

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Fenotypová analýza transgenních linií vojtěšky  
(*Medicago sativa*) exprimujících MMK2 v symbiotické  
interakci s mikroorganismy rodu *Rhizobium***

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Veronika Kúkolová**  
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové  
inženýrství  
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Olga Šamajová, Dr.**  
Rok: 2024

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

V Olomouci dne .....

.....

Veronika Kúkolová

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Olze Šamajové Dr., za odbornou pomoc v laboratoři i při psaní této práce, cenné rady, vstřícnost a věnovaný čas. Poděkování patří také všem zaměstnancům Katedry biotechnologií, kteří mi byli vždy ochotni poradit. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu oddělení prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnění práce v laboratoři a využití veškerého vybavení. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině za podporu v průběhu celého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Kúkolová
Název práce	Fenotypová analýza transgenních linií vojtěšky ( <i>Medicago sativa</i> ) exprimujících MMK2 v symbiotické interakci s mikroorganismy rodu <i>Rhizobium</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.) je nejrozšířenější luštěninou na světě. Její jedinečná schopnost fixovat vzdušný dusík ji činí klíčovou plodinou pro udržitelné zemědělství. Tato fixace dusíku je umožněna symbiózou s bakteriemi rodu *Rhizobium*, které vytváří na kořenech rostliny hlízky. V hlízkách dochází k přeměně atmosférického dusíku na amoniak, který rostlina využívá pro svůj růst a vývoj. Klíčovou roli v těchto symbiotických vztazích hrají také signální dráhy mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPK). Jsou aktivovány bezprostředně po infekci rostliny bakteriemi a jsou zodpovědné za přenos signálů mezi rostlinou a bakterií, a dále za růst a vývoj rostliny.

Experimentální část práce byla zaměřena na studium symbiotických interakcí vojtěšky seté a *Sinorhizobium meliloti*. Metodou nepřímé somatické embryogeneze byly připraveny rostliny divého typu a transgenních linií exprimujících GFP-MMK2 pod různými promotory. Cílem bylo sledovat a porovnat vývoj těchto linií v kontrolních podmínkách a v interakci se *S. meliloti*. Fenotypová charakterizace byla soustředěna na délku a rychlost růstu kořenových systémů a velikost listové plochy za kontrolních podmínek. Po inokulaci kořenů se *S. meliloti* byla analyzována tvorba infekčních vláken a hlízek. Pomocí exprese *MMK2* byla zkoumána také role této MAPK v symbiotických procesech.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> , MAPK signální dráhy, MMK2, hlízky, kořen
Počet stran	83
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Kúkolová
Title	Phenotypic analysis of alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) transgenic lines expressing MMK2 in symbiotic interaction with microorganisms of the genus <i>Rhizobium</i> .
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biotechnology
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2024

### Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is the most widely grown legume in the world. Its unique ability to fix atmospheric nitrogen makes it a key crop for sustainable agriculture. This nitrogen fixing ability is facilitated through a symbiotic relationship with bacteria belonging to the genus *Rhizobium*, which induce the formation of nodules on the roots of the plant. Within these nodules, atmospheric nitrogen is converted into ammonia, which the plant uses for its growth and development. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways also play a key role in these symbiotic relationships. They are activated immediately after infection of the plant by bacteria and are responsible for the transmission of signals between the plant and bacteria, and for the growth and development of the plant.

The experimental part of the thesis was focused on the study of symbiotic interactions between alfalfa and *Sinorhizobium meliloti*. Wild-type plants and transgenic lines expressing GFP-MMK2 under various promoters were generated using the indirect somatic embryogenesis method. The aim was to monitor and compare the development of these lines under both control conditions and in presence of *S. meliloti*. Phenotypic characterization focused on the length and growth rate of root systems, as well as leaf area under control conditions. After root inoculation with *S. meliloti*, the formation of infective filaments and nodules was analyzed. Additionally, the role of this MAPK in symbiotic processes was also examined using MMK2 expression.

Keywords *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*, MAPK signaling pathways, MMK2, nodules, root

Number of pages	83
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY .....</b>	<b>11</b>
2.1	Vojtěška setá.....	11
2.2	Mitogenem aktivované protein kinázy .....	11
2.2.1	Signalizace mitogenem aktivovaných protein kináz v interakci se symbiotickými bakteriemi.....	12
2.2.2	Mitogenem aktivované protein kinázy u <i>M. sativa</i> .....	14
2.3	Symbiotické bakterie .....	15
2.3.1	Signalizace symbiotických procesů.....	16
2.3.2	Organogeneze hlízek .....	18
2.3.3	Regulace vývoje hlízek.....	19
2.3.4	Tvorba symbiozomů.....	20
2.4	Pletivová kultura.....	21
2.4.1	Somatická embryogeneze u <i>Medicago</i> .....	22
2.4.2	Kultivační média pro somatickou embryogenezi .....	25
2.4.3	Transgenní linie u rodu <i>Medicago</i> .....	26
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
3.1	Materiál.....	29
3.1.1	Rostlinný materiál .....	29
3.1.2	Bakteriální materiál .....	29
3.1.3	Chemikálie.....	29
3.1.4	Roztoky a média .....	30
3.1.5	Přístroje.....	33
3.1.6	Software.....	34
3.2	Metody.....	34
3.2.1	Sterilizace listů pro indukci somatické embryogeneze .....	34
3.2.2	Příprava B5H média pro indukci kalusů .....	34

3.2.3	Příprava B50 média pro indukci somatických embryí .....	34
3.2.4	Příprava MMS média k indukci klíčení.....	35
3.2.5	Příprava MS média .....	35
3.2.6	Příprava pevného Fahraeus média bez N <sub>2</sub> .....	35
3.2.7	Příprava tekutého Fahraeus média bez N <sub>2</sub> .....	35
3.2.8	Příprava LB média pro kultivaci <i>S. meliloti</i> .....	35
3.2.10	Kultivace kultury <i>S. meliloti</i> ve Fahraeus médiu.....	36
3.2.11	Inokulace rostlin kulturou <i>S. meliloti</i> .....	36
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
4.1	Příprava rostlinného materiálu .....	37
4.2	Fenotypová analýza transgenních linií v kontrolních podmínkách.....	41
4.2.1	Analýza délky kořenového systému transgenních linií .....	41
4.2.2	Analýza listové plochy transgenních linií .....	43
4.3	Fenotypová analýza transgenních linií po inokulaci <i>S. meliloti</i> .....	45
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>79</b>



# CÍLE PRÁCE

## **Teoretická část**

1. Vypracování literární rešerše na téma signalizace pomocí mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK) u vojtěšky a její zapojení do symbiotických interakcí s prospěšnými mikroorganismy rodu *Rhizobium*.

## **Experimentální část**

2. Příprava rostlinného materiálu cestou SE u divokého typu a transgenních linií vojtěšky exprimujících GFP-MMK2.
3. Fenotypová analýza transgenních linií v kontrolních podmínkách (délka kořenového systému, rychlost růstu, tvorba kořenových vlásků; velikost a morfologie listů).
4. Fenotypová analýza transgenních linií po ošetření se *Sinorhizobium meliloti* (tvorba infekčních vláken, počet, morfologie a velikost hlízek).

# 1 ÚVOD

Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.) je považována za celosvětově nejvýznamnější rostlinu. Náleží mezi bobovité dvouděložné rostliny. *M. sativa* je pomocí symbiotických bakterií schopna fixovat vzdušný dusík, a tím překonat jeden z hlavních faktorů omezující růst rostlin - nedostatek dusíku v půdě.

Nejnámější rody bakterií fixující vzdušný dusík jsou *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* a *Sinorhizobium*. Rhizobia tvoří na kořenech rostlin specializované orgány – hlízky (noduly), ve kterých dochází k přeměně atmosférického dusíku na amoniak. Bakterie tedy poskytují rostlině sloučeniny bohaté na dusík, a naopak rostlina dodává bakteriím zdroje uhlíku a energie ve formě sacharidů. Vznik symbiotického vztahu zahrnuje výměnu signálních molekul mezi rostlinou a bakterií, a aktivaci signálních transdukčních drah. Při tomto procesu hrají roli i mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), které jsou aktivovány brzy po rhizobiální infekci.

MAPK dráhy představují evolučně konzervovaný signální mechanismus u eukaryot. Prostřednictvím tří typů reverzibilně fosforylovaných kináz: MAPK kinázy kinázy (MAPKKK), MAPK kinázy (MAPKK) a MAP kinázy (MAPK), přenášejí a zesilují signály, které vedou k fosforylaci substrátových proteinů. Signalizace pomocí MAPK kaskád tak může vést k různým buněčným odpovědím, jako je diferenciací, buněčné dělení nebo stresové odpovědi. U rostlin hrají MAPK roli ve vývoji, dělení a působení hormonů. Podílejí se také na signalizaci biotických a abiotických stresů, včetně chladu, sucha a poranění a při interakcích rostliny s patogenem.

Cíl experimentální části bakalářské práce zahrnoval přípravu rostlin divého typu a transgenních linií *M. sativa* nepřímou somatickou embryogenezí. Získané rostliny byly v dalších částech práce využity na fenotypovou charakterizaci. Porovnán byl vývoj jednotlivých linií v kontrolních podmínkách, následně byly sledovány interakce těchto linií se symbiotickými bakteriemi *S. meliloti*. Díky expresi GFP-MMK2 bylo také pozorováno zapojení této MAPK do vývoje infekčních vláken a hlízek.

## 2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

### 2.1 Vojtěška setá

Vojtěška setá neboli alfalfa, latinsky *Medicago sativa* L., je nejvýznamnější a nejrozšířenější luštěninou po celém světě. Náleží mezi bobovité dvouděložné rostliny. Mezi její hlavní charakteristiky patří cizosprašnost a tetraploidní genom. Právě kvůli těmto vlastnostem je její výzkum náročný. Proto se jako modelová rostlina pro čeleď bobovité využívá blízce příbuzná *Medicago truncatula*, která je samosprašná a diploidní (Tichá *et al.*, 2020; Küster, 2013). Význam vojtěšky spočívá zejména v její genetické variabilitě a následné schopnosti přizpůsobit se různým podmínkám prostředí. Hluboký silně vyvinutý kořen umožňuje vojtěšce odolávat suchu a vysokým teplotám. Díky vysokým výnosům biomasy hraje důležitou roli při produkci biopaliv. Vzhledem k vysokému obsahu proteinů, vitamínů a mikroprvků, nezbytných pro správný růst a vývoj, je základní složkou krmiv pro hospodářská zvířata (Radovic *et al.*, 2009). *M. sativa* je pomocí symbiotických bakterií schopna fixovat vzdušný dusík, a tím překonat jeden z hlavních faktorů omezující růst rostlin - nedostatek dusíku v půdě (Checcucci *et al.*, 2016). Zároveň se eliminuje potřeba využívat chemické doplňky dusíku (Radovic *et al.*, 2009).

### 2.2 Mitogenem aktivované protein kinázy

Mitogenem aktivované protein kinázové (MAPKs) dráhy představují evolučně konzervovaný signální mechanismus u eukaryot (Ichimura *et al.*, 2002). Prostřednictvím tří typů reverzibilně fosforylovaných kináz, MAPK kaskády přenášejí a zesilují signály, které vedou k fosforylaci substrátových proteinů (Rodriguez *et al.*, 2010). Signalizace pomocí MAPK kaskád tak může vést k různým buněčným odpovědím, jako je diferenciace, buněčné dělení nebo stresové odpovědi. U rostlin hrají MAPK roli ve vývoji, dělení a působení hormonů. Podílejí se také na signalizaci biotických a abiotických stresů, včetně chladu, sucha a poranění a při interakcích rostliny s patogenem (Šamajová *et al.*, 2013a, b).

MAPKs jsou součástí fosforylační kaskády, která se skládá ze tří postupně aktivovaných kináz: MAPK kinázy kinázy (MAPKKK), MAPK kinázy (MAPKK) a MAP kinázy (MAPK) (Rodriguez *et al.* 2010; Šamajová *et al.* 2013a, b; Komis *et al.* 2018). Signalizace začíná u receptorů na plazmatické membráně, které po reakci na vnější

podnět aktivují serin/threonin proteinové kinázy - MAPKKK. Ty následně fosforylují, a tím aktivují MAPKK, pro které je charakteristická duální specifita, která jim umožňuje fosforylaci MAPK na threoninových a tyrosinových zbytcích TXY motivu. Aktivované MAPK následně regulují různé efektorové proteiny, kinázy, enzymy nebo transkripční faktory. Deaktivace a regulace aktivity MAPK jsou zprostředkovány tyrosin a serin/threonin specifickými fosfatázami (Rodriguez *et al.*, 2010; Kiegerl *et al.*, 2000).

Důležitou roli hrají MAPK také v imunitě rostlin. Do obrany proti mikrobiálním peptidům jsou zahrnuty transmembránové receptory (PRR – pattern recognition receptors), které rozpoznávají molekulární vzory asociované s patogenem (PAMP – pathogen-associated molecular patterns). PAMP spouští obranné reakce, mezi které se řadí změna v genové expresi patogenu a produkce antimikrobiálních sloučenin. Jednou z nejlépe charakterizovaných PRR u rostlin je FLS2 – receptor na flagellin (flg22) (Rodriguez *et al.*, 2010).

Stanovení aktivity kináz se provádí měřením fosforylace určitých substrátových proteinů, které obsahují serin-prolin nebo threonin-prolin fosforylační místa. Nejčastěji využívaným substrátem ve fosforylačních reakcích je myelinový bazický protein (MBP). MBP může být použit *in vitro* nebo zavedením kináz do polyakrylamidové matrice. Množství radioaktivně značeného ATP, kvantifikovaného v opakovaných experimentech, je mírou fosfotransferové aktivity kinázy. Pro zajištění specifity testů může být provedeno pročištění zájmové kinázy – imunoprecipitace (Rodriguez *et al.*, 2010).

Aktivaci MAPK lze detekovat pomocí protilátek specifických pro stav fosforylace. Takové protilátky se mohou vyrábět například naočkováním králíků syntetickým fosfo-peptidem, který odpovídá zbytkům v okolí TXY motivu. Cílem je získat činidlo, které se bude vázat pouze na jeden fosfo-epitop, a následně bude detekovat, zda je daný protein fosforylován na určitém zbytku (nebo zbytcích, za předpokladu, že jsou blízko sebe, jako Tyr a Thr v aktivační smyčce MAPK). Příkladem jsou anti-fosfo-ERK protilátky, konkrétně „Phospho-p44/p42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) protilátka“ a anti-fosfo-p38 protilátky „Phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182) (Bardwell & Shah, 2006).

### **2.2.1 Signalizace mitogenem aktivovaných protein kináz v interakci se symbiotickými bakteriemi**

Mnohé buněčné reakce na vnější podněty jsou zpracovávány a řízeny fosforylací proteinů. Nejvýznamnějšími regulátory buněčných procesů v rostlinách jsou signální

kaskády zprostředkované MAPK (Komis *et al.*, 2018). Dále jsou proteinové kinázy zapojené do interakcí mezi luštěninami a symbiotickými bakteriemi, a také do vývoje kořenových hlízek (Grimsrud *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2020). Tyto symbiotické interakce, díky kterým dochází k fixaci dusíku, jsou zkoumány u několika luštěnin jako *M. truncatula*, *Lotus japonicus* a *M. sativa*. U vojtěšky je ovšem řízení symbiotických reakcí a zapojení MAPK signalizace do vývoje hlízek stále málo objasněné.

