

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Dokumentace symbiotických interakcí rostlin vojtěšky
s prospěšnými bakteriemi rodu *Rhizobium***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

„Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce, panu doc. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za věnovaný čas, pomoc a odborné rady při práci. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. a celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za možnost práce v laboratoři, za milou atmosféru a ochotu vždy pomoci a poradit. Práce byla částečně podpořena IGA (projekty č. IGA_PrF_2018_031 a IGA_PrF_2019_011) ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michaela Jarošová
Název práce	Dokumentace symbiotických interakcí rostlin vojtěšky s prospěšnými bakteriemi rodu <i>Rhizobium</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Rostliny se mohou proti vlivu biotického stresu, konkrétně proti patogenům, bránit mnoha způsoby. Tato obrana mimo jiné zahrnuje komplexní dráhu MAP kinas. U modelového druhu *Medicago sativa* jsou to např. SIMK a SIMKK. Tyto kinasy jsou podle všeho zahrnuty také do symbiotického procesu interakcí vojtěšky a rhizobiálních bakterií. Na studium tohoto interakčního procesu mohou být použity metody neinvazivní mikroskopie, jakou je light-sheet mikroskopie. Diplomová práce byla zaměřena na studium symbiotických interakcí rostlin *Medicago sativa* s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. Byly optimalizované podmínky kokultivace rostlin s bakteriemi u kontrolních i transgenních linií *M. sativa* s expresí ABD2-GFP pro vizualizaci aktinového cytoskeletu. Interakční procesy byly mikroskopicky pozorovány v časových intervalech po dobu několika hodin. Tato analýza probíhala dvěma způsoby. Nejprve při snímání interakcí přímo na kultivačním médiu v Petriho miskách, poté pomocí light-sheet mikroskopie, která dovoluje navodit podmínky co nejpodobnější těm přirozeným. V případě light-sheet mikroskopie byly pozorovány pouze první stádia přichycení rhizobakterií na kořenové vlásky. Také byla vyhodnocena efektivita tvorby hlízek mezi kontrolní linií a linií produkující ABD2-GFP. Při imunoblotové analýze abundance kinas bylo zjištěno, že linie se sníženou expresí SIMKK měla velmi sníženou abundanci SIMK a při procesu tvorby hlízek došlo k silné aktivaci MAP kinas.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, <i>Sinorhizobium meliloti</i>
Počet stran	96
Počet příloh	6
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Michaela Jarošová
Title	Documentation of symbiotic interactions of alfalfa plants with rhizobia
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Plants can protect themselves to the effects of biotic stress, particularly pathogens, in many ways. This defense includes also the complex pathway of MAP kinases. In model *Medicago sativa* most studied are SIMK and SIMKK. These kinases also appear to be involved in the symbiotic process of alfalfa and rhizobial bacteria. Noninvasive microscopy methods such as light-sheet microscopy can be used to study these interaction processes. The aim of the thesis was to study symbiotic interactions of *Medicago sativa* plants with *Sinorhizobium meliloti*. Co-culture conditions for plants and for bacteria symbiosis on both control and transgenic *M. sativa* lines expressing ABD2-GFP for actin visualization were optimized. Interaction processes were observed at time intervals for several hours. This microscopic analysis was done in two ways. First, by documenting interactions directly on the culture medium in Petri dishes, and second, using light-sheet microscopy, which allows imaging of whole plants at conditions to be as similar as possible to the natural ones. In the case of light-sheet microscopy, only the first stages of attachment of rhizobacteria to root hairs were observed. Also, the efficacy of nodule formation process between the control line and the transgenic ABD2-GFP line was compared. In immunoblotting studies of kinase abundance, it was found that the line with downregulation of SIMKK expression (SIMKK-RNAi) had a very low SIMK abundance. In general, nodulation proces was consequenced by strong activation of MAP kinases.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, <i>Sinorhizobium meliloti</i>
Number of pages	96
Number of appendices	6
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	3
2.1 Biotický stres	3
2.1.1 Obrana rostlin proti patogenům	3
2.2 Mechanismy zapojené do obranných reakcí proti biotickému stresu	5
2.2.1 Buněčná stěna	5
2.2.2 Plazmatická membrána a endocytóza	5
2.2.3 Methylace cytosinu	6
2.2.4 Rostlinné hormony	7
2.2.5 Tvorba reaktivních forem kyslíku	7
2.2.6 Stresem indukované mitogen aktivované protein kinasy	8
2.3 Bakterie a jejich interakce s rostlinami	9
2.3.1 Symbiotická interakce rostlin rodu <i>Medicago</i> s rhizobiálními bakteriemi	10
2.4 Změny aktinového cytoskeletu během symbiotické reakce rostlin s rhizobiálními bakteriemi	14
2.5 Vizualizace rostlinného cytoskeletu v živých buňkách	17
2.5.1 Využití Light-sheet mikroskopie v rostlinné vývojové biologii	18
3 Experimentální část	20
3.1 Materiál	20
3.1.1 Použité chemikálie	20
3.1.2 Použité protilátky	21
3.1.3 Použité přístroje	22
3.1.4 Použité roztoky a média	23
3.1.5 Rostlinný materiál	28
3.1.6 Bakteriální materiál	29
3.2 Metody	29
3.2.1 Příprava médií pro indukci somatické embryogeneze <i>Medicago sativa</i> v <i>in vitro</i> podmínkách	29
3.2.2 Příprava pevného MS média pro kultivaci <i>Medicago sativa</i> ze semen	30
3.2.3 Příprava pevného Fahraeus média bez obsahu dusíku	30
3.2.4 Příprava tekutého Fahraeus média bez obsahu dusíku	30
3.2.5 Příprava TY média pro kultivaci <i>S. meliloti</i>	31
3.2.6 Příprava LB média pro kultivaci <i>S. meliloti</i>	31

3.2.7 Příprava kultury <i>Sinorhizobium meliloti</i> ze zásobního roztoku	31
3.2.8 Příprava a kultivace kultur <i>S. meliloti</i> ve Fahraeus médiu bez obsahu dusíku	32
3.2.9 Povrchová sterilizace semen <i>M. sativa</i>	32
3.2.10 Kultivace semen divokého typu kultivarů Europe	32
3.2.11 Kultivace semen <i>M. sativa</i> kontrolní linie RSY a transgenní linie s produkcí ABD2-GFP	33
3.2.12 Somatická embryogeneze <i>M. sativa</i>	34
3.2.13 Indukce symbiotické interakce mezi kořeny <i>M. sativa</i> a bakteriemi <i>S. meliloti</i>	34
3.2.14 Dokumentace a vyhodnocování klíčivosti semen a procesu tvorby hlízek	35
3.2.15 Dokumentace a vyhodnocování průběhu somatické embryogeneze	35
3.2.16 Příprava příčných a podélných řezů hlízek <i>M. sativa</i>	35
3.2.17 Příprava rostlin <i>M. sativa</i> pro vitální mikroskopické pozorování	36
3.2.18 Příprava rostlin <i>M. sativa</i> pro mikroskopii v FEP tubičce	36
3.2.19 Příprava rostlin <i>M. sativa</i> pro mikroskopii v FEP tubičce bez přítomnosti agarosy	36
3.2.20 Příprava rostlin <i>M. sativa</i> pro mikroskopii na plastovém držáku	38
3.2.21 Příprava rostlin <i>M. sativa</i> pro sledování interakce s bakteriemi <i>S. meliloti</i> v Light-sheet mikroskopu	39
3.2.22 Light-sheet mikroskopie	39
3.2.23 Snímání transgenních rostlin <i>M. sativa</i> s expresí 35S::ABD2-GFP a bakterií <i>S. meliloti</i> s expresí mRFP	40
3.2.24 Zpracování dat	41
3.2.25 Imunobloting	41
3.2.25.1 Odběr vzorků a jejich homogenizace	41
3.2.25.2 Extrakce proteinů	41
3.2.25.3 Centrifugace	42
3.2.25.4 Měření koncentrace proteinů podle Bradforda	42
3.2.25.5 Příprava vzorků pro nanesení na gel	43
3.2.25.6 Výroba gelů	43
3.2.25.7 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	44
3.2.25.8 Přenos proteinů na membránu	44
3.2.25.9 Blokování nespecifických vazeb a aplikace protilátek	45
3.2.25.10 Detekce proteinů	46
3.2.25.11 Odstranění navázaných protilátek z membrán	46
3.2.25.12 Vyhodnocování	46

4	Výsledky	47
4.1	Klíčivost semen <i>M. sativa</i>	47
4.2	Somatická embryogeneze kontrolních a transgenních linií <i>M. sativa</i>	49
4.3	Pozorování symbiotického procesu mezi <i>M. sativa</i> a <i>S. meliloti</i>	50
4.3.1	Časoběrné snímání interakcí mezi kořenovými vlásky <i>M. sativa</i> a rhizobiálními bakteriemi <i>S. meliloti</i>	52
4.4	Pozorování procesu symbiózy u kontrolních a transgenních rostlin <i>M. sativa</i> s rhizobakteriemi <i>S. meliloti</i>	56
4.4.1	Vyhodnocení růstových parametrů rostlin <i>M. sativa</i>	61
4.4.2	Porovnání tvorby kořenových hlízek u rostlin <i>M. sativa</i> mezi kontrolní a transgenní linií	62
4.4.3	Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v zastoupení a aktivitě MAPK v rostlinách v průběhu symbiotického procesu	65
4.5	Růst kořene <i>M. sativa</i> při snímání Light-sheet mikroskopem	72
4.5.1	Optimalizované pozorování interakcí mezi kořenovými vlásky <i>M. sativa</i> a rhizobiálními bakteriemi <i>S. meliloti</i> v Light-sheet mikroskopu	78
5	Diskuze	83
6	Závěr	86
7	Literatura	88
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	95
9	Přílohy	96

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Vypracování literární rešerše zaměřené na odpověď rostlinných buněk na biotický stres a při biotických interakcích. Souhrn poznatků o fenotypových projevech stresovaných rostlin na úrovni pletiv, orgánů a celých rostlin při aktivaci signálních drah v podmínkách stresu a význam MAPK-MAPKK signálních modulů při kompartmentalizaci přenosu signálů v buňce.

Experimentální část

- Optimalizace kultivačních podmínek *in vivo* a *in vitro* pro řízenou aplikaci bakterií rodu *Rhizobium*, ke sledování symbiotického procesu a k vyhodnocování reakcí rostlin.
- Charakteristika fenotypových změn rostlin v symbióze s bakteriemi rodu *Rhizobium*, kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování vývojových parametrů.
- Mikroskopické studium interakcí rostlin s bakteriemi rodu *Rhizobium*, průběhu symbiotického procesu a změn dynamických procesů v živých buňkách kořene se zaměřením na cytoskelet.
- Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v zastoupení a aktivitě MAPK v geneticky modifikovaných rostlinách v průběhu symbiotického procesu.

1 ÚVOD

Rostliny si během evoluce vyvinuly specifické mechanismy, kterými se přizpůsobují složitým stresovým podmínkám, čímž minimalizují škody při zachování cenných zdrojů pro růst a reprodukci. Pro tento účel jsou schopny využít specifickou a jedinečnou stresovou odezvu, i při působení více stresových faktorů současně (Rizhsky *et al.*, 2004). Interakce rostlin s patogenními bakteriemi může probíhat v extracelulárním prostoru (apoplastu), nebo mohou mikroorganismy přímo napadat rostlinné buňky a jejich funkce. Jedním z důležitých ochranných prvků rostlin proti patogenům jsou buněčné povrchy, jako je buněčná stěna či plazmatická membrána. Důležitou roli v ochranných mechanismech hrají také rostlinné hormony. Například kyselina abscisová (ABA) hraje důležitou úlohu v mnoha aspektech rozvoje rostlin a v adaptivních reakcích na různé environmentální podmínky (Shinozaki *et al.*, 2003). Rostlinné hormony kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) a ethylen (ET) hrají hlavní roli v rezistenci vůči chorobám. Tyto biotické stresové hormony jsou součástí komplexní sítě synergických a antagonistických interakcí (Thomma *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002). Dalším charakteristickým znakem úspěšného rozpoznání rostlinných patogenů je také rychlá a přechodná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) nazvaná "oxidativní hoření" (Lamb a Dixon 1997, Torres *et al.*, 2006).

Při prospěšné symbiotické interakci mezi kořeny bobovitých rostlin a bakteriemi rodu *Rhizobium* dochází k tvorbě útvarů na kořenech rostlin, zvaných hlízky, v nichž jsou diferenciované formy bakterií schopny vzdušný dusík přeměňovat na organické dusíkaté sloučeniny využitelné rostlinami. Tento proces se nazývá fixace dusíku a je velmi důležitý i z hlediska zemědělství, jelikož se bobovitých rostlin využívá jako zelených hnojiv k obohacení půdy dusíkatými sloučeninami.

Tato diplomová práce se zaměřuje především na mikroskopickou analýzu interakcí mezi rostlinami *Medicago sativa* a rhizobiálními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. Transgenní rostliny použité v této práci nesou ve svém genomu stabilně začleněn konstrukt *35S::ABD2::GFP*. Díky produkci fluorescenčně značeného proteinu ABD2-GFP je možné sledovat aktinový cytoskelet v živých buňkách pomocí rozličných mikroskopických metod. Využití bakterií s expresí fluorescenčních proteinů, GFP nebo mRFP, umožní pozorování počátků symbiotických interakcí s rostlinnými kořenovými vlásky a následnou tvorbu kořenových hlízek. Je však nutné vzít v úvahu skutečnost, že při přílišném zatížení rostlin i bakterií vysokými dávkami excitačního světla, může

indukovaná fototoxicita zastavit průběh symbiotického procesu. Tyto symbiotické procesy budou pozorovány, jak při růstu na pevném kultivačním médiu v miskách pomocí klasických mikroskopických metod, tak i pomocí light-sheet fluorescenční mikroskopie, která dovoluje sledovat živé organismy v téměř přirozených podmínkách (Ovečka *et al.*, 2015). Taktéž budou vyhodnoceny změny v zastoupení proteinů SIMK a MMK3 mezi různými liniemi *M. sativa* a taktéž bude porovnána aktivita MAPK v těchto rostlinách za kontrolních podmínek a v podmínkách po inokulaci bakteriální kulturou *S. meliloti*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Rostliny, vzhledem ke svému přisedlému způsobu života, jsou neustále vystavovány širokému spektru stresových faktorů. Mezi tyto faktory patří například sucho, zvýšená teplota, vysoká slanost půdy, chlad, nedostatek živin, nebo napadení a infekce rostlinnými patogeny. Tyto faktory mohou mít velmi nepříznivý vliv na růst a výnos rostlin v polních podmínkách (Chinnusamy a Zhu, 2009; Suzuki *et al.*, 2014). Rostliny si během evoluce vyvinuly specifické mechanismy, které je ochraňují vůči složitým stresovým podmínkám, minimalizují možné poškození a napomáhají při zachování cenných zdrojů nutných pro růst a reprodukci. Rostliny jsou schopny aktivovat i specifické a jedinečné obranné reakce, když jsou pod vlivem kombinace více stresových faktorů současně (Rizhsky *et al.*, 2004). Současné působení různých faktorů vede k indukci složitých reakcí rostlin, jelikož odezvy na kombinaci různých stresových faktorů jsou z velké části řízeny aktivací a kombinací různých signálních drah. Tyto dráhy se mohou navzájem pozitivně, ale i negativně ovlivňovat. To je typické zejména při kombinaci biotických a abiotických stresů působících na rostliny, jelikož signalizační dráhy aktivované těmito odlišnými stresy mohou působit vzájemně antagonisticky (Asselbergh *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2014).

V dnešní době je důležité zaměřit výzkum reakcí rostlin vůči stresům takovým směrem, aby bylo možné komplexně porozumět indukci a sledu reakcí rostliny na stresové faktory a vypracovat metody pro řízené úpravy rostlin k tomu, aby byly více odolné proti stresům při udržení schopnosti dosahovat vysoké výnosy (Suzuki *et al.*, 2014). Například studium interakcí rostlin s patogeny přináší důležité informace nejen ve výzkumu samotného onemocnění rostlin, ale je klíčové také pro pochopení důsledků nových epidemií v rámci ochrany rostlinných společenstev, pro regulaci invazivních plevelů, ale také i pro bezpečné zavádění metod biologické kontroly (Parker a Gilbert, 2004).

2.1 Biotický stres

2.1.1 Obrana rostlin proti patogenům

Rostliny jsou neustále vystaveny širokému spektru mikroorganismů, jako jsou bakterie, houby či oomycety. Cílem mikroorganismů je získat přístup k živinám rostlin a následně se množit. Interakce může probíhat jenom v extracelulárním prostoru

(apoplastu), nebo mohou mikroorganismy napadat rostlinné buňky, vnikat do nich a inhibovat jejich funkce. Pokud jsou tyto mikroorganismy patogenní, jejich vzájemná interakce s rostlinami může být kompatibilní, nebo nekompatibilní. Kompatibilní vztah je interakce, která vede u rostliny ke vzniku onemocnění. Nekompatibilní vztah se projevuje rezistencí rostliny vůči patogenovi (Leborgne-Castel *et al.*, 2010).

Vzhledem k tomu, že rostlinám chybí síť cirkulujících buněk v rámci imunitního systému, jejich obrana závisí na vrozené imunitě každé buňky a na systémových signálech, které se do celé rostliny šíří z infekčních míst. Lokální a systémové imunitní odpovědi jsou známé jako hypersenzitivní odpověď (HR), která je charakterizována rychlou buněčnou smrtí v místě infekce (Mur *et al.*, 2008) a také systémově získanou rezistencí, která poskytuje dlouhodobou ochranu celému organismu (Durrant a Dong, 2004).

Imunitní systémy v rostlinách zahrnují dva druhy obrany proti mikrobiálním patogenům (Jones a Dangl, 2006). První druh obrany je tvořen transmembránovými receptory, nazývanými receptory rozpoznávání vzoru (PRR). Ty detekují konzervativní mikrobiální epitopy známé jako molekulární vzorce asociované s patogenem (PAMP) a iniciují obranné reakce, které zahrnují přeprogramování exprese hostitelského genu a tvorbu antimikrobiálních sloučenin. Tyto PAMP jsou rozpoznávány odlišnými receptory pro rozpoznávání konzervovaných vzorů buněk, které aktivují bazální nebo vrozené imunitní odpovědi, což se nazývá PAMP-vyvolaná imunita (PTI). Některými příklady PAMP jsou bakteriální povrchové elicitory flagellin (flg22), harpin a lipopolysacharidy a komponenty houbových buněčných stěn chitin, chitosan či ergosterol (Boller a Felix, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010).

K potlačení hostitelské PTI mohou patogeny přenášet efektorové proteiny do hostitelských buněk, aby potlačily aktivity signalizačních komponent PTI. Rostliny tento postup zvrátily vývojem mechanismů pro detekci mikrobiálních efektorů prostřednictvím imunitních receptorů, nazývaných proteiny rezistence (R), které vyvolávají lokální buněčnou smrt hostitelské buňky (hypersenzitivní reakci). Tento způsob rostlinné obrany je označován jako efektorově spouštěná imunita (ETI) (Jones a Dangl, 2006). Četné studie podporují centrální roli signálních kaskád mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK) v obraně vůči patogenům, kupříkladu u *Arabidopsis*, tabáku, rýže a rajčete (Frye *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2010).

2.2 Mechanismy zapojené do obranných reakcí proti biotickému stresu

2.2.1 Buněčná stěna

Rostlinná buněčná stěna je exoskeleton (extracelulární matrix) obklopující buněčný protoplast a je tvořena vysoce integrovanou a strukturálně složitou sítí proteinů a polysacharidů včetně celulózy, hemicelulózy a pektinu (Crosgrave, 2005). Při vývoji v procesu morfogeneze poskytuje strukturální podporu buněk, pletiv a orgánů a společně s kutikulou představují první fázi obrany před biotickým i abiotickým stresem (Hamann, 2012). Například při napadení patogeny jsou rostliny schopny v oblasti pokusů o penetraci patogenu ukládat a měnit složení komponentů a strukturu buněčné stěny v reakci na infekci. Taková buněčná stěna je bohatá na kalózu, akumulují se tu fenolické sloučeniny a různé toxiny a syntetizují se ligninové polymery pro zpevnění stěny (Hückelhoven, 2007; Dong *et al.*, 2008).

Patogeny na buněčné stěně rostlin uvolňují PAMP buď neúmyslně, nebo jako důsledek činnosti enzymů pro rozklad rostlinných buněčných stěn. Rostliny naopak rozpoznají tyto PAMP a aktivují řadu obranných mechanismů, včetně tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS), syntézy a exportu antimikrobiálních sloučenin a zpevnění buněčných stěn. Navíc, PAMP také mohou aktivovat intracelulární odpověď, jako je aktivace biosyntézy kyseliny salicylové, což pozitivně připraví rostlinu na další fázi boje. Buněčné odpovědi na PAMP, jako je např. flg22 nebo chitin, a narušení buněčné stěny jsou velmi podobné (např. indukce ROS, nadprodukce kalózy a ligninu). Mechanismus PAMP signalizace slouží ke studiu důležitého procesu známého jako signalizace integrity buněčné stěny. Poškození buněčné stěny (indukované např. v mutantech s poškozením buněčných stěn nebo po působení činnidly narušujícími buněčnou stěnu) může být spojeno se zvýšenou produkcí obranných hormonů rostlin, jako je kyselina salicylová, etylen nebo kyselina jasmonová. Jedním z důsledků signalizace integrity buněčné stěny je aktivace ochrany rostlinné buňky k omezení průniku patogenů v místech penetrace (Hématy *et al.*, 2009).

2.2.2 Plazmatická membrána a endocytóza

Rostlinná plazmatická membrána (PM) také slouží jako důležitá bariéra, která interaguje s mikroorganismy a umožňuje jejich rozpoznávání. Také má schopnost vázat

pomocí receptorů mikrobiální molekuly. Endocytóza je proces, při kterém se PM invaginuje dovnitř buňky a následně odštěpuje. Dochází k internalizaci plasmatických membránových proteinů a lipidů, extracelulárních molekul, tekutin, částic, exosomů, ale také virů a bakterií (Šamaj *et al.*, 2004). Endocytické dráhy zahrnují například clathrinem zprostředkovanou endocytózu, na clathrinu nezávislou endocytózu, endocytózu v kapalně fázi, fagocytózu a další. Endocytóza závislá na clathrinu je nejlépe studovanou formou endocytické internalizace. Je vysoce regulována strukturními, adaptačními, regulačními a signalizačními proteiny, které se podílejí na tvorbě endocytických vezikul, jako i jejich odštěpování od plasmatické membrány (Šamaj *et al.*, 2004). Tato internalizace je konzervovaný proces, který zprostředkovává mnoho buněčných biologických procesů, včetně vyhledávání a desenzibilizaci receptorů, rozptýlení signálů v buňce (Sorkin a von Zastrow, 2002; Murphy *et al.*, 2005; Lin a Guttman, 2010) a také v boji proti patogenům.

2.2.3 Methylace cytosinu

Metylace cytosinu je stabilní a dědičná modifikace DNA, která zprostředkovává epigenetickou kontrolu v celém genomu. V mnoha eukaryotních organismech je regulace genové exprese metylací DNA klíčová pro diferenciaci buněk a formování pletiv. Na molekulární úrovni je metylace DNA spojena s polohováním nukleosomů, specifickými histonovými modifikacemi a transkripční aktivitou (Zilberman *et al.*, 2007; Bernatavichute *et al.*, 2008; Chodavarapu *et al.*, 2010). V rostlinách modulace metylace DNA v reakci na podmínky prostředí představuje potenciálně robustní mechanismus pro regulaci genové exprese. Ve výzkumu Dowena *et al.* (2012) bylo zjištěno, že DNA metylace kontroluje obranné odpovědi *Arabidopsis* proti biotrofnímu patogenu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst). Profilování DNA methylomů rostlin *Arabidopsis* vystavených bakteriálním patogenům, avirulentním bakteriím nebo hormonu kyselině salicylové (SA), odhalilo mnoho diferenciaciálně metylovaných oblastí vyvolaných stresem, z nichž mnohé byly úzce spojeny se selektivní aktivací genové exprese.

Regulovaná degradace proteinů zprostředkovaná ubiquitinem a proteazomem (UPS = ubiquitin proteasome system) hraje zásadní roli v tom, že umožňuje rostlinám měnit jejich proteom, čímž rostliny zvyšují své šance na přežití za mnoha různých podmínek.

UPS se podílí na regulaci téměř všech vývojových procesů v rostlinách, od embryogeneze až po produkci rostlinných orgánů, pravděpodobně díky své ústřední roli v mnoha hormonálních cestách. Nedávné důkazy pomáhají pochopit molekulární mechanismy, při kterých dochází k propojování systému UPS s biotickými obrannými reakcemi prostřednictvím hormonální regulace (Dreher a Callis, 2006).

2.2.4 Rostlinné hormony

Současné důkazy naznačují, že rostlinný hormon kyselina abscisová (ABA) hraje důležitou úlohu v mnoha aspektech vývoje rostlin a v adaptivních reakcích na různé environmentální podmínky (Shinozaki *et al.*, 2003). Role ABA v odolnosti vůči chorobám rostlin však není úplně definována. Naproti tomu rostlinné hormony kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) a ethylén (ET) hrají hlavní roli v rezistenci vůči chorobám. Tyto biotické stresové hormony jsou součástí komplexní sítě synergických a antagonistických interakcí (Thomma *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002). Na základě experimentů s exogenní aplikací ABA, inhibicí biosyntézy ABA, či použití mutantů s deficiencí ABA bylo prokázáno, že zvýšené hladiny ABA korelují se zvýšenou citlivostí rostlin vůči patogenům. Pozorované změny v koncentraci ABA byly však mírné ve srovnání s dramatickými změnami v produkci SA, JA nebo ET při patogenezi (Audenaert *et al.*, 2002; Mohr a Cahill, 2003; Thaler a Bostock, 2004). U rostlin *Arabidopsis* při ošetření ABA nebo stimulací stresem, což vedlo k velkému zvýšení koncentrace ABA, došlo ke zvýšení náchylnosti k avirulentním bakteriím (Mohr a Cahill, 2003). Bylo zjištěno, že koncentrace ABA je důležitá pro vývoj náchylnosti k onemocnění u *Arabidopsis*. ABA negativně ovlivňuje rezistenci na chorobu hlavně tím, že interferuje na různých úrovních se signalizací biotických stresů. Rychlá tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) je ústřední součástí odpovědi na odolnost vůči chorobám a signalizaci ABA (Laloi *et al.*, 2004).

2.2.5 Tvorba reaktivních forem kyslíku

Dalším charakteristickým znakem úspěšného rozpoznání rostlinných patogenů je také rychlá a přechodná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) nazvaná "oxidativní hoření" (Lamb a Dixon 1997, Torres *et al.*, 2006). Tato produkce ROS je typicky

apoplastická a dvoufázová (Levine *et al.*, 1994). První je nespecifická přechodná fáze, která obvykle probíhá během několika minut po interakci s patogenem. Druhá fáze je trvalá, nastává po několika hodinách po útoku patogena a je obvykle spojena se vznikem obrany a hypersenzitivní reakcí (HR) (Piedras *et al.*, 1998; Grant a Loake, 2000). Produkce ROS se objevuje vždy během aktivace jak PTI, tak ETI. Nicméně, rozpoznávání faktorů avirulence z bakteriálních, houbových nebo virových patogenů prostřednictvím odpovídajících R proteinů také indukuje silné oxidativní hoření (Piedras *et al.*, 1998, Torres *et al.*, 2002). ROS mají, podle několika experimentů, také signalizační funkci. Pomáhají zprostředkovat aktivaci obranných genů a vytvářet další obranné prostředky, kontrolují transkripční faktory nebo interagují s jinými signalizačními složkami, jako jsou fosforylační kaskády (Kovtun *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). ROS mohou také zprostředkovat syntézu fytoalexinů a sekundárních metabolitů, které potlačují růst patogenů (Thoma *et al.*, 2003). Jsou však nejčastěji spojeny s HR, která přispívá k omezení šíření patogenů a může být zdrojem signálů pro vytvoření dalších obranných prostředků (Mur *et al.*, 2008).

2.2.6 Stresem indukované mitogen aktivované protein kinasy

Rostliny reagují na napadení patogenem tím způsobem, že aktivují vícestupňové obranné reakce, které zahrnují rychlou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), posílením buněčných stěn a hypersenzitivní reakci, kterou představuje lokalizovaná buněčná smrt v místech infekce (Jonak *et al.*, 2002). Tyto reakce zabezpečují signální dráhy spojené s kaskádami Mitogenem aktivovaných proteinových kinas. O nich je známo, že regulují buněčný růst a smrt, diferenciaci, buněčný cyklus a reakce na stresové faktory (Tanoue *et al.*, 2001). Eukaryotické mitogenem aktivované protein kinasové (MAPK, také nazývané MPK) kaskády přenášejí environmentální a vývojové podněty do intracelulárních odpovědí. MAPK kaskády se skládají minimálně ze tří kinasových komponent (MAPKKK, MAPKK a MAPK) v signálním modulu. Obecně membránové receptory stimulují MAP kinasu kinasu kinasu (MAP3K, také nazývané MAPKKK nebo MEKK) (Dan *et al.*, 2001; Tanoue *et al.*, 2001). Následně pokračuje sekvenční fosforylace, kdy MAP3K aktivují podřízené MAP kinasu kinasu (MAP2K, také nazývané MAPKK, MKK nebo MEK), které následně aktivují MAPK. MAPK pak cíleně aktivují prostřednictvím fosforylace různé efektorové proteiny v cytoplazmě nebo

jádro, mezi které patří jiné protein kinasy, enzymy, cytoskeletální proteiny nebo transkripční faktory (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

MAPK jsou promiskuitní serin/threonin protein kinasy, které fosforylují různé substráty, včetně transkripčních faktorů, proteinových kinas a cytoskeletálních proteinů. Specifičnost MAPK kaskád fungujících uvnitř stejné buňky závisí na přítomnosti dokovacích domén, které se nacházejí v různých složkách modulů MAPK a také prostřednictvím proteinů, které mohou fyzicky integrovat více proteinů, které se musí pro aktivaci dostat do vzájemného kontaktu (Tanoue *et al.*, 2001).

Rostlinné MAPK rozdělujeme do čtyř podskupin (A-D). Většina známých členů rodiny rostlinných MAPK patří do podskupin A a B. Modelová rostlina, hůseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*), obsahuje 12 MAPK řadících se do podskupin A-C. Ty mají ve svém aktivačním místě aminokyselinový fosforylační motiv TEY, zatímco osm MAPK patřících do podskupiny D má na odpovídající pozici motiv TDY (Jonak *et al.*, 2002). U vojtěšky (*Medicago sativa*) byly popsány MAPK indukovaná stresem (SIMK), MAPK2 (MMK2), MMK3 a stresem aktivovaná MAPK (SAMK) (Tena *et al.*, 2001).

Několik MAPK kaskád je spojeno s indukcí různých obranných reakcí. U vojtěšky různé patogenní elicitory aktivují různé kombinace až čtyř MAPK, identifikovaných jako SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK (Cardinale *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2002). SIMK a SAMK jsou aktivovány různým působením stresů (Cardinale *et al.*, 2002). V rámci signálních modulů SIMKK jako nadřazená MAPKK, aktivuje SIMK a MMK3, zatímco PRKK jako nadřazená MAPKK aktivuje SIMK, MMK3 a SAMK (Jonak *et al.*, 2002).

2.3 Bakterie a jejich interakce s rostlinami

Je známo, že mnohé bakterie jsou schopné stimulovat růst rostlin přímou nebo nepřímou interakcí s kořeny rostlin. Tyto bakterie byly klasifikovány jako rhizobakterie podporující růst rostlin (plant growth promoting rhizobacteria = PGPR). Navíc velká část kořenového systému rostlin je kolonizována mykorhizálními houbami a jejich přítomnost také obecně stimuluje růst rostlin (Artursson *et al.*, 2006).

2.3.1 Symbiotická interakce rostlin rodu *Medicago* s rhizobiálními bakteriemi

Rostliny z čeledi bobovitých tvoří prostřednictvím svých kořenových systémů vzájemnou symbiózu s bakteriemi rodu *Rhizobium* a *Badyrhizobium*. Tyto bakteriální rody jsou schopny fixovat vzdušní dusík ve speciálních kořenových orgánech hostitele, tzv. hlízkách (nodulech) (Gage *et al.*, 1996). Tento symbiotický vztah závisí na vzájemném rozpoznání, které je založeno na výměně signálu mezi oběma partnery. Flavonoidní sloučeniny produkované kořeny rostlin jsou prvními signály, které jsou vyměněny mezi hostitelem a jeho rhizobiálním symbiontem (Perret *et al.*, 2000). Jsou uvolňovány do rhizosféry a rozpoznávány bakteriálními NodD proteiny, transkripčními regulátory, které se vážou přímo na signální molekulu a jsou schopny aktivovat expresi adekvátních genů k produkci specifických Nod faktorů (NF) (Mulligan a Long, 1985). Dochází k syntéze a sekreci rhizobiálních lipochitooligosacharidů, nazvaných nodulační (Nod) faktory (NF), které aktivují řetězec událostí, jež vede k invazi kořenových buněk (Obr. 1A, Esseling *et al.*, 2004; Geurts *et al.*, 2005). NF jsou bakteriemi uvolňovány do prostředí. Chemická struktura NF je důležitá pro rozpoznání mezi symbiotickými partnery. NF jsou rozpoznány membránovými kinasami podobnými receptorům LysM (LysM-RLK) kořenových epidermálních buněk. Tím se spouští signalizační cesta, kterou tvoří signalizační modul nazvaný společná symbiotická cesta (Oldroyd, 2001).

