., Fauquet, C. M. (2002). Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology*, 21(12), 963–977. <https://doi.org/10.1089/104454902762053891>.
- Tejada-Jiménez, M., Castro-Rodríguez, R., Kryvoruchko, I., Mercedes Lucas, M., Udvardi, M., Imperial, J., González-Guerrero, M. (2015). *Medicago truncatula* Natural Resistance-Associated Macrophage Protein1 is required for iron uptake by rhizobia-infected nodule cells. *Plant Physiology*, 168(1), 258–272. <https://doi.org/10.1104/pp.114.254672>.
- Terpolilli, J. J. (2009): *Why are the symbioses between some genotypes of Sinorhizobium and Medicago suboptimal for N2 fixation?*. [PhD Thesis]. Murdoch University, Perth, Australia.
- Tichá, M., Illésová, P., Hrbáčková, M., Basheer, J., Novák, D., Hlaváčková, K., Šamajová, O., Niehaus, K., Ovečka, M., Šamaj, J. (2020). Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1265–1280. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1814689>.
- Timmers, A. C. J. (2000). Infection of Root Hairs by Rhizobia: Infection Thread Development with Emphasis on the Microtubular Cytoskeleton. *Root Hairs*, 223–239. https://doi.org/10.1007/978-4-431-68370-4_14.
- Timmers, A. C. J. (2008). The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy*, 231(2), 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02040.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1242/dev.126.16.3617>.
- Timmers, A. C. J., Soupene, E., Auriac, M. C., De Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), 1204–1213. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1204>.
- Tsyganova, A. V., Kitaeva, A. B., Gorshkov, A. P., Kusakin, P. G., Sadovskaya, A. R., Borisov, Y. G., Tsyganov, V. E., Bautista, S. (2021). Glycyrrhiza uralensis Nodules: Histological and Ultrastructural Organization and Tubulin Cytoskeleton Dynamics. *Agronomy*, 11(12), 2508. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122508>.
- Turgut-Kara, N., Ari, S. (2010). The optimization of voltage parameter for tissue electroporation in somatic embryos of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *African Journal of Biotechnology*, 9(29), 4584–4588.
- Tyagi, A. K. (2001). Plant genes and their expression. *Current science*, 161–169.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V. V., Hara-Nishimura, I., Larkins, B. A. (2010). Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6894–6899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911482107>
- van Essen, D., Zhu, Y., Sacconi, S. (2010). A Feed-Forward Circuit Controlling Inducible NF-κB Target Gene Activation by Promoter Histone Demethylation. *Molecular Cell*, 39(5), 750–760. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.010>.
- Vasil, I. K. (1988). Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology*, 6(4), 397–402. <https://doi.org/10.1038/nbt0488-397>.
- Vassileva, V. N., Kouchi, H., Ridge, R. W. (2005). Microtubule dynamics in living root hairs: Transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals. *Plant Cell*, 17(6), 1777–1787. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031641>.
- Volkman, D., Baluška, F. (1999). Actin cytoskeleton in plants: From transport networks to signaling networks. *Microscopy Research and Technique*, 47(2), 135–154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19991015\)47:2<135::AID-JEMT6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19991015)47:2<135::AID-JEMT6>3.0.CO;2-1).
- 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, 304804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01870>.