Důležitou roli v počátku symbiotické signalizace a tvorby hlízek u *L. japonicus* hraje MAPK kináza SIP2, která interaguje s kinázou podobnou symbiotickému receptoru (SymRK) (Chen *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že *LjMPK6* je cílem fosforylace SIP2, a že signalizační modul SymRK-SIP2-LjMPK6 je nezbytný pro organogenezi hlízek u *L. japonicus* (Yin *et al.*, 2019). RNA interference (RNAi) v *LjMPK6* způsobila sníženou tvorbu hlízkových primordií, zatímco jeho nadexprese podpořila iniciaci infekčních vláken, primordií i tvorbu hlízek. Dále byla pomocí histochemické analýzy zjištěna aktivita *LjMPK6* v kořenových vláscích a hlízkových primordií v brzkých i pozdních stádiích rhizobiální infekce.

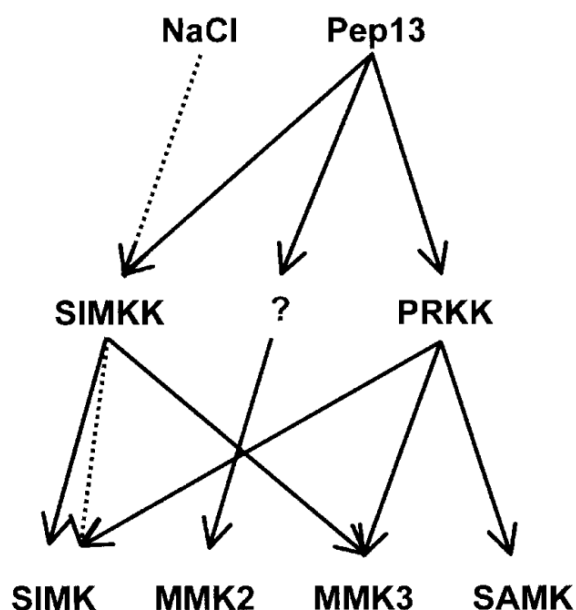
Chen *et al.* (2017) identifikovali MtMAPKK4 u *M. truncatula* jako sekvenčně podobnou LjSIP2. MtMAPKK4 se podílí na regulaci různých vývojových procesů a na tvorbě kořenových hlízek. Interaguje s downstream MtMAPK3 a MtMAPK6 partnery, které jsou aktivovány MtMAPKK5. Stresem aktivovaný signalizační modul MtMAPKK5-MtMAPK3/6 má negativní vliv na ranou interakci *M. truncatula* se symbiotickými půdními bakteriemi, což způsobuje snížení tvorby hlízek (Chen *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2017).

Další shodu v sekvenci aminokyselin s LjSIP2 vykazuje z 88 % SIMKK z *M. sativa* (Chen *et al.*, 2012). SIMKK (stresem indukovaná MAPKK) je zodpovědná za aktivaci SIMK při solném stresu (Cardinale *et al.* 2000; Kiegerl *et al.*, 2000). SIMK je aktivována také během tvorby kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002) a má schopnost ovlivnit vývojové procesy při symbiotických interakcích (Hrbáčková *et al.*, 2021). Při nadexpresi SIMK vznikají delší kořenové vlásky a je podpořena tvorba infekčních vláken a hlízek, zatímco po downregulaci dochází k vývoji kratších kořenových vlásků a ke snížení počtu infekčních vláken i hlízek (Hrbáčková *et al.*, 2021). Použitím zobrazovací metody založené na LSFM (light sheet fluorescence microscopy) bylo odhaleno spojení SIMK s rhizobiální internalizací a akumulací v infekčních kapsách a vláknech. V prvních fázích symbiotických interakcí však zůstává role SIMK neobjasněná (Hlaváčková *et al.*, 2023).

### 2.2.2 Mitogenem aktivované protein kinázy u *M. sativa*

Fosforylační kaskáda zprostředkovaná MAPKs hraje zásadní roli v buněčné signalizaci rostlin. Navzdory tomu signální kaskáda MAPK však zůstává v luštěninách stále nedostatečně charakterizována. MAPK aktivované patogenními elicitory u vojtěšky jsou MMK3 a MMK2. Dalšími MAPK, které se zapojují do odpovědi na patogenní stimuly a abiotické stresy, jsou SIMK a SAMK (Cardinale *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že odpověď na elicitory a solný stres zprostředkovává SIMKK. V případě solného stresu SIMKK aktivuje SIMK a po ošetření elicitorem aktivuje SIMK i MMK3. Naopak PRKK (pathogen-responsive protein kinase kinase) přenáší pouze elicitorový signál a aktivuje tak SIMK, SAMK a MMK3. Avšak MAPKK, zodpovědná za aktivaci MMK2 vyvolanou elicitorem, zatím nebyla identifikována (Obr. 1) (Cardinale *et al.*, 2002).

Analyzována byla také role protein kináz v kořenech vystavených stresu z těžkých kovů. Konkrétně byl testován vliv vysoké hladiny měďnatých a kademnatých iontů. Měď je za optimálních podmínek důležitá pro růst a vývoj rostlin, ale při vyšších koncentracích způsobuje nadměrnou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Mir *et al.*, 2021). Kadmium, je z důvodu své reaktivity a schopnosti inaktivovat různé enzymatické reakce, považováno za toxické pro všechny živé buňky (Hussain *et al.*, 2022). Při zvýšeném množství měďnatých iontů došlo k aktivaci SIMK, SAMK, MMK3 a MMK2. Zatímco aktivace SIMK a SAMK byla zprostředkována SIMKK, aktivátor MMK3 a MMK2 nebyl odhalen. Ani v reakci na kademnaté ionty nebyla MAPKK způsobující aktivaci SIMK, SAMK, MMK3 a MMK2 identifikována (Jonak *et al.*, 2004).



Obr. 1: Konvergence a divergence signálů vyvolaných solí a elicitory na úrovni MAPKK. Zdroj: (Cardinale *et al.*, 2002).

### 2.3 Symbiotické bakterie

Bakterie fixující dusík symbiózou s luštěninami patří do různých skupin  $\alpha$ - a  $\beta$ -proteobakterií souhrnně nazývaných rhizobia. Mnoho  $\alpha$ -proteobakterií dlouhodobě interaguje s vyššími eukaryoty. Může se jednat o kolonizaci na povrchu, fakultativní symbiotické vztahy anebo vnitrobuněčné patogeny a endosymbionty (Maróti & Kondorosi, 2014). Ze vzájemných interakcí mají určitým způsobem prospěch mikroby i rostlina. Prospěšné bakterie pomáhají rostlinám vstřebávat živiny důležité pro metabolismus a podporu obranných reakcí (Tichá *et al.*, 2020). Jedním z takovýchto procesů je fixace dusíku pomocí hlízek (nodulů), která se vyvinula u několika linií luštěnin, ale ne všechny jsou schopny této symbiózy. Dodnes bylo objeveno 12 000 luštěnin tvořících hlízky, z nichž každá má svého rhizobiálního partnera (Maróti & Kondorosi, 2014). Jelikož jsou luštěniny i rhizobiální bakterie fylogeneticky rozmanité, žádný z rhizobiálních kmenů nemůže symbiotizovat se všemi luštěninami a naopak. Specificita se vyskytuje jak na úrovni druhu, tak na úrovni genotypu. Může se projevit již v raných fázích infekce, kdy stejné bakteriální kmeny mohou infikovat a spustit tvorbu hlízek u jedné hostitelské rostliny, ale u jiné ne. Často, se ale inkompatibilita projeví, až v pozdější fázi vývoje hlízek, tudíž se efektivita fixace dusíku u různých kombinací rostliny a bakterie výrazně liší (Wang *et al.*, 2012, 2017, 2018; Yang *et al.*, 2017). Symbiotická specificita je výsledkem měnících se signálů

na straně hostitelské rostliny i na straně bakterií. V průběhu adaptačních procesů se tak zároveň musejí vyvíjet i různé rozpoznávací mechanismy. Znalost genetických a molekulárních základů symbiotické specifity je tak důležitá pro vývoj technik genetické manipulace s cílem zvýšit účinnost fixace dusíku (Wang *et al.*, 2018).

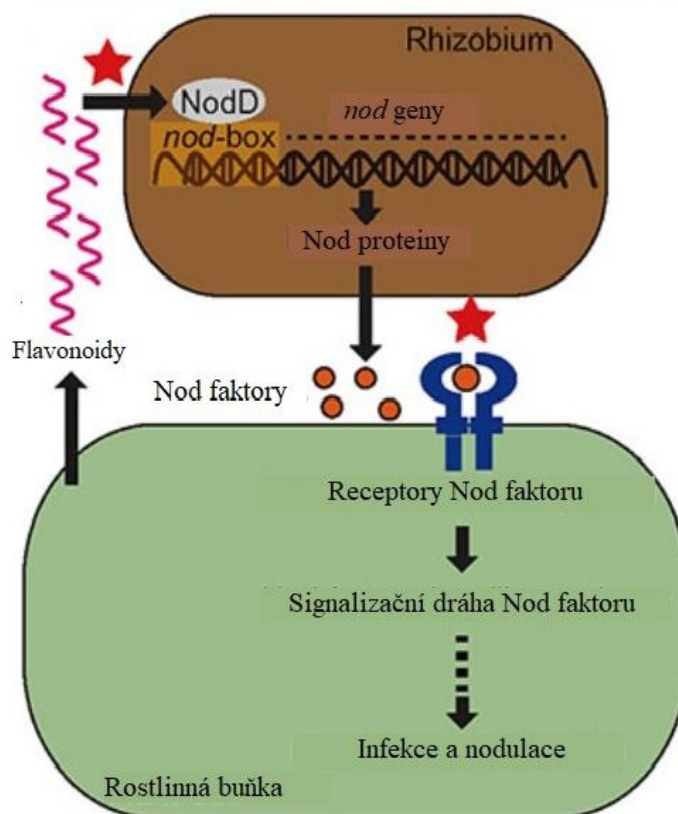
Vzhledem k nedostatku dusíku v půdě si luštěniny vybudovaly schopnost provádět symbiotické interakce s půdními bakteriemi fixujícími dusík. Nejčastěji jsou to bakterie z rodu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* a *Sinorhizobium*, které mohou redukovat atmosférický dusík na amoniak ve specializovaných orgánech, kořenových hlízkách. Zabezpečují tak až 60 % z celkové nutriční spotřeby dusíku hostitelských rostlin. Zároveň jsou poté luštěniny schopné zpět dodávat fixovaný dusík do půdy s deficitem minerálního a organického dusíku. Díky tomu hrají luštěniny zásadní roli v přírodních a zemědělských ekosystémech (Roy *et al.*, 2020; Tichá *et al.*, 2020).

### 2.3.1 Signalizace symbiotických procesů

Interakce vojtěšky a rhizobií je velmi citlivý a regulovaný proces, který vyžaduje velké množství energie. Symbiotické procesy jsou zahájeny rostlinou až při deficitu dusíku. Za těchto podmínek kořeny luštěnin vylučují do rhizosféry flavonoidní sloučeniny. Rhizobia je rozpoznávají jako signály, a po aktivaci exprese nodulačních genů (*nod*), spouští syntézu lipochitoooligosacharidového (LCO) signálu neboli nodulačního (Nod) faktoru (Oldroyd *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). Nod faktory informují rostlinu o potenciálním prospěšném symbiontovi. Následně jsou rozpoznány rostlinnými receptory a spouští sérii reakcí vedoucích k vývoji hlízek (Obr. 2) (D'Haese & Holsters, 2002).

Expese genu *nod* je indukována NodD proteiny prostřednictvím jejich vazby na DNA motivy (*nod* boxy) (Wang *et al.*, 2018). Rhizobiální NodD proteiny jsou přizpůsobeny k rozpoznávání flavonoidů vylučovaných různými luštěninami, což slouží ke včasné kontrole symbiózy. Bylo prokázáno, že flavonoidy mohou stimulovat vazbu NodD proteinů na promotory *nod* genů u *Sinorhizobium meliloti* (Peck *et al.*, 2006).





Obr. 2: Signalizace u symbiózy a rostlinná imunita zapojená do rozpoznávání specifity v interakcích luštěniny a rhizobií (označeno červenými hvězdami). Upraveno dle: Wang *et al.*, 2018.

Flavonoidy vylučované kořeny rostlin fungují jako chemotaktické signály pro rhizobia v podmínkách nedostatku dusíku. Dosavadní znalosti o tom, jak mohou flavonoidy ovlivňovat okruh hostitelů pocházejí především z bakteriální genetiky, zatímco rostlinné geny jsou v tomto procesu méně prozkoumané. Ze složité směsi flavonoidních sloučenin, kterou kořeny rostlin produkují, je těžké stanovit, které z nich jsou důležitější a podílejí se tak na determinaci rozsahu hostitelů (Liu & Murray, 2016). Luteolin byl prvním identifikovaným flavonoidem schopným indukovat expresi *nod* genů v širokém spektru rhizobiálních kmenů, ale není specifický pro luštěniny. Naopak methoxychalkon je jedním z nejsilnějších infekčních signálů u *Medicago* a blízkce příbuzných luštěnin. Část flavonoidních sloučenin může také fungovat jako fytoalexiny a posilovat specifitu symbiózy (Liu & Murray, 2016).

Nod faktory jsou lipochitooligosacharidy obsahující  $\beta$ -1,4 vázaný N-acetyl-d-glukosaminový hlavní řetězec, jehož neredukující cukerná část je substituována acylovým řetězcem (Dénarié *et al.*, 1996). Jsou základní signální složkou pro rozvoj symbiózy u většiny luštěnin. Strukturní variace Nod faktorů jsou klíčové pro určení

rozsahu hostitelů, jelikož tyto faktory musí být hostitelem rozpoznány pro zahájení infekce a nodulace (D'Haese & Holsters, 2002). Nod faktory jsou rozpoznávány receptory Nod-faktoru, což jsou receptorové kinázy obsahující doménu LysM. U *M. truncatula* byly identifikovány dva receptory Nod-faktoru, MtLYK3 (LYSIN MOTIF KINASE) a MtNFP (NOD FACTOR PERCEPTION) (Smit *et al.*, 2007). Rostliny s absencí genu *LYK3* nebyly schopny vytvořit infekční vlákna (IT), čímž byla potvrzena role této kinázy jako vstupního receptoru (Limpens *et al.*, 2003).

Pro vytvoření symbiotických vztahů jsou kromě Nod faktorů důležité i povrchové rhizobiální polysacharidy, jako exopolysacharidy, lipopolysacharidy a kapsulární polysacharidy. Předpokládá se, že tyto povrchové složky jsou schopny potlačit obranu rostlin, ale jejich role v průběhu bakteriální infekce zůstává nejasná (Wang *et al.*, 2018). V některých případech se však ukázalo, že exopolysacharidy jsou v mnoha rhizobiálních infekcích nezbytné. Například u symbiocy *Sinorhizobium-Medicago* je hlavním exopolysacharidem sukcinoglykan produkovaný *S. meliloti*, který je vyžadovaný pro iniciaci a prodloužení infekčních vláken (Cheng & Walker, 1998).