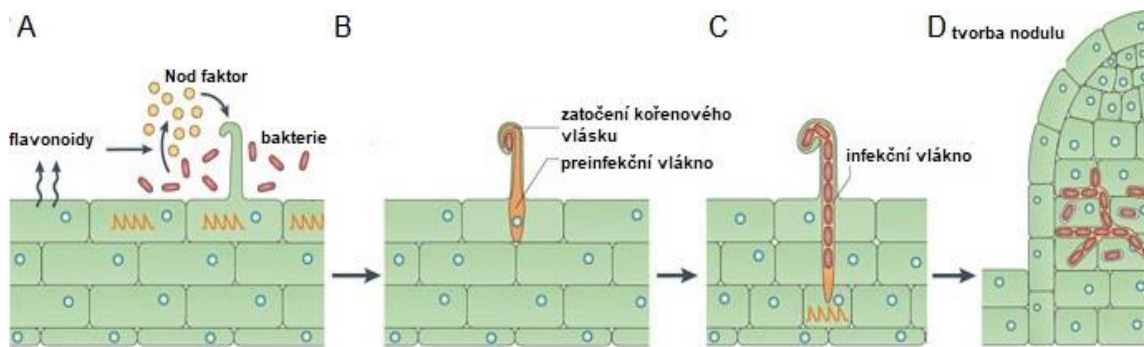
Po interakci kořenových vlásků a NF dochází ke změnám v uspořádání aktinu během 3 až 5 minut (Weerasinghe *et al.*, 2003). První deformace kořenových vlásků se objevují po 1 až 3 hodinách (Sieberer *et al.*, 2009). Odpovědi na NF ve vnitřních pletivech kořene jsou pomalejší. Reorganizace mikrotubulů a relokace jádra se objevuje po 16 až 18 hodinách v buňkách pericyklu a podobné události probíhají v kortexu po 18 až 24 hodinách (Timmers *et al.*, 1999). Výsledkem toho je synchronizace tvorby primordia hlízky ve vnitřní vrstvě kortexu s iniciací tvorby infekčního vlákna (IT) v kořenových vláscích epidermálních buněk. Žádná z těchto událostí se neobjeví, pokud neproběhne signalizace indukovaná NF (Murray *et al.*, 2011).

Průnik bakterií do jednotlivých buněčných vrstev kořene začíná v epidermální vrstvě přes kořenové vlásky. Zde jsou rhizobakterie zachyceny a následně internalizovány v utěsněné infekční kapse (Geurts *et al.*, 2005). První pozorovatelnou událostí v tomto infekčním procesu je zatočení kořenů vlásků (tzv. „curling“), při němž dochází k lokalizované inhibici polarizovaného vrcholového růstu na špičce kořenových vlásků

a k následnému postupnému přeorientování (Obr. 1B, Gage, 2004; Stacey *et al.*, 2006). Bakterie se uzavřou uvnitř zatočené části kořenových vlasů, kde rostlinná buněčná stěna degraduje, buněčná membrána se postupně invaginuje, vzniká zde bakteriální mikrokolonie, tvořící tzv. infekční kapsu. V tomto okamžiku kořenové vlásky zastavují růst směrem ven a začínají růst směrem dovnitř a vytvářejí apoplastický tubulární útvar, nazývaný infekční vlákno (IT), ve kterém se bakterie reprodukuje a postupují za jeho rostoucím vrcholem (Obr. 1C, Fournier *et al.*, 2008).

Degradace buněčné stěny, aniž by došlo k prasknutí buněk, je nezbytná pro iniciaci IT (Ridge a Rolfe, 1985). Enzymy degradující buněčnou stěnu kořenových vlásků, které jsou indukovány během infekce rhizobii, jsou především pektinmethylesteráza a polygalakturonáza (Munoz *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2002). Enzymy degradující stěnu rostlinných buněk jsou vylučovány na lokalizované místo na membráně, aby místně uvolnily nebo degradovaly buněčnou stěnu (Vissenberg *et al.*, 2001). IT roste směrem k dělicím se buňkám hlízkového primordia v kortexu kořene (Leborgne-Castel *et al.*, 2010). Ještě předtím, než IT přeroste epidermální vrstvu kořene, jsou kortikální buňky indukovány k dediferenciaci a k iniciaci buněčného dělení. Kromě kortikálních buněk se také aktivují buňky pericyklu. Když infekční vlákno dosáhne buněk vyvíjejícího se hlízkového primordia, dochází k jeho větvení, bakterie se uvolňují do buněk prostřednictvím endocytózy, přičemž vytvářejí struktury obalené plasmatickou membránou nazývané peribakteriální nebo symbiosomální membrána. Peribakteriální membrána účinně izoluje bakterie od cytoplazmy hostitelských buněk při kontrole transportu vybraných metabolitů v obou směrech (Puppo *et al.*, 2005).

Tyto procesy závisejí na degradaci buněčných stěn rostlinných buněk, na syntéze složek buněčné stěny infekčního vlákna a na reorganizaci cytoskeletálních komponent tvořících preinfekční vlákno. Následně se rhizobakterie v infikovaných buňkách dělí a diferencují na bakterioidy (van Brussel *et al.*, 1992; Stacey *et al.*, 2006).



Obr. 1: Schéma interakce mezi kořenovými vlásky a rhizobii, tvorba infekčního vlákna a nodulace (upraveno podle Oldroy, 2013)

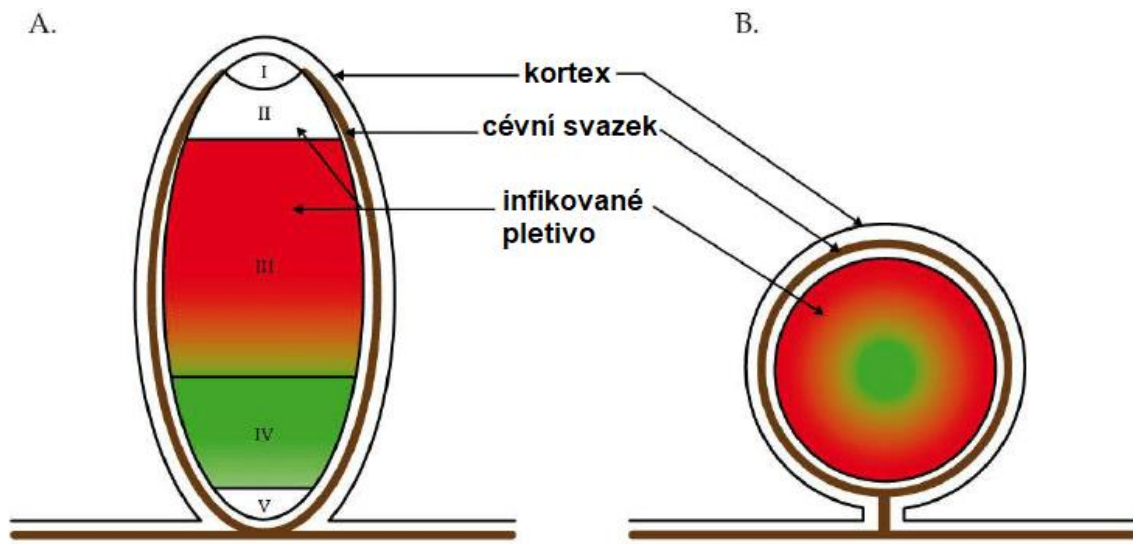
Souběžně s rhizobiální infekcí, kortikální buňky iniciují meristematickou aktivitu, čímž vytvářejí hlízková primordia (Obr. 1D). Ve hlízkovém primordiu se bakterioidy oddělí od cytoplazmy hostitelské buňky peribakteriální membránou a vytvoří se specifická struktura s charakteristikou organely, nazývaná symbiosom. Bakterioidy, uzavřené ve funkční symbiózní membráně mají pečlivě regulovaný zdroj kyslíku a uhlíku, který umožňuje bakteriím účinně redukovat dusík uvnitř rostlinných pletiv. Po dokončení diferenciaci buněk a bakterioidů, bakterie začínají exprimovat geny pro enzymy komplexu nitrogenasy a tím mohou začít s fixací atmosférického dusíku (N_2) přičemž se vytváří amonium (NH_3), který je následně asimilován hostitelskou rostlinou (Stacey *et al.*, 2006). Tvorba hlízek je iniciována mitotickou aktivací buněk vnitřního kortexu kořene. Podrobná analýza buněk kořene *Medicago sativa* (Timmers *et al.*, 1999) ukázala, že vnitřní a střední kortikální buňky, stejně jako buňky pericyklu, jsou mitoticky aktivovány po inokulaci rhizobiální bakteriální kulturou. Bylo také dokázáno, že buňky střední vrstvy kortexu kořene tvoří meristém zakládající se hlízky.

Hlízky u rostlin se obecně dělí na dva druhy, na nedeterminované a determinované. Maximální doba fixace dusíku u determinovaných i nedeterminovaných hlízek je omezena na 3 až 5 týdnů po infekci (Puppo *et al.*, 2005). Nedeterminované hlízky mají protáhlý tvar a pocházejí z distálního růstu z trvalého meristému; zatímco determinované hlízky jsou sférické a vyvíjejí se z přechodného meristému (Hirsch, 1992). Determinované hlízky ztrácí svůj meristém již v rané fázi vývoje. Naproti tomu nedeterminované hlízky mají trvalý apikální meristém, aktivita vede k tvorbě různých zón představujících postupné vývojové stavy (Vasse *et al.*, 1990; Hadri *et al.*, 1998).

Modelový rod *Medicago* tvoří nedeterminované hlízky. Jsou složeny z pletiv s odstupňovaným stářím, kde nejmladší buňky se nachází v blízkosti meristému.

Centrální pletivo hlízek se skládá ze dvou buněčných typů. První typ reprezentují infikované buňky, které obsahují rhizobia, a jsou rozptýlené mezi specializovanými neinfikovanými buňkami. Toto centrální pletivo je obklopeno třemi neinfikovanými periferními pletivy: parenchymem, endodermis a kortexem. Neinfikovaná pletiva jsou také přítomna v bazální části hlízek (Brewin, 1991). Celkově jsou takové hlízky složeny z několika zón (Obr. 2). Zóna I obsahuje meristém bez bakterií, který je tvořen nediferencovanými dělicími se buňkami. Zóna II, neboli zóna infekce, obsahuje ve své distální části neinfikované diferenciační buňky (oblast před infekcí) a buňky, kde jsou bakterie uvolňovány z IT; v proximální části zóny II se rostlinné a bakteriální buňky postupně zvětšují a diferencují prostřednictvím řady endoreduplikačních cyklů (Cebolla *et al.*, 1999). Zóna III obsahuje symbiózy, v nichž dochází k fixaci dusíku bakteriální nitrogenasou. Symbiózy se skládají z diferencovaných bakterií obklopených peribakteriální membránou rostlinného původu. Oblast mezi zónami II a III je oblastí několika širokých buněčných vrstev, nazývaných interzóna. Po několika týdnech postupně zesiluje zóna IV, které se vyvíjí z proximální části hlízky (Perez Guerra *et al.*, 2010).

Prvními příznaky stárnutí hlízky je snížení hladiny legemoglobinu, což vede k růžové až zelené barvě hlízky a ke ztrátě turgidity u starších hlízek (Perez Guerra *et al.*, 2010). Ve zralých nedeterminovaných hlízkách začíná senescence buněk v zóně IV. Při stárnutí hlízek se tato senescenční zóna postupně posouvá v proximálním distálním směru, dokud nedosáhne apikální části, což vede k celkové degeneraci hlízek (Puppo *et al.*, 2005, Van de Velde *et al.*, 2006). Při použití transmisní elektronové mikroskopie byly během senescence rozlišeny dvě po sobě jdoucí stadia: první stádium, charakterizované degradací bakterií s několika málo umírajícími rostlinnými buňkami a pokročilejší stádium senescence hlízek, během které buňky úplně resorbují jejich symbiózy a začínají se rozpadat (Van de Velde *et al.*, 2006).



Obr. 2: Schéma hlízky a jejich zón. A) podélný a B) příčný řez (upraveno podle Dunpot *et al.*, 2012)

2.4 Změny aktinového cytoskeletu během symbiotické reakce rostlin s rhizobiálními bakteriemi

Aktinový cytoskelet je nejkřehčí a nejdynamičtější složka cytoskeletu rostlinné buňky. Zobrazování takovéto jemné struktury aktinového cytoskeletu je mimo možnosti klasické konfokální mikroskopie a vyžaduje nové mikroskopické techniky, které umožňují vyšší rychlost snímání a vyšší rozlišení (Genre a Timmers, 2019). V rostlinách má aktinový cytoskelet důležitou roli v regulaci intracelulárního transportu, v morfogenezi, v dynamice endomembránového systému a je klíčovým regulátorem polarity a růstu buněk (Staiger, 2000; Braun *et al.*, 2004; Pollard a Cooper, 2009). Aktinový cytoskelet je nevyhnutelný i pro růst kořenů (Ringli *et al.*, 2002). V kořenových vláscích je aktin uspořádán v podélných svazcích, které se rozprostírají podél buňky až ke špičce (Miller *et al.*, 1999, Lhuissier *et al.*, 2001).

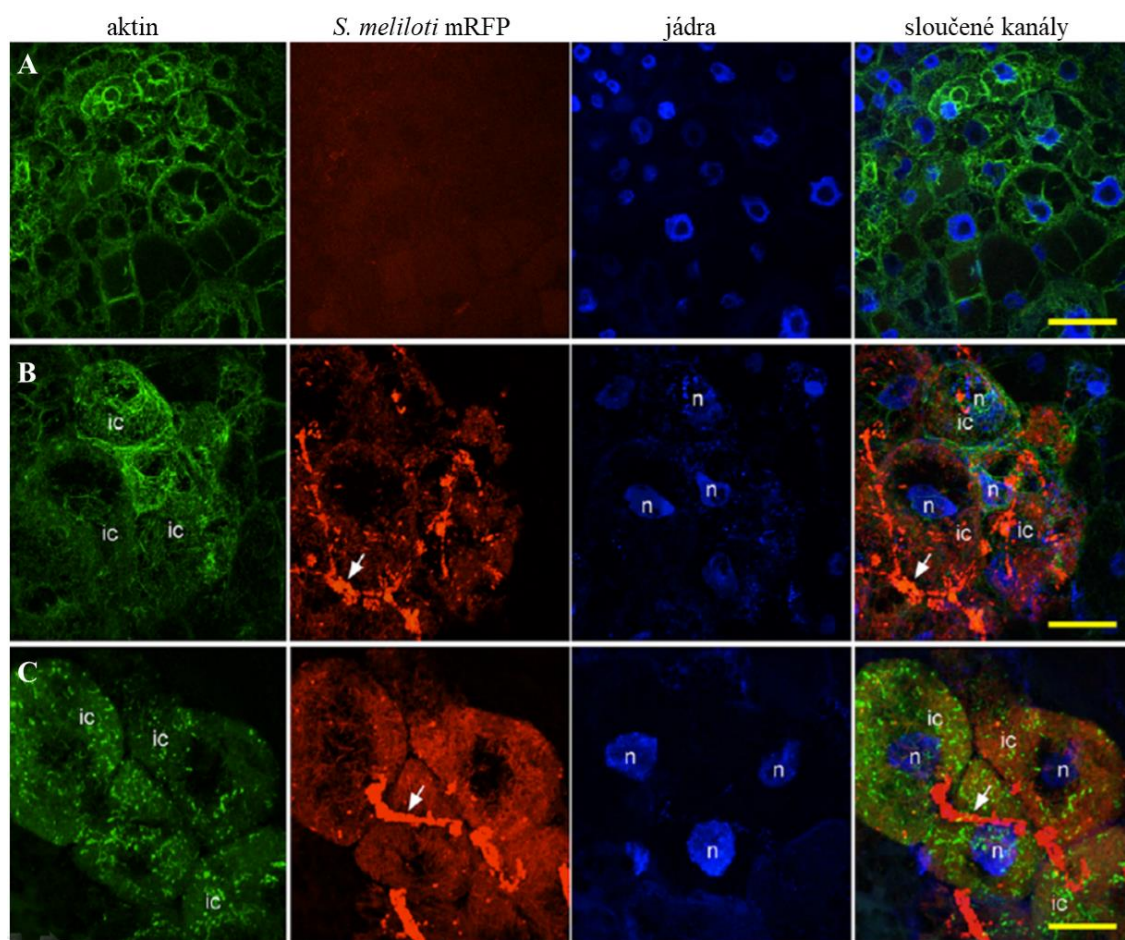
Vláknitý, tzv. F-aktin je nutný i pro přeprogramování růstu kořenových vlásků, k jejich deformaci vyvolanou NF a také pro pohyb jádra v kořenových vláscích (Miller *et al.*, 1999; Timmers *et al.*, 1999; Sielberer *et al.*, 2005). Reorganizace aktinového cytoskeletu probíhá prostřednictvím polymerace monomerů G-aktinu a nukleací nových vláken působením komplexu ARP2/3 (Smith a Oppenheimer, 2005). Aktivace komplexu ARP2/3 vyžaduje komplex SCAR/WAVE. Tyto proteiny jsou důležité pro růst kořenových vlásků a jsou jedním z komponentů umožňujících infekci rhizobiálními bakteriemi (Yokota *et al.*, 2009; Miyahara *et al.*, 2010). Několik studií ukázalo, že

jednou z nejrychlejších reakcí na rhizobiální NF je přeskupení F-aktinu v rostoucích kořenových vláscích před jejich deformací a zatočením (Cardenas *et al.*, 1998; Vassileva *et al.*, 2005; Weerasinghe *et al.*, 2003). Ve špičkách kořenových vlásků vystavených působení NF podélné široké aktinové svazky rychle procházejí fragmentací a reorganizací, také dochází k vyšší akumulaci difuzního G-aktinu (Cardenas *et al.*, 1998, Weerasinghe *et al.*, 2003). Aktinové mikrofilamenty tedy hrají důležitou roli během interakce bobovitých rostlin a rhizobiálních bakterií takovým způsobem, že pre-programují růst kořenových buněk, aby umožnily začátek a průběh symbiotických interakcí. Důležitým faktem je, že intracelulární pohyb jádra k apexu kořenového vlásku vyžaduje aktin, nikoli však mikrotubuly (Chytilova *et al.*, 2000). Také pohyb jádra k bázi kořenových vlásků, ke kterému dochází po skončení růstu kořenových vlásků, vyžaduje aktin (Ketelaar *et al.*, 2002).

Nejnovější výzkumy naznačují, že rostlinný aktinový cytoskelet hraje zásadní roli také při vývoji hlízek. Pozorování dynamiky F-aktinu v živých buňkách vyvíjejících se hlízek je však omezeno, protože infikované buňky se nacházejí v jejich vnitřních pletivech. Ve studii Zhang *et al.* (2019) byly popsány stabilně transformované rostliny *Medicago truncatula* produkující fúzní fluorescenční protein ABD2-GFP vážící se na aktinový cytoskelet. Díky tomu bylo možné pozorovat organizaci a dynamiku aktinového cytoskeletu během produkce hlízek. Zobrazování živých buněk v hlízkách v tomto experimentu ukázalo, že buňky v oblasti meristému hlízek (zóna I) jsou malé a je v nich přítomna perinukleární aktinová síť s typickým uspořádáním (obr. 3a). Síť aktinových vláken kolem jádra v meristemických buňkách je spojena prostřednictvím cytoplazmatických provazů s aktinovou sítí v kortikální části buněk. V buňkách infekční zóny (zóna II, obr. 3b) dosáhla reorganizace aktinu svého maxima, přičemž síť aktinových vláken se rozkládala od perivacuolárního prostoru směrem k bakteroidům. Infekční vlákna jsou zde obklopena hustou sítí aktinových svazků. Také objevili výrazně kratší fragmenty aktinových svazků, které formou hustých svazků obklopují infekční vlákna. Ve fixační zóně (zóna III, obr. 3c) byla pozorována silná fragmentace aktinu na krátké až bodové struktury. Navíc buňky v zónách II a III byly zvětšené s výrazně zvětšenými jádry (obr. 3b, c).

Tyto nové výsledky doplňují předchozí poznatky o organizaci mikrotubulů v hlízkách *M. truncatula* (Kitaeva *et al.*, 2016). Díky tomu je možné podrobněji popsat roli cytoskeletu v diferenciaci buněk hlízek a v procesu uvolňování rhizobií z infekčních vláken. Svazky mikrotubulů podél infekčních vláken a kolem infekčních kapiček jsou

uspořádány podél aktinových filamentů, co potvrzuje, že dvě hlavní složky rostlinného cytoskeletu (aktin a mikrotubuly) působí synergicky během časně kolonizace buněk kořene rhizobiálními bakteriemi (Genre a Timmers, 2019). Velký rozdíl je v rozložení mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu v diferencovaných buňkách hlízek. Bylo prokázáno, že mikrotubuly jsou uspořádány ve svazcích, které vedou podél bakterioidů, obklopující vakuolu (Kitaeva *et al.*, 2016). Tento vzor je jen částečně pozorován u aktinových mikrofilament, které se organizují do komplexnější sítě (Genre a Timmers, 2019).



Obr. 3: Struktura hlízek u transgenních rostlin *Medicago truncatula* indukovaných rhizobiiem *S. meliloti* kmenu Rm2011 s expresí mRFP. Organizace aktinového cytoskeletu v různých zónách hlízek. Organizace F-aktinu označeného markerem ABD2-GFP v zóně I (A), zóně II (B) a zóně III (D). Ic = infikovaná buňka; n = jádro; Šipky označují infekční vlákna. Měřítka - 20 μ m (upraveno podle Zhang *et al.*, 2019).

2.5 Vizualizace rostlinného cytoskeletu v živých buňkách

Abychom dobře pochopili dynamiku růstu rostlin, je důležité pozorovat a kvantitativně analyzovat jejich vývoj neinvazivním způsobem v čase. Důležitým požadavkem pro výzkum rostlinného cytoskeletu je schopnost jednoduše a spolehlivě zobrazovat jeho organizaci a dynamiku v živých buňkách. Toto je umožněno z velké části díky pokrokům ve vývoji nových pokročilých metod fluorescenční mikroskopie a úspěšným zavedením metod značení částí rostlinného cytoskeletu *in vivo* (Rocchetti *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Mikrotubuly a aktinové filamenty (F-aktin), které jsou dvěma hlavními složkami cytoskeletu, lze nyní snadno zobrazit v živých rostlinných buňkách pomocí translační fuze s fluorescenčními proteiny (např. Marc *et al.*, 1998; Vidali *et al.*, 2009). Zobrazování cytoskeletu v živých buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie je z velké části omezeno na buňky lokalizované na povrchu rostliny, jako jsou epidermální buňky, trichomy a kořenové vlásky (Dyachok *et al.*, 2008). Pro zobrazování cytoskeletu v buňkách umístěných ve vnitřních pletivech rostlin, je nutné použít konvenční metody fixace, imunolokalizace, řezání či permeabilizace, aby byl umožněn vstup cytoskeletálních fluorescenčních značek do buněk a jejich následné efektivní zobrazení (např. Blancaflor a Hasenstein, 2000).

Pokrok ve vývoji optické mikroskopie zahrnující rychlejší metody snímání, využití citlivějších kamer, zavádění specializovaných imerzních objektivů a optimalizace například konfokální či multifotonové mikroskopie výrazně přispěl k efektivnímu pozorování dynamických procesů v živých preparátech. V kombinaci s přímým značením cílových proteinů pomocí exprese fluorescenčních proteinů se tak zobrazování živých buněk stává silným nástrojem pro zkoumání dynamických procesů v rostlinách (Chalfie *et al.*, 1994; Shaw, 2006; Shaw 2013). Konfokální laserová fluorescenční mikroskopie má omezení v hloubce pronikání do zkoumaného vzorku (asi 500 μm), což je způsobeno rozptylem světla. Dále je známo, že tyto zobrazovací přístupy způsobují poškození živých buněk vysokou intenzitou světla (tzv. „fototoxicita“), co může výrazně omezovat využití této metody při analýze velkých objemných objektů. Fluorescenční mikroskopie s využitím tenkého listu světla (light-sheet fluorescence microscopy, LSFM) je naopak atraktivní volbou. Detekce vyzařovaného signálu se u této metody provádí kolmo k rovině osvětlení (Abadie *et al.*, 2018).

Fototoxicita při mikroskopickém pozorování výrazně limituje délku pozorování buněčných a vývojových procesů v rostlinách (Sena *et al.*, 2011). Technický pokrok v tomto směru nastal právě zavedením metody Light-sheet fluorescenční mikroskopie (LSFM). Principem LSFM je plošné osvětlování jedné optické roviny vzorku pomocí světelného paprsku ve tvaru tenkého listu světla. Toto osvětlení je kolmé na rovinu detekční dráhy, kterou zabezpečuje nezávislý objektiv (Maizel *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2013). Míra fototoxicity je výrazně redukována a pokud se vyskytne, postihuje buňky a fluorofory pouze v rovině osvětlení a jenom v zóně ohniskové roviny detekčního objektivu (Reynaud *et al.*, 2008). Tato konfigurace osvětlování a zobrazování výrazně omezuje i vypalování fluorescenčních značek (tzv. „fotobleaching“), minimalizuje tím energetické zatížení vzorku. Rychlé zobrazování současným nasnímáním celé roviny na čip kamery následně umožňuje velice rychlé získávání volumetrických dat celého vzorku v různých hloubkách (z-rovinách), čehož se následně využívá k 3D rekonstrukci obrazu celého vzorku (Becker *et al.*, 2013).

2.5.1 Využití Light-sheet mikroskopie v rostlinné vývojové biologii

Technologie LSFM poskytuje mimo jiné i jedinečné uspořádání osvětlovacích a zobrazovacích prvků, které je vhodné pro mikroskopování rostlin. Vzorek je ke snímání nainstalován vertikálně, což umožňuje, aby kořeny rostly přirozeně dolů ve směru gravitace. Konstrukce LSFM také umožňuje pohyb a rotaci vzorku kolem svislé osy, je tedy možné tvořit obraz z různých úhlů a vytvořit trojrozměrný model (Reynaud *et al.*, 2008). Vybuzená fluorescence je detekována nezávislým objektivem a detekována CCD kamerou. Vícebarevné a vícekanálové snímání je dosaženo pomocí kombinace různých laserových excitačních vlnových délek, emisních fluorescenčních filtrů a duálního kamerového systému (Ovečka *et al.*, 2015, Maizel *et al.*, 2011).

Snímání živých vzorků na krátkou dobu pomocí klasických fluorescenčních mikroskopických metod je poměrně snadné. Také jejich příprava je tak jednoduchá, že stačí pouze rostlinu umístit na sklíčku ve vhodném médiu s krycím sklem nahoře (Calder *et al.*, 2015). Úspěšné zobrazování živých rostlin s vysokým rozlišením po dlouhou dobu je však obtížnější. Je nutné se zaměřit na několik důležitých faktorů. Nevyhnutelností je udržovat stále prostředí, které obklopuje vzorek, fyziologické podmínky, a dále musí být vzorek ve stabilní poloze při snímání. V naprosté většině

případů sledování vzorků po dlouhou dobu je nutné využít speciální způsob jejich přípravy, někdy s nutností přípravy speciálních pozorovacích komor (Chan *et al.*, 2007).

I když je rostlinný materiál relativně odolný vůči určitým změnám v prostředí, jsou rostliny výrazně citlivé na snížení hladin živin a kyslíku během mikroskopických experimentů. Bylo prokázáno, že například nedostatek kyslíku má vliv na změny v lokalizaci určitých jaderných proteinů, přičemž se objevuje abnormální skvrnitý vzor jejich distribuce (Koroleva *et al.*, 2009). Proto musí být pozorovací komůrky pro dlouhodobé snímání rostlin navrženy tak, aby udržovaly vhodné prostředí, ideálně aby vzorek vydržel být vitální po dobu až několika hodin a dnů. Pokud rostou rostliny ve statických systémech, živiny v médiu se po nějaké době zcela vyčerpají, což výrazně redukuje jejich viabilitu. Proto se stále častěji využívají perfuzní systémy, které jsou schopny vyměňovat ochuzené médium kolem vzorku za čerstvé médium, čímž je kontinuálně zajištěna stabilita prostředí, ve kterém rostliny rostou, a to po celou dobu trvání experimentu (Calder *et al.*, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- 1000x Gamborg's vitamin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- 37% Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich)
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES, Duchefa Biochemie)
- 4x Laemli Sample buffer (BioRad)
- 70 % a 96 % etanol (PENTA)
- Adenin (SIGMA-ALDRICH)
- Agarosa s nízkou teplotou tání (SIGMA-ALDRICH)
- Blotting-Grade Blocker (BioRad)
- BSA (hovězí sérový albumin; Sigma-Aldrich)
- CaCl₂ (SIGMA-ALDRICH)
- Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad): Luminol/enhancer solution a Peroxide solution
- cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
- CuSO₄ · 5H₂O (SIGMA-ALDRICH)
- DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich)
- Dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich)
- Egtaková kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich)
- FeSO₄ · 7H₂O (SIGMA-ALDRICH)
- Gamborg B5 medium - Basal salt mixture (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Gellan gum powder (Alfa Aesar)
- Sacharóza (SIGMA-ALDRICH)
- Glycin (Sigma-Aldrich)
- H₃BO₃ (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Hypochlorid sodný (SIGMA-ALDRICH)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- KH₂PO₄ (SIGMA-ALDRICH)

- Kinetin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- KOH (SIGMA-ALDRICH)
- Kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- L-glutamin (SIGMA-ALDRICH)
- L-glutathion (SIGMA-ALDRICH)
- L-prolin (SIGMA-ALDRICH)
- L-serin (SIGMA-ALDRICH)
- LB Broth s agarem (Miller) (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- Micro agar (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- Murashige and Skoog medium - Basal salt mixture (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Myoinositol (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich)
- Na_2EDTA (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)
- Peroxosíran amonný (Sigma-Aldrich)
- PhosSTOP (Roche)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich)
- Precision Plus Protein TM Dual Color Standards (BioRad)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x (BioRad)
- Sterilizovaná destilovaná voda
- Ticarcilin disodium/clavulanate potassium (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Tryptone (SIGMA-ALDRICH)
- Tween ® 20 (SIGMA-ALDRICH)
- Yeast extract (SIGMA-ALDRICH)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SIGMA-ALDRICH)

3.1.2 Použité protilátky

- Primární afinitně přečištěná myší polyklonální protilátka anti-Actin (Sigma Aldrich)
- Primární afinitně přečištěná králičí polyklonální protilátka anti-MMK3 (GenScript)

- Primární afinitně izolovaná králičí polyklonální protilátka anti-AtMPK6 (Sigma-Aldrich)
- Primární králičí Phospho-p44/42 MAP kinase (thr202/tyr204) polyklonální protilátka (Cell Signaling Technologies)
- Sekundární koží anti-králičí protilátka s navázanou křenovou peroxidasou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)
- Sekundární koží anti-myší protilátka s navázanou křenovou peroxidasou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)

3.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Waga Elektronikzen)
- Aparatura na SDS-PAGE a Western blot (BioRad)
- Aparatura na výrobu gelů (BioRad)
- Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga stolní chlazená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)
- Dokumentační systém ChemiDoc™ MP (BioRad)
- Elektromagnetická míchačka (MSH-420, BOECO, Germany)
- Epifluorescenční mikroskop se systémem Apotom (Axio Imager M2, Apotome.2, ZEISS, operační program ZEN Blue)
- Epifluorescenční mikroskop (Axio Imager M2, ZEISS, operační program ZEN Blue)
- Fotoaparát Nikon 7000 (Nikon)
- Fytotron (WEISS Gallenkamp)
- Hlubokomrazicí box (Panasonic)
- Chladničky laboratorní (Electrolux, Space Plus, Gorenje, Liebherr)
- Chlazená centrifuga Allegra (Beckman Coulter)
- ImageScanner™ III (GE Healthcare)
- Laboratorní předvážky (S1502, BEL-Engineering)
- Laminární box (MERCİ)
- Lightsheet mikroskop (Lightsheet Z1, ZEISS, operační program ZEN Black)
- Mikrocentrifuga s vortexem FVL-2400N (BioSan)

- Mikrovlnná trouba (MGE21, HITACHI)
- pH metr stolní (PC 2700)
- Spektrofotometr Infinite M Nano (Tecan)
- Stereomikroskop s kontinuálním zvětšením (Axio Zoom.V16, ZEISS, operační program ZEN Blue)
- Termoblok (Bioer)
- Třepačka Rocker Shaker MR - 12 (BioSan)
- Vortex (MIXER, Labnet International, Inc.)

3.1.4 Použité roztoky a média

Sterilizační roztok pro povrchovou sterilizaci semen

6,6 ml	10 % hypochlorid sodný
3,4 ml	70 % etanol
50 µl	0,05 % Tween 20

Zásobní roztok aminokyselin

6,65 g	glutamin
0,83 g	serin
0,004 g	adenin
0,083 g	L-glutathion

Doplněno do 250 ml dH₂O, sterilizováno přes 0,2 µm bakteriologický filtr, uchováváno při teplotě 4°C.

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

10 mg	2,4-D
0,5 ml	70 % etanol
8 ml	H ₂ O
1,5 ml	1 M NaOH

Vortexováno, doplněno 10 ml H₂O, sterilizováno přes 0,2 µm bakteriologický filtr, uchováváno při -20°C.

Zásobní roztok kinetinu (0.1 mg.ml⁻¹)

1 mg kinetin

2 ml 1 M NaOH

Vortexováno, doplněno 10 ml H₂O, sterilizováno přes 0,2 µm bakteriologický filtr, uchováváno při -20°C.

Pevné kultivační MS médium

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

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

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

Pevné kultivační MMS médium

4.3 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)

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

0.1 g.l⁻¹ myoinositol

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

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

Pevné B5H médium k indukci kalogenézy

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

1.0 ml.l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

0.5 g.l⁻¹ KNO₃

0.25 g.l⁻¹ MgSO₄·7H₂O

0.5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ phytigel

MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno 1M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po autoklávování bylo přidáno:

30 ml.l⁻¹ roztoku aminokyselin

1.0 mg.l⁻¹ 2,4-D (250 µl zásobního roztoku 2,4-D na 250 ml média)

0.1 mg.l⁻¹ kinetinu (250 µl zásobního roztoku kinetinu na 250 ml média).

Pevné B50 médium k indukci somatické embryogeneze

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

1.0 ml.l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

0.5 g.l⁻¹ KNO₃

0.25 g.l⁻¹ MgSO₄·7H₂O

0.5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ phytigel

MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno 1 M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po autoklávování bylo přidáno:

30 ml.l⁻¹ roztok aminokyselin

Tekuté Fahraeus médium bez N₂:

Zásobní roztoky:

Makronutrienty

do pracovního roztoku použito:

1,232 g/10 ml MgSO₄ · 7H₂O (1 ml/l)

0,953 g/10 ml KH₂PO₄ (1 ml/l)

0,712 g/10 ml Na₂HPO₄ · 2H₂O (2 ml/l)

0,13 g/10 ml Fe-EDTA (2,5 ml/l)

Mikronutrienty

do pracovního roztoku použito:

0,01 g/10 ml MnSO₄ · H₂O (100 µl/l)

0,015 g/10 ml CuSO₄ · 5H₂O (100 µl/l)

0,017 g/10 ml ZnSO₄ · H₂O (100 µl/l)

0,01 g/10 ml H₃BO₃ (100 µl/l)

0,011 g/10 ml Na₂MoO₄ · 2H₂O (100 µl/l)

pH 6,5 (upraveno 1 M a 0,1 M HCl), sterilizováno autoklávováním

přidáno po autoklávování: 1,1098 g/10 ml CaCl₂

Pevné Fahraeus médium bez N₂:

Makronutrienty a mikronutrienty viz „Tekuté Fahraeus médium bez N₂“

Přidáno: 13 g.l⁻¹ mikroagar

pH 6,5 (upraveno 1 M a 0,1 M HCl), sterilizováno autoklávováním

Přidáno po autoklávování: 1,1098 g/10 ml CaCl_2

Tekuté TY médium pro kultivaci *S. meliloti*

5.0 g.l⁻¹ bacto-tryptone

3.0 g.l⁻¹ yeast extract

MiliQ H₂O, pH 7,2 (upraveno 1 M HCl), sterilizováno autoklávováním. Po autoklávování bylo přidáno:

0,665 g.l⁻¹ CaCl_2

Pevné TY médium pro kultivaci *S. meliloti*

5.0 g.l⁻¹ bacto-tryptone

3.0 g.l⁻¹ yeast extract

15 g.l⁻¹ mikroagar

MiliQ H₂O, pH 7,2 (upraveno 1 M HCl), sterilizováno autoklávováním. Po autoklávování bylo přidáno:

0,665 g.l⁻¹ CaCl_2

LB médium pro kultivaci *S. meliloti*

40 g.l⁻¹ LB Broth s agarem (Miller)

MiliQ H₂O, pH 7,2 (upraveno 1 M HCl), sterilizováno autoklávováním.