- Wasteneys, G. O., Galway, M. E. (2003). Remodeling the Cytoskeleton for Growth and Form: An Overview with Some New Views. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 691–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134818>.
- Weeks, J. T., Ye, J., Rommens, C. M. (2008). Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*, 17(4), 587–597. <https://doi.org/10.1007/S11248-007-9132-9>.
- Weerasinghe, R. R., Collings, D. A., Johannes, E., Allen, N. S. (2003). The distributional changes and role of microtubules in Nod factor-challenged *Medicago sativa* root hairs. *Planta*, 218(2), 276–287. <https://doi.org/10.1007/S00425-003-1097-1/FIGURES/10>.
- Wegner, A., Engel, J. (1975). Kinetics of the cooperative association of actin to actin filament. *Biophysical Chemistry*, 3(3), 215–225. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(75\)80013-5](https://doi.org/10.1016/0301-4622(75)80013-5).
- Wei, Z., Liu, Y., Lin, C., Wang, Y., Cai, Q., Dong, Y., Xing, S. (2011). Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnology Letters*, 33(12), 2487–2494. <https://doi.org/10.1007/S10529-011-0709-2>.
- Whitehead, L. F., Day, D. A., Hardham, A. R. (1998). Cytoskeletal arrays in the cells of soybean root nodules: The role of actin microfilaments in the organisation of symbiosomes. *Protoplasma*, 203(3–4), 194–205. <https://doi.org/10.1007/BF01279476>.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, J., et al. (2001). The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294(5550), 2317–2323. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1066804>.
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., Wang, X. C., Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12870-014-0327-Y>.
- Xu, L. (2018). De novo root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition. *Current opinion in plant biology*, 41, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.004>.
- Xu, N., Kang, M., Zobrist, J. D., Wang, K., Fei, S. Z. (2022). Genetic Transformation of Recalcitrant Upland Switchgrass Using Morphogenic Genes. *Frontiers in Plant Science*, 12, 781565. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.781565/FULL>.
- Yan, P., Shen, W., Gao, X., Li, X., Zhou, P., Duan, J. (2012). High-throughput construction of intron-containing hairpin RNA vectors for RNAi in plants. *PLOS one*, 7(5), e38186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038186>.
- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., Held, M., Hossain, M. S., Szczyglowski, K., Morieri, G., et al. (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of lotus japonicus roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell*, 21(1), 267–284. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063693>.
- Yoneda, A., Higaki, T., Kutsuna, N., Kondo, Y., Osada, H., Hasezawa, S., Matsui, M. (2007). Chemical genetic screening identifies a novel inhibitor of parallel alignment of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant and Cell Physiology*, 48(10), 1393–1403. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm120>.
- Yoon, Y., Pitts, K., McNiven, M. (2002). Studying cytoskeletal dynamics in living cells using green fluorescent protein. *Molecular biotechnology*, 21, 241–250. <https://doi.org/10.1385/MB:21:3:241>.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 2(12), 2143–2150. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1983.TB01715.X>.
- Zepeda, I., Sánchez-López, R., Kunkel, J. G., Bañuelos, L. A., Hernández-Barrera, A., Sánchez, F., Quinto, C., Cárdenas, L. (2014). Visualization of Highly Dynamic F-Actin Plus Ends in Growing *Phaseolus vulgaris* Root Hair Cells and Their Responses to *Rhizobium etli* Nod Factors. *Plant and Cell Physiology*, 55(3), 580–592. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCT202>.
- Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., Kong, Z. (2019). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during

- nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 221(2), 1049–1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>
- Zhao, Y., Zhao, S., Mao, T., Qu, X., Cao, W., Zhang, L., Zhang, W., He, L., Li, S., Ren, S., et al. (2011). The plant-specific actin binding protein SCAB1 stabilizes actin filaments and regulates stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23(6), 2314–2330. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.086546>.
- Zhou, R., Liu, H., Ju, T., Dixit, R. (2020). Quantifying the polymerization dynamics of plant cortical microtubules using kymograph analysis. *Methods in Cell Biology*, 160, 281–293. <https://doi.org/10.1016/BS.MCB.2020.04.006>.
- Zupan, J. R., Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiol*, 1041–1047. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1041>.
- Zwetsloot, A. J., Tut, G., Straube, A. (2018). Measuring microtubule dynamics. *Essays in Biochemistry*, 62(6), 725–735. <https://doi.org/10.1042/EBC20180035>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2,4-D	2,4-dichlorfenoxycetová kyselina
3U (UTR)	3' nepřekládaná oblast
5U (UTR)	5' nepřekládaná oblast
Amp	ampicilin
<i>BAR</i>	gen <i>BIALAPHOS RESISTANCE</i>
BRE	B rozpoznávací element
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CDS	kódující sekvence
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
eGFP	vylepšený zelený fluorescenční protein
F-aktin	filamentární aktin
G-aktin	aktin v podobě monomerů
GFP	zelený fluorescenční protein
GMO	geneticky modifikovaný organismus
GTP	guanosintrifosfát
IBA	indol-3-máselná kyselina
IAA	indol-3-octová kyselina
JA	jasmonová kyselina
Kan	kanamycin
<i>LB</i>	levá hranice
M	marker
MAP4	Protein asociovaný s mikrotubuly 4
MBD	doména vážící mikrotubuly
MCS	mnohonásobná klonovací oblast
mRFP	monomerní červený fluorescenční protein
mRNA	messenger RNA
NAA	1-naftyloctová kyselina
NK	negativní kontrola
Nod faktor	nodulační faktor
<i>NOS</i>	gen <i>NOPALINE SYNTHASE</i>
OD ₆₀₀	optická hustota vzorku měřeného při vlnové délce 600 nm
p/Pro	promotor
PCR	polymerázová řetězová reakce
pDNA	plazmidová DNA
<i>pEF1α</i>	promotor <i>ELONGAČNÍHO FAKTORU 1 ALFA</i>
PPT	fosfinitricin
PPT ^R	rezistence na fosfinitricin
<i>pUBQ10</i>	promotor <i>UBIKVITINU 10</i>
<i>RB</i>	pravá hranice
RFP	červený fluorescenční protein
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky za minutu
rRNA	ribozomální RNA
Spe	spektinomycin
t/Ter	terminátor

T-DNA	transferová DNA
tRNA	transferová RNA
TSS	místo začátku transkripce
TUA6	Tubulin alfa 6
TUB6	Tubulin beta 6
<i>Vir</i>	geny virulence
<i>virGN_{45D}</i>	gen <i>VirG</i> , s mutací asparaginu na kyselinu asparagovou v pozici 54