### 2.3.2 Organogeneze hlízek

Připojením rhizobií ke kořenovým vláskům dochází k jejich stočení, díky kterému jsou bakterie zachyceny v tzv. infekčních kapsách. Následnou invaginací plazmatické membrány vzniká v těchto kapsách infekční vlákno, které obsahuje množící se bakterie (Roy *et al.*, 2020). Současné dělení buněk v kůře a pericyklu kořene způsobí organogenezi hlízek v úspěšně infikovaných buňkách (Xiao *et al.*, 2014). Organogeneze hlízek je řízena třemi odlišnými procesy, které probíhají současně: kolonizace bakteriemi, vznik hlízek a autoregulace počtu hlízek. Luštěniny jako *M. truncatula* a *M. sativa* mají trvalé nodulové meristémy, které vytvářejí protáhlé, někdy vícelaločné, nedeterminované noduly. Naopak determinované noduly jsou kulovité a tvořené přechodně aktivními meristémy u druhů *Phaseolus vulgaris* a *L. japonicus* (Roy *et al.*, 2020; Maróti & Kondorosi, 2014).

Když se kořenové vlásky stočí, zachytí kompatibilní rhizobia a vytvoří se infekční vlákna pro transport bakterií do pletiv kořene. Kortikální a pericyklové buňky se začínají znovu dělit a spouští tak tvorbu nodulových primordií a vaskularizaci (Oldroyd *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2013). Vývoj determinovaných i nedeterminovaných typů nodulů je zahájen buněčným dělením v pericyklu. Nedeterminované noduly ale následně vznikají

z vnitřní kůry a noduly determinované ze střední a vnější kůry (Hadri *et al.*, 1998). Pletivo hlízek se skládá z vnějšího kortexu, kortikální endodermis, cévních svazků a vnitřní kůry, která obsahuje hlavní, většinou infekční zónu. U zralých nedeterminovaných hlízek je tato oblast rozčleněna do vývojových zón: meristém (zóna I), infekční zóna (zóna II), zóna fixace dusíku (zóna III) a zóna senescence (IV). Zralé determinované hlízky se skládají pouze ze zóny fixace dusíku a případně zóny senescence. Tvorba jednotlivých pletiv a zón u hlízek je výsledkem postupných antiklinálních a periklinálních dělení v pericyklu, endodermis a kortikálních vrstvách (Xiao *et al.*, 2014).

### 2.3.3 Regulace vývoje hlízek

Dlouho známými regulátory organogeneze hlízek jsou rostlinné hormony, zejména auxiny a cytokininy. Jejich koncentrace a poměr určují, kde a kdy se buňky dělí. Cytokininy regulují dělení buněk, které vede k tvorbě nodulových primordií a jejich signály jsou vnímány především cytokininovým receptorem MtCRE1 (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007; Tirichine *et al.*, 2007). Mezi přímé cíle cytokininové signalizace patří MtNSP2 a MtbHLH476, oba pozitivně regulující organogenezi hlízek (Ariel *et al.*, 2012). Biosyntéza cytokininů je zprostředkována isopentenyltransferázou a homeostázu během vývoje nodulů zajišťuje cytokininem aktivovaný enzym ribosid 5'-monofosfát fosforibohydrolasa (Mortier *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2016).

Přestože jsou geny auxinové odpovědi indukované v místech iniciace determinovaných i nedeterminovaných hlízek, inhibice polárního transportu je důležitá pouze pro vývoj nedeterminovaných hlízek (Ng & Mathesius, 2018). Auxinové exportéry PINFORMED u *Medicago*: PIN2, PIN3 a PIN4 a auxinový importní přenašeč LIKE AUXIN (LAX2) podporují organogenezi hlízek (Huo *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2017). Transkripční regulace vývoje nodulů vyvolaná auxinem je také řízena transkripčním faktorem MtbHLH1 (Godiard *et al.*, 2011). Na auxinové signalizaci se u *M. truncatula* podílí MtCDC16 (CELL DIVISION CYCLE). Kořeny transformované konstruktem *CDC16* RNAi vykazovaly sníženou citlivost k auxinu, defektní růst primárních kořenů a menší počet postranních kořenů. V reakci na *S. meliloti* poté vykazovaly kořeny *Mtcdc16i* téměř čtyřnásobný nárůst počtu nodulů, což naznačuje, že snížená citlivost na auxin vede k fenotypu hypernodulace (Kuppusamy *et al.*, 2009).

Organogeneze nodulů je mimo jiné kontrolována i transkripčními faktory. Některé mohou být aktivovány protein kinázou závislou na vápníku (CCaMK). Její stimulace je

závislá na oscilaci koncentrace vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ), které reagují na signalizaci Nod faktory. Katalytická aktivita CCaMK je řízena volnými nebo na kalmodulin (CaM) vázanými ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , čímž může převádět oscilační signál  $\text{Ca}^{2+}$  na fosforylaci proteinů (Yano *et al.*, 2008). CCaMK u *L. japonicus*, jejíž ortologem je DMI3 (DOES NOT MAKE INFECTION) u *M. truncatula*, fosforyluje LjCYCLOPS a v případě *M. truncatula* IPD3. Tím je aktivována exprese transkripčního faktoru NIN (Nodule Inception), což vede k tvorbě infekčních vláken a vzniku hlízek (Yano *et al.*, 2008).

Tvorba IT a vývoj nodulů u *Medicago* je závislá také na ethylenovém faktoru ERN1 (REQUIRED FOR NODULATION 1). Bylo zjištěno, že mutanti *Mtern1*, tvořili infekční kapsy s omezenou schopností buněk se dělit, a následně tak produkovali prázdné nodulové výběžky (Middleton *et al.*, 2007). ERN1 je podobně jako NIN aktivován komplexem CCaMK/CYCLOPS (Cerri *et al.*, 2017; Kawaharada *et al.*, 2017) a reguluje expresi ENOD11 a ENOD12 (EARLY NODULATION), které asociují s buněčnou stěnou a jsou klíčové pro vývoj IT (Andriankaja *et al.*, 2007). Blízkým homologem ERN1 je ERN2, po jehož mutaci dochází k tvorbě nodulů, avšak se známkami předčasného stárnutí. Dvojití mutanti *ern1-1* a *ern2-1* nebyli schopni iniciovat infekci ani vývoj hlízek. ERN1 a ERN2 společně působí v epidermis kořene, ale pouze ERN1 umožňuje vývoj zralých nodulů. Oba tyto faktory tedy hrají klíčové role v nejranějších fázích vývoje hlízek (Cerri *et al.*, 2016).

### 2.3.4 Tvorba symbiozomů

Když se IT dostane do kortexu vyvíjejícího nodulu, rozvětví se a uvolní bakterie do rostlinných buněk prostřednictvím infekčních „kapiček“ bez buněčné stěny, což vede ke vzniku jedinečné „organely“ zvané symbiozom. Bakterie uvnitř symbiozomů rostou a dělí se, dokud nezaplňují rostlinnou buňku tisíci symbiozomů obsahujícími několik bakterií (Roth & Stacey, 1989).

Předpokládalo se, že k tvorbě symbiozomů dochází endocytickým procesem, avšak nedávné genetické studie ukázaly, že se na tomto procesu podílí i exocytotická (sekreční) dráha, která dopravuje membránové vezikuly do cytoplazmatické membrány (Limpens *et al.*, 2009). Fúzi membrán během exocytózy zajišťují komplexy SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), které se dělí na dva typy: v-SNARE (lokalizované na membráně vezikul) a t-SNARE (lokalizované v cílové membráně). Downregulace dvou genů v-SNARE u *M. truncatula*, *MtVAMP721d*

a *MtVAMP721e* (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN), zablokovala uvolňování bakterií z IT a tvorbu symbiozomů, aniž by ovlivnila vývoj nodulů. Oba tyto geny jsou lokalizovány v místech uvolňování bakterií a na membráně symbiozomů (Ivanov *et al.*, 2012). Další z *VAMP72* genů *M. truncatula*, *MtVAMP721a*, se může podílet na obraně rostlin, je potlačován transkripčním faktorem *MtRSD* (REGULATOR OF SYMBIOSOME DEVELOPMENT), a mutanti *Mtrsd* jsou defektní ve vývoji symbiozomů a fixaci dusíku (Sinharoy *et al.*, 2013).

V membráně symbiozomů se také nacházejí dva proteiny endocytické dráhy, *MtFLOT2/4* a *MtSYMREM1* (Haney & Long, 2010; Lefebvre *et al.*, 2010). RNAi *MtFLOT2/4* způsobila tvorbu malých bílých nodulů se sníženou schopností fixace dusíku, zatímco mutant *Mtsymrem1* byl defektní v uvolňování bakterií. *MtFLOT2/4*, *MtSYMREM1* a endocytóza se tedy mohou podílet na přenosu signálu a membránovém transportu souvisejícím s uvolňováním bakterií a vývojem symbiozomů. Zrání symbiozomů může být narušeno při knockdownu endosomální markerové GTPázy *MtRab7* (Ras-related protein in brain), což vede k předčasné senescenci nodulů (Limpens *et al.*, 2009).

Do diferenciaci symbiozomů je dále zapojen i cytoskelet, jehož hlavní rolí je nitrobuňkový transport. Během uvolňování bakterií a diferenciaci symbiozomů v hlízkách prochází aktin dynamickou přestavbou (Zhang *et al.*, 2019). RNAi *MtARP3* (ACTIN RELATED PROTEIN), kódující komponentu aktinového nukleačního komplexu potřebnou pro větvení aktinových vláken, narušila vývoj symbiozomů, což mělo za následek tvorbu malých, nefunkčních symbiozomů (Gavrin *et al.*, 2015).

## 2.4 Pletivová kultura

Pletivová kultura rostlin je technika, při níž se různé izolované části rostlin (explantáty) vyvíjejí *in vitro* za aseptických podmínek. Zahrnuje kultivaci explantátů (apikální stonkový a kořenový meristém, kalus, semeno, embryo, pylové zrno, vajíčko nebo dokonce jedna buňka), izolovaných z mateřské rostliny, na sterilním živném médiu, což vede ke množení buněk a regeneraci rostlin. První zmínky o pletivových kulturách rostlin pocházejí z počátku dvacátého století, kdy Gottlieb Haberlandt (Haberlandt, 1902) uskutečnil pokusy s kultivací mezofylových buněk na základě postulátů o "totipotenci rostlinných buněk" (Hasnain *et al.*, 2022). Za totipotentní se považují buňky, které

se mohou za specifických podmínek vyvinout do všech typů buněk organismu (Condic, 2014).

Rostlinné pletivové kultury hrají významnou roli v základním výzkumu v oblastech patologie rostlin fyziologie rostlin, metabolitů rostlin a ochrany přírody. Kromě toho je tato technika důležitá pro zachování biodiverzity rostlin vzhledem k rostoucím problémům s biotickými a abiotickými stresy. V tomto ohledu umožňují techniky *in vitro* zlepšovat různé znaky související s růstem a výnosem rostlin, které lze později využít pro jejich uchování *ex situ*. Účinné rostlinné sloučeniny získané ze vzácných nebo ohrožených druhů lze vyrábět technikami *in vitro* bez nepříznivých účinků na životní prostředí (Hasnain *et al.*, 2022).

Vývoj buněk a pletiv *in vitro* závisí na různých faktorech jako jsou: genotyp, rostlinný typ, věk a vývojové stadium explantátu, fyziologický stav rostliny a vnější prostředí, které zahrnuje složení média a fyzikální podmínky kultivace. Vzájemné působení těchto faktorů vede k indukci a expresi specifického buněčného dělení a vývoje (Gaj, 2004).

Bylo zjištěno, že odpověď vojtěšky na *in vitro* kultivaci je vysoce závislá na jejím genotypu. Přestože je u vojtěšky velmi dobře prostudovaný proces somatické embryogeneze (SE), patří mezi rostliny, u kterých je problém získat udržitelnou embryogenní kulturu (Sangra *et al.*, 2019).

#### **2.4.1 Somatická embryogeneze u *Medicago***

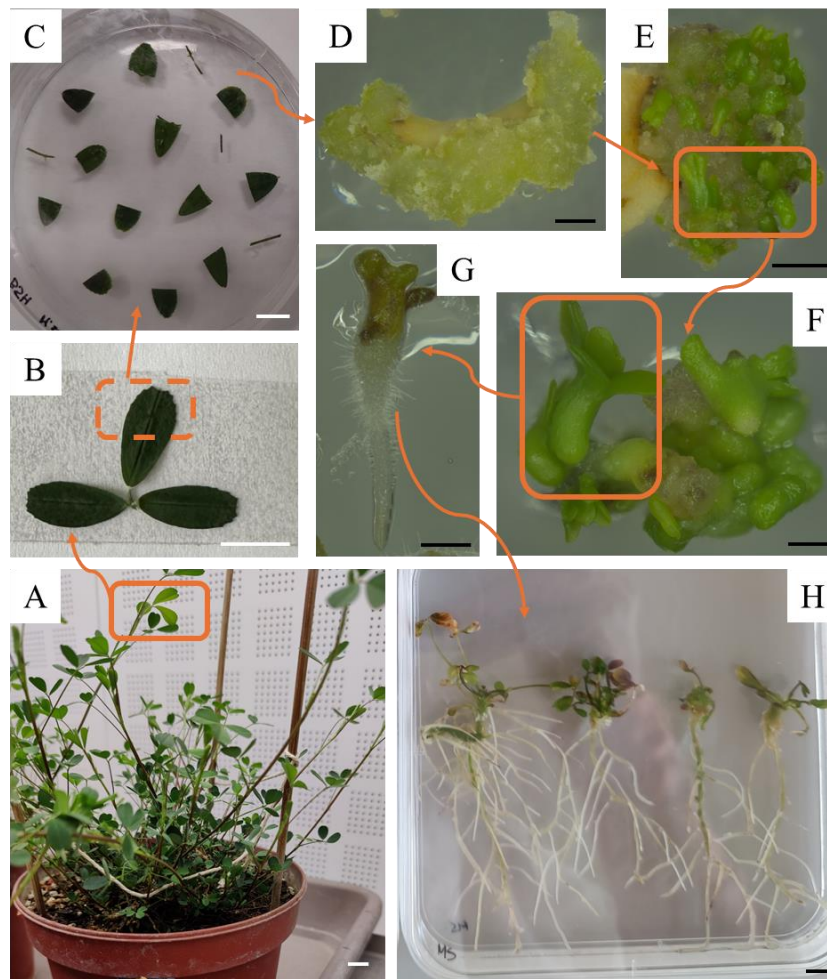
Poprvé byla popsána somatická embryogeneze (SE) u vojtěšky a dalších druhů *Medicago* Saundersem a Binghamem (1972). SE je regenerační proces, při kterém je v somatických buňkách v *in vitro* podmínkách indukován embryogenní potenciál. Jelikož je embryogenní potenciál vojtěšky nezávislý na typu explantátu, může být SE, na rozdíl od jiných druhů, navozena ze všech částí rostliny.

Somatická embrya jsou podobná zygotickým a procházejí vývojovými stádii charakteristickými pro zygotická embrya. Hlavním rozdílem je absence endospermu u somatických embryí, který zygotickým embryím poskytuje živiny a regulátory růstu. Tuto nevýhodu je tedy nutné kompenzovat vhodným složením kultivačních médií (Sangra *et al.*, 2019; Tichá *et al.*, 2020).

Vznik somatických embryí u *Medicago* v kulturách *in vitro* zahrnuje několik fází, z nichž každá je řízena souborem různých vnitřních (genotyp, typ explantátu) a vnějších faktorů (fyzikální – teplo, světlo, pH; chemické – makro- a mikroživiny, regulátory růstu,

cukry). Embrya mohou vznikat dvěma různými způsoby: přímo z preembryogenních determinovaných buněk (PEDC), např. embrya, nebo nepřímo z indukovaných embryogenních determinovaných buněk (IEDC), které původně embryogenní potenciál neměly (např. listy, explantáty řapíků), a proto vyžadují přeprogramování prostřednictvím růstových regulátorů (Kępczyńska & Kępczyński, 2023).