Extrakční pufr E (do 100 ml)

1,19 g HEPES, pH 7,5 (NaOH)

0,43 g NaCl

38 mg EGTA

100 µl 1M MgCl_2

4 mg NaF

10 ml 10 % glycerol

Doplněno: MiliQ H₂O do 100 ml. Sterilizováno pomocí filtru s velikostí pórů 22 µm

Kompletní Extrakční pufr E

+ 1M DDT 1 ul/1 ml
Complete 1 tableta/ 1ml MiliQ > 20 ul/1 ml
Phostop 1 tableta/ 1 ml MiliQ > 100 ul/1 ml

Přenosový pufr 10x (TB)

30 g.l⁻¹ Tris
144 g.l⁻¹ Glycin
Doplněno MiliQ H₂O

Pracovní TB:

100 ml 10x TB
100 ml 100 % methanolu
800 ml MiliQ H₂O

Tris buffered saline 10x (TBS) pufr

24,2 g.l⁻¹ Tris
87,8 g.l⁻¹ NaCl
MiliQ H₂O, pH 7,4 (upraveno koncentrovanou HCl)

1x TBST pufr

100 ml TBS
899 ml MiliQ H₂O
1 ml Tween 20

Elektrodový pufr (RB)

30 g.l⁻¹ Tris
144 g.l⁻¹ Glycin
10 g.l⁻¹ SDS
MiliQ H₂O

Pracovní RB:

100 ml RB
900 ml MiliQ H₂O

Ponceau S barvicí roztok

1g Ponceau S
50 ml Kyselina octová
950 ml MiliQ H₂O

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

6 g Tris
60 ml MiliQ H₂O

Doplněno MiliQ do 100 ml, pH 6,8 (upraveno 1 M HCl)

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

54,45 g Tris
150 ml MiliQ

Doplnit MiliQ do 300 ml, pH 8,8 (upraveno 1 M HCl)

3.1.5 Rostlinný materiál

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

3.1.6 Bakteriální materiál

Kmeny *Sinorhizobium meliloti* Rm2011 divokého typu a kmeny Rm2011 obsahující plazmid pHC60 (tetR, strR), kódující mRFP nebo obsahující plazmid pHC60 (tetR) kódující GFP (Boivin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2016).

3.2 Metody

3.2.1 Příprava médií pro indukci somatické embryogeneze *Medicago sativa* v *in vitro* podmínkách

Pro indukci somatických embryí bylo připraveno několik různých druhů pevných médií, které se liší složením živin a hormonů. Médium k indukci somatických embryí obsahovalo komerčně vyráběnou Gamborgovu B5 směs elementů, komerčně vyráběnou směs vitamínů, sacharózu, podpůrné látky (aminokyseliny, kinetin, KNO_3 a $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a auxin (2,4-D). Pro zpevnění média byl použit 0,45 % Gellan gum Médium bylo zředěno na požadovaný objem sterilní destilovanou MiliQ vodou.

Kultivační médium k indukci kalusu obsahovalo komerčně vyráběnou Gamborgovu B5 směs elementů, komerčně vyráběnou směs vitamínů, sacharózu, podpůrné látky (aminokyseliny, KNO_3 a $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). V tomto médiu už chyběl kinetin a 2,4-D. Pro zpevnění média byl použit Gellan gum o koncentraci 0,45 %. Médium bylo zředěno na požadovaný objem sterilní destilovanou MiliQ vodou.

Zralá somatická embrya byla kultivována na médiu obsahující komerční kompletní MS médium bez vitamínů, dále komerční Nitch a Nitch směs vitamínů a sacharózu. Pro zpevnění média byl přidán Gellan gum (0,45 %). Médium bylo zředěno do požadovaného objemu sterilní destilovanou MiliQ vodou.

Pro indukci zelených částí a pozdější kultivaci rostlin ze somatických embryí bylo použito médium obsahující komerční kompletní MS médium bez vitamínů, doplněné sacharózou. Pro zpevnění média byl přidán Gellan gum (0,45 %). Médium bylo zředěno do požadovaného objemu sterilní destilovanou MiliQ vodou.

Všechna média byla připravena v objemu 1 l. Směs potřebných látek byla doplněna na 800 ml sterilní destilovanou vodou a promíchána magnetickým míchadlem. Po rozpuštění všech látek bylo změřeno pH a upraveno pomocí 1 M KOH na hodnotu 5,7. Poté byl objem doplněn do 1 l sterilní destilovanou vodou a médium rozděleno do čtyř lahví o objemu 250 ml. Takto připravené médium se sterilizovalo v autoklávu.

3.2.2 Příprava pevného MS média pro kultivaci *Medicago sativa* ze semen

Pro kultivaci rostlin ze semen bylo použito médium obsahující komerční kompletní MS médium bez vitamínů, doplněné sacharózou. Při přípravě kultivačního MS média pro *Medicago* bylo nutné použít větší množství sacharózy jako zdroje uhlíku (30 g/l), než při kultivaci jiných rostlin (např. 3x více, než je použito při kultivaci *Arabidopsis thaliana*). Používá se komerční kompletní MS médium bez vitamínů, které slouží jako zdroj makro- a mikroelementů. Pro zpevnění média byl použit Gellan gum o koncentraci 0,45 % (4,5 g/l). Směs potřebných látek byla doplněna na 800 ml sterilní destilovanou vodou a promíchána magnetickým míchadlem. Po rozpuštění všech látek bylo změřeno pH a upraveno pomocí 1 M KOH na hodnotu 5,7. Poté byl objem doplněn do 1 l sterilní destilovanou vodou a médium rozděleno do čtyř lahví o objemu 250 ml. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu.

3.2.3 Příprava pevného Fahraeus média bez obsahu dusíku

Fahraeus médium, na rozdíl od MS média neobsahuje sacharózu jako zdroj živin, je složeno pouze z makroelementů a mikroelementů. Do plastové nádoby byly pomocí automatické pipety přidány makroelementy a mikroelementy z předem připravených zásobních roztoků. Pro zpevnění média byl použit Mikroagar o koncentraci 1,3 % (13 g/l). Směs roztoků byla doplněna na 800 ml sterilní destilovanou vodou a promíchána magnetickým míchadlem. Bylo změřeno pH a upraveno pomocí 1 M HCl na hodnotu 6,5. Poté byl objem doplněn do 1 l sterilní destilovanou vodou a médium rozděleno do čtyř lahví o objemu 250 ml. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po autoklávování byl do ochlazeného média přidán zásobní roztok CaCl₂ v poměru 100 µl/l (upraveno podle Fahraeus, 1957).

3.2.4 Příprava tekutého Fahraeus média bez obsahu dusíku

Do plastové nádoby byly pomocí automatické pipety přidány makroelementy a mikroelementy z předem připravených zásobních roztoků. Směs roztoků byla doplněna na 800 ml sterilní destilovanou vodou a promíchána magnetickým míchadlem. Bylo změřeno pH a upraveno pomocí 1 M HCl na hodnotu 6,5. Poté byl objem doplněn

do 1 l sterilní destilovanou vodou a médium rozděleno do čtyř lahví o objemu 250 ml. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci byl do ochlazeného média přidán zásobní roztok CaCl₂ v poměru 100 µl/l (upraveno podle Fahraeus, 1957).

3.2.5 Příprava TY média pro kultivaci *S. meliloti*

Toto kultivační médium obsahuje trypton a kvasnicový extrakt. Pro zpevnění média byl použit Mikroagar o koncentraci 1,5 % (15 g/l). Směs potřebných látek byla doplněna na 800 ml sterilní destilovanou vodou a promíchána magnetickým míchadlem. Po rozpuštění všech látek bylo změřeno pH a upraveno pomocí 1 M KOH na hodnotu 5,7. Poté byl objem doplněn do 1 l sterilní destilovanou vodou a médium rozděleno do čtyř lahví o objemu 250 ml. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci v autoklávu byl do ochlazeného média přidán zásobní roztok CaCl₂ poměru 100 µl/l. Pokud bylo potřebné připravit pevné TY médium, byl před sterilizací v autoklávu pro zpevnění média použit mikroagar o koncentraci 1,5 % (15 g/l). Médium o objemu 250 ml bylo poté rozděleno do deseti kulatých Petriho misek.

3.2.6 Příprava LB média pro kultivaci *S. meliloti*

Médium bylo připraveno navážením příslušného množství směsi látek v 800 ml sterilní destilované vody a promícháno magnetickým míchadlem. Po rozpuštění všech látek bylo změřeno pH a upraveno pomocí 1 M KOH na hodnotu 7,2. Poté byl objem doplněn do 1 l sterilní destilovanou vodou. Médium bylo rozděleno do čtyř lahví o objemu 250 ml. Takto připravené médium se potom sterilizovalo v autoklávu.

3.2.7 Příprava kultury *Sinorhizobium meliloti* ze zásobního roztoku

Z mrazicího boxu (-80 °C) byly mikrozskumavky Eppendorf s kulturou *S. meliloti* přeneseny do laminárního boxu, kde byla část roztoku rozmrazena. Sterilní bakteriologickou kličkou byla odebraná část kultury rozetřena na Petriho misku s pevným TY médiem nebo LB médiem, do kterého byla předem přidána příslušná antibiotika (tetracyklin 50 mg/l, streptomycin 400 mg/l) v poměru 1:1000. Miska byla obalena alobalem, jelikož bakterie *S. meliloti* jsou půdní bakterie žijící ve tmě. Takto

připravená miska s bakteriemi byla přenesena do inkubátoru, kde se bakterie kultivovaly při 30 °C. Kultivace trvala přibližně 48 hodin. Po nárůstu bakteriálních kolonií se Petriho miska přenesla do chladničky (4 °C), aby se růst bakterií zpomalil.

3.2.8 Příprava a kultivace kultur *S. meliloti* ve Fahraeus médiu bez obsahu dusíku

Do sterilní zkumavky Falcon, s připraveným tekutým Fahraeus médiem (20 ml), byla sterilním párátkem naočkovaná část narostlé kultury *S. meliloti* z TY (LB) média na Petriho misce. Zkumavka se utěsnila Parafilmem a obalila aluminiovou folií z důvodu průniku světla k bakteriím. Takto připravené zkumavky se přenesly do inkubátoru s třepačkou, ve kterém byly suspenzní kultury kultivovány při teplotě 30 °C a rychlosti třepání 150 otáček/min. Kultura se takto kultivovala přes noc.

3.2.9 Povrchová sterilizace semen *M. sativa*

Semena divokého typu i transgenních a kontrolních linií *Medicago* byla skladována v lednici v mikrozskumavkách Eppendorf.

V laminárním boxu se semena sterilizovala ve sterilní mikrozskumavce Eppendorf. K semenům přidán 1 ml 70 % etanolu, a za stálého protřepávání se nechal působit po dobu 30 sekund. Následně se etanol vyměnil za 1 ml sterilizačního roztoku. Semena byla za stálého protřepávání v roztoku sterilizována 3 minuty. Po sterilizaci se semena promyla 5 x po 2 minutách sterilní destilovanou MiliQ vodou. Po posledním promytí byla semena imbibována přes noc v lednici (při 4 °C) v téže mikrozskumavce v 1 ml čisté sterilní destilované MiliQ vody.

3.2.10 Kultivace semen divokého typu kultivaru Europe

V prvním experimentu byla použita semena *M. sativa* divokého typu kultivaru Europe. Po imbibici ve vodě (24 hodin, přes noc) byla semena vyseta jak na pevné kultivační MS médium, tak na pevné kultivační Fahraeus médium bez N₂. Pevné MS médium sloužilo ke kultivaci v kontrolních podmínkách za přístupu plného spektra živin. Pevné Fahraeus médium bez N₂ bylo potřebné ke kultivaci v podmínkách s minimálním

obsahem živin bez přístupu dusíku. Dále sloužilo k pozdějšímu studiu interakce rostlin s bakteriemi *S. meliloti*.

3.2.11 Kultivace semen *M. sativa* kontrolní linie RSY a transgenní linie s produkcí ABD2-GFP

V dalším experimentu byla použita semena *M. sativa* kontrolní linie RSY a transgenní linie produkující ABD2-GFP. Šlo o semena rostlin, která prošla procesem samosprašení. Jelikož se druh *Medicago* rozmnožuje především cizosprašně, došlo u těchto semen k určité inbrední depresi, která zamezovala volnému klíčení. Bylo tedy nutné mechanicky narušit osemení, a tím umožnit kořínku vyklíčit.

Experiment s narušením osemení probíhal dvojím způsobem:

1. Nařezáním osemení po imbibici ve sterilní destilované vodě
2. Skarifikace semen pomocí smirkového papíru

První postup zahrnoval sterilizaci semen a jejich imbibici ve sterilní destilované vodě MiliQ v lednici (4 °C) po dobu 24 hodin. Druhý den bylo sterilním skalpelem nařezáno osemení v místech klíčení. Vše probíhalo za sterilních podmínek v laminárním boxu se sterilními nástroji, aby nedošlo k infekci narušeného osemení. Poté se semena vysela na pevné kultivační MS médium na pevné kultivační Fahraeus médium bez N₂. Pevné MS médium sloužilo ke kultivaci v kontrolních podmínkách za přístupu živin. Pevné Fahraeus médium bez N₂ bylo potřebné ke kultivaci v podmínkách bez přístupu dusíku, a k pozdějšímu studiu interakce rostlin s bakteriemi *S. meliloti*.

Druhým způsobem přípravy těchto semen byla jejich skarifikace. Semena kontrolní RSY linie a ABD2-GFP byla v počtu 10-15 nasypana do kulaté Petriho misky, která byla vyložena smirkovým papírem o hrubosti zrn 150. Přiložením druhého kousku smirkového papíru a jemnými pohyby po semínkách došlo k obroušení a poškození jejich osemení. Poté byla semena standardně vysterilizována (viz výše) a imbibována ve sterilní destilované MiliQ vodě v lednici (4 °C) po dobu 24 hodin. Druhý den byla semena vyseta na pevné kultivační MS médium, nebo na pevné kultivační Fahraeus médium bez N₂. Pevné MS médium sloužilo ke kultivaci v kontrolních podmínkách za přístupu živin. Pevné Fahraeus médium bez N₂ bylo potřebné ke kultivaci v podmínkách bez přístupu dusíku, a k pozdějšímu studiu interakce rostlin s bakteriemi *S. meliloti*.

Všechna semena byla kultivována při 21 °C ve fytotronu při 70 % relativní vzdušné vlhkosti a fotoperiodě 16h světlo – 8h tma.

3.2.12 Somatická embryogeneze *M. sativa*

Pro somatickou embryogenezi byly použity mladé nepoškozené listy rostlin *Medicago sativa* (transgenní linie ABD2-GFP a kontrolní linie RSY) rostoucích ve fytotronu v *in vivo* podmínkách. Byly odebírány listy z druhého až pátého nodu nekvetoucí rostliny a přeneseny v kohoutkové vodě v 50 ml kónické zkumavce Falcon do laminárního boxu, v němž se listy sterilizovaly a připravily ke kultivaci.

Trojčlenné listy byly sterilizovány v 50 ml kónické zkumavce Falcon. Nejprve byly listy promyty 1 minutu roztokem 0,1 % Tweenu 20 a poté přemístěny do 50 ml kónické zkumavky Falcon s 1 % hypochloridem sodným a 0,05 % Tweenem 20 a sterilizovány po dobu 5 minut za mírného třepání. Poté byly listy propláchnuty 3x v Petriho misce v čisté sterilní vodě.

Po sterilizaci byl každý list rozdělen na dvě poloviny pomocí sterilního skalpelu. Takto vytvořené explantáty byly přeloženy abaxiální stranou dolů do Petriho misky na pevné B5H médium k indukci kalusu. Po dvou až třech týdnech byly kalusy přeloženy na B50 médium k indukci somatické embryogeneze. Vyvinutá somatická embrya byla posléze přeložena na MMS médium indukující tvorbu kořenů a výhonků, a následně na MS médium pro dlouhodobou kultivaci kompletních rostlin *in vitro*.

Kultivace probíhala při 21 °C ve fytotronu při 70 % relativní vzdušné vlhkosti a fotoperiodě 16 h světlo – 8 h tma.

3.2.13 Indukce symbiotické interakce mezi kořeny *M. sativa* a bakteriemi *S. meliloti*

Kultura *S. meliloti* z třepačky byla přemístěna do laminárního boxu, současně s rostlinkami *M. sativa* kultivovanými na pevném Fahraeus médiu bez dusíku. Na povrch kořenů rostliny byla pomocí automatické pipety nanášena kultura *S. meliloti* (2 ml, OD₆₀₀ 0,05). Miska byla uzavřena pomocí Parafilmu a přelepená páskou. Tímto se zabránilo trhání Parafilmu. Miska byla poté obalena černou fólií tak, aby kořeny zůstaly ve tmě.

3.2.14 Dokumentace a vyhodnocování klíčivosti semen a procesu tvorby hlízek

Klíčovost semen byla vyhodnocovaná u kultivaru Europe, kontrolní linie RSY a transgenní line FABD2-GFP. Po 24 hodinové imbibici byla semena přeložena na hranaté Petriho misky s pevným MS médiem, nebo pevným Fahraeus médium bez N₂. Po aplikaci bakterií na kořeny rostlin, byl průběh symbiotických interakcí sledován pomocí digitálního fotoaparátu Nikon, skeneru, Stereomikroskopu s kontinuálním zvětšením, Epifluorescenčního mikroskopu a Epifluorescečního mikroskopu se systémem Apotom. Stádia těchto interakcí, počty hlízek a také vzhled kořenového systému byla tímto způsobem dokumentována. Získání data o délkách kořenového systému a počtu hlízek byla vyhodnocena v programu ImageJ a zpracována v programech Microsoft Office Excel a MatLab.

3.2.15 Dokumentace a vyhodnocování průběhu somatické embryogeneze

Průběh somatické embryogeneze v jednotlivých stádiích u kontrolní i transgenní linie byl pozorován pomocí Stereomikroskopu s kontinuálním zvětšením. Snímky byly pořízeny přímo na Petriho miskách při viditelném světle, a při fluorescenční iluminaci. Při této iluminaci byla zjišťována přítomnost fluorescence GFP u transgenních linií FABD2-GFP přímo na Petriho miskách.

3.2.16 Příprava příčných a podélných řezů hlízek *M. sativa*

Kořenové hlízky 21 dní po inokulaci bakteriální suspenzí *S. meliloti* byly pomocí skalpelu odřezány z kořene *M. sativa*. K vytvoření tenkých řezů byla použita podélně naříznutá bezová duše, a do zářezu vložena hlízka. Poté se pomocí žiletky vytvořil co nejtenčí řez. Takto vytvořené řezy byly poté položeny na podložní mikroskopické sklíčko, zakápnuty destilovanou vodou a přiklopeny krycím sklíčkem. Vytvořené vzorky bylo možné pozorovat pomocí Epifluorescenčního mikroskopu jak v procházejícím, tak i fluorescenčním světle.

3.2.17 Příprava rostlin *M. sativa* pro vitální mikroskopické pozorování

K mikroskopickému pozorování byly použity 3 až 4 dny staré semenáčky po vyklíčení a malé rostlinky získané ze somatické embryogeneze. Rostlinky opatrně vyjmuly z pevného kultivačního média. Transgenní rostliny obsahující proteiny značené s GFP byly přímo připraveny pro snímání v Light-sheet mikroskopu bez specifického barvení (podle Ovečka *et al.*, 2015).

3.2.18 Příprava rostlin *M. sativa* pro mikroskopii v FEP tubičce

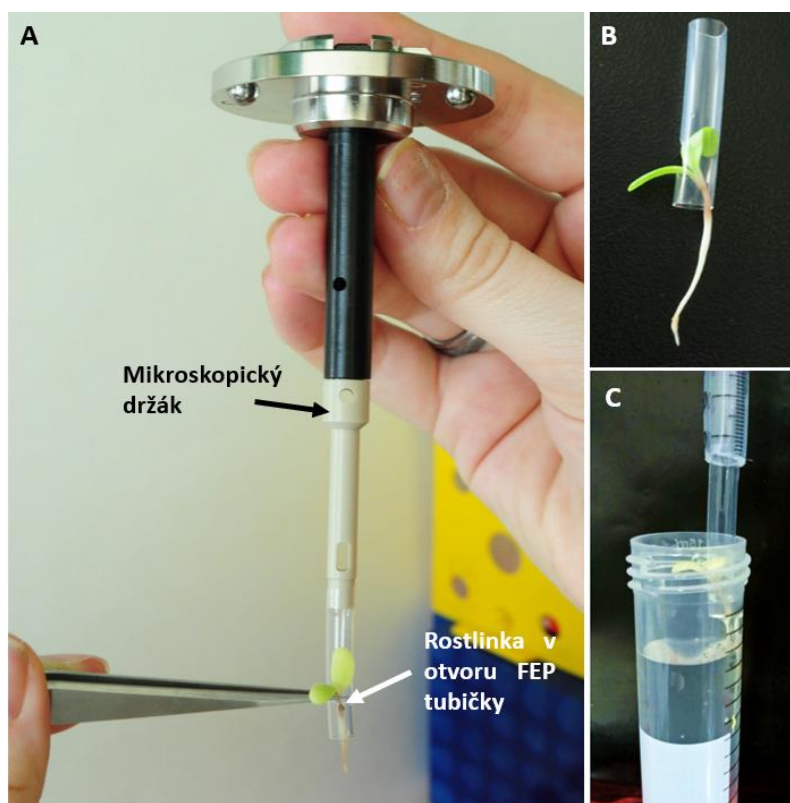
Před pozorováním se rostlinka upevnila v tubičce z FEP materiálu (Fluorinated ethylene propylene) o průměru 2,4 mm a 2,8 mm (vnitřní a vnější průměr) pomocí 1 % agarosy, která má bod tání při nízkých teplotách mezi 28 °C a 32 °C. Používá se z důvodu, že ostatní ztužovací látky mají bod tání při vyšších teplotách, což by vyvolalo tepelný stres u rostliny zalévané agarosou. Agarosa byla připravena smícháním 0,1 mg agarosového prášku v mikrozkuhavce Eppendorf s 1 ml tekutého Fahraeus média bez dusíku. Obsah mikrozkuhavky byl promíchán na vortexu a poté se mikrozkuhavka umístila do termobloku a zahřívána na teplotu 70 °C po dobu 30 minut s pravidelným promícháváním, aby se agarosový prášek rozpustil v médiu. Po 30 minutách byla teplota snížena na 30 °C. Při teplotě menší než 28 °C začíná agarosa tuhnut. Tímto je z vložené rostlinky připraven vhodný preparát k mikroskopování v Light sheet mikroskopu (Jarošová, 2017).

Rostlina byla opatrně vložena do mikrozkuhavky s agarosou. Poté se seshora na rostlinku nasunula FEP tubička. Po částečném ztuhnutí agarosy se tubička nasunula do 1 ml stříkačky s odstraněným hrotem. Tubička byla společně s rostlinkou vyjmuta z mikrozkuhavky. Po vyjmutí se nechala agarosa v tubičce na vzduchu ztuhnout. Takto připravený vzorek už bylo možné okamžitě pozorovat v Light-sheet mikroskopu.

3.2.19 Příprava rostlin *M. sativa* pro mikroskopii v FEP tubičce bez přítomnosti agarosy

Před pozorováním byla rostlinka upevněna v tubičce s FEP materiálu (Fluorinated ethylene propylene) o průměru 2,4 mm a 2,8 mm (vnitřní a vnější průměr). Do boční

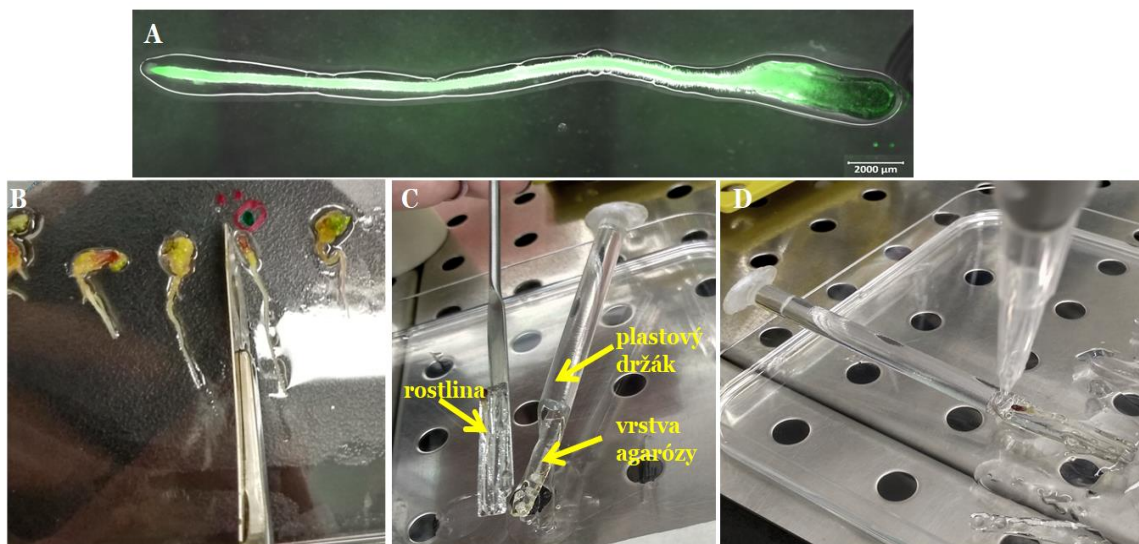
stěny tubičky byl předem vyřezán otvor, pomocí kterého se rostlinka vložila dovnitř tak, že děložní listy zůstaly vně tubičky a díky tomu měla rostlina dostatek místa na vývoj nadzemní části a nemohla vypadnout z tubičky (Obr. 4A). Bylo ovšem nutné postupovat rychle, aby nedošlo k zaschnutí kořene, a tím i ke zničení rostlinného vzorku. Takto připravený vzorek už bylo možné okamžitě pozorovat v Light-sheet mikroskopu. Podle předpokladů, díky absenci agarosy a volné přístupnosti kořene v médiu v komůrce, byla rostlina vhodnější pro mikroskopii symbiotických procesů s rhizobiálními bakteriemi (detailně na Obr. 4B). V čase mezi přípravou rostliny pro mikroskopování a její instalací do pozorovací komůrky mikroskopu, byl vzorek v tubičce ponořen v tekutém kultivačním médiu, aby nedošlo k zaschnutí kořene (Obr. 4C).



Obr. 4: Příprava rostliny *M. sativa* pro Light-sheet mikroskopii v plastové tubičce bez použití agarosy. A) Schéma instalace rostliny bočním otvorem do FEP tubičky, B) Detailní pohled na rostlinku *M. sativa* v FEP tubičce. C) Rostlinky v FEP tubičce v tekutém médiu

3.2.20 Příprava rostlin *M. sativa* pro mikroskopii na plastovém držáku

Kvůli velikosti použitých rostlin, které byly příliš rozměrné, a aby bylo možné je umístit do FEP tubičky, bylo nutné použít jiný protokol k přípravě rostlin pro Light-sheet mikroskopii. Rostlina stále rostoucí na bločku pevného kultivačního média se připevnila na plastový držák vyrobený 3D tiskárnou (podle von Wangenheim *et al.*, 2017). Rostlina rostla na pevném médiu bez dusíku ve svislé poloze (Obr 5A). Před samotným snímáním rostlina vyřízla skalpelem, i s bločkem média kolem ní (Obr 5B). Předem se připravila a rozeřáta 1,5 % agarosa s nízkou teplotou tání v tekutém médiu bez dusíku. Agarosa rozpuštěná při teplotě 80 °C byla po dobu 30 minut temperována na 33 °C. Plastový držák byl sterilizován 70 % ethanolem. Otvory v plastovém držáku se utěsily pomocí malého proužku lepicí pásky. Poté se agarosa pomocí automatické pipety aplikovala v tenké vrstvě na plastový držák. Než stačila agarosa na držáku ztuhnout, byl na ni položen bloček tuhého média s rostlinou (Obr. 5C). Rostlina se na držáku upevnila pár kapkami agarosy v místě hypokotylu. (Obr. 5D). Celý proces přípravy se omezil na co nejkratší dobu, aby nedošlo k zaschnutí a úmrtí rostliny.



Obr. 5: Příprava rostliny *M. sativa* s expresí ABD2-GFP a její připevnění na plastový držák pro Light-sheet mikroskopii. A) Detail rostliny indukované somatickou embryogenezí, B) rostlina v Petriho misce a její vyřezání skalpelem v bločku pevného kultivačního média, C) schéma instalace bločku média s rostlinkou na vrstvu agarosy na plastový držák, D) upevnění rostliny na držáku pomocí malého množství agarosy.

3.2.21 Příprava rostlin *M. sativa* pro sledování interakce s bakteriemi *S. meliloti* v Light-sheet mikroskopu

Pro pozorování interakcí mezi kořeny *M. sativa* a bakteriemi *S. meliloti* v Light-sheet mikroskopu v čase byly využity dva postupy. V prvním případě byly pozorovány rostliny, na jejichž kořeny se ještě při kultivaci na Petriho misce na pevném médiu bez dusíku aplikovaly bakterie v tekuté kultuře. Na tyto rostliny byl 48 – 72 h před snímáním přidán 1 ml tekuté bakteriální kultury v tekutém médiu bez dusíku při $OD_{600}=0,05$. Ke snímání pak se rostlinky připravily dle protokolu upevnění na plastový držák a snímány v Light-sheet mikroskopu při aktivní perfúzi média s průtokem 1 ml/min. Při druhém postupu byla tekutá bakteriální kultura ($OD_{600}=0,05$) přidána až do tekutého média v pozorovací komůrce Light-sheet mikroskopu. Rostlina z pevného kultivačního média byla podle protokolu upevněna na plastový držák a vložena do pozorovací komůrky s tekutým médiem bez dusíku. Po krátké adaptaci se do pozorovací komůrky pomocí stříkačky přidala tekutá bakteriální kultura, která se opět nechala po dobu 30-60 min adaptovat bez perfúze média. Po stabilizační době se perfúzní systém nastavil na průtok 1 ml/min a bylo spuštěno pozorování interakcí mezi kořenem vojtěšky a rhizobiálními bakteriemi.

3.2.22 Light-sheet mikroskopie

Pozorování kořene připravených rostlin bylo provedeno pomocí Light-sheet fluorescenčního mikroskopu, který je vybaven detekčním objektivem WPlan-Apochromat 20x/1,0 NA s vodní imerzí a dvěma osvětlovacími objektivy LSFM 10x / 0,2 NA.

Rostlinky se snímaly pomocí osvětlení ze dvou bočních stran. Jelikož jsou kořínky *Medicago* poměrově velké a objemné k velikosti zorného pole snímacího objektivu, nebylo možné růst kořenové špičky sledovat pouze v jednom zorném poli. Tento problém se vyřešil nastavením časového snímání kořene ve dvou a více zorných polích, které byly ve snímacích parametrech nastaveny následně po sobě v ose Y (tzv. multiview režim).

Komůrka mikroskopu k pozorování se naplnila tekutým Fahraeus médiem bez dusíku, které zajišťovalo pro rostlinku výživu po celou dobu snímání a bránilo před

vyschnutím. Před samotným snímáním bylo nutné nechat mikroskopickou komůrku alespoň 30 min stabilizovat k dosažení stabilní teploty 22 °C.

Rostlina upevněná pomocí agarosy a fixovaná v FEP trubičce byla po ustálení teploty vložena do mikroskopické komůrky pomocí držáku, který vzorek uchycuje shora. Rostlinku v trubičce bylo poté možno v komůrce otáčet a posouvat ve směrech X, Y a Z s možností rotace v rozsahu 360° k optimálnímu nastavení parametrů snímání.

Pozorování rostliny probíhalo v tzv. otevřeném systému. Kořen upevněný v FEP trubičce rostl nejprve v agarose, později prorostl z FEP trubičky ven. V tu chvíli rostl přímo v tekutém Fahraeus médiu v mikroskopické komůrce. Stejně tak při upevnění rostliny na plastovém držáku byl kořen v kontaktu přímo s tekutým médiem. Zelená část rostliny měla volný přístup ke vzduchu. Použitý systém umožnil přístup kyslíku, prodloužil životaschopnost rostlinky a umožnil delší a neinvazivní snímání růstu. Důležitá pro dlouhodobé snímání bez kontaminací byla také sterilní práce ve všech předchozích krocích.

Umístění rostliny k pozorování bylo provedeno pomocí kontrolovaného polohování a otáčení vzorku v X, Y a Z ose. Poté bylo nutné zaostřit na kořen a ujistit se, že nedošlo k jeho poškození při umísťování do mikroskopu. Osvětlení k nastavení pozice poskytovalo přední LED světlo a zobrazovací kamera na přední straně pozorovacího prostoru mikroskopu.

Dále bylo nutné nastavit důležité parametry pro snímání, tedy vhodné lasery, emisní filtry, vycentrované osvětlení z obou stran, zvětšení, dobu snímání, velikost snímaného prostoru v Z dimenzi a podle potřeby režim Multiview. Pokud se snímala fluorescence dvou fluoroforů, bylo nutné nastavit duální snímání ve dvou kanálech a nastavit rozdělení fluorescenčních emisních spekter výběrem příslušného dichroického zrcátka a emisních filtrů.