Proces SE vojtěšky zpravidla začíná z explantátu jako je plně vyvinutý list (Obr. 3A, B), který je nejprve povrchově sterilizován a následně rozřezán na menší části (Obr. 3C). Nepřímá SE zahrnuje tvorbu kalusu navozenou kombinací exogenních rostlinných hormonů (Obr. 3D). Následuje indukce embryogenních kalusů (Obr. 3E), a po jejich přenosu na kultivační média bez hormonů, také tvorba somatických embryí (Obr. 3F). Kompletně vyvinutá embrya jsou stimulována k vytvoření kořenů a výhonků (Obr. 3G), což vede k tvorbě celých rostlin kultivovaných *in vitro* (Obr. 3H), dokud nejsou vhodné k přenosu do *in vivo* podmínek. Dospělé rostliny rostoucí *in vivo* jsou schopné vyvíjet květy a produkovat semena, která dávají vzniknout dalším generacím rostlin (Tichá *et al.*, 2020).



Obr. 3: Schéma postupu nepřímé SE u *M. sativa*. Proces začíná výběrem mladých listů (A, B), které jsou po povrchové sterilizaci nařezány a umístěny na vhodné kultivační médium (C). Dalším krokem je tvorba kalusu na médiu obsahujícím hormony (D). Následuje indukce embryogenního potenciálu kalusu (E) a samotná tvorba somatických embryí (F) na médiu bez hormonů. Na médiu bohatém na vitamíny a aminokyseliny je indukováno klíčení embryí (G), které se po přenosu na MS médium vyvinou v kompletní rostliny (H). Měřítka = 1 cm (A, B, C, H), 2 mm (D, E), 1 mm (F, G).

Somatická embrya lze mimo jiné ihned po jejich získání a vysušení použít jako tzv. umělá semena (synseed; syntetická semena), která tvoří nezávadný a uniformní semenný materiál, který lze dlouhodobě skladovat bez ztráty klíčivosti. Získávání těchto semen se ukázalo jako nezávislé např. na nepříznivých klimatických podmínkách, které jsou překážkou pro získání plně životaschopného semenného materiálu; za vhodných podmínek mohou taková semena vyvinout funkční systémy výhonků a kořenů (Kępczyńska & Kępczyński, 2023).

Studium regulačních mechanismů v SE je klíčovou úlohou v biologii rostlin. Klonální množení prostřednictvím SE je široce používáno pro různé rostliny agronomického zájmu, jako je *Coffea* spp., *Pinus* spp., *Theobroma cacao* L. a další druhy, protože



usnadňuje množení elitních genotypů poměrně rychlým a účinným způsobem. Kromě toho se SE ve velké míře používá v protokolech pro genetickou transformaci těchto agronomických druhů a jiných plodin, jako jsou rýže, sója, kukuřice nebo pšenice. Protože účinnost transformace souvisí s embryogenní a regenerační schopností, je pochopení procesů SE velmi důležité (Salaün *et al.*, 2021).

#### **2.4.2 Kultivační média pro somatickou embryogenezi**

Nedostatek plně vyvinutých zralých somatických embryí a nízká úspěšnost transformace a vývoje v rostlinky jsou hlavními problémy regenerace somatických embryí u mnoha druhů *Medicago*. Vzhledem k tomu, že somatická embrya postrádají endosperm, je důležité zajistit pro ně živiny a růstové regulátory vhodným složením kultivačních médií. Kultivační média mohou být obohacena o přírodní organické látky s obsahem aminokyselin, vitaminů a některých růstových regulátorů, které podporují růst, regeneraci a SE rostlin. Takovými organickými látkami mohou být například extrakt z kvasnic, hydrolyzát kaseinu, kokosová voda a extrakt ze sinic (Amini *et al.*, 2016).

Indukce SE, stejně jako organogeneze a regenerace rostlin, závisí na přidání rostlinných růstových regulátorů, jako jsou auxiny a cytokininy. Ačkoli je dostupných mnoho protokolů, o indukci SE, přizpůsobených různým druhům a genotypům, klíčovým prvkem pro tvorbu embryí je rozsáhlá variace v koncentracích regulátorů růstu přidávaných do kultivačních médií. Většina protokolů je založena na použití auxinů, samotných nebo kombinovaných s cytokininy (Salaün *et al.*, 2021).

Obecně je známo, že predispozice k SE je geneticky řízena a je zprostředkována skutečným ontogenetickým stavem výchozích explantátů (cytologický, fyziologický, biochemický stav), které reagují na specifický indukční signál. U většiny rostlinných druhů, včetně druhů *Medicago*, je takovým signálem auxin, především syntetická kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). Mezi další syntetické auxiny patří kyselina 1-naftalenoctová (NAA), kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T) a kyselina 2-(2,4-dichlorfenoxy)-propanová, u kterých bylo prokázáno, že jsou účinné při indukci SE u druhů *Medicago*. V závislosti na rostlinném systému mohou být vyžadovány také cytokininy, regulátory odpovědné za dělení rostlinných buněk, pro uskutečnění embryogeneze v kulturách vojtěšky, včetně *M. sativa* a *M. truncatula*. K indukci embryí se spolu s auxiny používají především syntetické cytokininy jako je kinetin, méně často 6-benzyladenin (BA) a 6-benzylaminopurin (BAP). Kinetin používaný během indukční

fáze významně zvyšuje produkci embryí na médiu pro diferenciaci. K indukci SE u *M. truncatula* se používá především BAP nebo přirozený cytokinin, zeatin. Význam exogenních stimulantů, jako jsou auxiny a cytokininy, běžně používaných ve formě jejich syntetických analogů, byl při indukci SE u *Medicago* již rozsáhle prostudován. Nicméně znalosti o úloze endogenních rostlinných růstových fytohormonů, jako jsou stimulatory růstu gibereliny (GA) a IAA, a inhibitory růstu, jako je kyselina abscisová (ABA), kyselina jasmonová (JA) a ethylen, přítomných ve výchozích explantátech a pletivech během různých fází SE u *Medicago* byly popsány pouze v několika vědeckých publikacích (Meijer & Brown, 1987; Nolan *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1995; McKersie & Brown, 1996; Araújo *et al.*, 2004; Iantcheva *et al.*, 2014; Kępczyńska & Kępczyński, 2023).

Ošetření neindukovaných kalusů vojtěšky různými organickými kyselinami, před indukcí embryí pomocí 2,4-D, mělo za následek snížení růstu a změnu morfologie kalusu a způsobilo zvýšení produkce embryí. Embrya, která vznikla z takto ošetřených kalusů, vykazovala přirozenější morfologii než ta, pocházející z neošetřených kalusových buněk. Dále díky ošetření organickými kyselinami došlo k procentuálnímu zvýšení počtu dospělých rostlin. Bylo zjištěno, že účinek citrátu draselného na stimulaci embryogeneze lze zvýšit přidáním aminokyselin, jako je prolin nebo glutamin, do média. Avšak samostatné ošetření organickými kyselinami nemůže nahradit silný auxinový efekt kyseliny 2,4-D nutný na indukci kalusu (Nichol *et al.*, 1991).

### 2.4.3 Transgenní linie u rodu *Medicago*

Podobně jako u mnoha jiných plodin je genetické inženýrství jedním z významných procesů pro úpravu a vylepšení vlastností vojtěšky. Důležitý je proto vývoj účinných metod genetické transformace pro různé odrůdy vojtěšky. *M. sativa* byla průkopnickým rostlinným druhem, u kterého byla vyvinuta SE, a také genetická transformace. Biotechnologický výzkum vojtěšky tak v posledních letech zaznamenává významný pokrok (Liu *et al.*, 2018; Hrbáčková *et al.*, 2020).

Pro zlepšení využití organického fosfátu byly ve vojtěšce nadměrně exprimovány dva geny z *Medicago truncatula*, fytáza (*MtPHY1*) a purpurová kyselá fosfatáza (*MtPAP1*), oba pod kontrolou konstitutivního promotoru *CaMV35S* a promotoru *MtPT1* specifického pro kořen. Expres obou genů vedla k podobným úrovním aktivit kyselé fosfatázy, avšak nadměrná exprese genu *MtPHY1* vyvolala vyšší úroveň fytázové aktivity než

nadměrná exprese genu *MtPAP1*. Rostliny s vysokými hladinami exprese transgenu vykazovaly zlepšený růst ve srovnání s kontrolou (Ma *et al.*, 2012).

Ve snaze zvýšit toleranci vojtěšky vůči suchu byl transformován gen *Arabidopsis Enhanced Drought Tolerance 1 (AtEDT1)* do vojtěšky prostřednictvím transformace zprostředkované *Agrobacterium*. Ve srovnání s rostlinami divého typu vedlo působení stresu suchem k vyššímu přežití, tvorbě biomasy a ke snížení ztrát vody v transgenních rostlinách. U transgenních rostlin vojtěšky došlo ke zvětšení průduchů, a zároveň ke snížení jejich hustoty, což výrazně přispělo ke snížení ztráty vody z listů. Významným zjištěním bylo, že transgenní rostliny vojtěšky vykazovaly větší kořenové systémy s větší délkou kořenů, hmotností kořenů a průměry kořenů než rostliny divého typu. Transgenní rostliny měly sníženou membránovou permeabilitu a obsah malondialdehydu, ale vyšší obsah rozpustného cukru a prolinu, vyšší aktivitu superoxiddismutázy, vyšší obsah chlorofylu a zvýšenou expresi genů reagujících na suchu, ve srovnání s rostlinami divého typu (Zheng *et al.*, 2017).

Charakterizovány byly také produkční parametry transgenních rostlin vojtěšky s geneticky modifikovanou SIMK po infekci *S. meliloti*. Linie *SIMKK RNAi*, způsobující silnou downregulaci *SIMKK* i *SIMK*, vykazovaly snížený růst kořenových vlásků a schopnost tvorby infekčních vláken a hlízek. Naopak konstitutivní nadměrná exprese *SIMK* značené GFP podporovala růst kořenových vlásků a shlukování infekčních vláken a hlízek. Dále snížení exprese *SIMKK* a *SIMK* vedlo ke snížení biomasy nadzemních částí rostlin, zatímco nadměrná exprese GFP-*SIMK* vedla k jejímu zvýšení (Hrbáčková *et al.*, 2021).

V práci Hlaváčková *et al.* (2023) byly pro charakterizaci distribuce *SIMK* v kořenových vláscích infikovaných *S. meliloti* také použity stabilní transgenní linie vojtěšky s geneticky upravenou abundancí a aktivitou kinázy *SIMK*. Bylo zjištěno, že na rozdíl od linie s nadměrnou expresí GFP-*SIMK*, kde byla aktivovaná *SIMK* silně akumulována kolem infekčních kapes a IT, transgenní linie *SIMKK RNAi* vykazovala výrazně sníženou akumulaci. Počet vytvořených IT v transgenní linii *SIMKK RNAi* byl tak významně nižší, což naznačuje význam aktivované *SIMK* v infekčních kapsách. Ta je dále nutná pro správnou tvorbu IT (Hlaváčková *et al.*, 2023).

Předchozí studie prokázaly, že nadměrná exprese genů souvisejících se stresem vedla ke zvýšené toleranci vojtěšky vůči stresu ze soli. Li *et al.* (2014) úspěšně vnesli cDNA *CHOLINE OXIDASE A (CODA)* pocházející z *Agrobacterium globiformis*

do chloroplastů vojtěšky pod kontrolou silného stresem inducibilního promotoru *SWEETPOTATO PEROXIDASE ANIONIC 2* (*SWPA2*). Tyto transgenní rostliny vojtěšky vykazovaly zvýšenou toleranci vůči oxidačnímu, solnému stresu a taktéž stresu ze sucha.

Dále byly vytvořeny a charakterizovány transgenní rostliny vojtěšky s heterologní expresí *AtNDPK2* (*NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 2*) pod kontrolou stresového inducibilního promotoru *SWPA2*. Tyto transgenní rostliny vykazovaly zvýšenou toleranci vůči oxidačnímu stresu, vysokým teplotám, soli a suchu. Tato zvýšená tolerance byla zajištěna vychytáváním reaktivních forem kyslíku (ROS), zvýšenou aktivitou enzymu NDPK2, zlepšenou ochranou integrity membrány a zvýšenou akumulací prolinu (Wang *et al.*, 2014).

Pomocí genetického inženýrství bylo ke zlepšení různých plodin využito také několik mikroRNA. Například nadměrná exprese mikroRNA156 (*miR156OE*) je nově vznikajícím nástrojem pro zlepšení tolerance vojtěšky k suchu, protože umlčuje protein *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 13* (*SPL13i*), což vede ke sníženým ztrátám vody, zlepšené vodivosti průduchů a fotosyntetické asimilaci. Roli by mohly *miR156OE* a *SPL13i* hrát i v toleranci vůči teplotnímu stresu, protože rostliny nesoucí tyto konstrukty vykazovaly zvýšené hladiny antioxidantů (Matthews *et al.*, 2019). Rostliny s nadměrnou expresí *miR156OE* podle NGS (next-generation sequencing) vykazovaly rozsáhlé změny v expresi genů, včetně genů podílejících se na nodulaci, vývoji kořenů a biosyntéze fytohormonů (Aung *et al.*, 2017).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Rostlinný materiál

- *Medicago sativa* L. divý typ Regen SY (RSY)
- *Medicago sativa* L. transgenní linie s konstruktem *proMMK2::GFP:MMK2*
- *Medicago sativa* L. transgenní linie s konstruktem *35S::GFP:MMK2*
- *Medicago sativa* L. transgenní linie s konstruktem *AtUBQ10::GFP:MMK2*

#### 3.1.2 Bakteriální materiál

- *Sinorhizobium meliloti* divý typ, kmen Sm2011 značený s mRFP (monomeric red fluorescent protein)

#### 3.1.3 Chemikálie

*Alfa Aesar:*

Gellan Gum

*Duchefa Biochemie:*

1000x Gamborg vitamíny

1000x Nitsch & Nitsch vitamíny

2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina)

Gamborg B5 základní směs solí

kinetin

mikroagar

Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)

myoinositol

*Sigma Aldrich:*

dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

dihydrát molybdenanu sodného ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

dusičnan draselný ( $\text{KNO}_3$ )

glycin

heptahydrát síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

heptahydrát síranu železnatého ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

hydroxid draselný (KOH)

hydroxid sodný (NaOH)

hypochlorid sodný

chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ )

kyselina boritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )

LB Broth (Miller)

L- prolin

monohydrát síranu manganatého ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

monohydrát síranu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

pentahydrát síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

sacharóza

síran zinečnatý ( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

Tween 20

### 3.1.4 Roztoky a média

#### Médium B50

3,1 g . l<sup>-1</sup> Gamborg B5 základní směs solí

0,5 g . l<sup>-1</sup>  $\text{KNO}_3$

0,25 g . l<sup>-1</sup>  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g . l<sup>-1</sup> prolin

30 g . l<sup>-1</sup> sacharóza

4,5 g . l<sup>-1</sup> Gellan Gum

1 ml . l<sup>-1</sup> 1000x Gamborg vitamíny (přidává se po autoklávování)

30 ml . l<sup>-1</sup> roztok aminokyselin (přidává se po autoklávování)

1000 ml milliQ voda

pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

#### Médium B5H

3,1 g . l<sup>-1</sup> Gamborg základní směs solí

0,5 g . l<sup>-1</sup>  $\text{KNO}_3$

0,25 g . l<sup>-1</sup>  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g . l<sup>-1</sup> prolin

30 g . l<sup>-1</sup> sacharóza

4,5 g . l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml . l <sup>-1</sup>	1000x Gamborg vitamíny (přidává se po autoklávování)
30 ml . l <sup>-1</sup>	roztok aminokyselin (přidává se po autoklávování)
1 ml . l <sup>-1</sup>	2,4-D (přidává se po autoklávování)
1 ml . l <sup>-1</sup>	kinetin (přidává se po autoklávování)
1000 ml	milliQ voda
	pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

### **MMS médium**

4,3 g . l <sup>-1</sup>	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
0,1 g . l <sup>-1</sup>	myoinositol
30 g . l <sup>-1</sup>	sacharóza
4,5 g . l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml . l <sup>-1</sup>	Nitsch & Nitsch vitamíny (přidává se po autoklávování)
1000 ml	milliQ voda
	pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

### **MS médium**

4,3 g . l <sup>-1</sup>	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
30 g . l <sup>-1</sup>	sacharóza
4,5 g . l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1000 ml	milliQ voda
	pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

### **Roztok aminokyselin**

6,65 g	glutamine
0,83 g	serine
0,004 g	adenine
0,083 g	L-glutathione
250 ml	milliQ voda
	sterilizace roztoku přes bakteriologický filtr, uchováváno v lednici při teplotě 4 °C

### **Roztok 2,4-D**

10 mg	2,4-D
-------	-------

50  $\mu$ l ethanol  
150  $\mu$ l 1M NaOH  
10 ml milliQ voda  
sterilizace roztoku přes bakteriologický filtr, uchováváno v mrazáku při teplotě -20 °C

#### **Roztok kinetinu**

1 mg kinetin  
20  $\mu$ l 1M NaOH  
10 ml milliQ voda  
sterilizace roztoku přes bakteriologický filtr, uchováváno v mrazáku při teplotě -20 °C

#### **Roztoky pro sterilizaci listů *M. sativa***

Roztok 1:

70% (v/v) ethanol

Roztok 2:

0,05% (w/v) Tween 20

1% (v/v) hypochlorid sodný

sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22  $\mu$ m)

Roztok 3:

milliQ H<sub>2</sub>O

sterilizace filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,22  $\mu$ m)

#### **Tekuté Fahreus médium bez N<sub>2</sub>**

Zásobní roztoky:

Makronutrienty:

0,1232 g . ml<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (1 ml . l<sup>-1</sup>)

0,00953 g . ml<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 ml . l<sup>-1</sup>)

0,00712 g . ml<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O (2 ml . l<sup>-1</sup>)

0,0013 g . ml<sup>-1</sup> Fe-EDTA (2,5 ml . l<sup>-1</sup>)

Mikronutrienty:

0,001 g . ml<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O (100  $\mu$ l . l<sup>-1</sup>)

0,0015 g . ml<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O (100  $\mu$ l . l<sup>-1</sup>)

0,0017 g . ml<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O (100  $\mu$ l . l<sup>-1</sup>)



0,001 g . ml <sup>-1</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	(100 μl . l <sup>-1</sup> )
0,0011 g . ml <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	(100 μl . l <sup>-1</sup> )
0,11 g . ml <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> (přidáno po autoklávování)	
	pH 6,5 pomocí HCl, sterilizováno autoklávování	

### **Pevné Fahreus médium bez N<sub>2</sub>**

Zásobní roztoky:

Makro- a mikronutrienty viz Tekuté Fahreus médium bez N<sub>2</sub>

13 g . ml <sup>-1</sup>	mikroagar
0,11 g . ml <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> (přidáno po autoklávování)
	pH 6,5 pomocí HCl, sterilizováno autoklávováním

### **LB médium pro kultivaci *S. meliloti***

40 g . l <sup>-1</sup>	LB Broth (Miller) s agarem
	pH 7,2 pomocí HCl, sterilizováno autoklávováním

### **3.1.5 Přístroje**

analytické váhy XA110/2X	Radwag
aparatura na přípravu gelů	BioRad
centrifuga Allegra 64R	BECKMAN COULTER
digestoř	Merci
elektromagnetická míchačka MSH-420	BOECO
fytotronová komora	Weiss Gallenkamp
inkubátor s nastavitelnou teplotou	Memmert
konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710	Zeiss
laboratorní předvážky S1502	BEL- Engineering
mikroskop AXIO Zoom V.16	Zeiss
orbitální třepačka s inkubací ES- 20	Biosan
pH metr PC 2700	Eutech Instruments
stereolupa MSZ5000	Krüß
sterilní laminární box	Merci

### **3.1.6 Software**

Microsoft Office 365, ImageJ, ZEN Blue 2011, ZEN Black 2011

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Sterilizace listů pro indukci somatické embryogeneze**

1. promytí listů v kohoutkové vodě s kapkou detergentu
2. promytí listů v 70% ethanolu po dobu 10 s
3. promytí listů ve sterilizačním roztoku (1% hypochlorid sodný a 0,05% Tween) po dobu 90 s
4. promytí listů ve sterilní destilované vodě 3x po dobu 5 min

Takto vysterilizované listy byly z destilované vody přeneseny na filtrační papír na Petriho misce a pomocí skalpelu příčně nařezány na polovinu. Tyto listové explantáty byly adaxiální stranou položeny na B5H médium pro indukci kalusu.

### **3.2.2 Příprava B5H média pro indukci kalusů**

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byly za stálého míchání rozpuštěny Gamborg základní směs solí,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , prolin, sacharóza a Gellan Gum. Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 5,7 pomocí KOH. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po vychladnutí byl v laminárním boxu k médiu přidán roztok aminokyselin, kinetin, 2,4-D a 1000x Gamborg vitamíny.

Kultivace explantátů probíhala ve fytotronové komoře za konstantních podmínek (21 °C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h).

### **3.2.3 Příprava B50 média pro indukci somatických embryí**

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byly za stálého míchání rozpuštěny Gamborg základní směs solí,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , prolin, sacharóza a Gellan Gum. Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 5,7 pomocí KOH. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po vychladnutí byl v laminárním boxu k médiu přidán roztok aminokyselin a 1000x Gamborg vitamíny.

Kultivace kalusů probíhala ve fytotronové komoře za konstantních podmínek (21 °C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h).

### **3.2.4 Příprava MMS média k indukci klíčení**

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byly za stálého míchání rozpuštěny základní směs solí MS salts, myoinositol, sacharóza a Gellan Gum. Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 5,7 pomocí KOH. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po vychladnutí byly v laminárním boxu k médiu přidány Nitsch & Nitsch vitamíny.

Kultivace embryí probíhala ve fytotronové komoře za konstantních podmínek (21 °C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h).

### **3.2.5 Příprava MS média**

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byly za stálého míchání rozpuštěny základní směs solí MS salts, sacharóza a Gellan Gum. Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 5,7 pomocí KOH. Médium bylo sterilizováno v autoklávu.

### **3.2.6 Příprava pevného Fahraeus média bez N<sub>2</sub>**

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byly za stálého míchání přidány makro- a mikronutrienty ze zásobních roztoků a mikroagar. Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 6,5 pomocí HCl. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po vychladnutí byl v laminárním boxu k médiu přidán roztok CaCl<sub>2</sub>.

### **3.2.7 Příprava tekutého Fahraeus média bez N<sub>2</sub>**

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byly za stálého míchání přidány makro- a mikronutrienty ze zásobních roztoků. Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 6,5 pomocí HCl. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po vychladnutí byl v laminárním boxu k médiu přidán roztok CaCl<sub>2</sub>.

### **3.2.8 Příprava LB média pro kultivaci *S. meliloti***

Ve  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ vody byl za stálého míchání rozpuštěn LB Broth agar (Miller). Po přidání požadovaného objemu vody bylo upraveno pH na hodnotu 7,2 pomocí HCl. Médium bylo sterilizováno v autoklávu.

### **3.2.9 Kultivace kultury *S. meliloti* v LB médiu**

Zkumavka s kulturou *S. meliloti* byla přenesena z mrazáku na led k pomalému rozmražení. Byly připraveny dvě sterilní zkumavky Falcon o objemu 50 ml, do kterých

bylo nalito 20 ml tekutého LB média. K LB médiu bylo napipetováno 20  $\mu$ l tetracyklinu a streptomycinu. Do každé zkumavky byl následně přidán 1 ml rozmražené bakteriální konzervy *S. meliloti*. Zkumavky byly obaleny alobalem pro zamezení přístupu světla k bakteriím a přeneseny na orbitální třepačku k inkubaci (48 h, 180 RPM, 28 °C).

### **3.2.10 Kultivace kultury *S. meliloti* ve Fahraeus médiu**

Po 48 hodinách kultivace v LB médiu byla změřena optická hustota kultury. Kultura byla naředěna Fahraeus médiem (FAH), aby hodnota OD<sub>600</sub> odpovídala 0,5. Zkumavky byly opět zabaleny alobalem a umístěny na kývačku (pod úhlem 10°) k inkubaci (4 h, 5 RPM, 23 °C).

### **3.2.11 Inokulace rostlin kulturou *S. meliloti***

Po 4 hodinách kultivace v tekutém FAH médiu byla kultura *S. meliloti* použita k inokulaci rostlin *M. sativa*. Inokulovány byly rostliny rostoucí 5 dnů na pevném FAH médiu. Přibližně 1 – 2 ml kultury, podle velikosti kořenového systému, bylo aplikováno pipetou do těsné blízkosti kořenů. Petriho misky byly v oblasti kořenů obaleny černou folií, aby se zabránilo přímému přístupu světla.

## 4 VÝSLEDKY

V kapitole výsledky jsou popsána data získaná v experimentální části bakalářské práce. První kapitola zahrnuje průběh přípravy rostlinného materiálu všech použitých transgenních linií *M. sativa*, jehož získání bylo nezbytné pro navazující experimenty. Následující část se věnuje fenotypové analýze rostlin v kontrolních podmínkách. Konkrétně je vyhodnocena délka kořenových systémů rostlin získaných cestou nepřímé SE a kultivovaných *in vitro*, a dále morfologie listů rostlin pěstovaných *in vivo*. Ve třetí části je popsán fenotyp kořenových vlásků po přenosu na FAH médium a fenotypová analýza rostlin po inokulaci *S. meliloti*. Nejprve jsou zhodnoceny délky kořenových systémů v průběhu dvaceti (patnácti) dnů od inokulace bakteriemi, a následně vývoj infekčních vláken a hlízek.

### 4.1 Příprava rostlinného materiálu

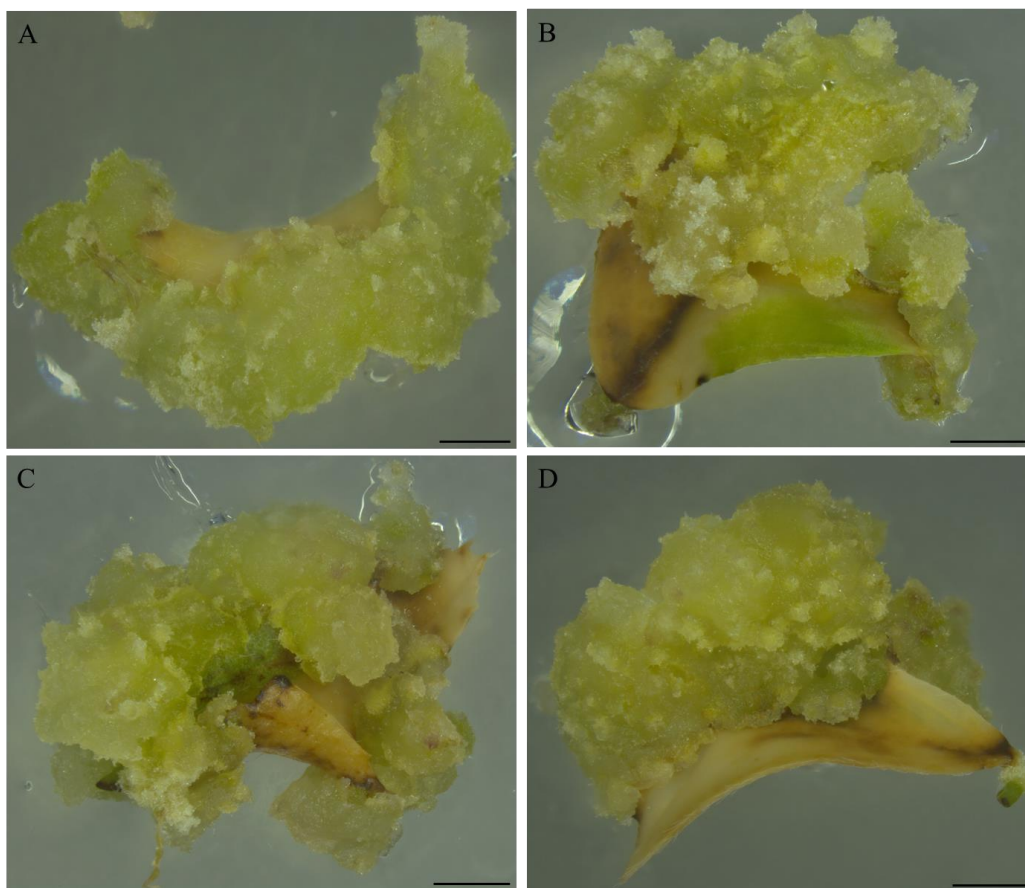
Rostlinný materiál byl připraven cestou nepřímé SE. Jako explantáty byly použity plně rozvinuté listy *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2*, a *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Listy byly sterilizovány a přeneseny na B5H médium pro indukci kalusů, na kterém byly kultivovány 3 týdny. Po této době byly kalusy pozorovány mikroskopem a zdokumentovány (Obr. 4). Bylo zjištěno, že u divého typu a *35S::GFP:MMK2* se kalusy ve většině případů tvořily po celé ploše listů (Obr. 4A, C). U linie *proMMK2::GFP:MMK2* probíhala tvorba kalusu ve větší míře na postranních částech listů (Obr. 4B) a u linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* převažovala tvorba na řezných plochách listů (Obr. 4D).

Kalusy byly následně přeneseny na médium B50 pro indukci tvorby somatických embryí. Embrya byla zdokumentována po 2 týdnech kultivace na tomto médiu (Obr. 5, 6). Významně rychlejší a početnější produkce embryí probíhala u linií RSY a *AtUBQ10::GFP:MMK2* (Obr. 5, 6A, D). Zároveň byla tato embrya větší a podélného tvaru, na rozdíl od *proMMK2::GFP:MMK2* a *35S::GFP:MMK2*, které produkovaly embrya menší, spíše oválného tvaru, a u kterých bylo pozorováno fialové zbarvení kalusů způsobené tvorbou antokyanů (Obr. 5, 6B, C).