3.2.23 Snímání transgenních rostlin *M. sativa* s expresí 35S::ABD2-GFP a bakterií *S. meliloti* s expresí mRFP

Pro pozorování kořenů transgenních rostlin s produkcí GFP-značených proteinů byl použit excitační laser o vlnové délce 488 nm a emisní filtr BP 505-545. Snímání probíhalo v režimu optických řezů v Z rovině, v časových intervalech snímání každých 5 minut po dobu 15 hodin. Rozlišení obrazu snímání v X, Y a Z dimenzích bylo 0,228 x 0,228 x 0,477 μm/pixel. Záběry byly získány ve třech po sobě následujících zobrazeních

v režimu Multiview. Pro pozorování kořenů transgenních rostlin a také bakterií značených mRFP bylo použito kromě excitačního laseru pro GFP o vlnové délce 488 nm a emisního filtru BP 505-545 i nastavení pro snímání mRFP s použitím excitačního laseru o vlnové délce 561 nm a emisního filtru BP 560-585.

3.2.24 Zpracování dat

Statistické údaje klíčivosti semen a růstu kořenů byly zpracovány do grafů pomocí programů MatLab a Microsoft Excel. Ze snímků celého kořene, získaných pomocí softwaru ZEN 2014 (Zeiss), byly vytvořeny snímky s definovaným rozměrem v ose X, Y a Z. Pomocí tohoto softwaru byly vytvořeny 3D snímky a videa, zobrazující růst v čase. U některých dat byla využita metoda dekonvoluce snímků použitím algoritmů „Nearest Neighbour“ nebo „Constrained Iterative“ přímo v softvérové aplikaci ZEN 2014 (Zeiss).

3.2.25 Imunobloting

3.2.25.1 Odběr vzorků a jejich homogenizace

Na tuto analýzu byly použity vzorky kořenů a nadzemních částí rostlin, indukovaných somatickou embryogenezí a kultivovaných *in vitro*. Použity byly rostliny v kontrolních podmínkách a rostliny s indukovaným procesem tvorby hlízek po 15 dnech od inokulace rhizobiální tekutou kulturou. Všechny rostliny se kultivovaly na Fahraeus médiu bez dusíku.

Vzorky kořenů a nadzemních částí byly homogenizovány v předem vychlazené třecí misce s tloučkem. Během homogenizace se do misky nalévalo malé množství tekutého dusíku. Následně byly vzorky buď zmrazeny tekutým dusíkem ve vychlazené mikrozkuhavce a uloženy na -80 °C, nebo byly proteiny rovnou extrahovány.

3.2.25.2 Extrakce proteinů

Vzorky byly extrahovány v kompletním EB. Do čerstvě připraveného extrakčního pufru E bylo přidáno činidlo DTT (podle protokolu) pro redukci a rozrušení disulfidických vazeb, které stabilizují terciární a kvartérní strukturu proteinů. Dále se do extrakčního pufru přidalo dané množství inhibitoru proteas cOmplete™, aby v průběhu extrakce

nedocházelo k rozkladu proteinů. Byl přidán také inhibitor fosfatas PhosSTOP™ pro zabránění defosforylace fosforylovaných proteinů. Vzorky bylo nutné udržovat na chladu v boxu s ledem. Po změření hmotnosti homogenizovaného vzorku bylo přidáno příslušné množství Kompletního EB (do 1 g homogenátu byl napipetován 1 ml). Vzniklá směs byla vortexována a ponechána 15 minut extrahovat.

3.2.25.3 Centrifugace

V mezičase extrakce proteinů se centrifuga předchladila na 4 °C. Po 15 minutách extrakce byly mikrozkušavky vloženy do centrifugy na dobu 20 minut při 13 000 g a 4 °C. Po odstředění na centrifuze byl vzniklý supernatant přenesen pipetou se sterilní špičkou do čisté a označené 2 ml mikrozkušavky. Mikrozkušavky se supernatanty byly poté centrifugovány na mikrocentrifuze po dobu asi 1 minutu. Obsah byl poté pomocí pipety přenesen do 0,6 ml popsáných mikrozkušavek a uložen na ledu.

3.2.25.4 Měření koncentrace proteinů podle Bradforda

Jako první se připravil roztok hovězího sérového albuminu (BSA) pro vytvoření kalibrační křivky. Do 1 ml extrakčního pufru E bylo přidáno 10 mg BSA. Z tohoto roztoku se v kombinaci s Extrakčním puftrem (viz Tab.) vytvořily pracovní roztoky se zvyšující se koncentrací BSA pro tvorbu kalibrační křivky. Každý z těchto pracovních roztoků BSA byl smíchán v jamkách mikrodestičky v poměru 1 μl pracovního roztoku BSA s 239 μl MiliQ vody a 60 μl Protein Assay Reagent Concentrate 5x. Vzorky proteinů byly smíchány v jamkách mikrodestičky v poměru 1 μl vzorku s 239 μl MiliQ vody a 60 μl Protein Assay Reagent Concentrate 5x. První jamka mikrodestičky sloužila jako referenční vzorek, tudíž neobsahovala vzorek proteinu.

Pipetou se sterilní špičkou byl postupně každý vzorek v jamkách důkladně promíchán a ponechán při pokojové teplotě 10 minut reagovat. Během doby reakce byl na počítači spuštěn program i-control™ a také spektrofotometr. Měření vzorků na mikrodestičce probíhalo při 595 nm. Obsah proteinů se vypočítal z rovnice lineární regrese kalibrační křivky.

Tab. 1: příprava roztoků BSA se zvyšující se koncentrací pro vytvoření kalibrační křivky

Množství proteinů	Blank (0 µg)	0,5 µg	1,0 µg	1,5 µg	2,0 µg	2,5 µg	3,0 µg	4,0 µg	5,0 µg
Roztok BSA (µl)	0	5	10	15	20	25	30	40	50
Extrakční pufr (µl)	100	95	90	85	80	75	70	60	50

3.2.25.5 Příprava vzorků pro nanesení na gel

Ze zjištěné koncentrace proteinů v extraktech se vypočítalo potřebné množství proteinu a MiliQ vody do 75 µl vzorku pro docílení stejné koncentrace proteinů ve všech vzorcích. K těmto 75 µl vzorku bylo v digestoři napipetováno 20 µl 4x Laemmli pufru a 5 µl 2-merkptoethanolu. Vznikl tedy směsný roztok o objemu 100 µl. Směs byla zahřáta v termobloku v digestoři na teplotu 95 °C po dobu 5 minut. Poté byla směs aplikována na gel. Nevyužitou směs bylo možné uložit do mrazničky na -20 °C, byli ji však nutné ji před nanesením na gel znovu zahřát.

3.2.25.6 Výroba gelů

Před samotnou elektroforézou bylo třeba připravit „Stain-Free“ akrylamidové gely. Tyto gely mají velkou výhodu v tom, že je lze po gelové elektroforéze snímat skenerem a zjistit, zda je ve všech drahách stejné množství proteinů. Poté je možné kvantitativně vyhodnotit a porovnat množství daného proteinu ve vzorcích. Ze všeho nejdříve bylo nutné vyčistit spodní 1,0 mm a horní tenká skla destilovanou vodou a 70 % ethanolem, aby se na nich nezadržovaly nečistoty. Tyto by mohly interferovat s výsledky. Po vysušení se skla nasadila do aparatury pro výrobu gelů. Následně po sestavení aparatury byla mezera mezi skly naplněna destilovanou vodou podobu přibližně 5 minut pro zjištění těsnosti aparatury. Po odstranění vody byla skla opatrně vysušena.

Nejdříve se dle přiloženého návodu (viz Tab. 2) pro dělicí gel (tzv. „Resolving gel“) ve zkumavce Falcon smíchal roztok „Resolver A“ s roztokem „Resolver B“. TEMED a 10 % APS byly přidány až nakonec, protože zahajují polymeraci gelu. Lehkým vířením se promíchal obsah kyvety. Pasteurovou pipetou byl nanesen roztok mezi skla asi 1,5 cm pod horní hranu kratšího skla.

Na povrch dělicího gelu byl okamžitě přidán zaostřovací gel (tzv. „Staking gel“), který vznikl ve zkumavce Falcon smícháním roztoku „Resolver A“ s roztokem „Resolver B“. TEMED a 10 % APS, avšak v jiném poměru než u rozdělovacího gelu.

Do Zaostrovacího gelu se vložil plastový hřeben. Oba gely se nechaly současně polymerizovat 30 minut. Hotový gel byl buď ihned použit, nebo bylo možné jej zabalit do folie potřísněné dH₂O a uložit do lednice.

Tab. 2: složení Stain-free gelu (na 1 gel tloušťky 1 mm)

Roztok „Resolver“ (6 ml)	Resolver A 3 ml	Resolver B 3 ml	10% APS 30 µl	TEMED 3 µl
Roztok „Stacker“ (2 ml)	Resolver A 1 ml	Resolver B 1 ml	10% APS 10 µl	TEMED 2 µl

3.2.25.7 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Nejdříve byly vzorky umístěny do ledu a připravena elektroforetická vana a aparatura. Gely byly vloženy do aparatury, která se pak naplnila elektrodoým pufrem, a z gelů byly vyjmuty hřebínky. Do první jamky na gelu bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu a do zbylých jamek 15 µl vzorku. Jakmile byly všechny vzorky napipetovány, celý se tank naplnil elektrodoým pufrem, připojil ke zdroji na 100 V po dobu 10 minut a poté na 140 V. Samotná gelová elektroforéza trvala přibližně 2 hodiny.

3.2.25.8 Přenos proteinů na membránu

Pro přenesení proteinů z gelu na PVDF membránu bylo zapotřebí sestavit aparaturu pro proteinový transfer, vystříhnout dostatečně velkou membránu a vyrobit přenosový pufr. Po gelové elektroforéze se odpojil elektroforetický tank od zdroje napětí. Byla rozložena elektroforetická aparatura a pomocí plastových nástrojů oddělena skla od sebe. Gel byl poté opatrně vložen do přenosového pufru bez methanolu. V tomto pufru se ekvilibroval po dobu 10 minut. Dvě plastové houby a čtyři silnější filtrační papíry, které byly ponořeny v přenosovém pufru s methanolem, v něm byly ponechány po dobu 10 minut. Nastříháá membrána se nejprve aktivovala v 100% menthanolu po dobu 30 sekund a poté byla ponechána 10 minut ekvilibrovat v přenosovém pufru bez methanolu. Po ekvilibraci byl složen tzv. sendvič, který se skládal z kazety položené černou stranou dolů (= negativní pól), zvlhčené plastové houby a dvou zvlhčených silnějších filtračních papírů. Na filtrační papíry byl položen ekvilibrovaný gel otočený horní stranou dolů a na něj předem inkubovaná membrána, která byla několikrát rolována plastovým válečkem pro odstranění bublin. Na membránu byly položeny další

dva zvlhčené papíry a na ně položena plastová houba. Kazeta byla přiklopena druhou průhlednou stranou a uzavřena. Kompletní kazeta byla vložena do komory v tanku pro přenos proteinů. Ke komoře do tanku se vložil chladicí box. Celý tank byl poté naplněn přenosovým pufrům s methanolem. Následně by vložena do lednice a zapojen do zdroje napětí na 24 V přes noc a následující den na 100 V po dobu 30 minut pro dokončení přenosu.

Po přenosu byla membrána ponechána zcela oschnout. Poté se ponořila do 100 % methanolu pro zafixování proteinů z důvodu pozdějšího restripování membrány. Následně byla membrána obarvena 3 % roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové po dobu 1 minuty a promyta destilovanou vodou pro zjištění úspěšnosti přenosu. Byl vytvořen snímek obarvené membrány. Odbarvení membrány probíhalo třepáním membrány na třepačce ve skleněné nádobě po dobu 10 minut v destilované vodě a poté 3x10 minut v TBS-T pufru.

3.2.25.9 Blokování nespecifických vazeb a aplikace protilátek

Pro blokování nespecifických vazeb proteinů na membráně byl použit roztok BSA a mléka v TBS-T o různých koncentracích. Fosfospecifická protilátka vyžadovala pro zablokování pouze roztok 6 % BSA v 15 ml TBS-T, neboť se váže také na kasein obsažený v mléce. Blokace probíhala po dobu 2 hodin na pomalé třepačce při laboratorní teplotě. Následovalo promývání 2x 5 minut v TBS-T na rychlé třepačce a poté byla aplikována primární protilátka a inkubována na pomalé třepačce. Fosfospecifická protilátka byla ředěna v poměru 1:1000 s 5 % BSA v 15 ml TBS-T a inkubována v chladničce při 4 °C přes noc.

Pro ostatní protilátky byl pro blokaci použit roztok 5 % BSA a 5 % mléka v 15 ml TBS-T. Protilátka proti MMK3 byla ředěna v poměru 1:3000 v roztoku 3 % mléka v 15 ml TBS-T a inkubována dvě hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka proti MPK6 byla ředěna v poměru 1:15000 v roztoku 1 % BSA v 15 ml TBS-T a inkubována dvě hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka proti aktinu byla ředěna v poměru 1:5000 v roztoku 1 % BSA v 12 ml TBS-T a byla inkubována také dvě hodiny při laboratorní teplotě.

Roztoky primárních protilátek mohly být po použití zamrazeny pro další využití. Následovalo promývání 6x10 minut v TBS-T na rychlé třepačce, dále byla aplikována příslušná sekundární protilátka, konjugovaná s křenovou peroxidázou při pomalém

třepání. Sekundární protilátka byla ředěna v poměru 1:5000 v roztoku 1 % BSA v 15 ml TBS-T a inkubována hodinu a půl při laboratorní teplotě. Po odlití sekundární protilátky se membrány promývaly 5x10 minut v TBS-T.

3.2.25.10 Detekce proteinů

Pro detekci proteinů na membráně bylo připraveno ECL činidlo dle pokynů výrobce. Detekční roztok vznikl smícháním luminolu s peroxidem vodíku. Po promíchání byl roztok uchován zabalený v alobalu z důvodu citlivosti na UV záření. ECL činidlo se tedy musí připravovat vždy čerstvé těsně před detekcí. PVDF membrána se položila na prázdnou Petriho misku a roztok ECL byl napipetován na celý povrch membrány a ponechán na ní reagovat jednu minutu. Přebytečný substrát byl poté odpipetován a membrána se vložila na snímání do dokumentačního přístroje BioRad ChemiDoc™ MP.

3.2.25.11 Odstranění navázaných protilátek z membrán

Membrány mohou být znovu použity pro navázání dalších protilátek, pokud jsou z nich předešlé protilátky odstraněny. Membrána byla do další aplikace protilátek uchovávána v lednici při 4 °C v TBS-T pufru. Odstranění protilátek spočívalo v promývání membrány v 0,5 M NaOH 2x15 minut, dále v promývání membrány v MiliQ 3x10 minut a nakonec promývání v TBS-T 3x15 minut. Membrány se uložily v čistém TBS-T do lednice. Poté bylo možné opakovat imunodetekci s dalšími protilátkami.

3.2.25.12 Vyhodnocování

Snímání a dokumentace membrán proběhlo v dokumentačním přístroji BioRad ChemiDoc™ MP a programu Image lab. Nejdříve na vysokou citlivost pro vyhodnocení imunoblotingu, a poté pro kolorimetrické stanovení snímání membrány s vyznačeným markerem.

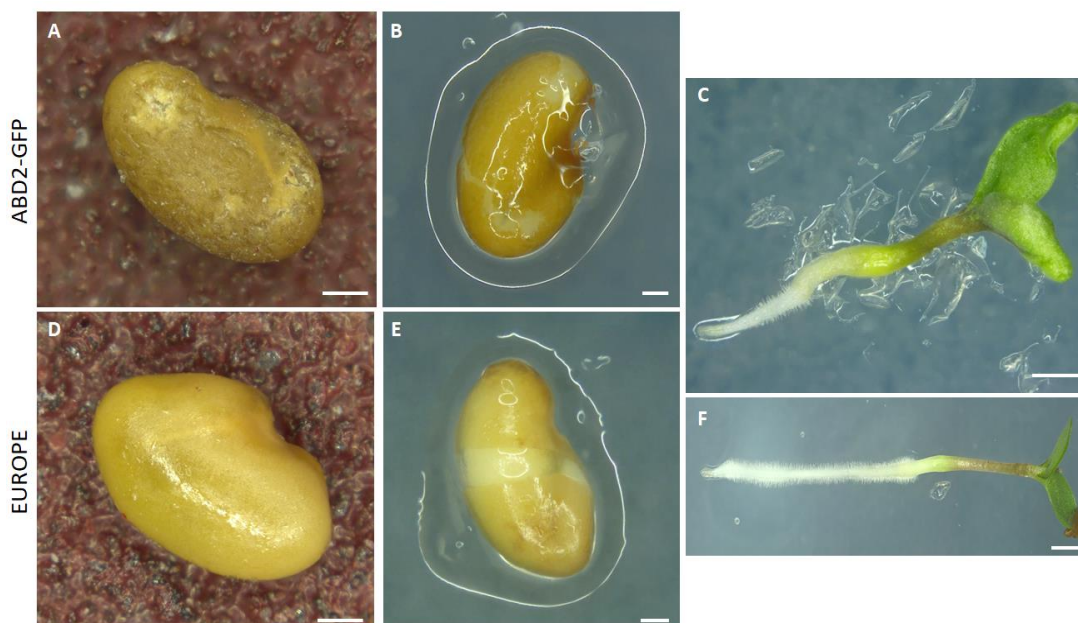
4 VÝSLEDKY

4.1 Klíčivost semen *M. sativa*

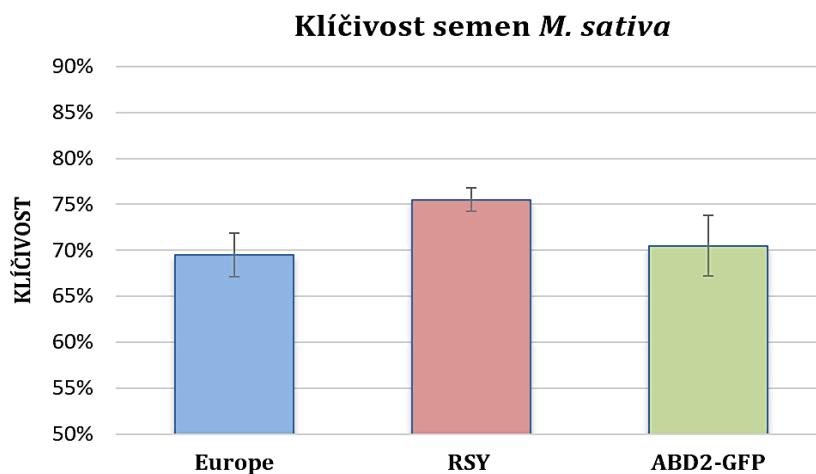
V první fázi experimentu byla pozorována a měřena klíčivost semen rostlin *M. sativa* kontrolní RSY linie a linie produkující ABD2-GFP fúzní protein. U semen bylo nutné použít mechanické narušení obalu semen (skarifikace), jelikož šlo o semena z rostlin získaných procesem samoopylení. Samoopylení u cizosprašných rostlin, jako je právě vojtěška, může vést k inbrední depresi. Ta se může projevovat tvrdým osemením, které zabraňuje klíčení. Klíčivost těchto semen byla porovnána s klíčivostí semen divokého typu kultivaru Europe, u nichž nebylo nutné provádět skarifikaci. Semena kultivaru Europe byla získána normálním procesem opylení hmyzem. Klíčivost byla sledována po třech dnech od začátku kultivace.

Na Obr. 6A je zobrazen rozdíl mezi semeny kultivaru Europe transgenními semeny ABD2-GFP po skarifikaci. Je možné sledovat (Obr. 6B), jak po 24 hodinové imbibici dochází k prasknutí osemení a semeno mohlo vyklíčit. Vyklíčená třídenní rostlinka je zobrazena na Obr. 6C. U semene divokého typu kultivaru Europe nebyla skarifikace nutná (Obr. 6D). Po 24 hodinové imbibici došlo k prasknutí osemení (Obr. 6E). Na Obr. 6F je zobrazená třídenní vyklíčená rostlinka.

Klíčivost semen z kontrolních rostlin, získaných metodou samoopylení po skarifikaci pomocí smirkového papíru, po 24 hodinové imbibici ve vodě při 4 °C, činila 76 %. Klíčivost semen rostlin s expresí ABD2-GFP, u nichž bylo také nutné použít skarifikaci k navození klíčení, činila 71 %. U semen z rostlin *M. sativa* divokého typu kultivaru Europe po 24 hodinové imbibici ve vodě činila klíčivost 70 %. Porovnání klíčivosti jednotlivých linií je ukázán v grafu na Obr. 7.



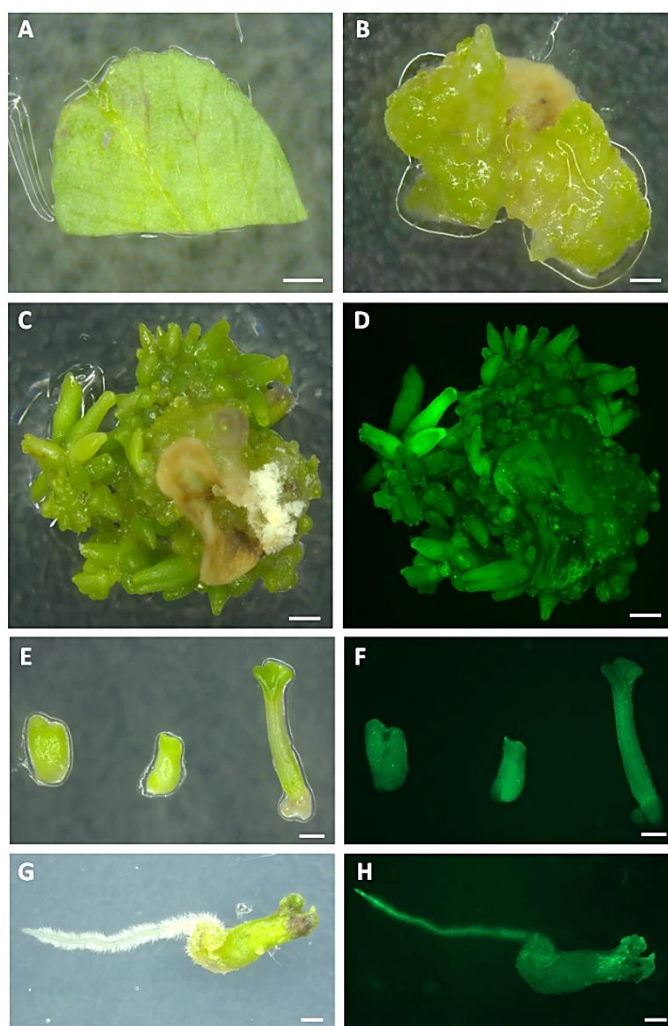
Obr. 6: Porovnání klíčení skarifikovaného semene *M. sativa* transgenní linie a semen divokého typu Europe. A) Semeno transgenní linie ABD2-GFP, které bylo skarifikováno pomocí smirkového papíru. B) Skarifikované transgenní semeno po 24 hodinové imbibici. C) Transgenní rostlinka ze skarifikovaného semene po 3 dnech kultivace. D) Semeno divokého typu kultivaru Europe, u nějž nebyla skarifikace nutná. E) Semeno kultivaru Europe po 24 hodinové imbibici. F) Rostlina ze semene kultivaru Europe po 3 dnech kultivace. Měřítka A), B), D) a E) je 0,5 mm, C) a F) je 2 mm.



Obr. 7: Porovnání klíčivosti semen linií *M. sativa*. Porovnávána je klíčivost semen divokého typu kultivaru Europe a kultivaru RSY u kontrolní linie a transgenní linie produkující ABD2-GFP.

4.2 Somatická embryogeneze kontrolních a transgenních linií *M. sativa*

Explantáty byly připraveny z vysterilizovaných listů a přeneseny na B5H médium, které indukovalo tvorbu kalusu. Po 14 dnech se explantáty s vytvořeným kalusem přenesly na B50 médium, na němž došlo k vývoji somatických embryí. Během 14 až 21 dnů byla zralá somatická embrya samostatně přenesena na MMS médium, na němž pokračoval vývoj embryí v rostliny. Po vytvoření kořínků v rozmezí 14 až 30 dnů, byly rostlinky přeneseny na MS médium, na němž došlo k dalšímu růstu kořene a vývoji zelené části. Náchylnost celého procesu indukce somatické embryogeneze *M. sativa* na bakteriální i houbové infekce vyžadovala přísně sterilní prostředí. Jednotlivá stadia somatické embryogeneze jsou ukázaná na Obr. 8. U transgenní linie s expresí ABD2-GFP byla prokázána produkce fúzního chimérického proteinu ABD2-GFP ve všech stadiích somatické embryogeneze pomocí fluorescenčního stereomikroskopu s fluorescenčním filtrem pro GFP.



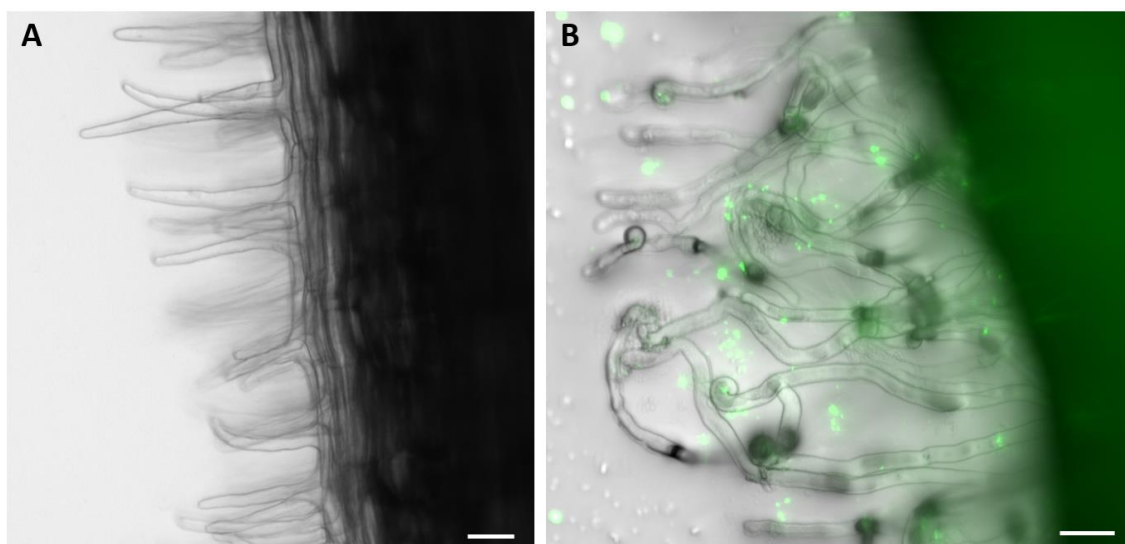
Obr. 8: Jednotlivé fáze somatické embryogeneze *M. sativa* transgenní linie ABD2-GFP. A) Explantát listu na B5H médiu první den kultivace. (B) Embryogenní kalus po 14 dnech od počátku somatické embryogeneze na B50 médiu. (C) a (D). Embryogenní kalus s vyvíjejícími se somatickými embryi po 14 dnech kultivace na B50 médiu, (D) GFP fluorescence. (E) a (F) Různé vývojové fáze embryí kultivované na MMS médiu, (F) GFP fluorescence. (G) a (H) Rostlinka kultivovaná 7 dní na MS médiu, (H) GFP fluorescence. Měřítka je 1 mm.

4.3 Pozorování symbiotického procesu mezi *M. sativa* a *S. meliloti*

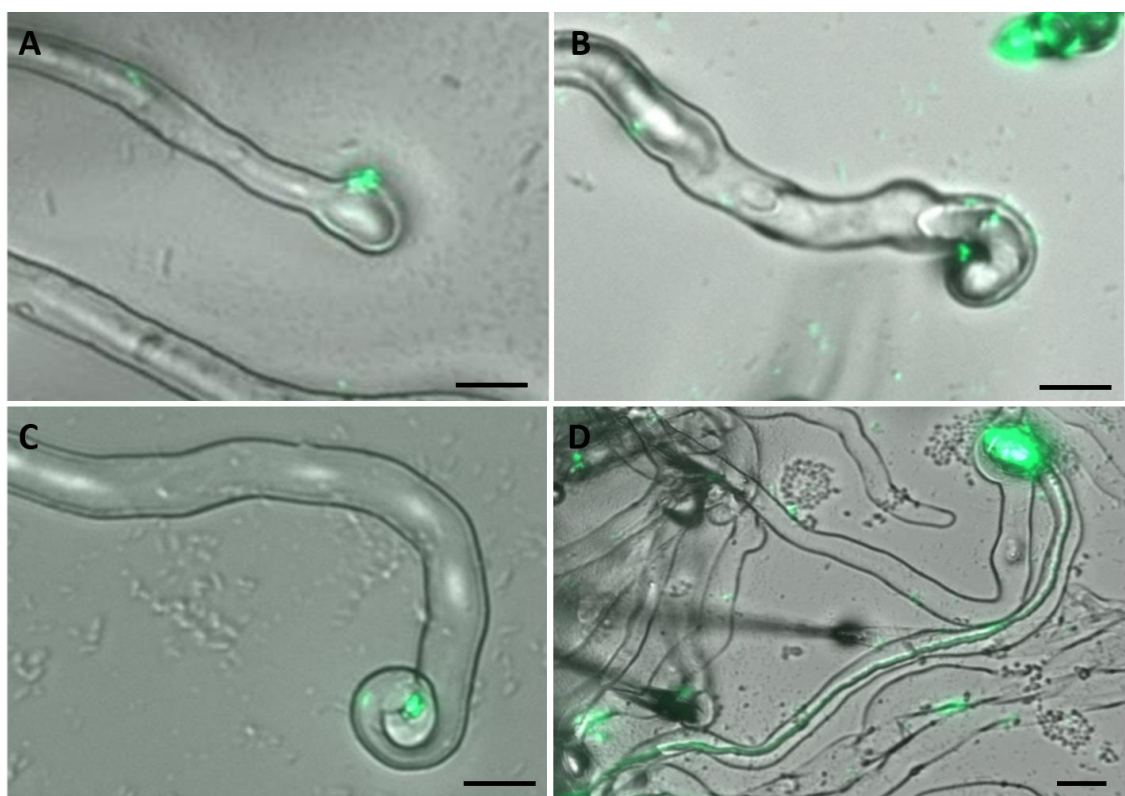
K optimalizaci studia symbiotických interakcí mezi kořeny *M. sativa* a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti* byly využity 10 dnů staré rostliny divokého typu kultivaru Europe, které posloužily k optimalizaci jak přípravy rostlin a inokulace bakteriemi, tak i ke zkoumání časového průběhu procesu tvorby hlízek od počátečních fází až po vývin hlízky. K interakci byly využity bakterie *S. meliloti* s expresí GFP. Interakce probíhaly na Petriho miskách na pevném Fahraeus médiu bez dusíku. Právě nepřítomnost tohoto prvku byla důležitá pro zahájení a postup symbiotického procesu. Suspenzní kultura byla kultivována v tekutém Fahraeus médiu bez dusíku do konečné optické hustoty $OD_{600}=0,05$.

Na Obr. 9 je ukázáno, jak se změnila morfologie kořenových vlásků 3 dny po inokulaci (Obr. 9B) oproti stavu před inokulací (Obr. 9A). Při snímání pomocí epifluorescenčního mikroskopu bylo možné pozorovat všechny iniciální fáze interakce mezi kořenovými vlásky *M. sativa* a bakteriemi *S. meliloti* produkujícími GFP. Na Obr. 10 jsou zobrazeny všechny počáteční symbiotické fáze. Po přichycení bakterií *S. meliloti* na špičku kořenového vlásku (Obr. 10A) se jeho špička zatočila kolem bakterie (Obr. 10B), a poté došlo k zakroucení vlásku (Obr. 10C). Přibližně po dvou dnech od zatočení špičky kořenového vlásku došlo k tvorbě kompletního infekčního vlákna, které prorostlo až k buňkám kortexu kořene (Obr. 10D).

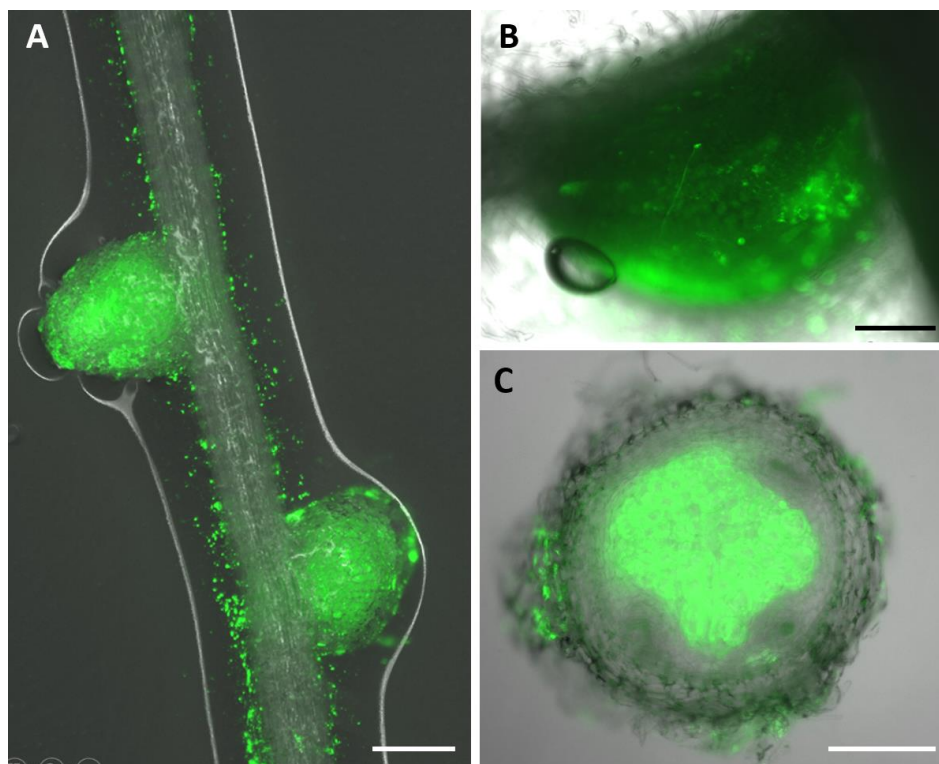
Po dvou týdnech bylo na kořenech *M. sativa* kultivaru Europe možné pozorovat počet hlízek indukovaných rhizobakteriemi *S. meliloti*. Tyto hlízky byly zkoumány pomocí stereomikroskopu s kontinuálním zvětšením. Na Obr. 11A a 11B jsou zachyceny hlízky na kořeni *M. sativa*, a je zde jasně zřetelný zelený fluorescenční signál patřící rhizobakteriím *S. meliloti*, které produkují GFP. Pro pozorování vnitřní struktury byly u hlízek provedeny řezy. Na Obr. 11C je zobrazen příčný řez hlízkou rostliny *M. sativa* kultivaru Europe, která byla indukována *S. meliloti* s produkcí GFP. Zelený signál ve střední části hlízky vymezuje fixační zónu hlízky s bakterioidy produkujícími GFP fluorescenční signál.