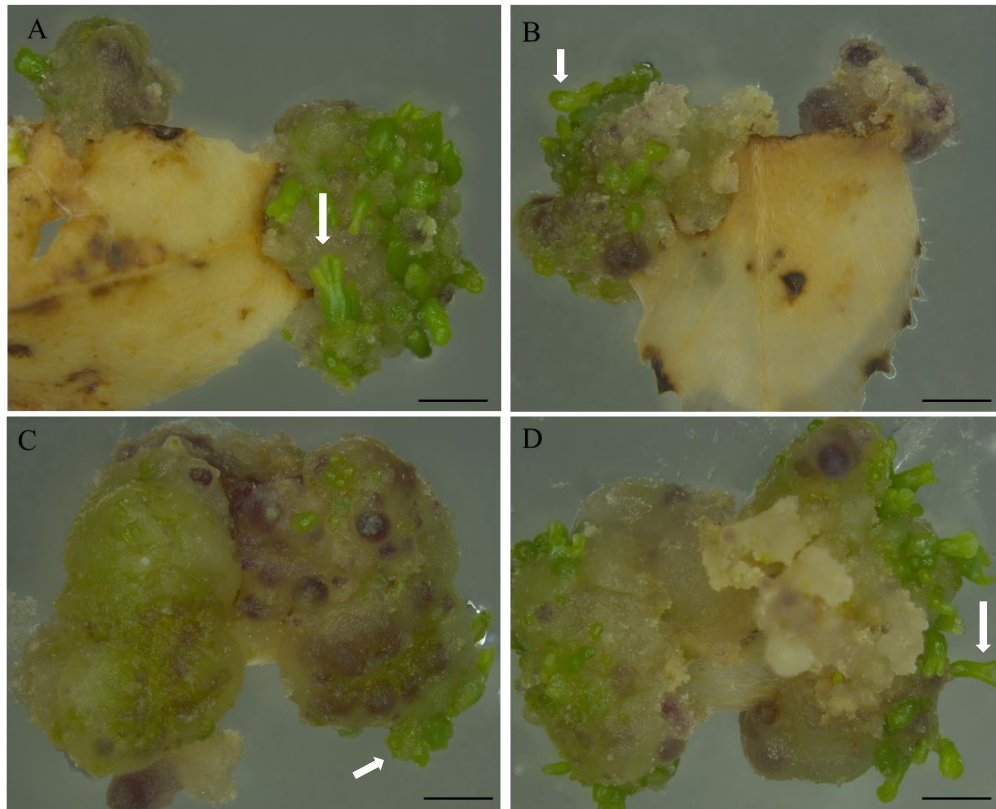
Nejvíce vyvinutá embrya byla přenesena po 2-3 týdnech z B50 na MMS média, kde byla kultivována 1-2 týdny do začátku klíčení. Byl pořízen detail embrya RSY po týdnu kultivace na MMS médiu pro zachycení počátečních stádií vývoje kořene a listů

(Obr. 7A). Detaily embryí u transgenních linií byly vyfoceny před přenosem na MMS médium pro potvrzení GFP signálu (Obr. 7B, C, D).

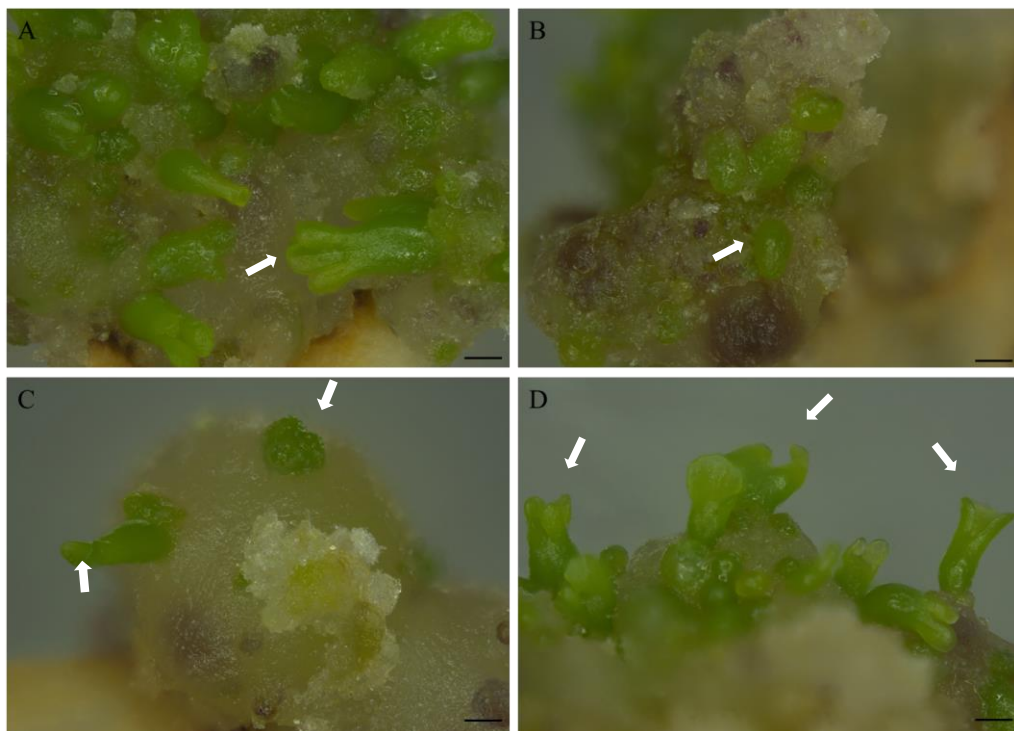
Po týdenní kultivaci na MMS médiu byla pomocí stereolupy vyselektována embrya, která vykazovala klíčení kořene a vývoj nadzemní části. Tato vyklíčená somatická embrya byla přenesena na MS médium, na kterém se vyvinula v celé rostliny, které zde byly uchovány pro další experimenty.



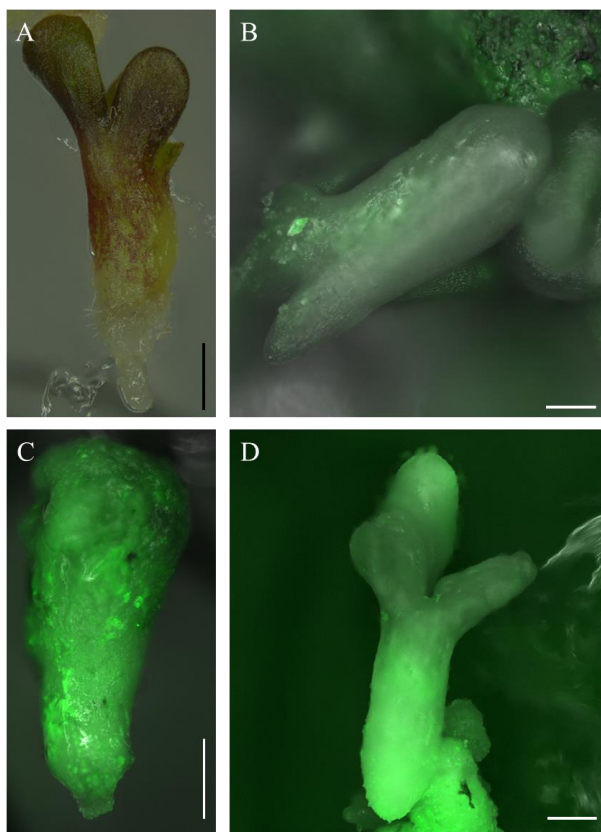
Obr. 4: Kalusy vytvořené na listových explantátech *M. sativa* po 3 týdnech kultivace na B5H médiu: A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Měřítko = 2 mm.



Obr. 5: Kalusy se somatickými embryi *M. sativa* po 2 týdnech kultivace na B50 médiu: A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Nejvyvinutější embrya jsou označena šipkami. Měřítko = 2 mm.



Obr. 6: Detaily somatických embryí *M. sativa* po 2 týdnech kultivace na B50 médiu: A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Embrya jsou označena šipkami. Měřítko = 500  $\mu$ m.



Obr. 7: Details somatických embryí *M. sativa* po týdnu kultivace na MMS médiu (A) a po 2 týdnech kultivace na B50 médiu (B, C, D). A – RSY (TL), B – *proMMK2::GFP:MMK2* (TL + GFP), C – *35S::GFP:MMK2* (TL + GFP), D – *AtUBQ10::GFP:MMK2* (TL + GFP). Měřítka = 1 mm (A), 200  $\mu$ m (B), 500  $\mu$ m (C, D).



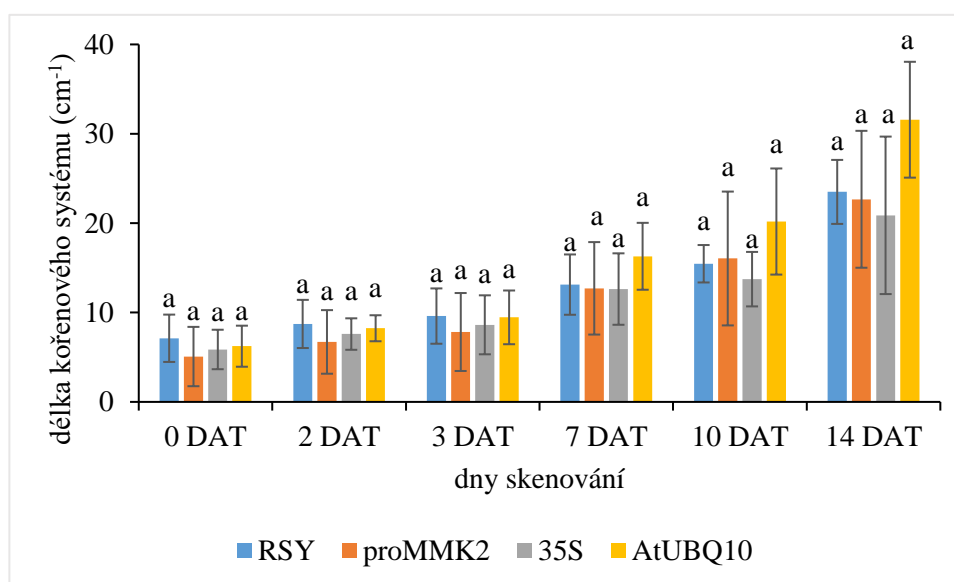
## 4.2 Fenotypová analýza transgenních linií v kontrolních podmínkách

### 4.2.1 Analýza délky kořenového systému transgenních linií

Po 14-denní kultivaci na MS médiu byly vybrány rostliny s nejlépe vyvinutým kořenovým systémem a nadzemní částí. Tyto rostliny byly přeneseny na nové Petriho misky s MS médiem. Z linií RSY a *35S::GFP:MMK2* bylo přeneseno 8 rostlin a z linií *proMMK2::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* celkem 11 rostlin. Následně byly Petriho misky s rostlinami skenovány 0, 2, 3, 7, 10 a 14 DAT (day after transfer) pro následné vyhodnocení růstu kořenů.

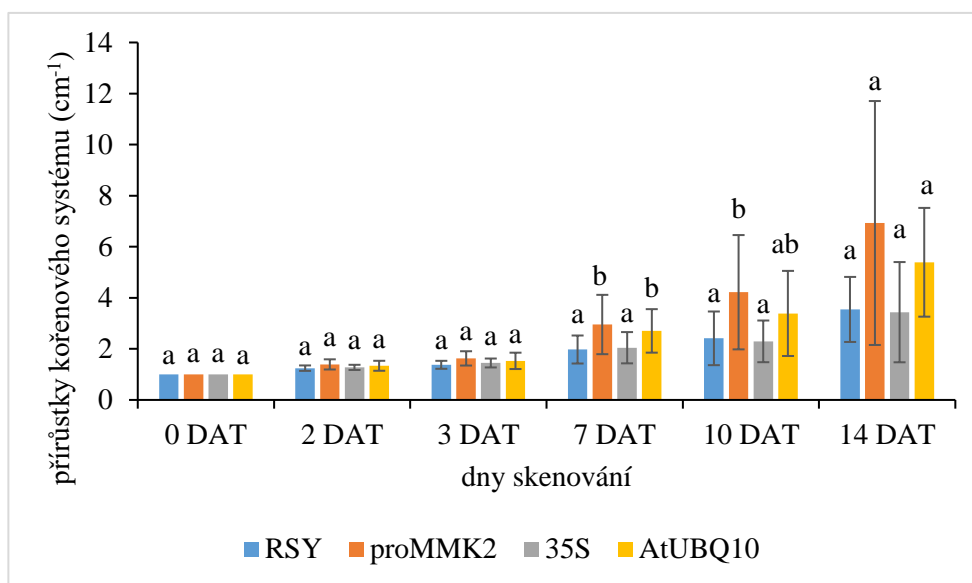
Pro výsledné hodnocení bylo vybráno 8 rostlin od každé linie. Měření délky kořenových systémů pro jednotlivé rostliny bylo provedeno v programu ImageJ. Poté byly vypočítány průměry délek kořenového systému v jednotlivých dnech pro každou linii. Ze získaných hodnot byl vytvořen graf (Obr. 8).

Jak je vidět na obrázku 8, kořeny všech linií do 3 DAT rostly velmi podobně. Od sedmého dne po přenosu, linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* vykazovala delší kořenový systém než zbylé tři linie. Mezi liniemi však nebyly žádný den zjištěny statisticky významné rozdíly.



Obr. 8: Graf s průměrnými délkami kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* naměřených v průběhu 14 dnů po přenosu na MS médium. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).

Dále byly pro každou rostlinu vypočítány relativní přírůstky (RP) kořenů za jednotlivé dny. Z těchto hodnot byly vypočítány průměry a směrodatné odchylky (Obr. 9). Bylo zjištěno, že 0. – 3. DAT se mezi liniemi nevyskytovaly statisticky významné rozdíly v RP. Sedmý den vykazovaly linie *proMMK2::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* významně vyšší RP kořenů než linie RSY a *35S::GFP:MMK2*. Desátý den už vykazovala statisticky významný rozdíl v RP pouze linie *proMMK2::GFP:MMK2*, a to oproti liniím RSY a *35S::GFP:MMK2*. Poslední den měření (14 DAT) nebyly zjištěny významné rozdíly mezi liniemi.



Obr. 9: Graf s relativními přírůstků kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* v průběhu 14 dnů. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).

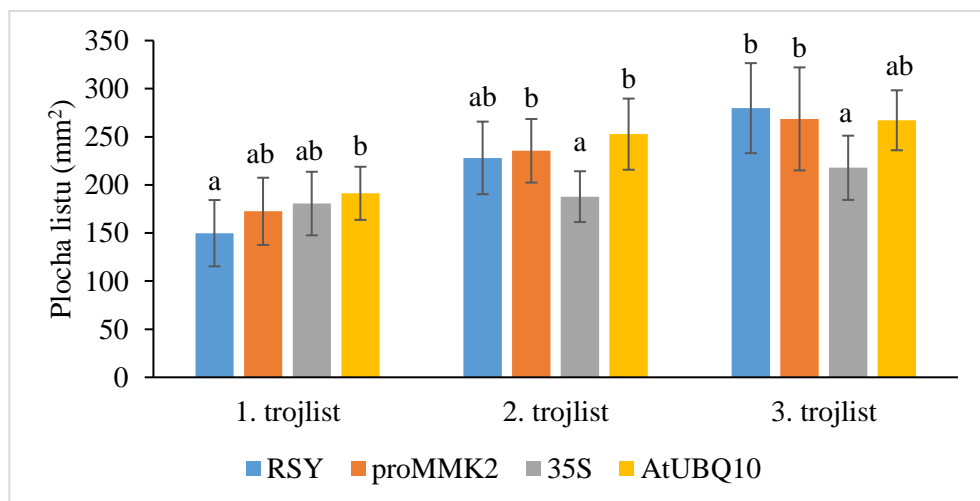
#### 4.2.2 Analýza listové plochy transgenních linií

Pro vyhodnocení morfologie a plochy listů byly použity rostliny *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2*, a *AtUBQ10::GFP:MMK2* rostoucí *in vivo* ve fytotronu. Rostlinám byly zastřiženy výhonky přibližně do stejné výšky (10 cm). Po 14 dnech byly z obnovených výhonků odebrány vždy první tři trojlístky, umístěny a zafixovány pomocí oboustranné lepicí pásky na papír v pořadí od nejmladšího k nejstaršímu a naskenovány (Obr. 10). U divého typu vykazovaly trojlístky širší tvar oproti ostatním liniím. Dále byla u některých listů divého typu pozorována vykrojení na špičce listů (Obr. 10A – šipky). U linie *proMMK2::GFP:MMK2* se tvořily také širší a kulatější lístky, a to převážně u druhého a třetího trojlístu (Obr. 10B). Transgenní linie *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* vykazovaly podobně úzké a špičaté lístky (Obr. 10C, D).