Obr. 9: Kořenové vlásky *M. sativa* kultivaru Europe A) před inokulací a B) 3 dny po inokulaci se *S. melilotis* produkcí GFP. Měřítka je 50 μm .



Obr. 10: Počáteční interakce mezi *S. meliloti* a kořenovými vlásky *M. sativa* a tvorba infekčního vlákna. A) Přisednutí bakterií na špičce kořenového vlásku, B) kořenový vlásek se začíná kroutit, C) zakroucený kořenový vlásek, D) infekční vlákno uvnitř kořenového vlásku. Měřítka je 20 μm .



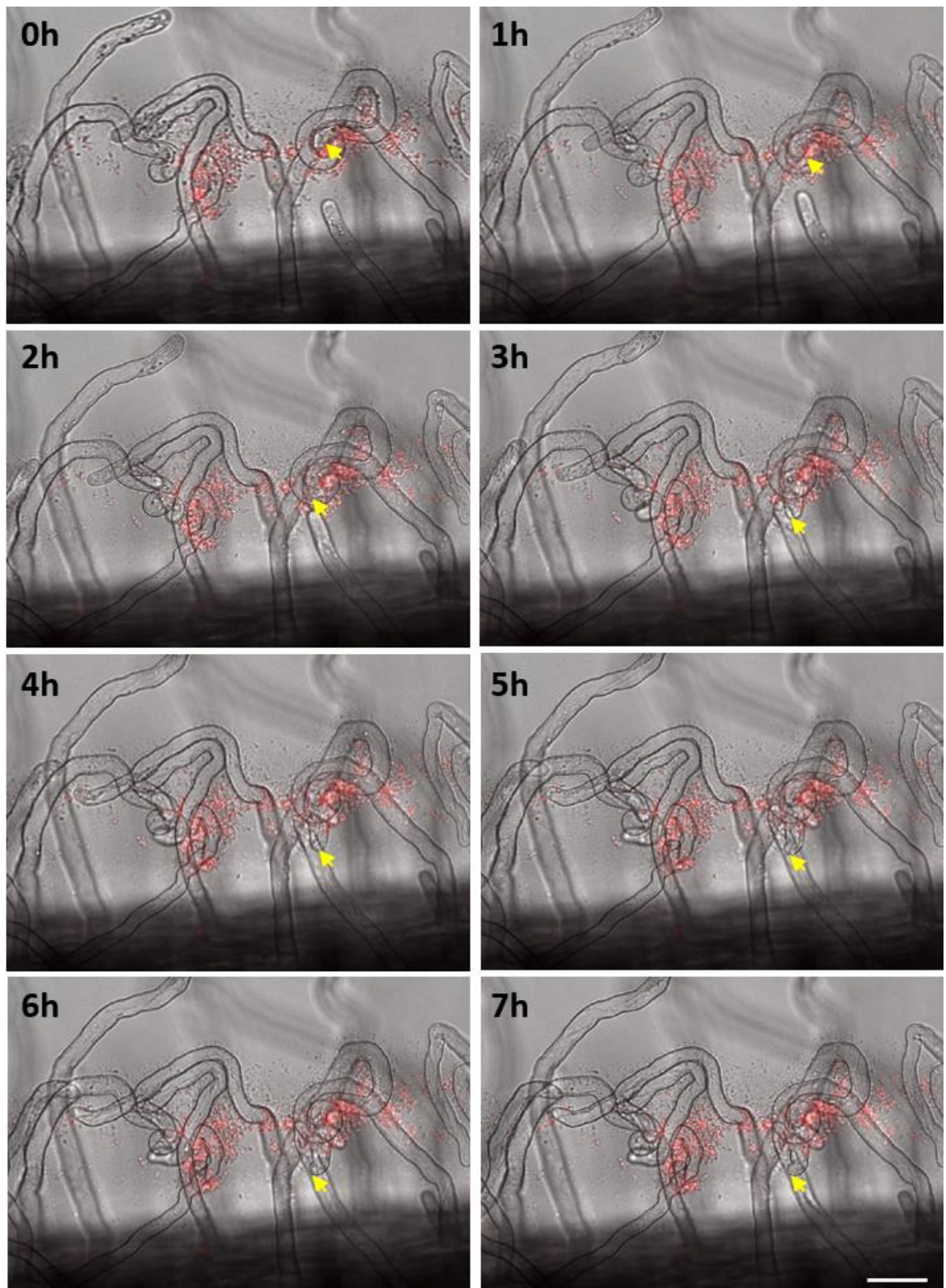
Obr. 11: Kořenové hlízky na kořenech *M. sativa* kultivaru Europe indukované rhizobakteriemi *S. meliloti* produkujícími GFP. A) Hlízky na kořeni rostliny *M. sativa* 21 dní po inokulaci. B) Detail hlízky na rostlině *M. sativa* 14 dní po inokulaci. C) příčný řez živou hlízkou *M. sativa* indukované *S. meliloti* GFP 21 dní po inokulaci. Měřítka je A) 500 μm , B) a C) 200 μm .

4.3.1 Časoběrné snímání interakcí mezi kořenovými vlásky *M. sativa* a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti*

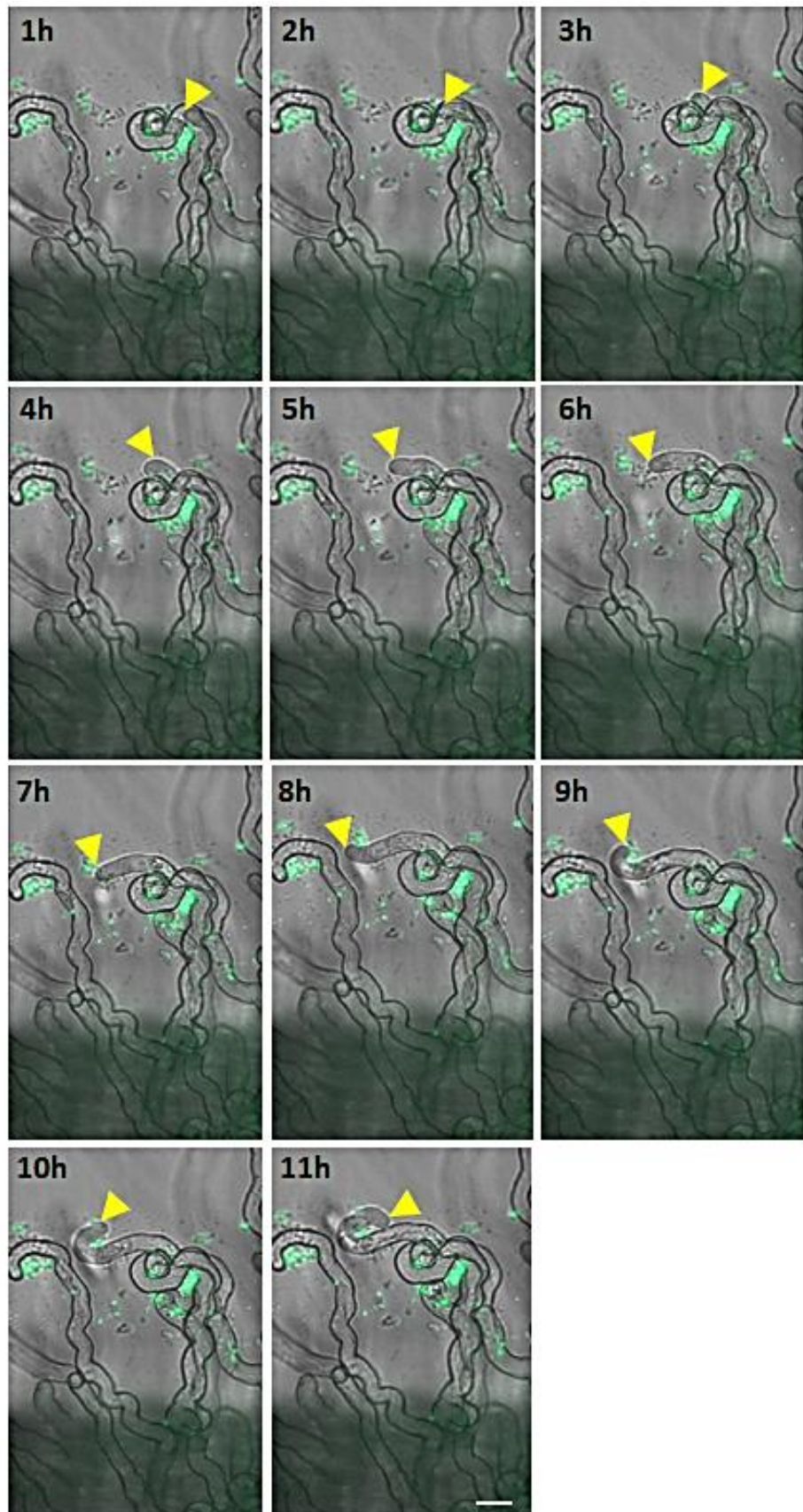
Pro neinvazivní pozorování interakcí mezi kořenovými vlásky *M. sativa* s bakteriemi *S. meliloti* byly využity 10 dní staré rostliny *M. sativa* kultivaru Europe inokulované bakteriální suspenzí *S. meliloti* s produkcí GFP nebo mRFP v tekutém Fahraeus médiu bez dusíku ($\text{OD}_{600} = 0,5$). Snímky byly pořízeny epifluorescenčním mikroskopem.

První série snímků na Obr. 12 (Video 1) ukazuje kořenové vlásky *M. sativa* kultivaru Europe jeden den po inokulaci suspenzí *S. meliloti* mRFP. Pro snímání průchozího světla byl použit expoziční čas 15 ms, pro emisi mRFP expoziční čas 1000 ms. Snímání probíhalo každých 30 minut po dobu 13 hodin. Bylo zde viditelné zatáčení kořenových vlásků kolem bakterií (žlutá šipka). Po 5 hodinách od začátku snímání však kořenové vlásky přestaly růst, proto je zobrazeno pouze prvních 7 hodin od počátku snímání. Příčinou zastavení růstu kořenových vlásků byl pravděpodobně stres rostliny z nadměrného osvětlení průchozím světlem a světlem pro excitaci mRFP bakterií.

Další série snímků na Obr. 13 (Video 2) ukazuje kořenové vlásky *M. sativa* kultivaru Europe třetí den po inokulaci suspenzí *S. meliloti* s produkcí GFP. Pro snímání průchozího světla byl použit nižší expoziční čas 7 ms, pro emisi GFP také nižší expoziční čas 500 ms. Snímání probíhalo každých 30 minut po dobu 13 hodin, na snímcích jsou zobrazena stádia každou hodinu. Kratší délky expozičních časů neměly negativní vliv na růst a vitalitu rostliny, kořenové vlásky rostly po celou dobu snímání. Bylo zde viditelné zatačení kořenových vlásků kolem bakterií (žlutá šipka).



Obr. 12: Časoběrná série snímků kořenových vlásků *M. sativa* kultivaru Europe v interakci se *S. meliloti* mRFP druhý den po inokulaci bakteriální suspenzí. Měřítka je 50 μm .



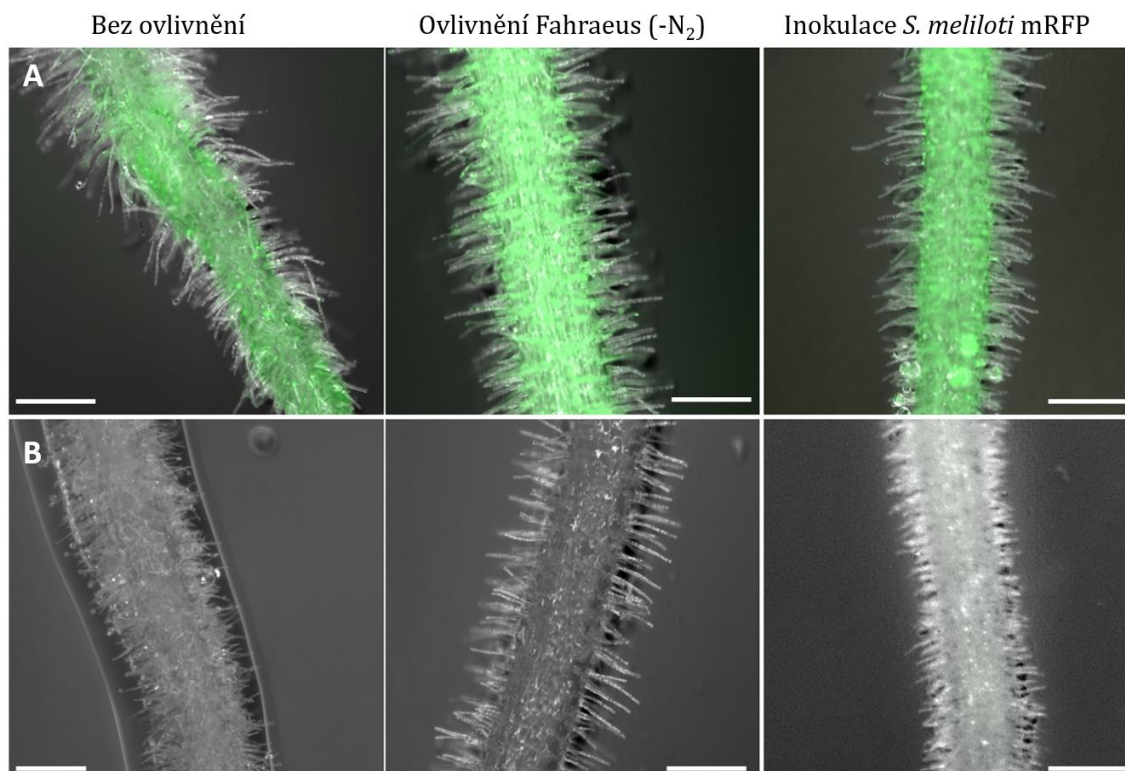
Obr. 13: Časoběrná série snímků kořenových vlásků *M. sativa* kultivaru Europe v interakci se *S. meliloti* GFP třetí den po inokulaci bakteriální suspenzí. Měřítka je 20 μm

4.4 Pozorování procesu symbiomy u kontrolních a transgenních rostlin *M. sativa* s rhizobakteriemi *S. meliloti*

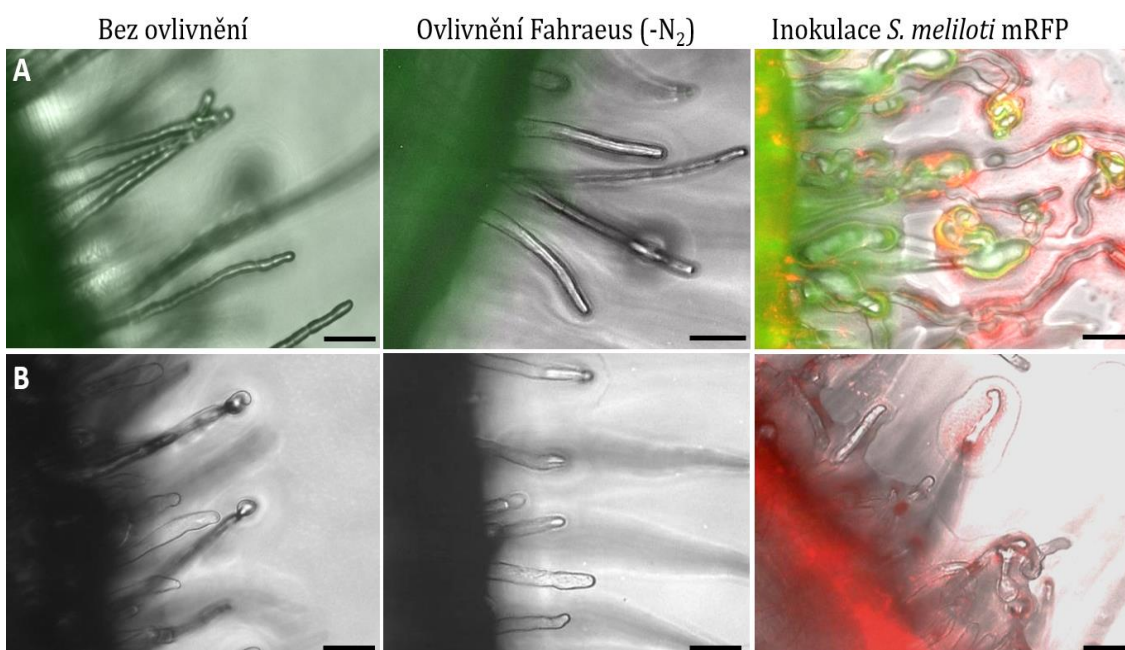
Jednou z hlavních částí práce bylo porovnání růstových parametrů *M. sativa* kontrolní a transgenní linie a analýza symbiotických procesů mezi těmito rostlinami a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti*. Ke studiu symbiotických interakcí mezi kořeny *M. sativa* a *S. meliloti* byly využity 14 dní staré rostliny *M. sativa* kontrolní linie RSY a transgenní linie ABD2-GFP. K porovnání růstu a vývojových změn kořene a také morfologie kořenových vlásků byly rostliny sledovány ve třech experimentálních variantách. V prvním případě rostliny rostly nijak neovlivněné pouze na pevném Farhaeus médiu bez dusíku: V druhém případě byly ošetřeny 2 ml čistého tekutého Farhaeus média bez dusíku. Třetí část rostlin byla inokulována suspenzí bakterií *S. meliloti* produkujících mRFP.

V první den experimentu bylo nutné ověřit, zda mají kořeny rostliny dobře vyvinuté kořenové vlásy, a zda není mezi liniemi i jednotlivými rostlinami rozdíl v morfologii vlásků. Na Obr. 14 je přehled obou pozorovaných linií ve třech růstových podmínkách. Kořenové vlásy vykazovaly ve všech případech dobrý vývoj, rostliny tedy byly vhodné k pozorování.

Změny v růstu a morfologii kořenových vlásků u rostlin bylo možné pozorovat už třetí den po inokulaci suspenzí *S. meliloti* mRFP. Na kořenových vláscích kontrolní i transgenní linie, které nebyly ovlivněny, jakož i na vláscích rostlin ošetřených tekutým Fahraeus médiem bez dusíku, nebyly zaznamenány žádné změny v růstu ani morfologii (Obr. 15). Avšak kořenové vlásy rostlin, které byly inokulovány rhizobakteriální suspenzí, změnilo vlivem působení Nod faktorů tvar a vykazovaly typická zakroucení: Došlo tedy ke změnám v cytoskeletu, které narušily apikální růst vlásků (Obr. 15, inokulace *S. meliloti* mRFP).



Obr. 14: Kořenové vlásky rostlin *M. sativa* v různých podmínkách růstu první den experimentu. A) Transgenní linie ABD2-GFP, B) kontrolní linie RSY. Měřítka je 500 μ m.

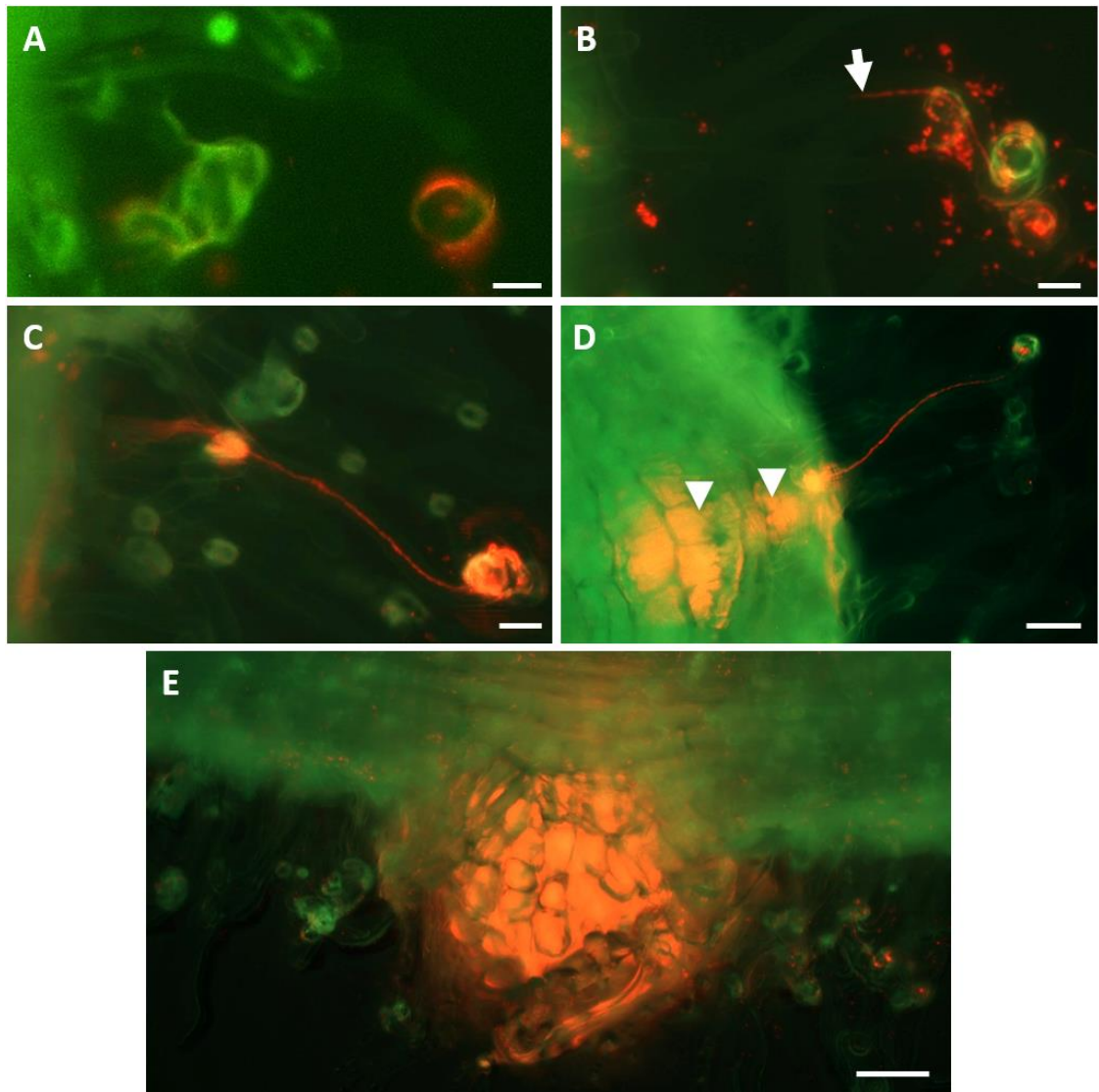


Obr. 15: Detail kořenů *M. sativa* s kořenovými vlásky po 3 dnech od začátku experimentu. A) Transgenní linie ABD2-GFP, B) kontrolní linie RSY. Měřítka je 50 μ m. Zelený signál představuje ABD2-GFP, červený signál představuje *S. meliloti* mRFP.

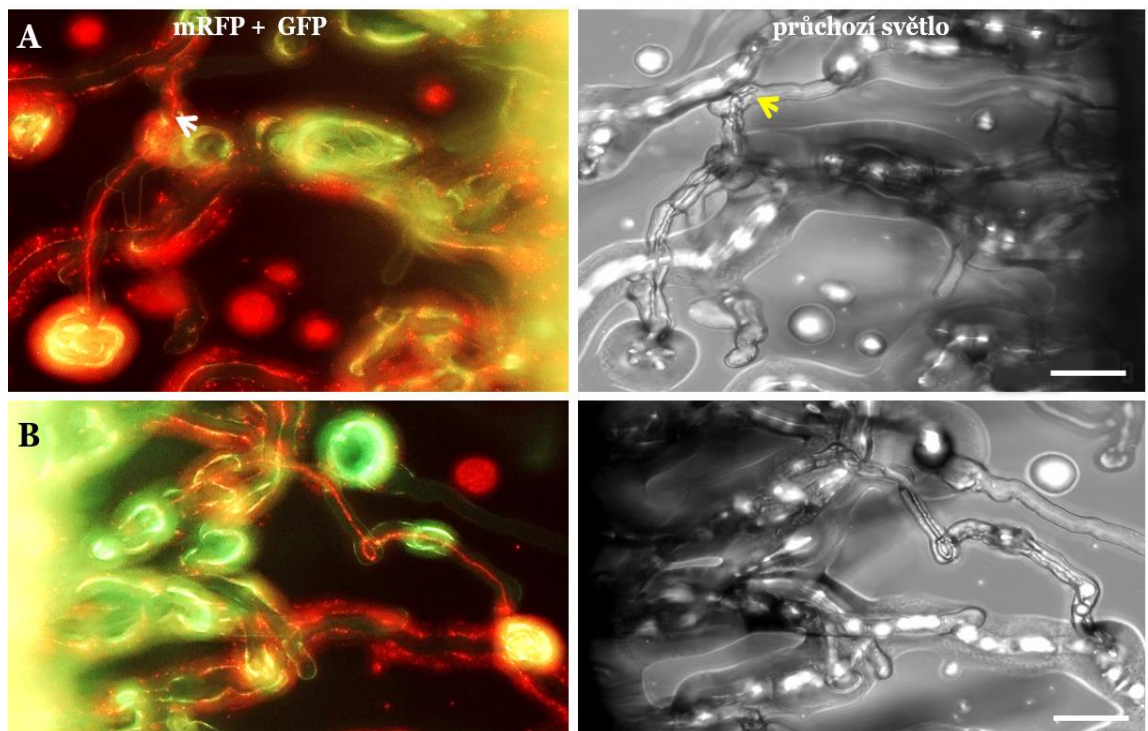
U obou linií, kontrolní i transgenní, byl průběh symbiotického procesu pozorován 1., 3., 5., 7., 9., 14. a 21. den od začátku experimentu. Průběh symbiotických interakcí je zde prezentován pouze na linii ABD2-GFP z důvodu přítomnosti fluorescenčního signálu rostliny. U kontrolní linie byl časový postup tvorby infekčních vláken a kořenových hlízek stejný. Snímky byly pořízeny epifluorescenčním mikroskopem (Axio Imager M2, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012) a epifluorescenčním mikroskopem se systémem Apotom (Apotome.2, ZEISS).

Jak již bylo zmíněno, první reakce kořenových vlásků se u rostlin objevily zhruba třetí den po inokulaci rhizobiální kulturou (Obr. 16A). Během dalších dvou dnů již bylo možné pozorovat v kořenových vláscích první stádia tvorby infekčních vláken, která se prodlužovala spolu s dělicími se bakteriemi *S. meliloti* mRFP (Obr. 16B, 17A šipka ukazuje konec infekčního vlákna). První kompletní infekční vlákna byla pozorována pátý den od inokulace, jak je vidět na Obr. 16C a 17B. Při snímání v průchozím světle bylo možné sledovat membránu obklopující infekční vlákno vyplněné dělicími se rhizobakteriemi (šipky na Obr. 17). V této fázi některá infekční vlákna ukončila vývoj. Část z nich pokračovala v růstu a při dosažení kortexu kořene došlo k uvolnění bakterií *S. meliloti* do dělicích se kortikálních buněk hlízkového primordia (Obr. 16D). Uvolnění bakterií bylo pozorovatelné jako červený signál v kořeni rostliny, jak ukazují hlavičky šipek na Obr. 16D.

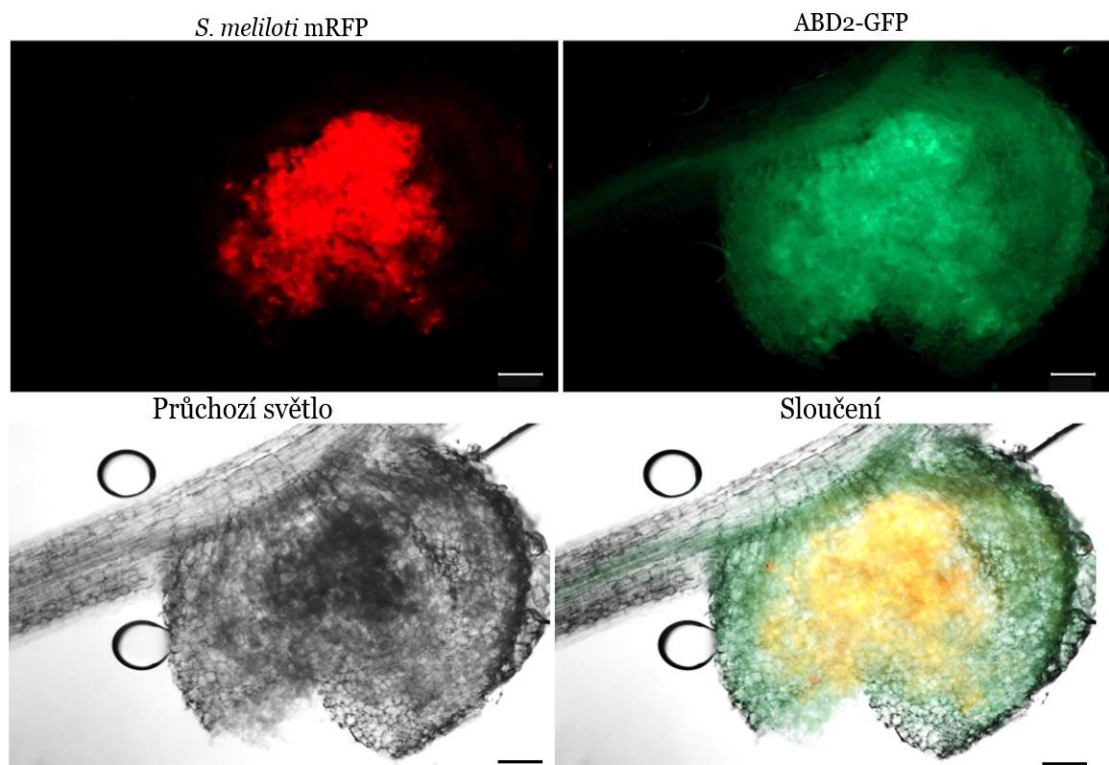
Po týdnu od inokulace bylo možné na kořenech rostlin kontrolní i transgenní linie pozorovat vytvořené kořenové hlízky. Vzhledem k tomu, že ke studiu symbiotického procesu byly použity rhizobakterie produkující mRFP, bylo možné jejich červený signál pozorovat uvnitř hlízek ve fixační zóně (Obr. 16E). Na podélném řezu hlízky po 14 dnech od inokulace je možné vidět červený signál rhizobakterií ve střední části hlízky i zelený signál ABD2-GFP v hlízce a v cévních svazcích (Obr. 18).



Obr. 16: Detail kořenových vlásků *M. sativa* transgenní linie ABD2-GFP v interakci se *S. meliloti* mRFP. A) Zakroucení kořenového vlásku po zachycení rhizobakterií, B) neúplné infekční vlákno, C) úplné infekční vlákno. D) Infekční vlákno, které dosáhlo kortexu kořene a u kterého došlo k uvolnění rhizobakterií. Měřítko je 20 μm . E) detail fluorescenčního signálu kořenové hlízky. Měřítko je 100 μm . Zelený signál představuje ABD2-GFP, červený signál představuje *S. meliloti* mRFP.



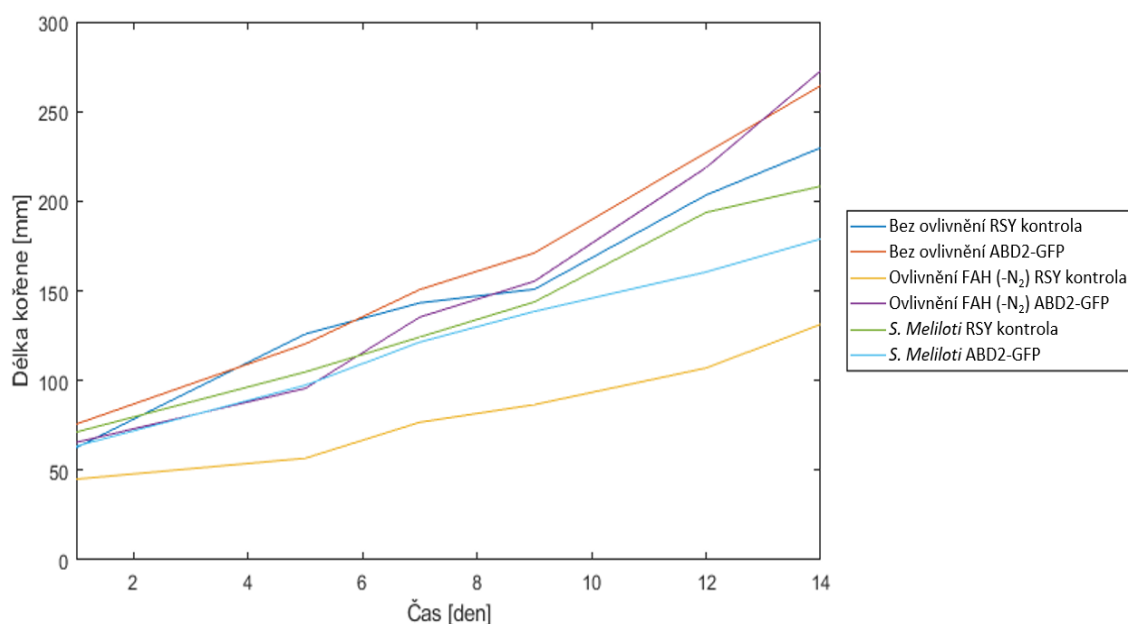
Obr. 17: Detail kořenových vlásků *M. sativa* transgenní linie FABD2-GFP s infekčním vláknem tvořeným *S. meliloti* mRFP. A) Neúplné infekční vlákno B) úplné infekční vlákno. Měřítka je 50 μm . Zelený signál představuje ABD2-GFP, červený signál představuje *S. meliloti* mRFP.



Obr. 18: Kořenová hlízka kolonizovaná *S. meliloti* mRFP 21 dní po inokulaci na rostlině *M. sativa* produkující ABD2-GFP. Měřítka je 100 μm .

4.4.1 Vyhodnocení růstových parametrů rostlin *M. sativa*

U rostlin kontrolní i transgenní linie byla v daných časových bodech měřena celková délka kořenového systému a ze získaných dat sestavena růstová křivka. Růstová křivka je průměrem délek kořenových systémů rostlin ze tří opakování. Růst kořenového systému ve třech kultivačních podmínkách obou studovaných linií nevykazoval v žádném z případů výrazné změny ani odchylky. Vložený konstrukt *35:ABD2-GFP* tedy nemá na růst transgenní linie výraznější vliv. Pouze v případě rostlin ovlivněných tekutým Fahraeus médiem byl rozdíl v délce kořenových systémů mezi liniemi výraznější (Obr. 19), což bylo částečně způsobeno rozdílnými délkami kořenových systémů mezi jednotlivými rostlinami.

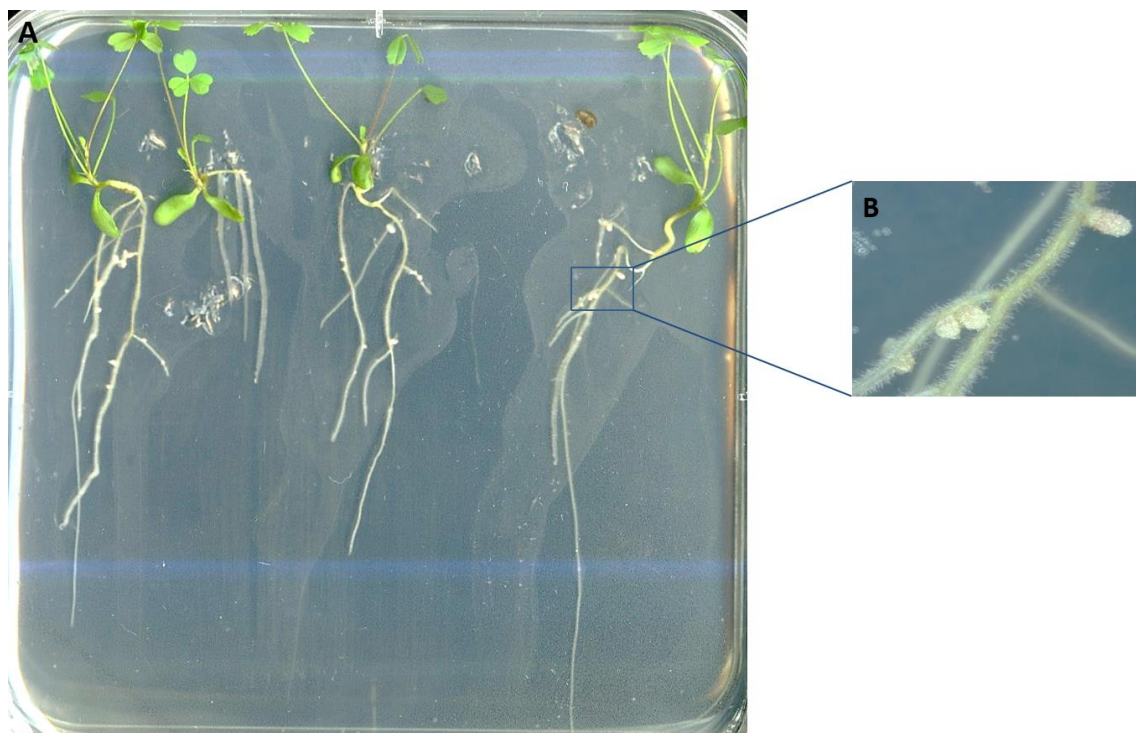


Obr. 19: Růstová křivka kořenů rostlin *M. sativa* kontrolní linie a transgenní linie **ABD2-GFP** v podmínkách bez ovlivnění, při ovlivnění tekutým Fahraeus médiem bez dusíku a po inokulaci tekutou bakteriální suspenzí *S. meliloti* mRFP.

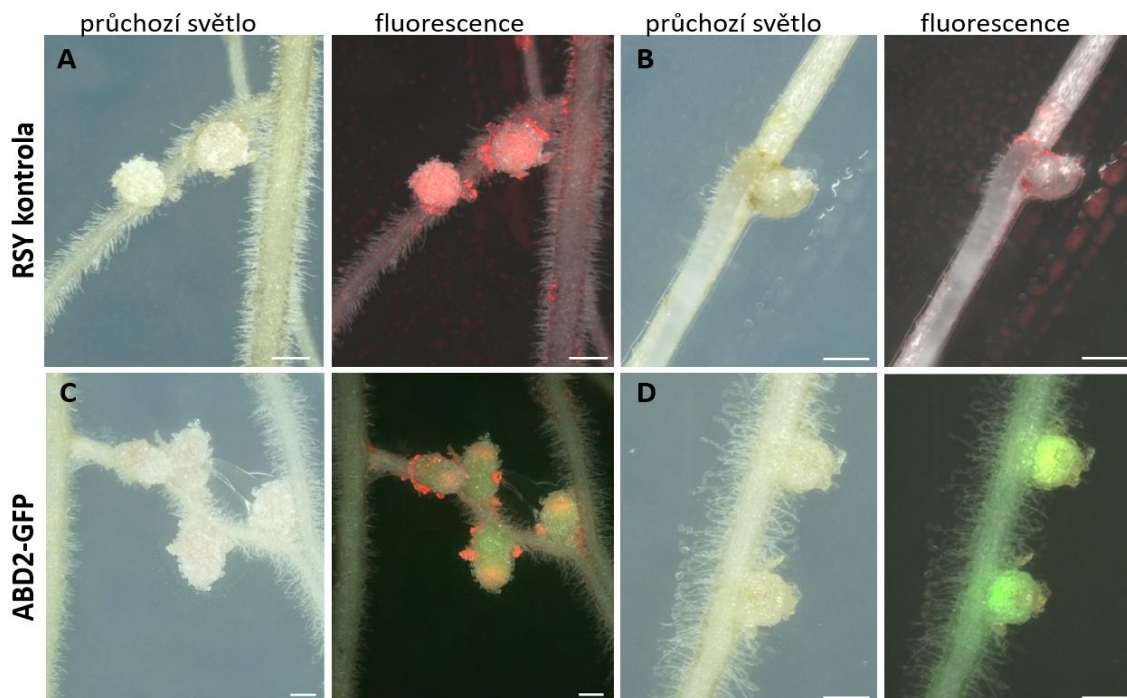
4.4.2 Porovnání tvorby kořenových hlízek u rostlin *M. sativa* mezi kontrolní a transgenní linií

Rostliny kontrolní RSY linie a transgenní ABD2-GFP linie byly vzájemně porovnány v efektivitě tvorby kořenových hlízek. Po 14 a 21 dnech od inokulace rostlin bakteriemi byly pomocí skeneru pořízeny snímky Petriho misek s rostlinami (Obr. 20A). Pomocí stereomikroskopu s kontinuálním zvětšením byly pořízeny detailní snímky kořenových hlízek (Obr. 20B). Vizually byly odlišeny živé hlízky aktivně fixující dusík od senescentních. Zatímco živé hlízky jsou bílé až bílorůžové barvy (Obr. 21A a 21C), senescentní hlízky přechází do nahnědlé barvy (Obr. 21B a 21D). Díky využití fluorescenčně značených rhizobakterií bylo možné prokázat, že u senescentních kořenových hlízek dochází ke ztrátě fluorescence.

Hlízky byly počítány na jednotlivých rostlinách a poté byl jejich počet zprůměrován pro celou linii. Jak je vidět na grafu v Obr. 22, po 14 dnech od inokulace se průměrný počet živých i senescentních hlízek u obou linií nelišil. Po 21 dnech došlo k nárůstu jak živých, tak i senescentních hlízek. Mezi liniemi však nebyl pozorován větší rozdíl. Na grafu jsou viditelné výrazné odchylky v počtech hlízek mezi rostlinami. Počet hlízek závisel na velikosti kořenového systému. Bylo tedy nutné přepočítat počet hlízek na celkovou velikost kořenového systému dané rostliny, jak ukazuje graf na Obr. 23. Z grafu lze vyčíst, že po 14 i 21 dnech od inokulace rhizobiální suspenzí byla četnost hlízek vyšší u transgenních rostlin. Rozdíly však nebyly statisticky významné. Potvrdila se tímto domněnka, že exprese konstruktů *35S:ABD2-GFP* pravděpodobně nemá značný vliv ani na růst, ani na tvorbu kořenových hlízek.

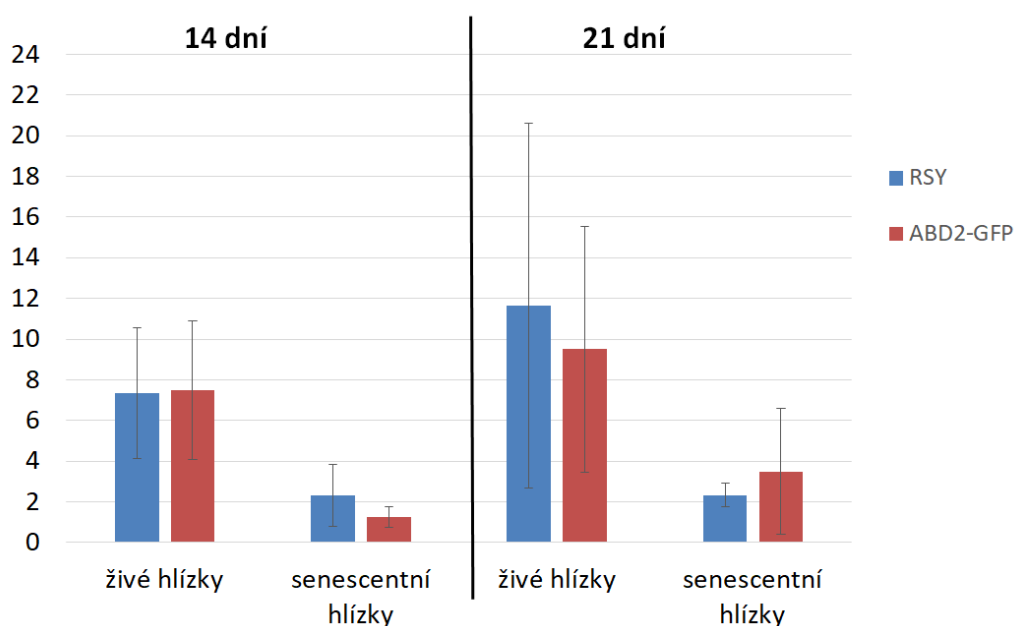


Obr 20.: Rostliny *M. sativa* na pevném Fahraeus médiu bez dusíku. A) Rostliny jsou nasnímány skenerem 14 dní po inokulaci *S. meliloti* mRFP. B) Detail kořenových hlízek na kořeni.



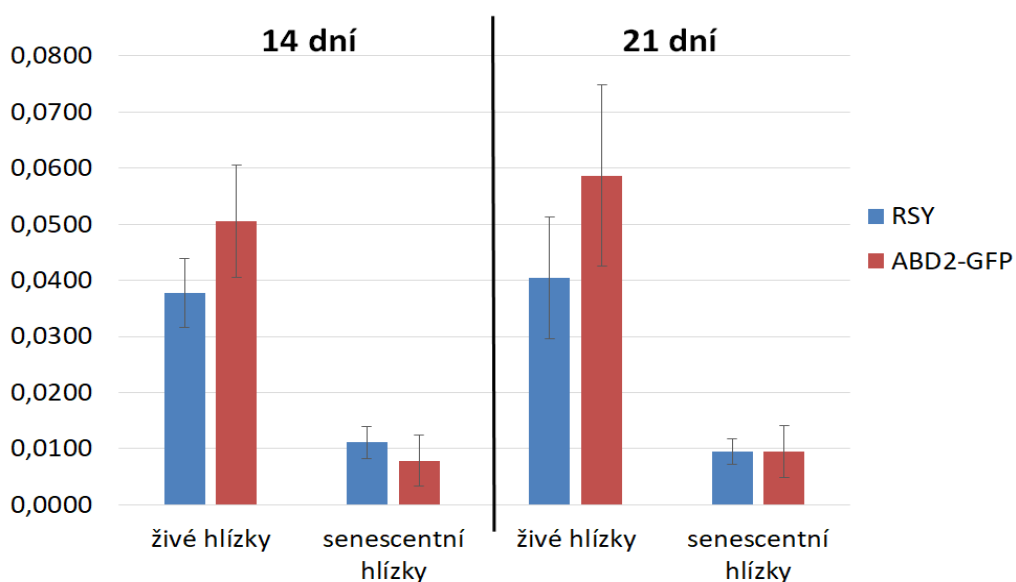
Obr. 21: Detail kořenových hlízek *M. sativa* indukovaných *S. meliloti* mRFP po 14 dnech od inokulace. A) Živé hlízky na kořeni kontrolní linie RSY, B) senescentní hlízky na kořeni kontrolní linie RSY. C) Živé hlízky na kořeni transgenní linie ABD2-GFP, D) senescentní hlízky na kořeni transgenní linie ABD2-GFP. Červený signál představuje *S. meliloti* mRFP, zelený signál představuje ABD2-GFP. Měřítka je 500 μ m.

Počet hlízek na kořenech



Obr. 22: Porovnání počtu živých a senescentních kořenových hlízek mezi kontrolní RSY linií a transgenní ABD2-GFP linií po 14 a 21 dnech od inokulace tekutou kulturou *S. meliloti* mRFP.

Počet hlízek na délku kořene



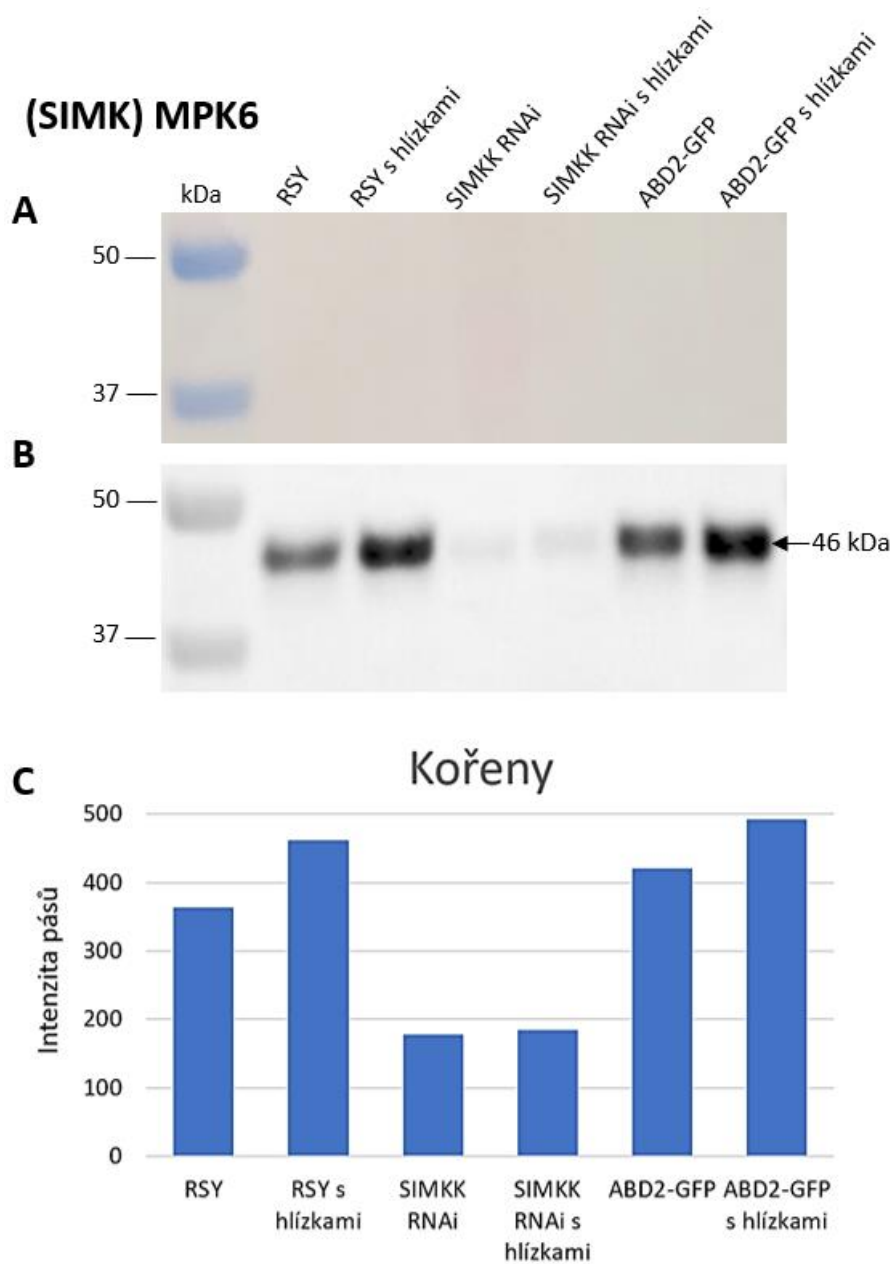
Obr. 23: Porovnání počtu živých a senescentních kořenových hlízek mezi kontrolní RSY linií a transgenní ABD2-GFP linií po 14 a 21 dnech od inokulace tekutou kulturou *S. meliloti* mRFP. Celkový počet hlízek je vztažen na délku kořenového systému jednotlivých rostlin.

4.4.3 Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v zastoupení a aktivitě MAPK v rostlinách v průběhu symbiotického procesu

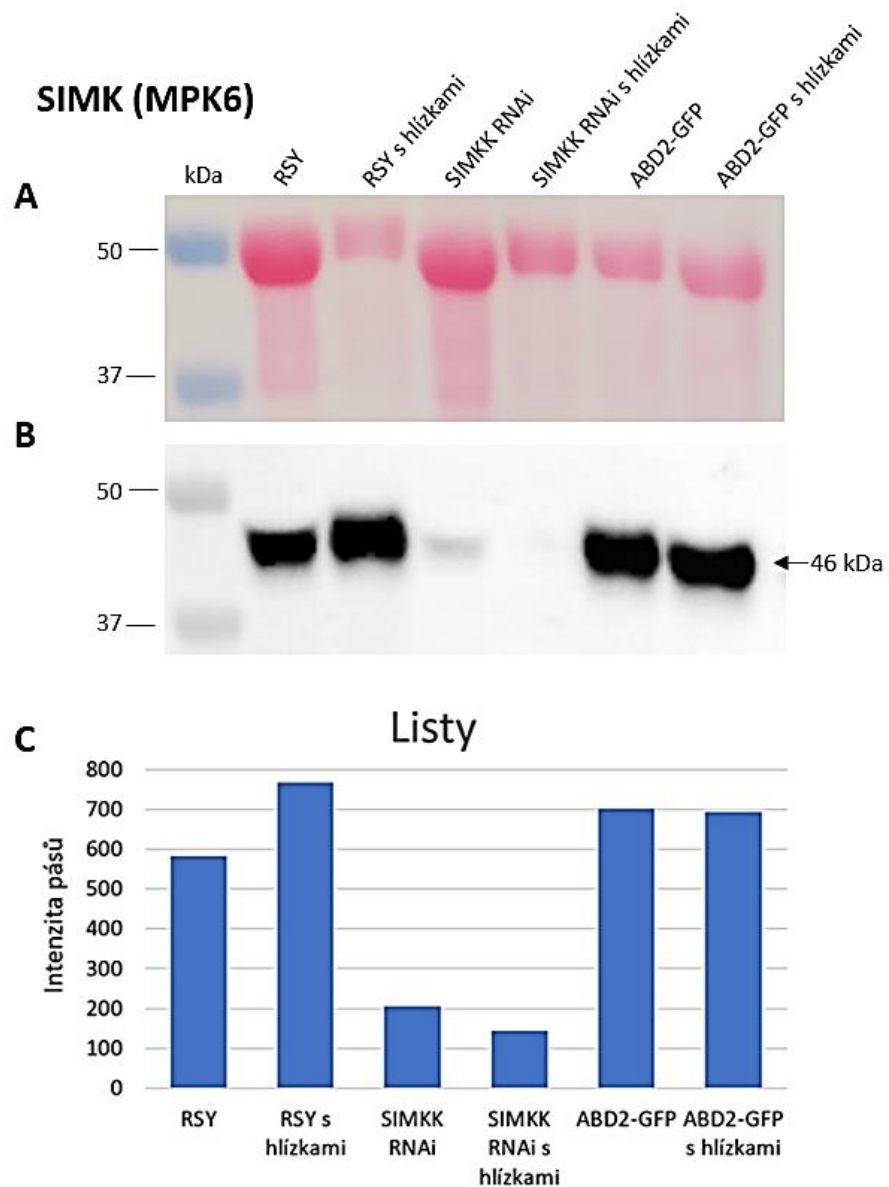
V další části experimentální práce byla provedena imunoblotová analýza pro detekci relativního množství proteinu SIMK, což je „Stress Induced MAP Kinase“ (u *Medicago sativa* specificky detekována pomocí protilátky proti MPK6) a proteinu MMK3, což je „Medicago MAP Kinase 3“. Oba tyto proteiny jsou kiny expimované v *M. sativa*, jako součást signalizační kaskády spolu se SIMKK. Tato analýza poskytla také úroveň fosforylace kinas pomocí specifické pERK protilátky, která specificky rozpoznává dvojité fosforylovaný TEY motiv MAP kinas. Přítomnost navázaných proteinů na PVDF membránu byla potvrzována po přenosu proteinů z gelu na membránu pomocí barviva Ponceau S v 5 % kyselině octové (Obr. 24A, 25A, 26A, 27A, 28A a 29A). Analýza byla provedena na rostlinách kontrolní RSY linie, na rostlinách linie s posttranskripčně potlačenou expresí proteinu SIMKK (SIMKK RNAi) a na transgenních rostlinách produkujících ABD2-GFP. První část rostlin byla kultivována v kontrolních podmínkách a druhá část rostlin byla inokulována rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* divokého typu ($OD_{600} = 0,5$). Rostliny byly posbírány a analyzovány 15 dní od začátku experimentu, tedy i 15 dní po inokulaci kulturou *S. meliloti*.

Množství SIMK (detekováno pomocí MPK6 protilátky) o molekulové hmotnosti 46 kDa v kořenech se zvýšilo u rostlin, u nichž se tvořily hlízky (Obr. 24). Přítomnost rhizobiálních bakterií a následné symbiotické interakce končící tvorbou kořenových hlízek mají tedy vliv na zvýšení množství SIMK. U rostlin SIMKK RNAi však bylo detekováno viditelně snížené množství SIMK. U těchto rostlin je potlačená exprese SIMKK. Důsledkem toho je snížené množství SIMK v těchto rostlinách (Bekešová *et al.*, 2015). Snížené množství SIMK bylo pozorováno i u listů rostlin SIMKK RNAi (Obr. 25).

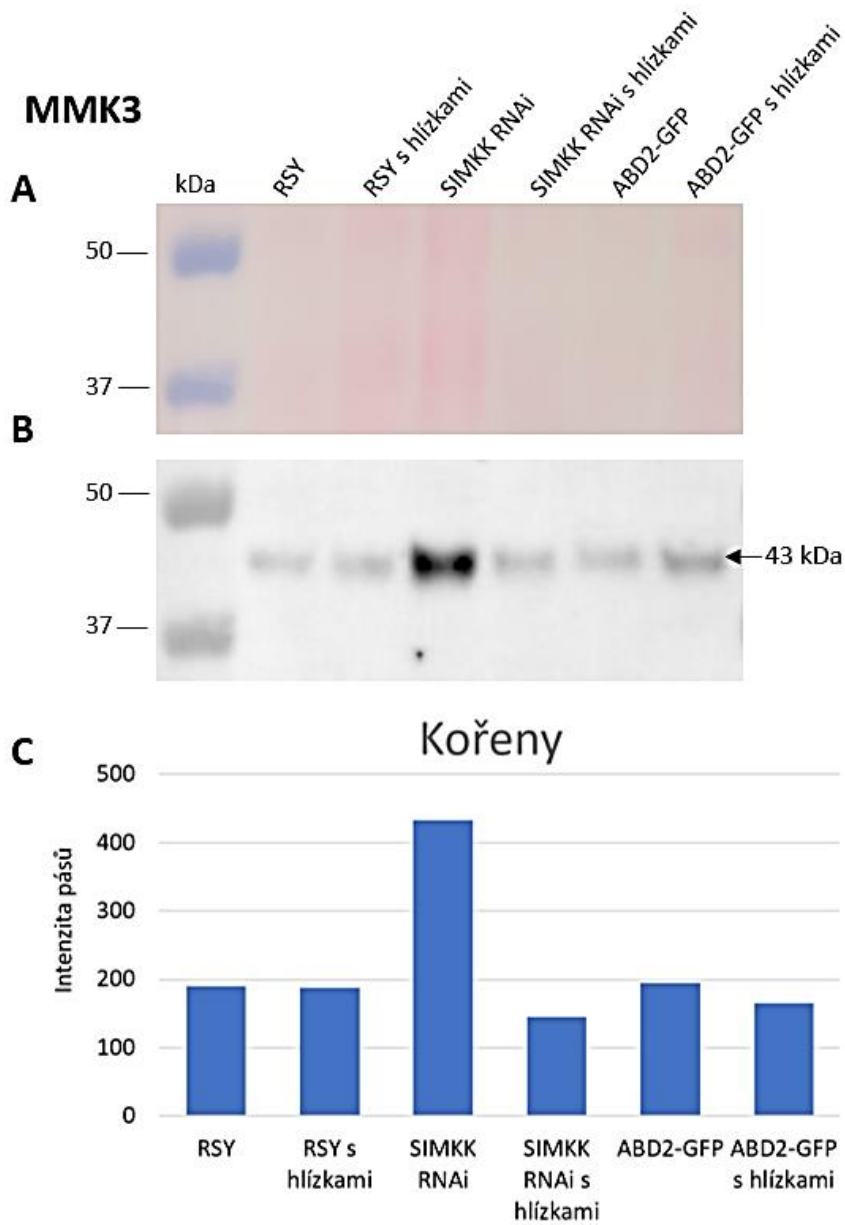
Při imunodetekci proteinu MMK3 o molekulové hmotnosti 43 kDa nebyl zjištěn rozdíl v jeho množství u jednotlivých vzorků jak u kořenů, tak u listů (Obr. 26). Graf intenzity pásů sice v případě vzorků z kořenů ukazuje na vyšší množství proteinu MMK3 u rostliny SIMKK RNAi v kontrolních podmínkách, toto množství však koreluje s vyšším množstvím přeneseného vzorku na membránu, jak ukazuje Obr. 26A. V případě vzorků listů bylo množství proteinu MMK3 velmi podobné u všech vzorků (Obr. 27) a opět vyšší hodnoty intenzity na Obr. 27C korelují s množstvím proteinů přenesených na membránu (Obr. 27A).



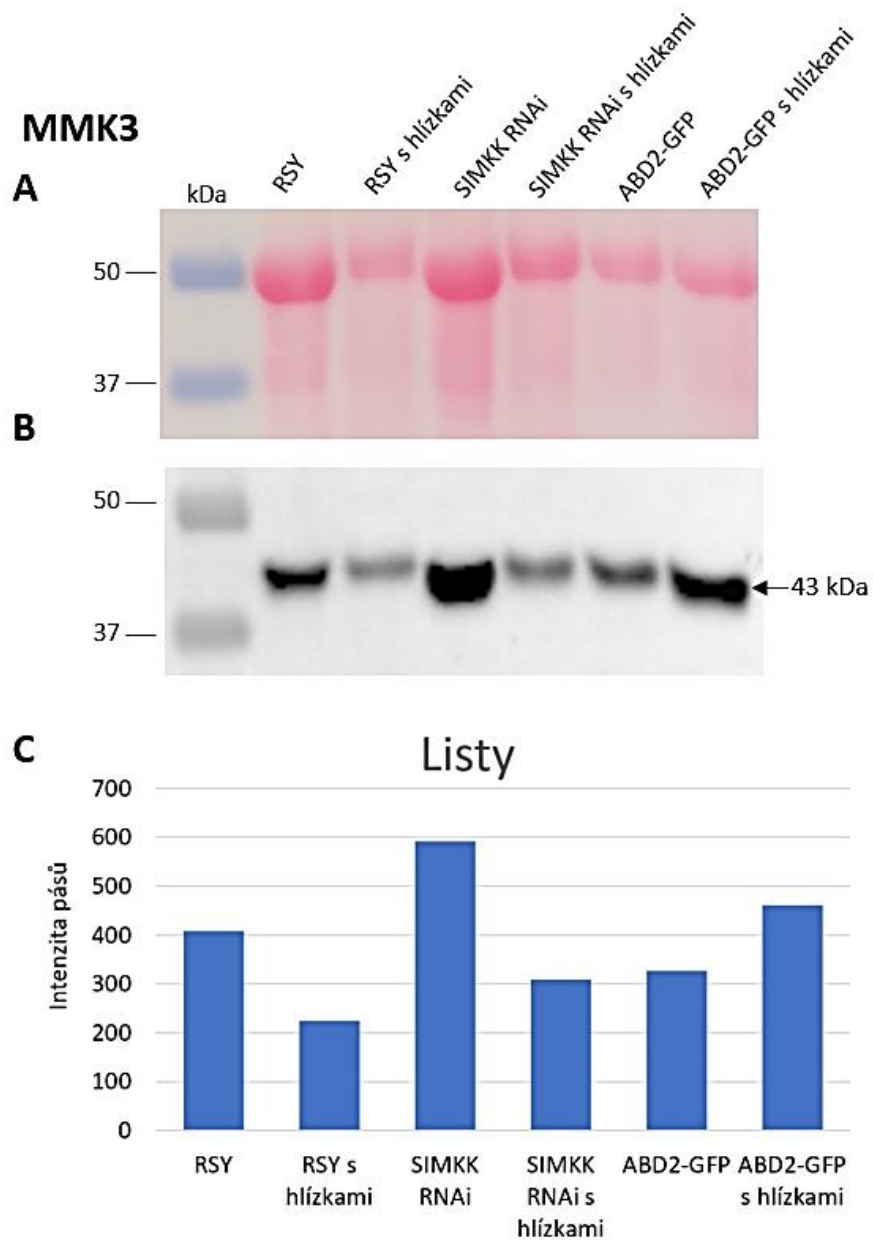
Obr. 24: Detekce obsahu proteinů SIMK ze vzorků kořenů rostlin *M. sativa* v kontrolních podmínkách a s kořenovými hlízkami. A) PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové. B) Imunodetekce SIMK proteinu o velikosti 46 kDa. C) Graf zobrazující intenzity pásů pro jednotlivé rostlinné linie v kontrolních podmínkách a s hlízkami.



Obr. 25: Detekce obsahu proteinů SIMK ze vzorků listů rostlin *M. sativa* v kontrolních podmínkách a s kořenovými hlízkami. A) PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové. B) Imunodetekce SIMK proteinu o velikosti 46 kDa. C) Graf zobrazující intenzity pásů pro jednotlivé rostlinné linie v kontrolních podmínkách a s hlízkami.

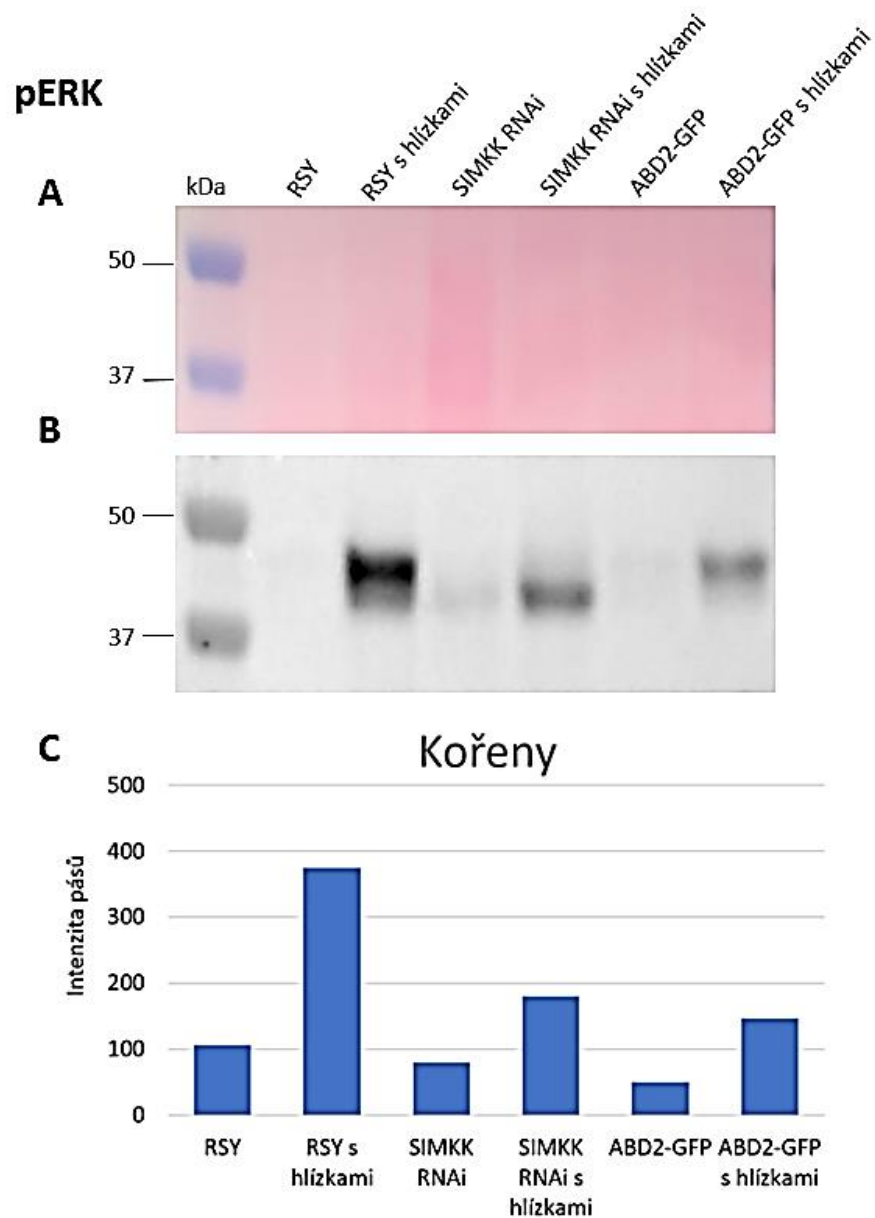


Obr. 26: Detekce obsahu proteinů MMK3 ze vzorků kořenů rostlin *M. sativa* v kontrolních podmínkách a s kořenovými hlízkami. A) PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové. B) Imunodetekce MMK3 proteinu o velikosti 43 kDa. C) Graf zobrazující intenzity pásů pro jednotlivé rostlinné linie v kontrolních podmínkách a s hlízkami.