Plocha jednotlivých trojlístků byla měřena v programu ImageJ. Pro první, druhý i třetí trojlíst byly vypočítány průměrné hodnoty, ze kterých byl sestaven graf (Obr. 11). U prvního trojlístu byla zjištěna největší plocha u linie *AtUBQ10::GFP:MMK2*, přičemž oproti divému typu byl tento rozdíl statisticky významný. Plocha druhého trojlístu byla významně menší u linie *35S::GFP:MMK2* a největší plocha byla opět u linie *AtUBQ10::GFP:MMK2*. V případě třetího trojlístu vykazovala linie *35S::GFP:MMK2* opět nejmenší plochu oproti zbylým liniím. Největší plocha trojlístu byla zjištěna u divého typu RSY.



Obr. 10: Trojlístky *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* rostoucích *in vivo*. A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Měřítko = 1 cm.

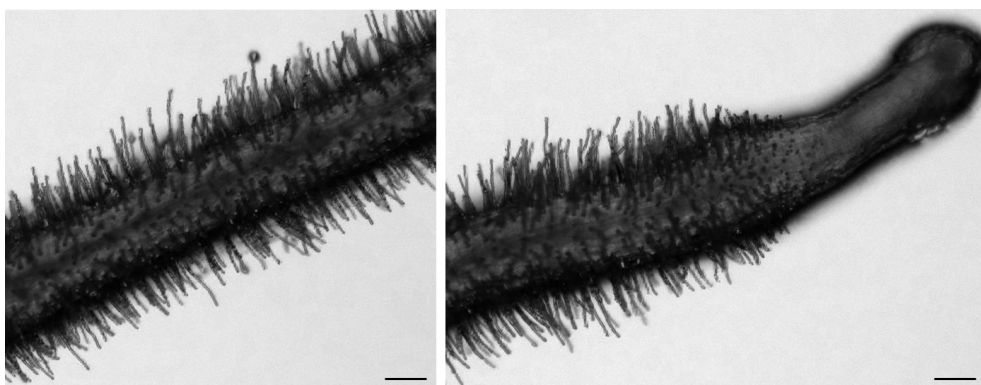


Obr. 11: Graf s průměrnými plochami trojlístků *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* po 14 dnech od zastříhnutí (N = 11 – 12). Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).

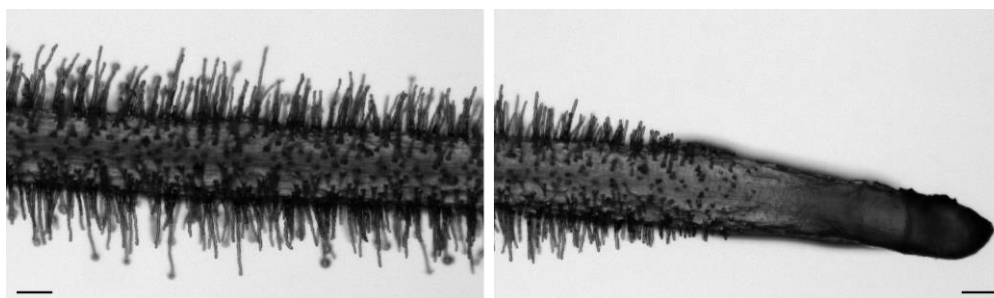
### 4.3 Fenotypová analýza transgenních linií po inokulaci *S. meliloti*

Pro vyhodnocení fenotypu rostlin inokulovaných bakteriemi *S. meliloti* bylo vybráno 12 nejlépe vyvinutých rostlin od každé linie. Tyto rostliny byly přeneseny z MS média na pevné FAH médium bez obsahu dusíku. Zde byly kultivovány po dobu pěti dnů pro aklimatizaci.

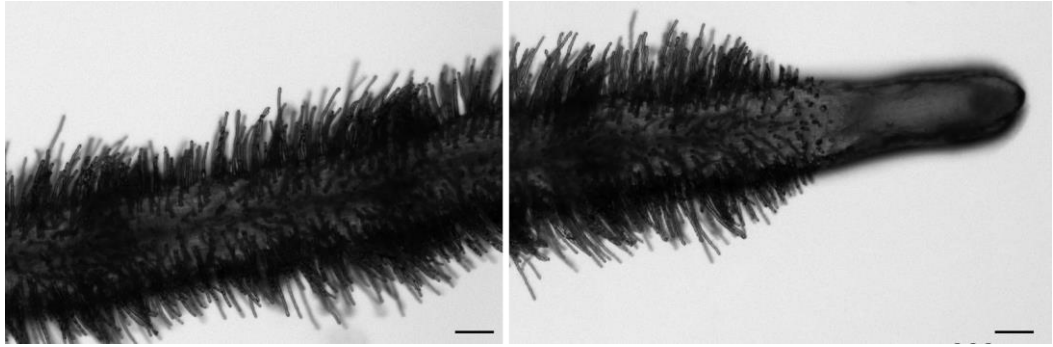
Po pěti dnech na FAH médiu byly pořízeny, a následně vybrány reprezentativní snímky rostoucích kořenů s kořenovými vlásky u jednotlivých linií (Obr. 12 - 15). V případě divého typu RSY, vykazovaly kořenové vlásky podobnou délku i rozmístění po celém kořeni (Obr. 12). U transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* docházelo od počátku kořene k postupnému nárůstu délky kořenových vlásků (Obr. 13). Kořenové vlásky u transgenní linie *35S::GFP:MMK2* tvořily střídavě oblasti s hustším a řidším zastoupením. V hustších oblastech se zároveň nacházely delší vlásky, v řidších naopak kratší vlásky (Obr. 14). Transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* vykazovala podobný fenotyp kořenových vlásků jako *proMMK2::GFP:MMK2*, s rozdílem většího počtu vlásků. Dále bylo pozorováno, že oproti ostatním liniím linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* vykazovala nejdelší vzdálenost od špičky kořene k první kořenové výduti (Obr. 15).



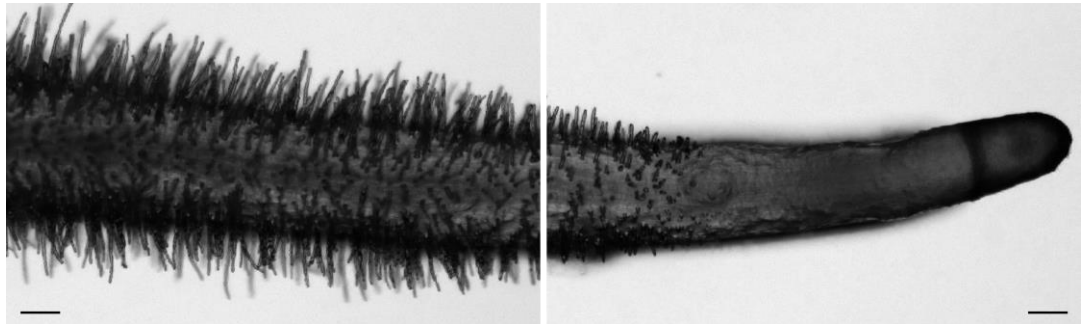
Obr. 12: Kořen *M. sativa* divý typ RSY na 5. DAT na FAH médiu. Měřítko = 200  $\mu$ m.



Obr. 13: Kořen *M. sativa* transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* na 5. DAT na FAH médiu. Měřítko = 200  $\mu$ m.



Obr. 14: Kořen *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP:MMK2* na 5. DAT na FAH médiu. Měřítka = 200  $\mu\text{m}$ .



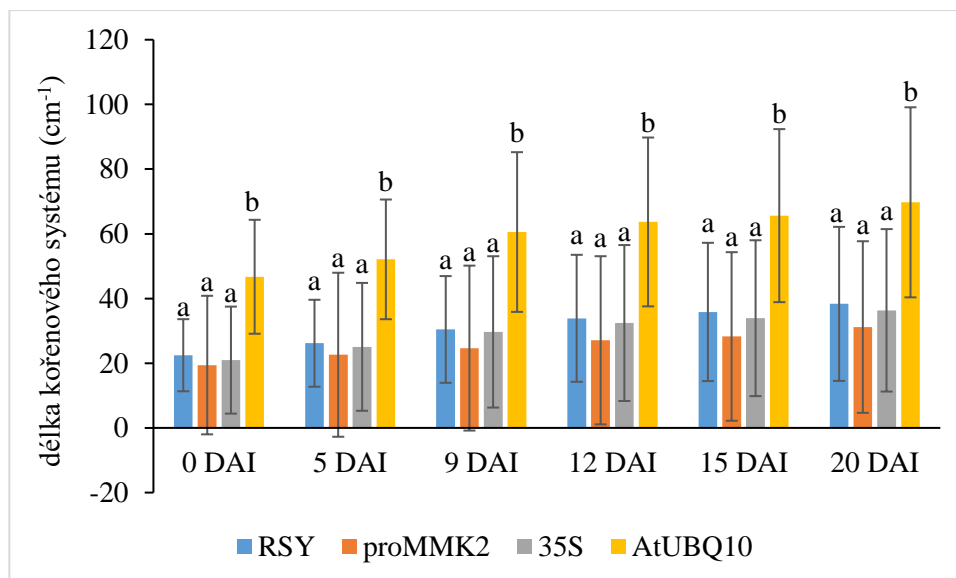
Obr. 15: Kořen *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* na 5. DAT na FAH médiu. Měřítka = 200  $\mu\text{m}$ .

Pátý den kultivace na FAH médiu byly kořeny inokulovány připravenou bakteriální kulturou *S. meliloti*. Takto ošetřené rostliny byly skenovány 0, 5, 9, 12, 15 a 20 DAI (day after inoculation) pro vyhodnocení délky kořenových systémů.

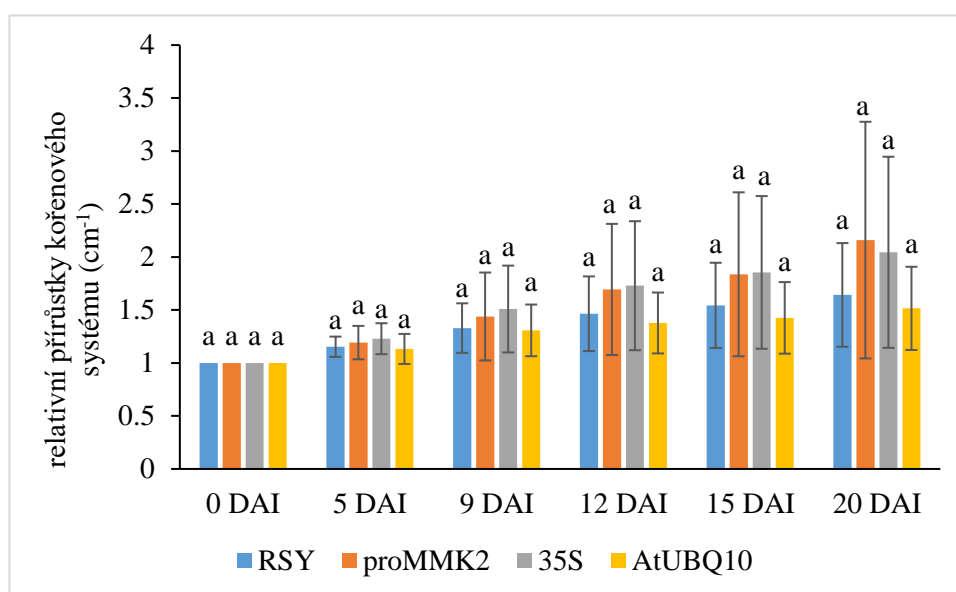
Délky kořenových systémů byly měřeny v programu ImageJ. Následně byly vypočítány průměry délek kořenového systému pro každou linii. Ze získaných hodnot byl vytvořen graf (Obr. 16). Bylo zjištěno, že linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* vykazovala oproti ostatním liniím delší kořenový systém ve všech hodnocených dnech. Mezi zbylými liniemi statisticky významné rozdíly nalezeny nebyly.

Pro každou rostlinu byly také vypočítány relativní přírůstky (RP) kořenů za jednotlivé dny. Z těchto hodnot byly vypočítány průměry a směrodatné odchylky (Obr. 17). Největší RP byly pozorovány u *proMMK2::GFP:MMK2* a *35S::GFP:MMK2*. Statisticky významné rozdíly mezi liniemi se však v žádném dni neprojevíly.

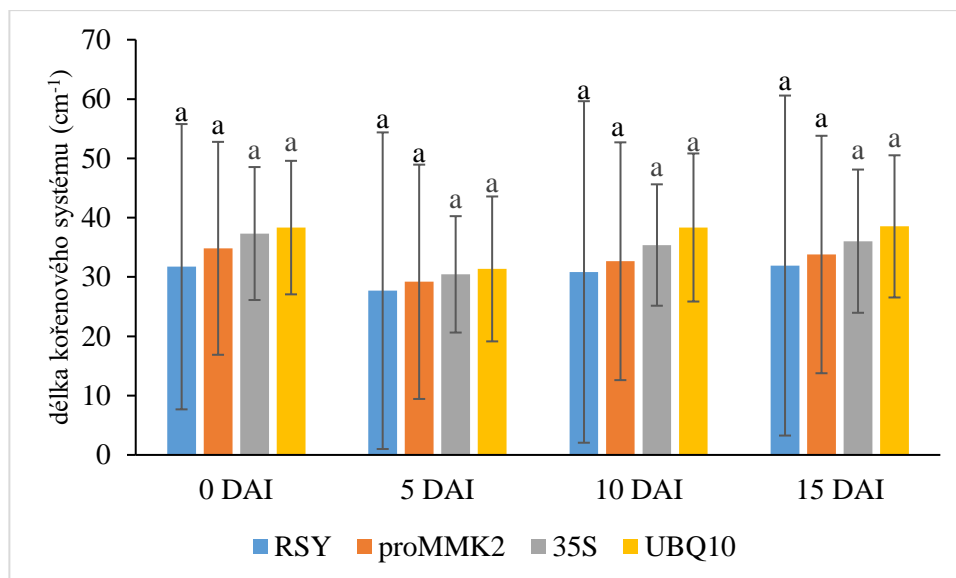
Při opakovaném experimentu byly kořenové systémy hodnoceny pouze v průběhu patnácti dnů po inokulaci. Mezi liniemi byly zjištěny velmi podobné průměrné délky i RP kořenových systémů bez významných statistických rozdílů (Obr. 18 a 19).