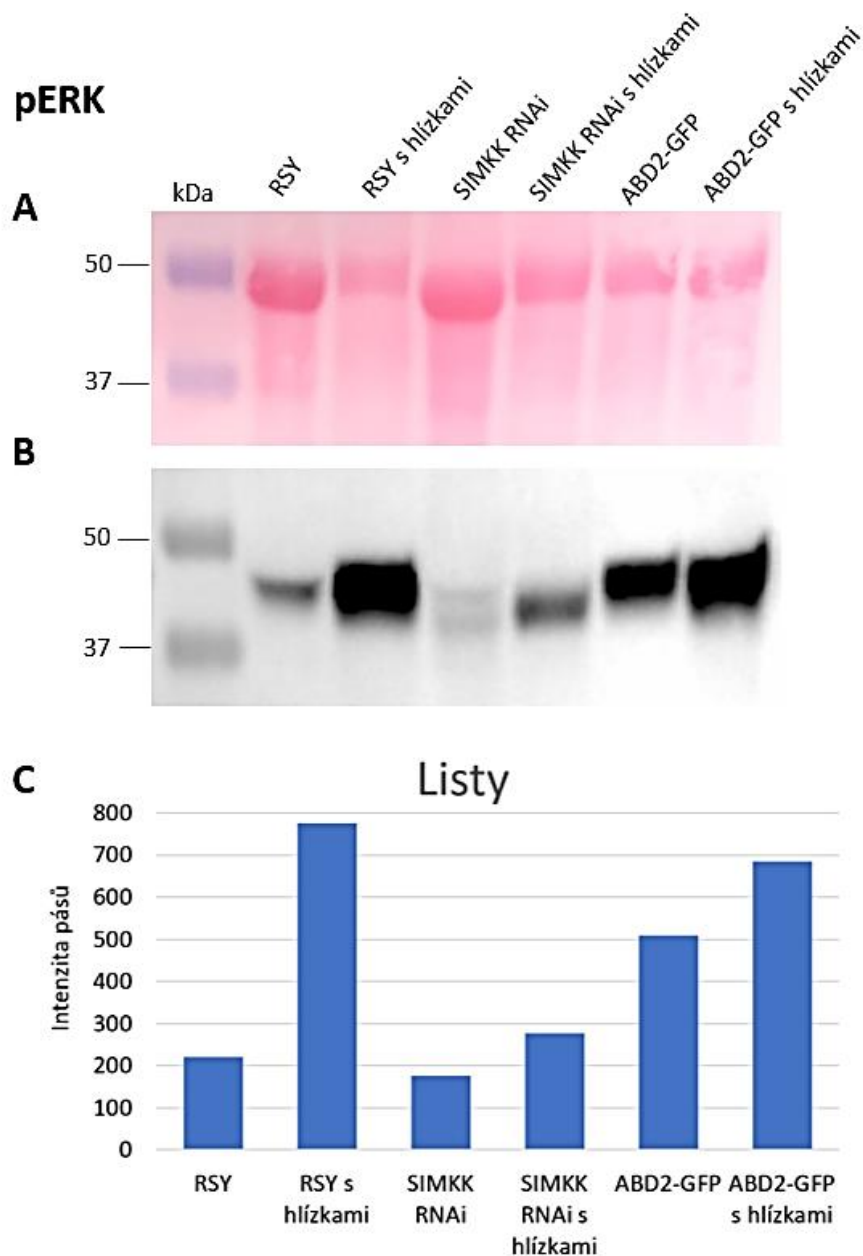


Obr. 27: Detekce obsahu proteinů MMK3 ze vzorků listů rostlin *M. sativa* v kontrolních podmínkách a s kořenovými hlízkami. A) PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové. B) Imunodetekce MMK3 proteinu o velikosti 43 kDa. C) Graf zobrazující intenzity pásů pro jednotlivé rostlinné linie v kontrolních podmínkách a s hlízkami.

Při imunoblotové analýze aktivace kinas při tvorbě hlízek na rostlinách *M. sativa* bylo zjištěno, že ve vzorcích kořenů došlo u všech linií k aktivaci kinas právě díky interakcím se rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti* a následné tvorbě hlízek po 15 dnech od inokulace bakteriální suspenzí. Tato aktivace kinas byla nejsilnější u kontrolní RSY linie (Obr. 28B a 28C). U vzorků listů byla taktéž pozorována aktivace kinas u rostlin během procesu tvorby hlízek. Nejslabší aktivaci kinas při tvorbě hlízek vykazovaly rostliny SIMKK RNAi linie (Obr. 29B a 29C).



Obr. 28: Detekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK) ze vzorků kořenů rostlin *M. sativa* v kontrolních podmínkách a s kořenovými hlízkami. A) PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové. B) Imunodetekce pERK protilátky, a tedy i aktivace kinas. C) Graf zobrazující intenzity pásů pro jednotlivé rostlinné linie v kontrolních podmínkách a s hlízkami.

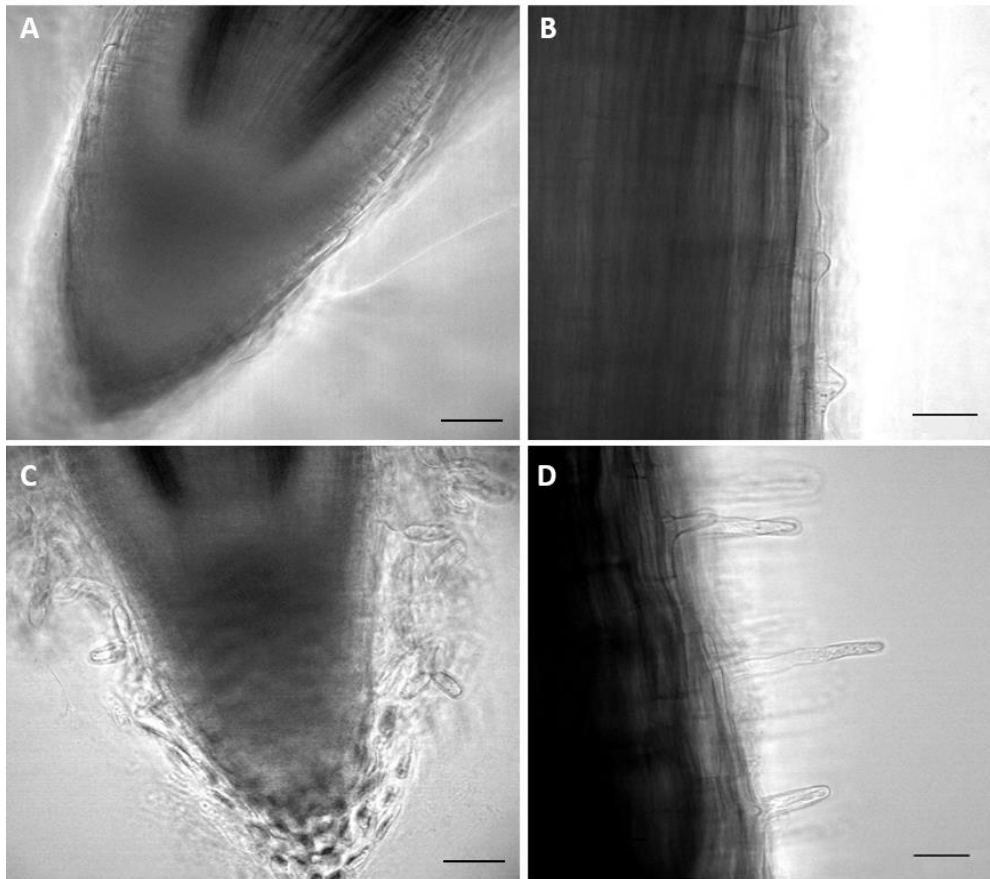


Obr. 29: Detekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK) ze vzorků listů rostlin *M. sativa* v kontrolních podmínkách a s kořenovými hlízkami. A) PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5 % kyselině octové. B) Imunodetekce pERK protilátky, a tedy i aktivace kinas. C) Graf zobrazující intenzity pásů pro jednotlivé rostlinné linie v kontrolních podmínkách a s hlízkami.

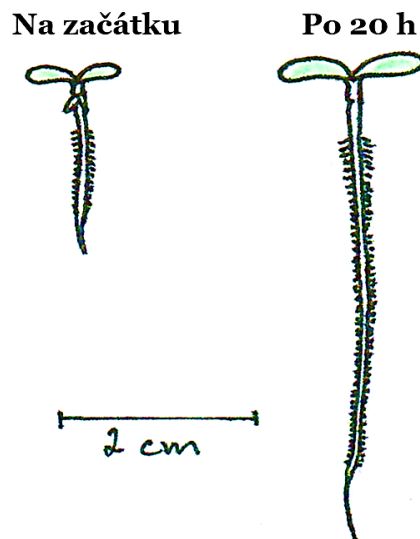
4.5 Růst kořene *M. sativa* při snímání Light-sheet mikroskopem

Další důležitou částí diplomové práce bylo pozorování kořenů rostlin *M. sativa* a jejich interakce s rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti* v reálném čase pomocí Light-sheet mikroskopu. Ke snímání Light-sheet mikroskopem byly použity 2-4 dny staré semenáčky kultivované ze semen na pevném MS médiu, nebo pevném Farhaeus médiu bez dusíku. Také byly použity rostlinky indukované somatickou embryogenezí, které byly kultivované na pevném MS médiu, nebo pevném Farhaeus médiu bez dusíku. Mikroskopická dokumentace byla zaměřena na snímání růstu kořene a kořenových vlásků. U všech pozorovaných rostlin byl během snímání úspěšně sledován jak růst kořene, tak růst kořenových vlásků (Obr. 30). Na studovaných kořenech se tvořily kořenové vlásky (Obr. 30B a 30D), což je důležité pro další použití této metody ke studiu symbiózy kořenů *Medicago* s rhizogeními bakteriemi.

Tekuté médium v pozorovací komůrce dodávalo rostlinám potřebné živiny a otevřený systém v mikroskopické komůrce jim poskytoval dostatečný přísun kyslíku. Pro dlouhodobé snímání po dobu několika hodin a dnů byla nutná výměna tekutého média v komůrce za nové a sterilní médium. Tímto způsobem možné simulovat při snímání podmínky, které jsou co nejvíce podobné těm přirozeným. Díky všem těmto optimalizacím bylo možné neinvazivně sledovat růst kořene po dobu 12 hodin a déle. Schéma délky kořene rostliny na počátku snímání a po 20 hodinách snímání je zobrazeno na Obr. 31.

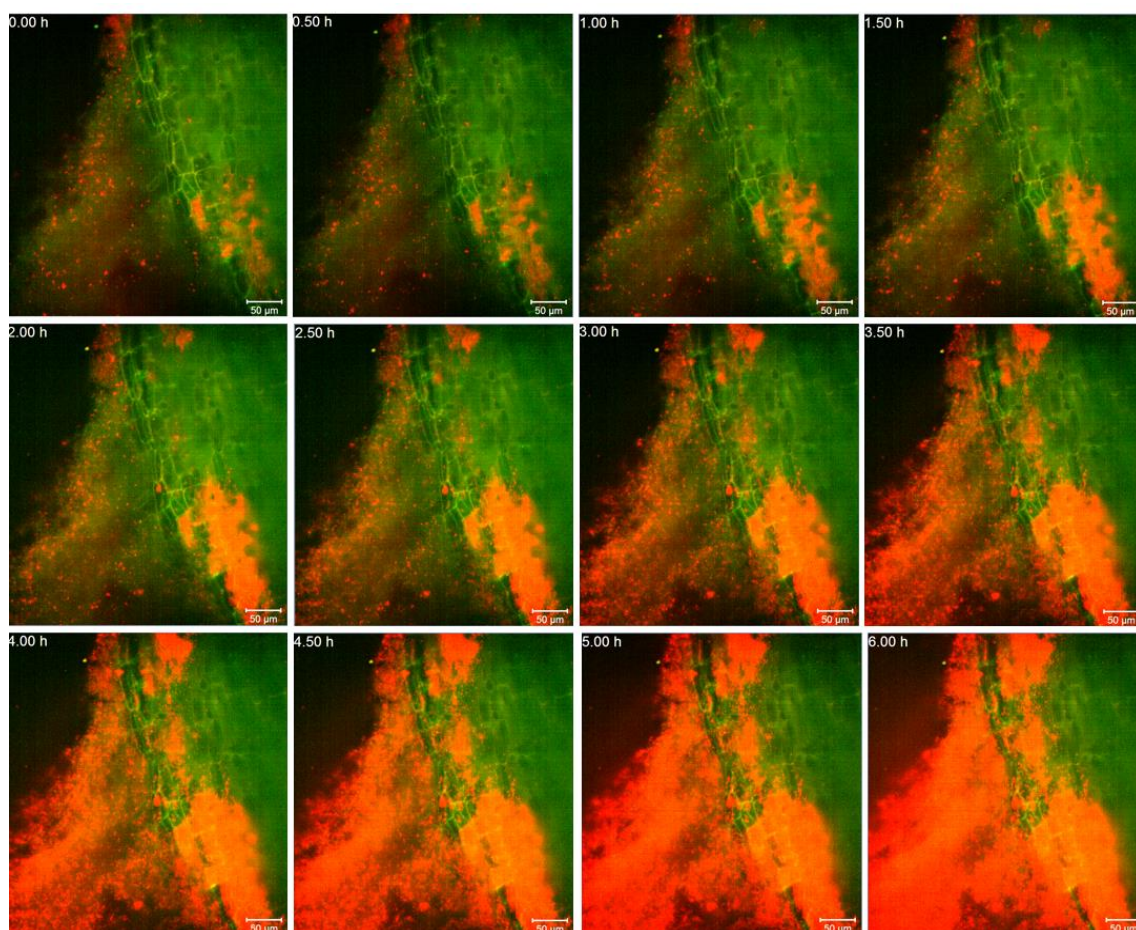


Obr. 30: Přehled kořene *M. sativa* v Light-sheet mikroskopu na počátku snímání a po 20 hodinách snímání. A) Kořenová špička před snímáním, B) kořen s ranými kořenovými vlásky před snímáním, C) kořenová špička po 20 hodinách snímání, D) tvorba kořenových vlásků po 20 hodinách snímání. Měřítko je 50 μm .



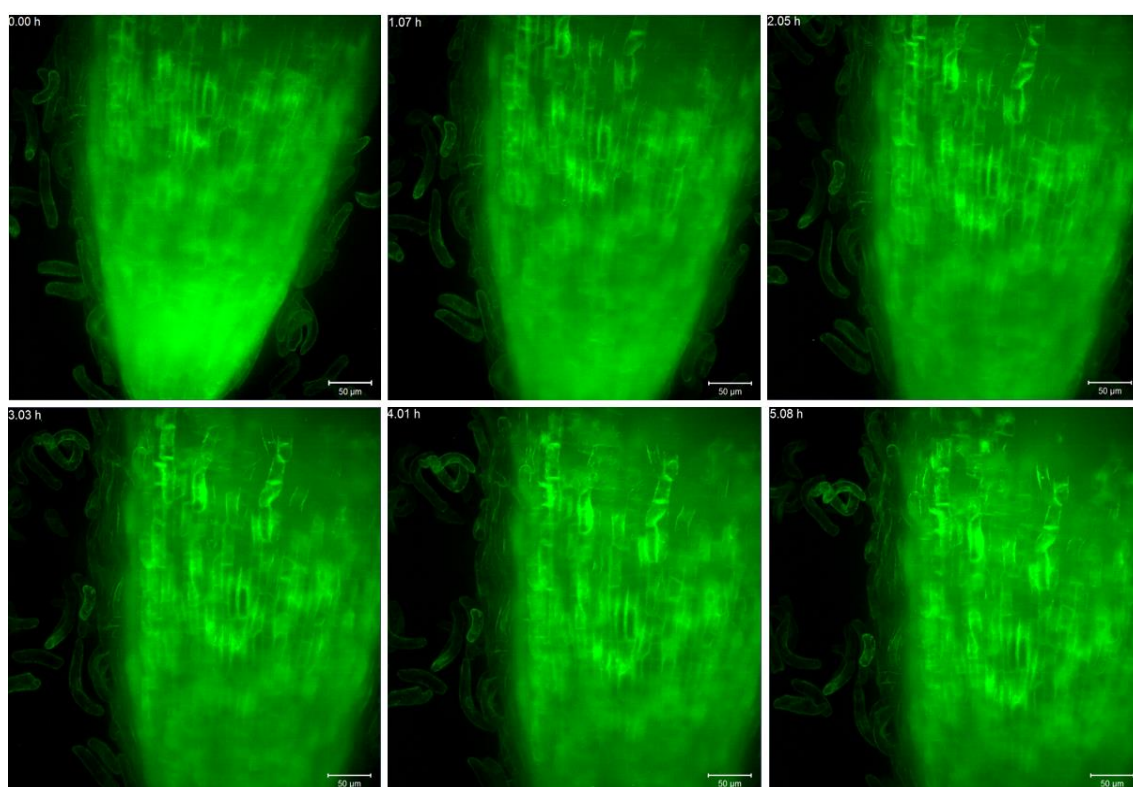
Obr. 31: Náčrt délky kořene *M. sativa* v Light-sheet mikroskopu na počátku snímání a po 20 hodinách snímání.

První pokusy o snímání rostlin *M. sativa* a jejich interakce s rhizobakteriemi *S. meliloti* v Light-sheet mikroskopu zahrnovaly přípravu, kdy rostlina, již předem inokulována bakteriální suspenzí *S. meliloti* mRFP ($OD_{600} = 0,05$), byla vložena s agarosou do FEP trubičky. Na sérii snímků na Obr. 32 (Video 3) je vidět časový průběh snímání kořene *M. sativa* po dobu 6 hodin. Při tomto snímání nebyl využit perfúzní systém výměny tekutého média v pozorovací komůrce. Vzhledem k tomuto omezení a díky tomu, že kořen rostliny i s interagujícími rhizobakteriemi byly „uzavřeny“ v agarose v FEP trubičce, došlo k silnému přemnožení rhizobakterií v okolí kořene, což znemožnilo další pozorování. K velmi silnému přemnožení rhizobakterií došlo asi po 3 hodinách od začátku snímání. Pozorování delší než 12 hodin bylo také kvůli nedostatku živin pro rostlinu stresující.

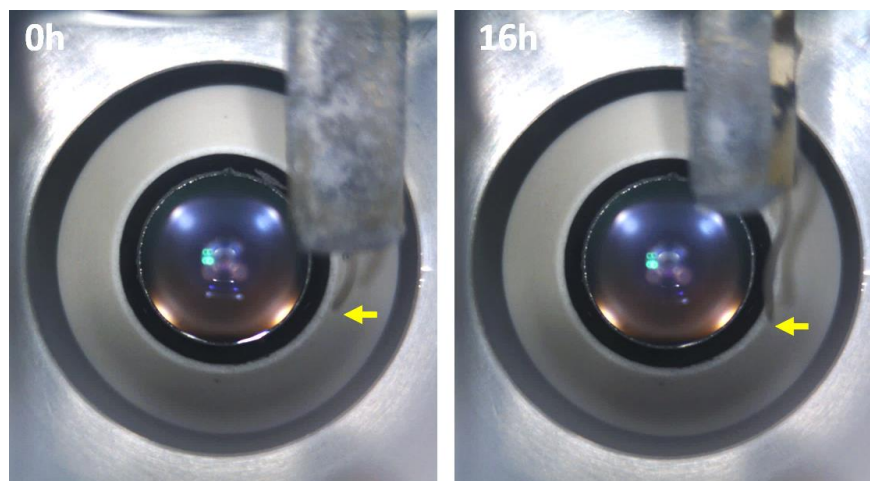


Obr. 32: Časový průběh snímání kořene *M. sativa* transgené line *FABD2-GFP* v interakci s rhizobakteriemi *S. meliloti* mRFP po dobu 6 hodin. Snímky jsou pořízeny každých 30 minut po dobu 6 hodin. Měřítka je 50 µm.

Vzhledem k tomu, že růst kořene rostliny *M. sativa* v FEP tubičce omezuje použití rhizobakterií *S. meliloti* a následné pozorování interakci mezi kořenovými vlákny rostliny s bakteriemi, bylo nutné optimalizovat přípravu rostliny k pozorování v Light-sheet mikroskopu a také upravit a vylepšit podmínky snímání. Obr. 33 ukazuje růst kořenové špičky rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP po dobu 6 hodin. Tato rostlina byla indukována procesem somatické embryogeneze a před snímáním byla kultivována na pevném MS médiu. Poté byla připravena ke snímání připevněním na plastový držák pomocí agarosy s nízkým bodem tuhnutí. Jako kultivační médium v pozorovací komůrce bylo použito tekuté MS médium. Toto médium obsahuje velké množství sacharózy, proto bylo nutné použít perfúzní systém pro výměnu média. Kořenová špička v komůrce byla snímána po dobu 16 hodin. Podmínky růstu byly optimální, což se prokázalo tím, že kořenová špička rostla po celou dobu snímání bez zjevného poškození uspořádání aktinového cytoskeletu. Rozdíl mezi délkou kořene na začátku snímání a po 16 hodinách je znázorněn na Obr. 34. Šipky ukazují na špičku kořene.

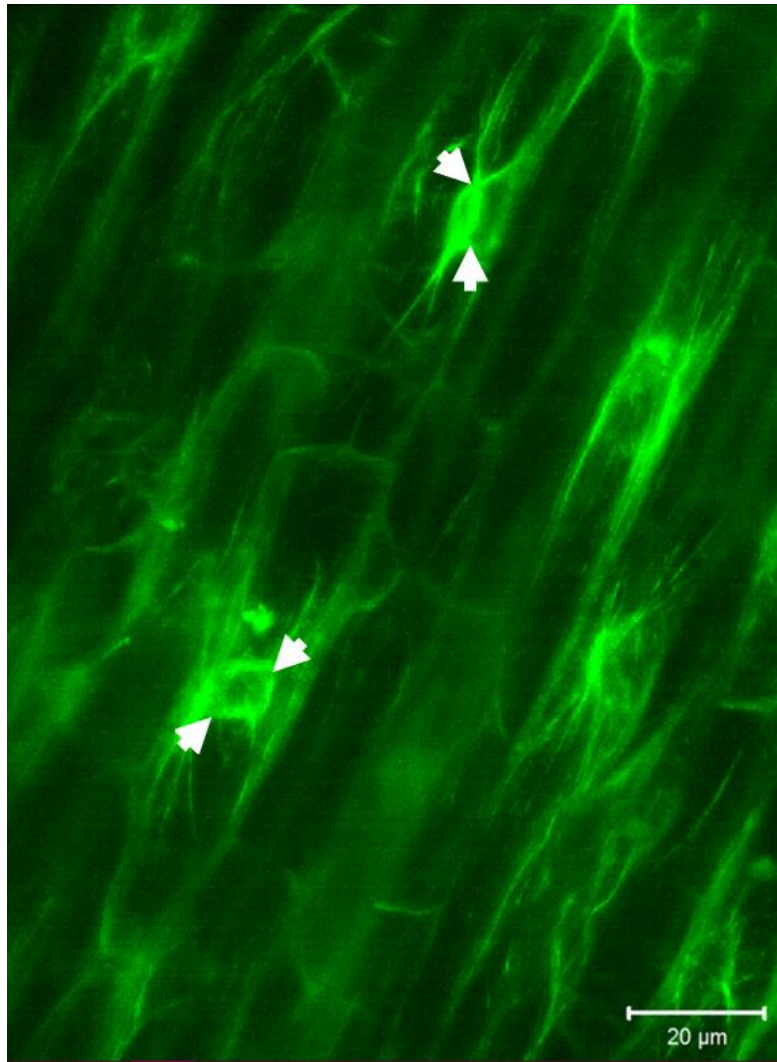


Obr. 33: Růst kořenové špičky transgenní rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP. Snímky jsou pořízeny po dobu 5 hodin každou hodinu. Měřítko je 50 µm.

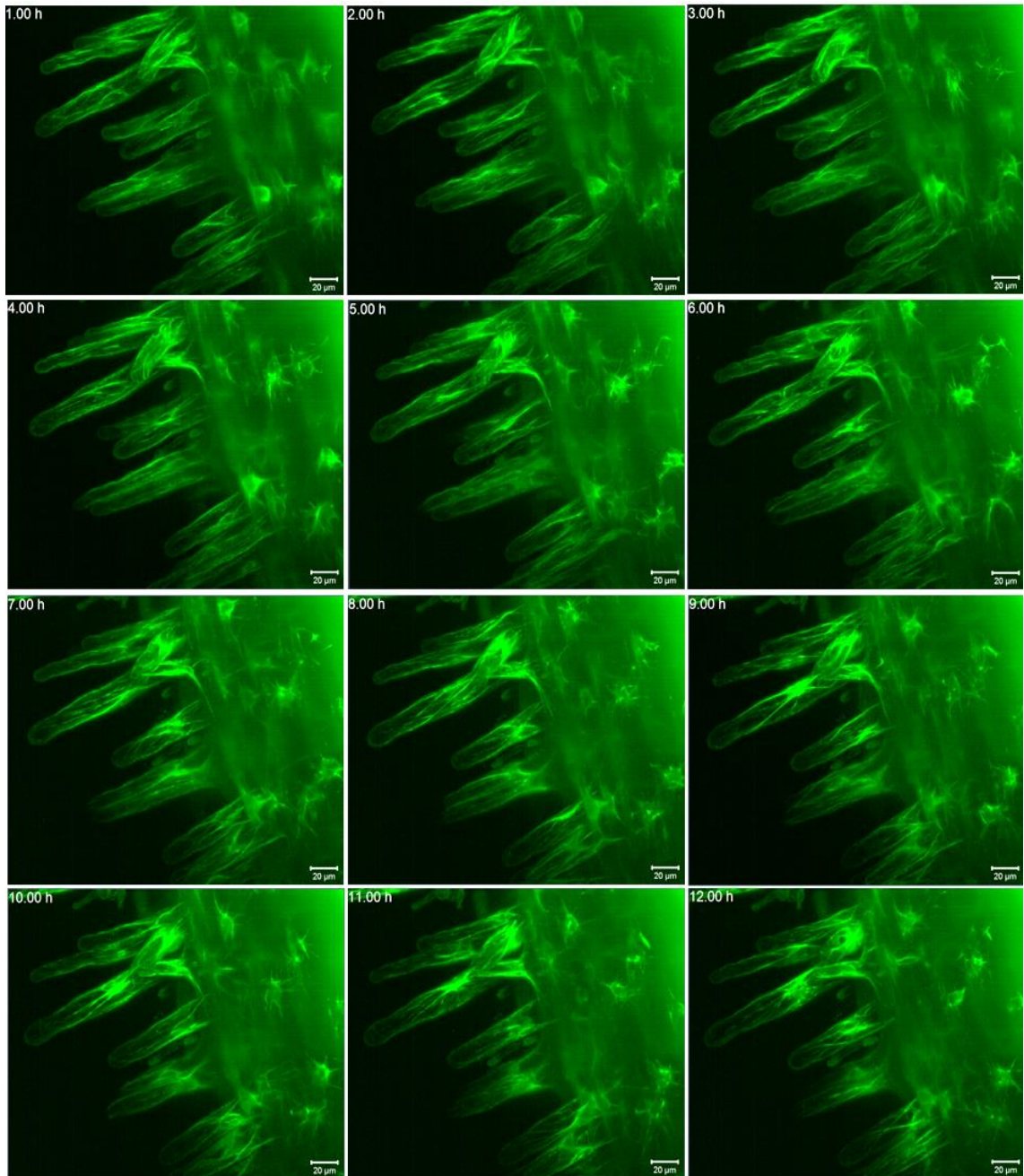


Obr. 34: Nárůst kořene transgenní rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP na plastovém držáku v pozorovací komůrce Light-sheet mikroskopu na začátku snímání a po 16 hodinách snímání.

Dalším důkazem toho, že příprava rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP a nastavení celého experimentu je optimální, je i fakt, že buňky si zachovávaly normální uspořádání a dynamiku aktinového cytoskeletu. Kortikální i perinukleární síť aktinového cytoskeletu epidermálních buněk kořene *M. sativa* v transgenní linii produkující ABD2-GFP ukazuje Obr. 35 (Video 4). Perinukleární aktinový cytoskelet (označen šipkami na Obr. 35) je zodpovědný za pozici a pohyb jádra v rámci buňky a je taktéž zapojen do relokace jádra během symbiotických interakcí mezi kořenovými vlásky *M. sativa* a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti*. Na Obr. 36 je ukázána série snímků pořízených během 12 hodin každou hodinu (Video 5). Především v kořenových vláscích je jasně vidět změny v uspořádání, což dokumentuje dynamiku kortikálního i perinukleárního aktinového cytoskeletu. Kořen a kořenové vlásky této rostliny byly snímány po dobu 48 hodin, aby bylo možné otestovat, zda rostlina dokáže v pozorovací komůrce mikroskopu přežít bez poškození déle než 12 hodin. Snímání delší než jeden den je totiž nezbytné pro pozorování interakcí mezi kořenovými vlásky *M. sativa* a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti*.



Obr. 35: Uspořádání aktinového cytoskeletu v epidermálních buňkách rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP. Perinukleární aktinový cytoskelet je označen šipkami. Měřítka je 20 μm .



Obr. 36: Změny v uspořádání a dynamika aktinového cytoskeletu v kořenových vláscích rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP. Snímky jsou pořízeny každou hodinu po dobu 12 hodin. Měřítka je 20 µm.

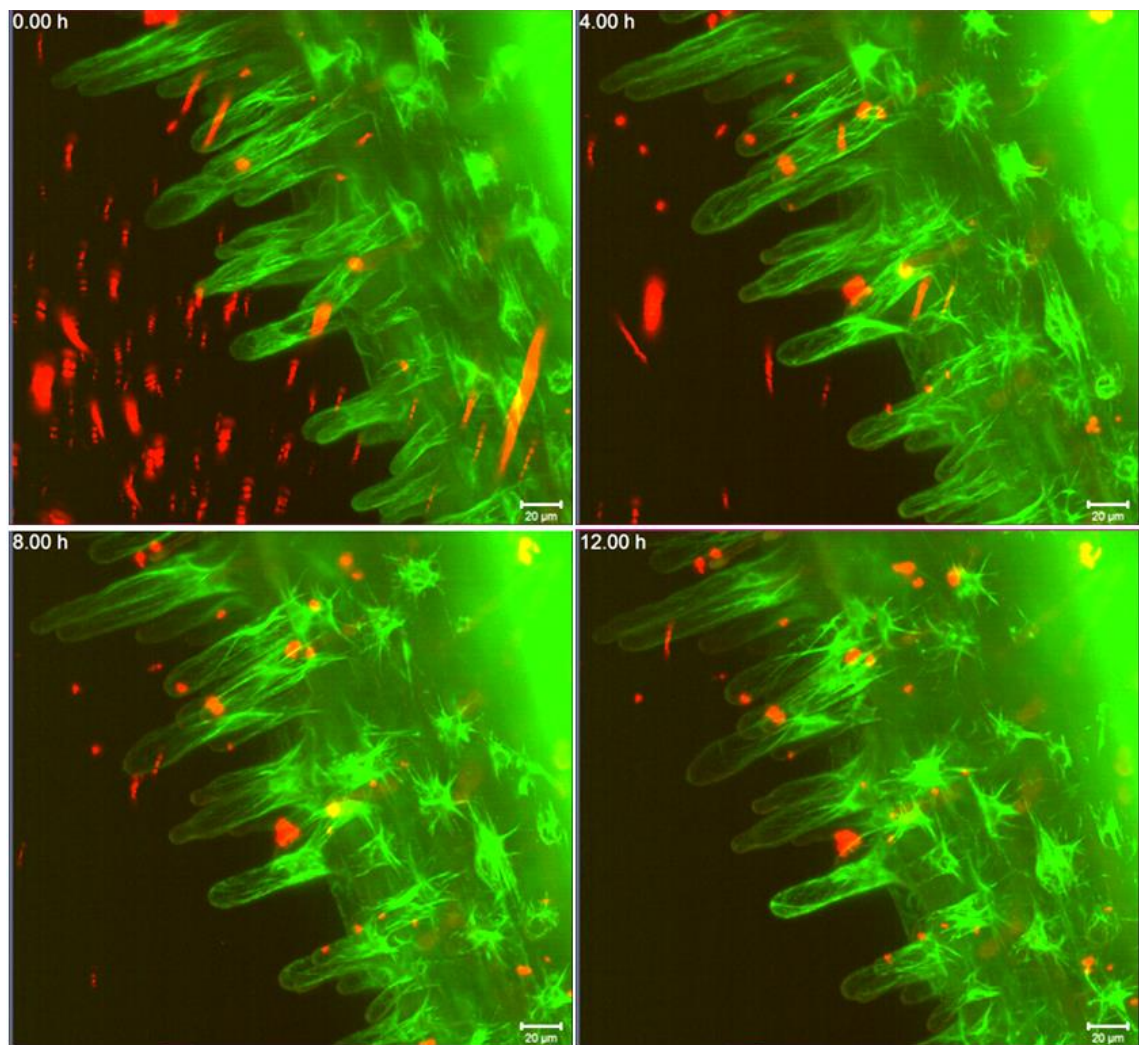
4.5.1 Optimalizované pozorování interakcí mezi kořenovými vlásky *M. sativa* a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti* v Light-sheet mikroskopu

Po ověření efektivitu použití plastového držáku k přípravě preparátů a ke snímání kořene *M. sativa* bylo následně možné využít tento protokol ke studiu interakcí mezi

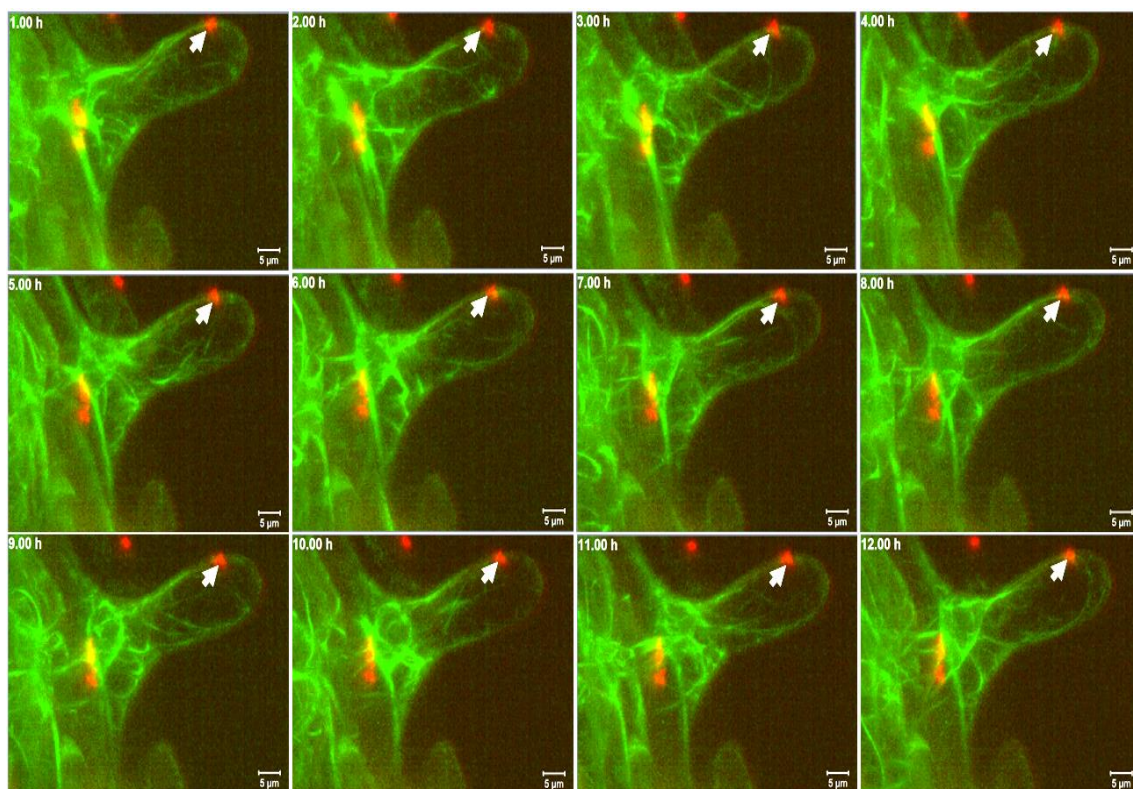
kořenovými vlásky *M. sativa* s bakteriemi *S. meliloti*. Ke zkoumání byly použity rostliny produkující ABD2-GFP a bakterie *S. meliloti* produkující mRFP. K docílení co nejjedleálnějších podmínek pro iniciaci interakcí bylo v pozorovací komůrce použito tekuté Fahraeus médium bez obsahu dusíku, které bylo postupně vyměňováno za čerstvé díky perfúznímu systému. To umožnilo nejen pročišťování a doplňování kultivačního média, ale také byly tímto způsobem odplavovány množící se bakterie *S. meliloti*. Díky tomu nedocházelo k jejich přemnožování v okolí kořene rostliny.

Na Obr. 37 je ukázán kořen *M. sativa* transgenní linie produkující ABD2-GFP s bakteriemi *S. meliloti* mRFP zachycenými na jeho povrchu a na kořenových vláscích v časech 0 h, 4 h, 8 h a 12 h od inokulace během snímání. Série snímků na Obr. 38 ukazuje přichycení bakterie *S. meliloti* na raný kořenový vlásek. Bakterie zůstala přichycena na špičce kořenového vlásku po dobu 12 hodin, avšak nedošlo k žádným změnám v aktinovém cytoskeletu, které by byly podmíněny výměnou rhizobiálních a rostlinných signálů. Nedošlo ke změně tvaru vlásku a vlásek po celou dobu přichycení bakterie nevykazoval růst. Bylo však vidět dynamiku aktinového cytoskeletu vlásku.

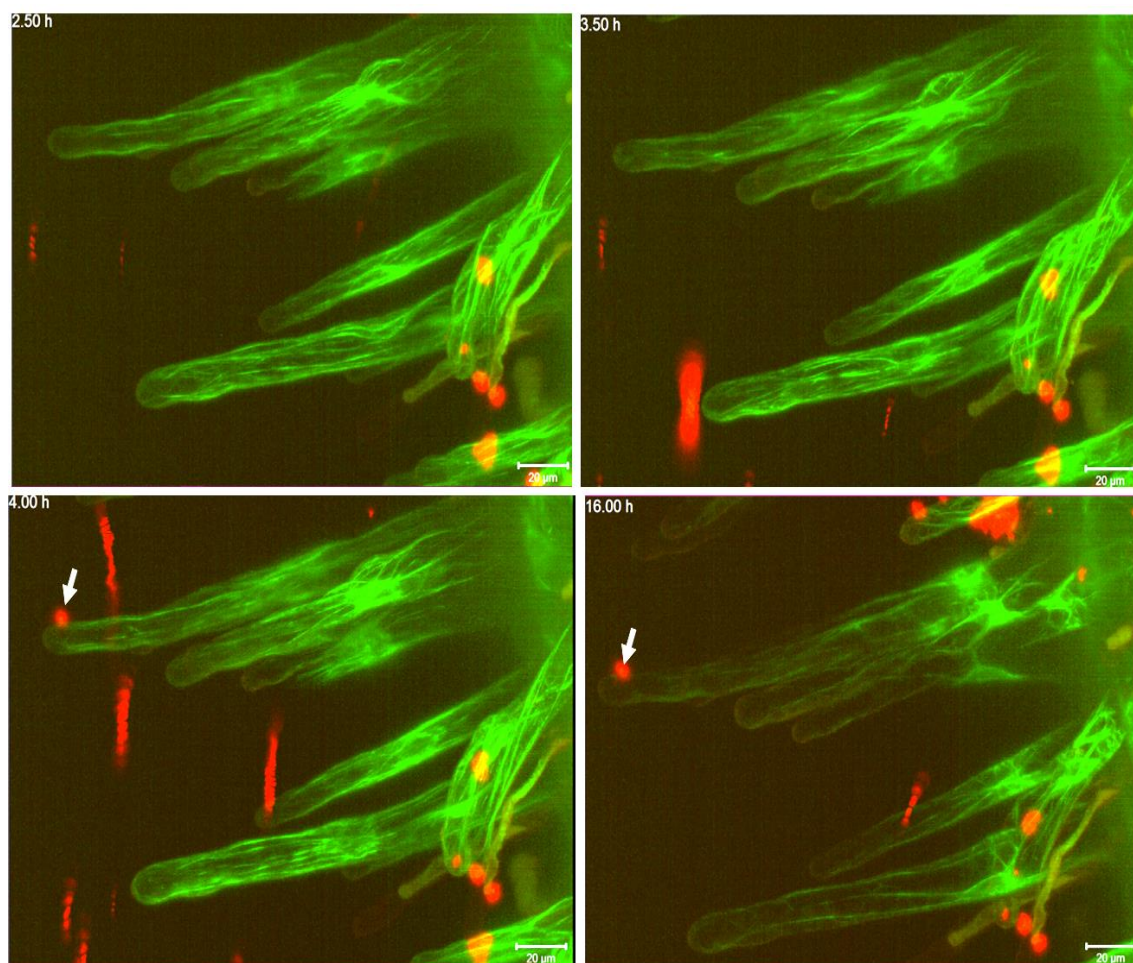
Série snímků na Obr. 39 ukazuje přichycení bakterie *S. meliloti* na již delší kořenový vlásek. Bakterie zůstala přichycena na špičce kořenového vlásku po dobu 4 až 16 hodin snímání, avšak nedošlo k žádným změnám v aktinovém cytoskeletu, které by byly podmíněny výměnou rhizobiálních a rostlinných signálů (Video 6). Nedošlo ke změně tvaru vlásku a vlásek po celou dobu přichycení bakterie nevykazoval růst. Bylo však vidět dynamiku aktinového cytoskeletu vlásku. Po 16 hodinách snímání došlo k rozpadu aktinového cytoskeletu a rostlina přestala růst. Delší snímání než 16 hodin tedy nebylo pro rostlinu vhodné. Postupné odumírání rostliny během snímání může být zapříčiněné nedostatečným přísunem kyslíku do média a také nepřítomností světla pro zelené části rostlin.



Obr. 37: Série snímků z časoběrného snímání interakcí kořene *M. sativa* produkujícího ABD2-GFP s bakteriemi *S. meliloti* RFP po dobu 12 h. Měřítka je 20 μm.



Obr. 38: Kořenový vlásek rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP v interakci s rhizobiální bakterií *S. meliloti* produkující mRFP (šipka). Snímky jsou pořízeny každou hodinu po dobu 12 hodin. Měřítka je 2 µm.



Obr. 39: Kořenové vlásky rostliny *M. sativa* produkující ABD2-GFP v interakci s rhizobiální bakterií *S. meliloti* produkující mRFP (šipka). Snímky jsou pořízeny v časech 2,5 hodiny, 3,5 hodiny, 4 hodiny a 16 hodin po inokulaci bakterií. Měřítko je 20 µm.

5 DISKUZE

Pro praktickou část této diplomové práce byla využita semena *M. sativa* kontrolní linie RSY a transgenní linie s expresí ABD2-GFP pro značení aktinového cytoskeletu. Semena těchto linií byla produkována procesem samosprašení. Jelikož se druh *Medicago* přirozeně rozmnožuje pouze cizosprašně, po umělém samosprašení dochází k inbrední depresi, která se projevuje slabou klíčivostí semen. Při pokusu překonat tento problém byly využity dva způsoby narušení osemení. Při nařezání osemení semen v místě klíčení došlo v některých případech k porušení embrya. Vyklíčené rostliny vykazovaly morfologická poškození a nestandardní růst kořene. Z tohoto důvodu byla nově využita metoda porušení osemení semen s využitím smirkového papíru. Tento postup se ukázal daleko efektivnější v klíčivosti. Také nedošlo k ovlivnění růstu kořenů proti předchozí metodě, která byla více invazivní. Jelikož samotná produkce semen pomocí samoopylení byla v našem případě málo efektivní, bylo nutné využít rostliny produkovévané procesem somatické embryogeneze. Rostliny indukované procesem somatické embryogeneze byly taktéž nejčastěji používány pro pozorování pomocí Light-sheet mikroskopie.

V současné době je pozornost vědců čím dál více zaměřena na proces fixace dusíku mezi rostlinami rodu *Medicago* a rhizobiálními bakteriemi rodu *Sinorhizobium* především pro zemědělské účely. Zkoumání těchto interakčních procesů je daleko častější u druhu *Medicago truncatula*, jelikož tento druh je diploidní a již došlo k osekvenování celého genomu. Například v práci Fourniera *et al.* (2008) byl pomocí konfokální mikroskopie pozorován proces tvorby infekčních vláken při symbióze *M. truncatula* a *S. meliloti*. V tomto případě byly kořeny rostlin pokryty speciální transparentní plastickou vrstvou propustnou pro vzduch, která měla stejný optický index lomu jako voda. To jim umožnilo co nejmenší ovlivnění rostliny při snímání. I když šlo o velmi přínosnou studii, růst kořene i infekčního vlákna během snímání probíhal v horizontální poloze a v malém prostoru mezi mikroskopickými sklíčky, což zcela nenapodobuje reálné podmínky v půdě. Oproti tomu postup v této práci zahrnuje snímání infekčního procesu na kultivačním médiu v Petriho misce. Tento postup je pro rostlinu i symbiotický proces příznivější. Lze pozorovat i kořeny větších rostlin v čase bez jakéhokoliv narušení. Je to však na úkor rozlišení, které poskytuje konfokální mikroskopie.

Jako nejvhodnější a nejpřirozenější technologie zkoumání dynamiky růstu rostlinných orgánů se v současné době jeví light-sheet mikroskopie. První pokusy o zobrazení dynamiky růstu kořene *Medicago* v trojrozměrném režimu provedl Silverberg *et al.* (2012). Zkoumali růst kořenů *M. truncatula* divokého typu v heterogenních prostředích pomocí vlastní sestavené zobrazovací techniky a aparatury vyvinuté pro 3D časosběrné zobrazení rostoucích kořenů („3D time-lapse imaging of growing roots“, 3D-TIGR). Díky této nové technologii, využívající laserový paprsek tvaru listu, bylo možné studovat spirálovité stočení kořenů *Medicago* způsobené fyzickou bariérou v růstovém médiu. Čím dál větší využití ke studiu dynamiky rostlinného růstu mají komerčně dostupné systémy light-sheet mikroskopie. První studie byly zaměřeny na vývojovou biologii modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Díky tomu bylo možné pozorovat jak dynamiku cytoskeletu, tak lokalizaci různých značených proteinů a buněčných struktur (Maizel *et al.*, 2011).

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo provést a optimalizovat mikroskopické studium rostliny *M. sativa* v reálném čase a při interakci s rhizobakteriemi. Kořen této rostliny je několikanásobně větší než u modelové rostliny *A. thaliana*, která je daleko lépe prozkoumaná. Je vhodnější na přípravu vzorku k mikroskopování, jako i k samotnému snímání pomocí light-sheet mikroskopu (např. Ovečka *et al.*, 2015; Sena *et al.*, 2011). Bylo velmi důležité optimalizovat postup přípravy vzorku i podmínky snímání v mikroskopické komůrce pro dlouhodobé pozorování. Tyto parametry bylo nutné optimalizovat jak pro snímání růstu kořene, tak i pro snímání interakčních procesů s rhizobiálními bakteriemi. Jelikož tyto symbiotické interakce trvají i několik desítek hodin, bylo nezbytné zamezit sekundárním infekcím kultivačního média. Dále bylo také nutné zamezit přemnožení rhizobiálních bakterií v pozorovací komůrce. Vzhledem k tomu, že se při nerušeném růstu kořenové špičky velice rychle dostala mimo zorného pole, bylo nutné využít režim „multiview“. Pomocí tohoto režimu bylo možné nastavit několik snímaných zorných polí posunutých v ose Y, tedy v ose růstu kořene a zachytit tak růst kořenové špičky po celou dobu snímání. Tímto způsobem bylo možné, obzvláště u pozorování interakcí kořenových vlásků s rhizobiálními bakteriemi, nastavit zorná pole na několik vybraných částí kořene. Tyto části bylo možné snímat nezávisle, ovšem ve stejném čase.

Při prvních pokusech bylo využito upraveného protokolu přípravy vzorku podle Ovečka *et al.* (2015), kdy byla předem inokulovaná rostlina rostoucí kolmo do média velmi opatrně „vyříznuta“ i s pevným kultivačním médiem okolo kořene do plastové

FEP trubičky. Takto vytvořený vzorek bylo možné okamžitě přemístit do mikroskopu a snímat. V tomto případě docházelo nejen k silnému přemnožení rhizobiálních bakterií, ale i samotné pevné kultivační médium snižovalo rozlišení snímání. Další možností, jak pozorovat interakce mezi kořenovými vlásky a rhizobiálními bakteriemi, byla inokulace kořene bakteriální suspenzí přímo v pozorovací komůrce. V tomto případě bylo nezbytné zabezpečit kontinuální výměnu kultivačního média v komůrce pomocí perfúzního systému. Toto vylepšení zabrání v budoucnu kontaminacím média a bude možné přidávat různé chemikálie s cílem studovat jejich vliv na růst kořene. Důležité pro naše pozorování bylo, aby se bakterie přidané do kultivačního média dostaly ke kořenovým vláskům rostliny. Z tohoto důvodu nebylo možné použít již zmíněný postup, kdy je celý kořen obklopen pevným kultivačním médiem či agarosou. Jako nejvhodnější se ukázal postup upravený podle von Wangenheim *et al.* (2017) s použitím speciálního plastového držáku. Díky tomu, že je kořen rostliny fixován pouze z jedné strany na vrstvě agarosy, jsou v podstatě všechny jeho kořenové vlásky volně v médiu, především na nově vytvořeném segmentu kořene přímo v mikroskopu. Bakterie tak mají větší možnost se na kořenové vlásky přichytit. V kombinaci s perfúzním systémem výměny média se tato optimalizace jeví jako nejvhodnější pro studium interakčních procesů mezi kořenovými vlásky a bakteriemi.

Jediným problémem omezujícím pozorování růstu po dobu delší než 24 hodin je nedostatek světla pro nadzemní části rostliny a také omezený přístup kyslíku. Tento nedostatek by mělo v budoucnu vyřešit LED osvětlení horní části rostliny v pravidelných intervalech, které simulují normální světelný režim, tedy 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Současně bude kořen rostliny od osvětlené části oddělen neprůhledným materiálem na hladině kultivačního média v pozorovací komůrce. Okysličení média může být zabezpečeno jeho sterilním probubláváním v zásobní láhvi v rámci perfúzního systému.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce v teoretické části popisuje biotické interakce rostlin s mikroorganismy. V části popisující biotický stres je shrnuto, jak tento stres působí na rostliny. Jsou popsány způsoby, jakými se rostliny proti tomuto druhu stresu, konkrétně proti patogenům, mohou bránit. Mechanismy obrany rostlin zahrnují jak mechanické bariéry buněčné stěny a plazmatické membrány, tak obranu na molekulární úrovni. Mezi takové způsoby obranných reakcí pak patří například methylace cytosinu, produkce rostlinných hormonů, tvorba reaktivních forem kyslíku a především série obranných reakcí, do nichž jsou zapojeny stresem indukované mitogen aktivované protein kinasy (SIMK a SIMKK u vojtěšky). V další části je také popsán symbiotický vztah mezi bobovitými rostlinami rodu *Medicago* a rhizobiálními bakteriemi *Sinorhizobium*. V další části teoretického úvodu jsou popsány změny aktinového cytoskeletu během interakcí kořenových vlásků s rhizobiálními bakteriemi, jelikož byly v experimentální části práce použity transgenní linie *M. sativa* se značením aktinového cytoskeletu.

Praktická část práce na začátku popisuje experimentální optimalizaci protokolu na přípravu semena také přípravu rostlin procesem somatické embryogeneze. Pomocí těchto metod byly produkovány rostliny pro praktické experimenty s kokultivací i mikroskopickou dokumentací symbiotického procesu. V další části se práce zaměřuje na kokultivaci rostlin *M. sativa* s bakteriemi *S. meliloti* na tekutém médiu bez dusíku. Mikroskopická pozorování rostlin na Petriho miskách byla zaměřena na identifikaci a charakterizaci jednotlivých stádií interakcí mezi kořenovými vlásky *M. sativa*, kontrolních i transgenní linie ABD2-GFP a rhizobiálními bakteriemi *S. meliloti*. Počáteční interakční procesy byly také pozorovány v čase několika hodin na rostlinách kultivaru Europe pomocí neinvazivní mikroskopie na Petriho miskách. Taktéž byly kořeny transgenních rostlin pozorovány pomocí neinvazivní light-sheet mikroskopie. K účelu dlouhodobého pozorování byly optimalizovány techniky přípravy rostlin k mikroskopii a také nastavení podmínek snímání tak, aby poskytovaly rostlinám co nejpřirozenější prostředí pro růst.

Byla taktéž kvantitativně vyhodnocena efektivita procesu tvorby hlízek u kontrolní a transgenní linie *M. sativa*. Počty vyvinutých hlízek u těchto linií nevykazovaly výraznější rozdíly mezi kontrolní a transgenní linií. Produkce ABD2-GFP proteinů tedy nemá výrazný vliv na tvorbu a životaschopnost kořenových hlízek. V poslední části

práce byla kvalitativně a kvantitativně vyhodnocena přítomnost kinas SIMK a MMK3 u rostlin kontrolní linie, linie s potlačenou expresí kinasy SIMKK a transgenní linie produkující ABD2-GFP. Byly analyzovány rostliny rostoucí v kontrolních podmínkách i rostliny s vyvinutými hlízkami. Tímto způsobem bylo prokázáno výrazně snížené množství SIMK u linie s potlačenou expresí SIMKK, jelikož exprese a aktivita SIMK je ovlivňována právě kinasou SIMKK. Taktéž byla prokázána aktivace kinas 15 dní od inokulace rhizobiální suspenzí.

7 LITERATURA

- Abadie S., Jardet C., Colombelli J., Chaput B., David A., Grolleau J.-L., Bedos P., Lobjois V., Descargues P., Rouquette J. (2018): 3D imaging of cleared human skin biopsies using light-sheet microscopy: A new way to visualize in-depth skin structure. *Skin Research and Technology* **24**, 294-303.
- Artursson V., Finlay R. D., Jansson J. K. (2006): Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* **8**, 1–10.
- Asselbergh B., De Vieesschauwer D., Höfte M. (2008): Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 709–719.
- Audenaert K., De Meyer G. B., Höfte M. (2002): Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *B. cinerea* and suppresses salicylic acid dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**, 491-501.
- Becker K., Jährling N., Saghafi S., Dodt H.-U. (2013): Ultramicroscopy: light-sheet-based microscopy for imaging centimeter-sized objects with micrometer resolution. *Cold Spring Harbor Protocols* **8**, 704-713.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vyplelová P., Ovečka M., Luptovčiak I., Illés P., Kuchařová A., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Front. Plant Sci.* 6:336.
- Bernatavichute Y. V., Zhang X., Cokus S., Pellegrini M., Jacobsen S. E. (2008): Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **3**:e3156. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003156>
- Blancaflor E. B., Hasenstein K. H. (2000): Methods for detection and identification of F-actin organization in plant tissues. In: *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions* (Staiger C., Baluška F., Volkmann D., Barlow P. W., eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 601–618.
- Boivin C., Camut S., Malpica C. A., Truchet G., Rosenberg C. (1990): *Rhizobium meliloti* Genes Encoding Catabolism of Trigonelline Are Induced under Symbiotic Conditions. *Plant Cell* **2**, 1157–1170.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379–406
- Braun M., Hauslage J., Czogalla A., Limbach C. (2004): Tiplocalized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta* **219**, 379–388.
- Brewin N. J. (1991): Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology* **7**, 191-226.
- Calder G. Hindle Ch., Chan J., Shaw P. (2015): An optical imaging chamber for viewing living plant cells and tissues at high resolution for extended periods. *Plant methods* **11**(1):22 <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-015-0065-7>
- Cardenas L., Vidali L., Dominguez J., Perez H., Sanchez F., Hepler P. K., Quinto, C. (1998): Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiology* **116**, 871-877.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 36734-36740.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **14**, 703-711.
- Cebolla A., Vinardell J. M., Kiss E., Olah B., Roudier F., Kondorosi A., Kondorosi, E. (1999): The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO Journal* **18**, 4476–4484.

- Cosgrove D. J. (2005): Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 850-861.
- Dan I., Watanabe N. M., Kusumi A. (2001): The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends in Cell Biology* **11**, 220–30.
- Dong X., Hong Z., Chatterjee J., Kim S., Verma D. P. (2008): Expression of callose synthase genes and its connection with *NPR1* signaling pathway during pathogen infection. *Planta* **229**, 87–98.
- Downen R. H., Pelizzola, M., Schmitz R. J., Lister R., Downen J. M., Nery J. R., Ecker, J. R. (2012): Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**(32), 2183–2191.
- Dreher K., Callis J. (2007): Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. *Annals of botany* **99**, 787-822.
- Dupont L., Alloing G., Pierre O., Msehli S. S., Hopkins J., Hérouart D., Frendo, P. (2012): The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence. In: *Senescence* (Nagata T., eds.) INTECH Open Access Publisher, 137-168
- Durrant W. E., Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185–209.
- Dyachok J., Shao M. R., Vaughn K., Bowling A., Facette M., Djakovic S., Clark L., Smith L. (2008): Plasma membrane-associated SCAR complex subunits promote cortical F-actin accumulation and normal growth characteristics in Arabidopsis roots. *Molecular Plant* **1**, 990–1006.
- Esseling J. J., Lhuissier F. G., Emons A. M. (2004): A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in *NORK*-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria. *Plant Cell* **16**, 933-944.
- Fahraeus G. M. (1957): The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Journal of general microbiology* **16**, 374-381.
- Fournier J., Timmers A. C., Sieberer B. J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D. G. (2008): Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology* **148**, 1985-1995.
- Frye C. A., Innes R. W. (1998) An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **10**, 947–956.
- Frye C. A., Tang D., Innes R. W. (2001): Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 373–378.
- Gage D. J., Bobo T., Long S. R. (1996): Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of bacteriology* **178**(24), 7159-7166.
- Gage D. J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280–300.
- Genre A. a Timmers T. (2019): The symbiotic role of the actin filament cytoskeleton. *New Phytologist* **221**, 611–613.
- Geurts R., Fedorova E., Bisseling T. (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 346–352.
- Grant J. J., Loake G. J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease. *Plant Physiology* **124**, 21–29.
- Hadri A. E., Spaink H. P., Bisseling T., Brewin N. J. (1998): Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria* (Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas P., eds.), Springer, The Netherlands, 347-360.
- Hamann T. (2012): Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in plant science* **3**(77), 1-5.
- Hématy K., Cherk C., Somerville S. (2009): Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current opinion in plant biology* **12**, 406-413.

- Hirsch A. M. (1992): Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* **122**, 211–237.
- Hückelhoven R. (2007): Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**, 101–127.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148), 802–805.
- Chan J., Calder G., Fox S., Lloyd C. (2007): Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. *Nature Cell Biology* **9**(2), 171–175.
- Chinnusamy V., Zhu J. K. (2009): Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 133–139.
- Chodavarapu R. K., Feng S., Bernatavichute Y. V., Chen, P.-Y., Stroud H., Yu Y., Hetzel J., Kuo F., Kim J., Cokus S. J., Casero D., Bernal M., Huijser P., Clark A. T., Kraemer U., Merchant S. S., Zhang X., Jacobsen S. E., Pellegrini M. (2010): Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* **466**, 388–392.
- Chytilova E., Macas J., Sliwiska E., Rafelski S. M., Lambert G. M., Galbraith, D. W. (2000): Nuclear dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2733–2741.
- Jarošová M. (2017): Mikroskopická dokumentace vývojových procesů rostlin. Bakalářská práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká Republika.
- Jonak C., Okresz L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415–424.
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Ketelaar T., Faivre-Moskalenko C., Esseling J. J., de Ruijter N. C. A., Grierson C. S., Dogterom M., Emons, A. M. C. (2002): Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: an actin-regulated process of tip growth. *Plant Cell* **14**, 2941–2955.
- Khokhlatchev A. V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E., Cobb M. H. (1998): Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605–615
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant cell* **12**(11), 2247–2258.
- Kitaeva A. B., Demchenko K. N., Tikhonovich I. A., Timmers A. C. J., Tsyganov V. E. (2016): 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**, 168–183.
- Koroleva O. A., Calder G., Pendle A. F., Kim S. H., Lewandowska D., Simpson C. G., Jones I. M., Brown J.W.S., Shaw P.J. (2009): Dynamic behavior of *Arabidopsis* eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *Plant Cell* **21**(5), 1592–1606.
- Kovtun Y., Chiu W.-L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 2940–2945.
- Laloi C., Apel K., Danon A. (2004): Reactive oxygen signaling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 323–328.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **48**, 251–275.
- Leborgne-Castel N., Thibaud A., Karim B. (2010): Endocytosis in plant–microbe interactions. *Protoplasma* **247**, 177–193.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. J. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583–593.
- Lhuissier F., De Ruijter N., Sieberer B., Esseling J. J., Emons A. (2001): Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art. *Annals of Botany* **87**, 289–302.
- Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2015): Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual review of plant biology* **66**, 415–440.

- Lievens S., Goormachtig S., Herman S., Holsters M. (2002): Patterns of pectin methylesterase transcripts in developing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 164–168.
- Lin A. E., Guttman J. A. (2010): Hijacking the endocytic machinery by microbial pathogens. *Protoplasma* **244**, 75-90.
- Maizel A., Von Wangenheim D., Federici F., Haseloff J., Stelzer E. H. K., (2011): High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *Plant Journal* **68**, 377–385.
- Marc J., Granger C. L., Brincat J., Fisher D. D., Kao T.-H., McCubbin A. G., Cyr R. J. (1998): A GFPMAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**, 1927–1940.
- Miller D. D., de Ruijter N. C. A., Bisseling T., Emons A. M. (1999): The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito lipochitoooligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal* **17**, 141–154.
- Mitchell Ch. E., Agrawal A. A., Bever J. D., Gilbert G. S., Hufbauer R. A., Klironomos J. N., Maron J. L., Morris W. F., Parker I. M., Power A. G., Seabloom E. W., Torchin M. E., Vázquez D. P. (2006): Biotic interactions and plant invasions. *Ecology Letters* **9**, 726–740.
- Miyahara A., Richens J., Starker C., Morieri G., Smith L., Long S, Downie J. A., Oldroyd G. E. (2010): Conservation in function of a SCAR/WAVE component during infection thread and root hair growth in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **23**, 1553–1562.
- Mohr P. G., Cahill D. M. (2003): Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology* **30**, 461-469.
- Mou Z., Fan W., Dong X. (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935–944.
- Mulligan J. T., Long S. R. (1985): Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, 6609–6613.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt, H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant Journal* **20**, 381–388.
- Munoz J. A., Coronado C., Perez-Hormaeche J., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A. J. (1998): MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa *Rhizobium meliloti* interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 9687–9692.
- Mur L. A., Kenton P., Lloyd A. J., Ougham H., Prats E. (2008): The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**(3), 501–520.
- Murphy A. S., Bandyopadhyay A., Holstein S. E., Peer W. A. (2005): Endocytotic cycling of PM proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 221–251.
- Murray J. D., Muni R. R. D., Torres-Jerez I., Tang Y., Allen S., Andriankaja M., Li G., Laxmi A., Cheng X., Wen J., Vaughan D., Schultze M., Sun J., Charpentier M., Oldroyd G., Tadege M., Ratet P., Mysore K. S., Chen R., Udvardi M. K. (2011): *Vapyrin*, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **65**, 244-252.
- Oldroyd G. E. D. (2001): Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Annals of Botany* **87**, 709–718.
- Oldroyd G. E. D. (2013): Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 252-263.
- Ovečka M., Vaškebová L., Komis G., Luptovčiak I., Smertenko A., Šamaj J. (2015): Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols* **10**, 1234–1247.
- Parker I., Gilbert G. (2004): The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**, 675-700.

- Perez Guerra J. C., Coussens G., De Keyser A., De Rycke R., De Bodt S., Van de Velde W., Goormachtig S., Holsters M. (2010): Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152**, 1574–1584.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 180–201.
- Piedras P., Hammond-Kosack K. E., Harrison K., Jones J. D. G. (1998): Rapid, Cf-9 and Avr9 dependent, production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **11**, 1155–1166.
- Pollard T. D., Cooper J. A. (2009): Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208–1212.
- Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M. M., de Felipe M. R., Harrison J., Vanacker H., Foyer C. H. (2005): Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytology* **165**, 683–701.
- Reynaud E.G., Krzic U., Greger K., Stelzer E. H. K. (2008): Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage. *Human Frontier Science Program Journal* **2**, 266–275.
- Ridge R. W., Rolfe B. G. (1985): *Rhizobium* sp. degradation of legume root hair cell-wall at the site of infection thread origin. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 717–720.
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., Keller B. (2002): *ACTIN2* is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**, 1464–1472.
- Rizhsky L., Liang H. J., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004): When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**, 1683–1696.
- Rocchetti A., Hawes C., Kriechbaumer V. (2014): Fluorescent labelling of the actin cytoskeleton in plants using a cameloid antibody. *Plant Methods* **10**:12 <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-10-12>.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Sena G, Frenz Z, Birnbaum KD, Leibler S (2011) Quantitation of cellular dynamics in growing *Arabidopsis* roots with light sheet microscopy. *PLoS ONE*, **6**:e21303. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021303>
- Shaw S. L., Ehrhardt D. W. (2013): Smaller, faster, brighter: advances in optical imaging of living plant cells. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 351–375.
- Shaw S. L. (2006): Imaging the live plant cell. *Plant Journal* **45**(4), 573–598.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 410-417.
- Sieberer B. J., Chabaud M., Timmers A. C., Monin A., Fournier J., Barker D. G. (2009): A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiology* **151**, 1197-1206.
- Smith L. G., Oppenheimer D. G. (2005): Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 271–295.
- Sorkin A., von Zastrow M. (2002): Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 600–614.
- Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G. D. (2006): Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current opinion in plant biology* **9**, 110-121.
- Staiger C. J. (2000): Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Biology* **51**, 257–288.
- Suzuki N., Rivero R., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. (2014): Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**, 32-43.
- Šamaj J., Baluska F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D., Menzel D. (2004): Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiology* **135**, 1150–1161.

- Tanoue T., Maeda R., Adachi M., Nishida E. (2001): Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO Journal* **20**, 466-479.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 392-400.
- Thaler S. J., Bostock R. M. (2004): Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* **85**, 48-58.
- Thoma I., Loeffler C., Sinha A. K., Gupta M., Krischke M., Steffan B., Roitsch T., Mueller M. J. (2003): Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal* **34**, 363-375.
- Thomma B. P., Penninckx I. A., Broekaert W. F., Cammue B. P. (2001): The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* **13**, 63-68.
- 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.
- Torres M. A., Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**, 373-378.
- Turner J. G., Ellis C., Devoto A. (2002): The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14**, 153-164.
- Van Brussel A. A. N., Bakhuizen R., Van Spronsen P. C., Spalink H. P., Tak T., Lugtenberg B. J. J., Kijne J. W. (1992): Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo- oligosaccharides of Rhizobium. *Science* **257**, 70-71.
- Van de Velde W., Guerra J. C., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M., Goormachtig S. (2006): Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141**, 711-720.
- Torres M. A., Dangl J. L., Jones J. D. (2002): Arabidopsis gp91^{phox} homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA* **99**, 517-522.
- Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet, G. (1990): Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**, 4295-4306.
- 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**, 1777-1787.
- Vidali L., Rounds C. M., Hepler P. K., Bezanilla M. (2009): Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PLoS One* **4**:e5744. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005744>.
- Vissenberg K., Fry S. C., Verbelen J.P. (2001): Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **127**, 1125-1135.
- Wang C., Yu H., Luo L., Duan L., Cai L., He X., Wen J., Mysore K.S., Li G., Xiao A. (2016): Nodules with activated defense1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **212**, 176-191.
- Wangenheim D., Hauschild R., Friml J. (2017): Light Sheet Fluorescence Microscopy of Plant Roots Growing on the Surface of a Gel. *Journal of Visualized Experiments* **119**: 55044. <https://www.jove.com/video/55044/light-sheet-fluorescence-microscopy-plant-roots-growing-on-surface>
- 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**, 276-287.
- Yokota K., Fukai E., Madsen L. H., Jurkiewicz A., Rueda P., Radutoiu S., Held M., Hossain M. S., Szczyglowski K., Morieri G., Oldroyd G. E., Downie J. A., Nielsen M. W., Rusek A. M., Sato S., Tabata S., James E. K., Oyaizu H., Sandal N., Stougaard J. (2009): Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* **21**, 267-284.

- Zhang X., Han L., Wang Q., Zhang C., Yu Y., Tian J., Kong Z. (2019): The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **221**, 1049–1059.
- Zilberman D., Gehring M., Tran R. K., Ballinger T., Henikoff S. (2007): Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**, 61–69.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABD2	z angl. „Actin binding domain 2“, Aktin vazebná doména 2
B5 médium	Gamborgovo médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSL	Digitální skenovací light-sheet fluorescenční mikroskop
GFP protein	Z angl. „Green fluorescent protein“, Zelený fluorescenční protein
IT	Z angl. „Infection thread“, Infekční vlákno
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
MMK3	Mitogen aktivovaná protein kinasa 3 u vojtěšky
MPK6	Mitogen aktivovaná protein kinasa 6
mRFP	Monomerní forma červeného fluorescenčního proteinu
MS médium	Murashige and Skoog médium
MT	Mikrotubul
NodD	Nodulační faktor D
Obr.	Obrázek
PAMP	Z angl. „pathogen-associated molecular patterns“, molekulární vzorce asociované s patogenem
PRR	Z angl. „Pattern recognition receptors“, receptory rozpoznávající patogena
PT	Z angl. „PAMP triggered immunity“, PAMP-vyvolaná imunita
ROS	Reaktivní formy kyslíku
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SIMK	Solným stresem indukovaná MAPK
SIMKK	SIMK kinasa
Tab.	Tabulka

9 PŘÍLOHY

Video 1

Video 2

Video 3

Video 4

Video 5

Video 6

Videa jsou k dispozici na přiloženém CD ve složce „Přílohy“.