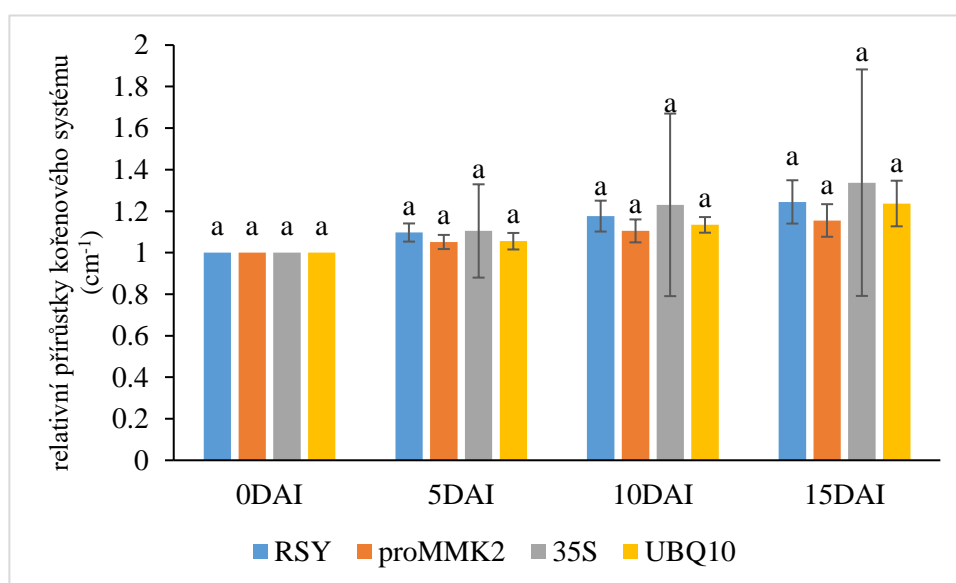
Obr. 16: Graf 1. experimentu s průměrnými délkami kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* naměřených v průběhu 20 dnů po inokulaci *S. meliloti*. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).



Obr. 17: Graf 1. experimentu s vypočítanými relativními přírůstky kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* v průběhu 20 dnů po inokulaci *S. meliloti*. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).



Obr. 18: Graf 2. experimentu s průměrnými délkami kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* naměřených v průběhu 15 dnů po inokulaci bakteriemi. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).



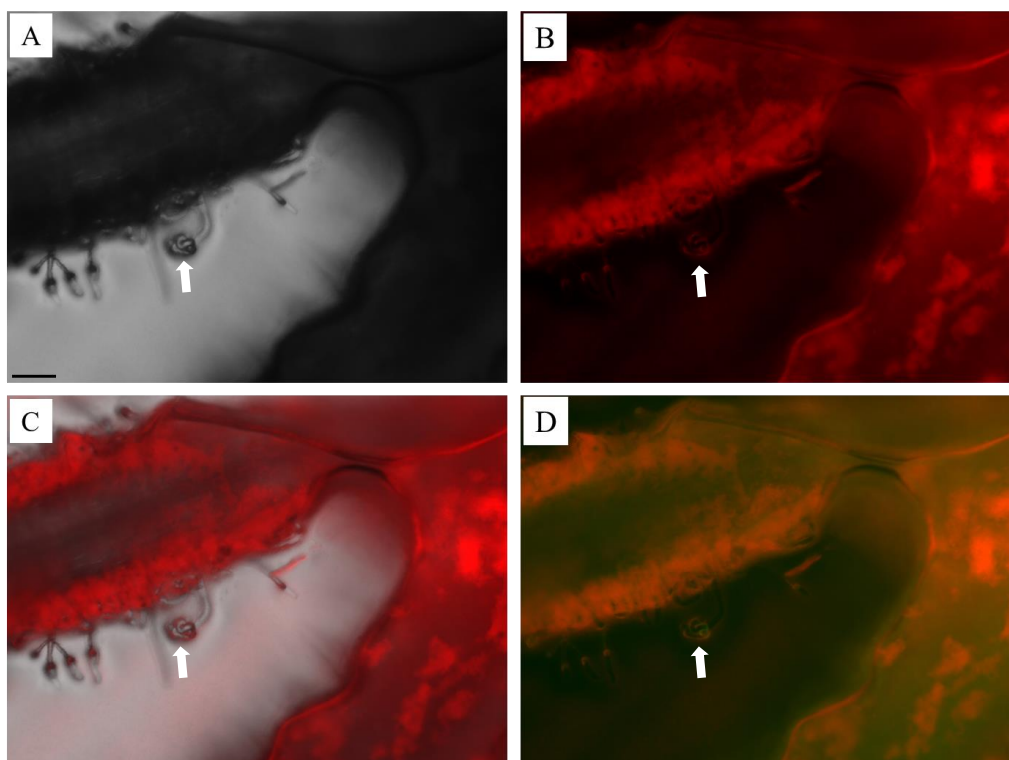
Obr. 19: Graf 2. experimentu s vypočítanými relativními přírůstky kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* v průběhu 15 dnů po inokulaci bakteriemi. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).

Pro studium interakcí mezi rostlinami a *S. meliloti* byl 9., 12. a 15. DAI pozorován vývoj infekčních vláken (IT) a 12. a 15. DAI vývoj hlízek pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obr. 20 – 29). Červený signál bakterií byl pozorován fluorescenčním kanálem pro RFP a zelený signál MMK2 fluorescenčním kanálem pro GFP.

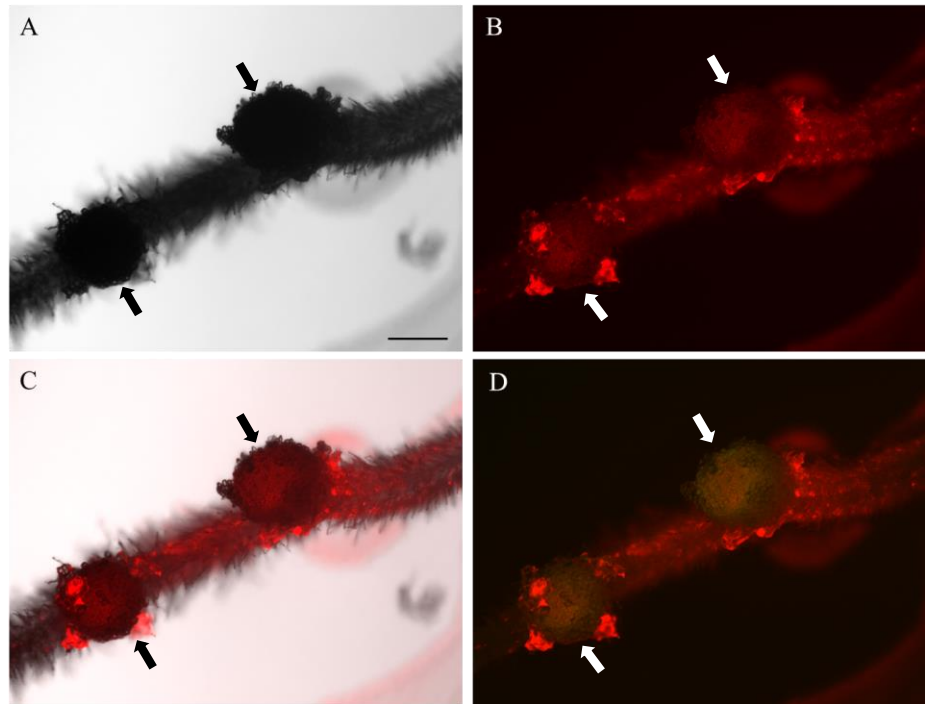


IT nebyla devátý ani dvanáctý den po inokulaci pozorovatelná. Viditelné byly pouze zatáčející se špičky kořenových vlásků okolo bakterií. Podobné to bylo i 15. DAI, kdy byly u linií RSY a *proMMK2::GFP:MMK2* zdokumentovány pouze stočené kořenové vlásky (Obr. 20, 22). Pouze u linie *35S::GFP:MMK2* bylo zdokumentováno viditelné IT (Obr. 24). U stočeného kořenového vlásku linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* byl zaznamenán signál MMK2 (Obr. 27).

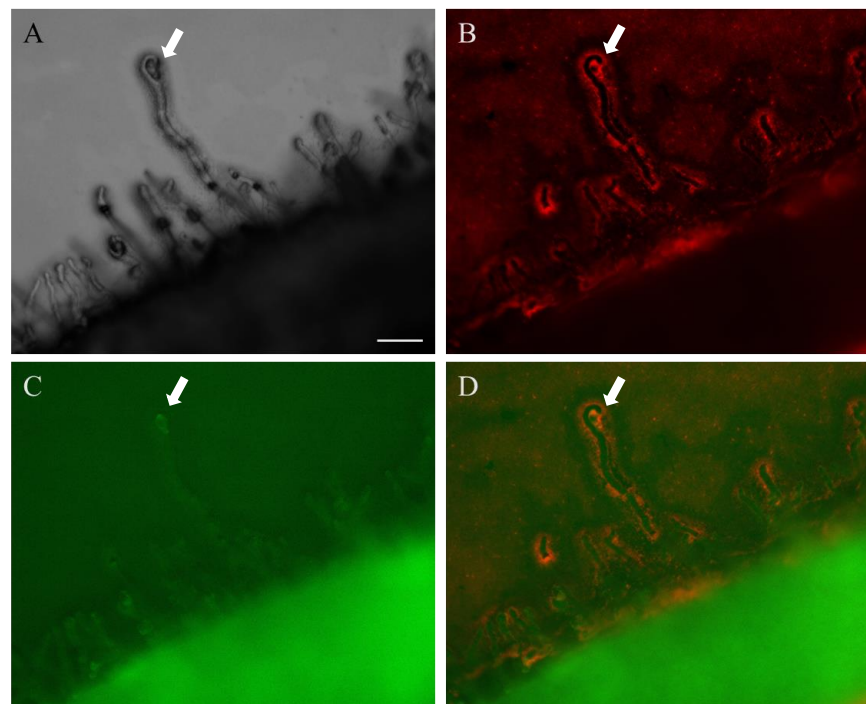
První vyvinuté hlízky byly u linií *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* pozorovány a vyfoceny již 12 DAI (Obr. 25 a 28). Patnáctý den po inokulaci byly pozorované hlízky u všech linií (Obr. 21, 23, 26 a 29).



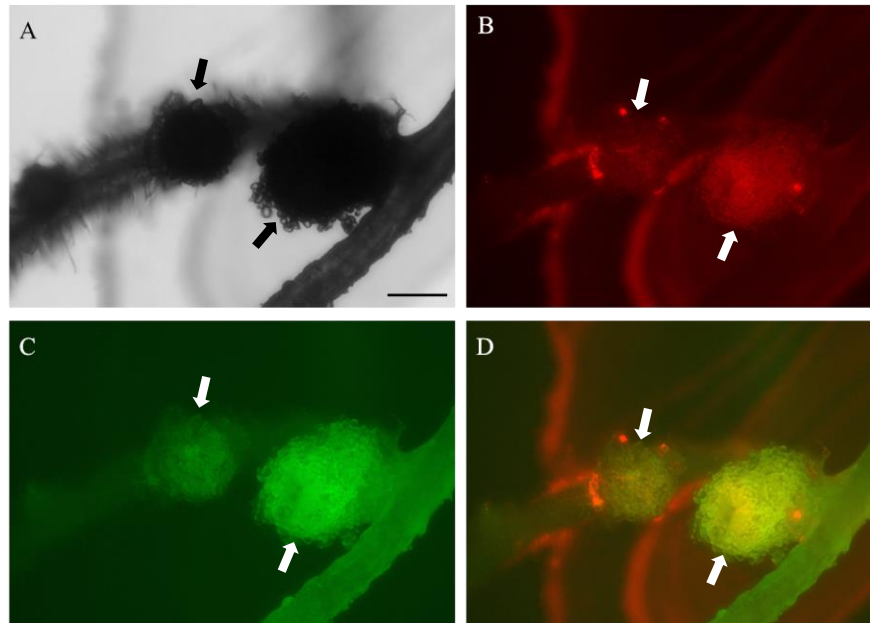
Obr. 20: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* divý typ RSY kultivovaný na FAH médiu na 15. DAI se *S. meliloti*. Zatočený kořenový vlasek označen šipkou. A – TL, B – mRFP, C – TL + mRFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu$ m.



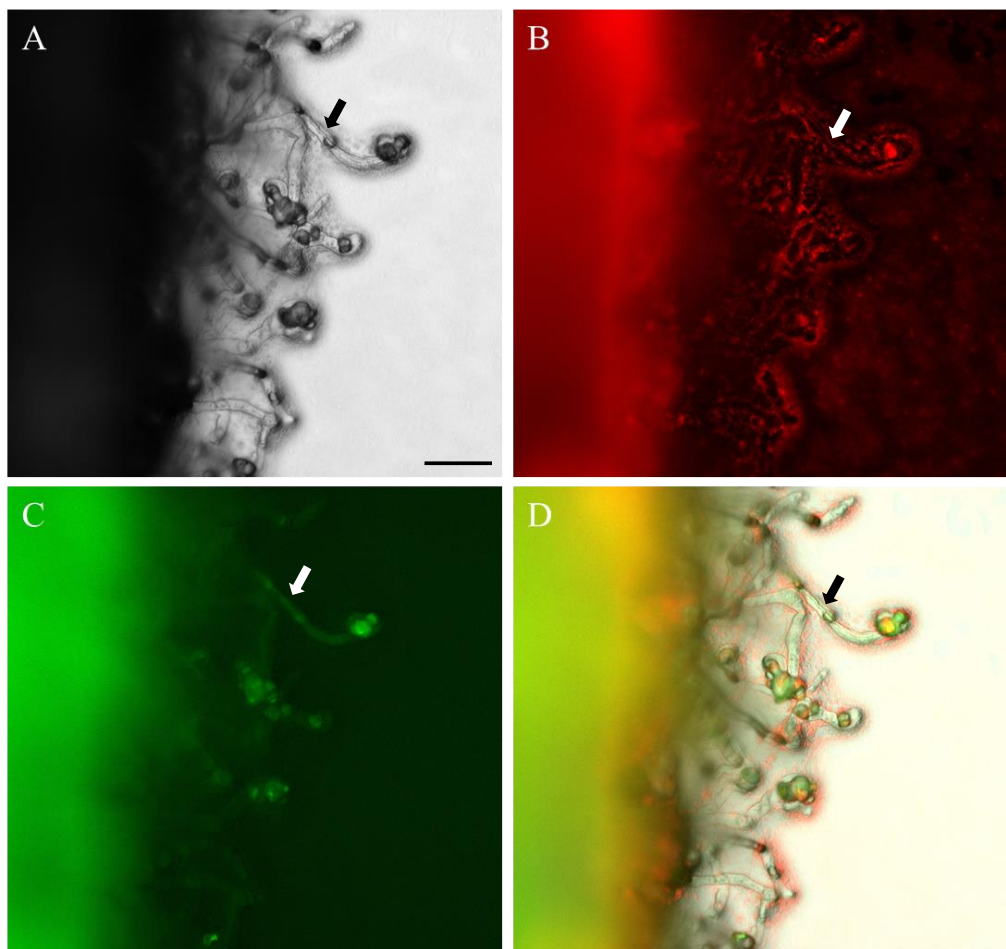
Obr. 21: Hlízky *M. sativa* divý typ RSY – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – RFP, C – TL + mRFP, D – mRFP + GFP. Měřítko = 500  $\mu$ m.



Obr. 22: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* kultivovaný na FAH médiu na 15 DAI se *S. meliloti*. Zatočený kořenový vlasek označen šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – mRFP + GFP. Měřítko = 100  $\mu$ m.

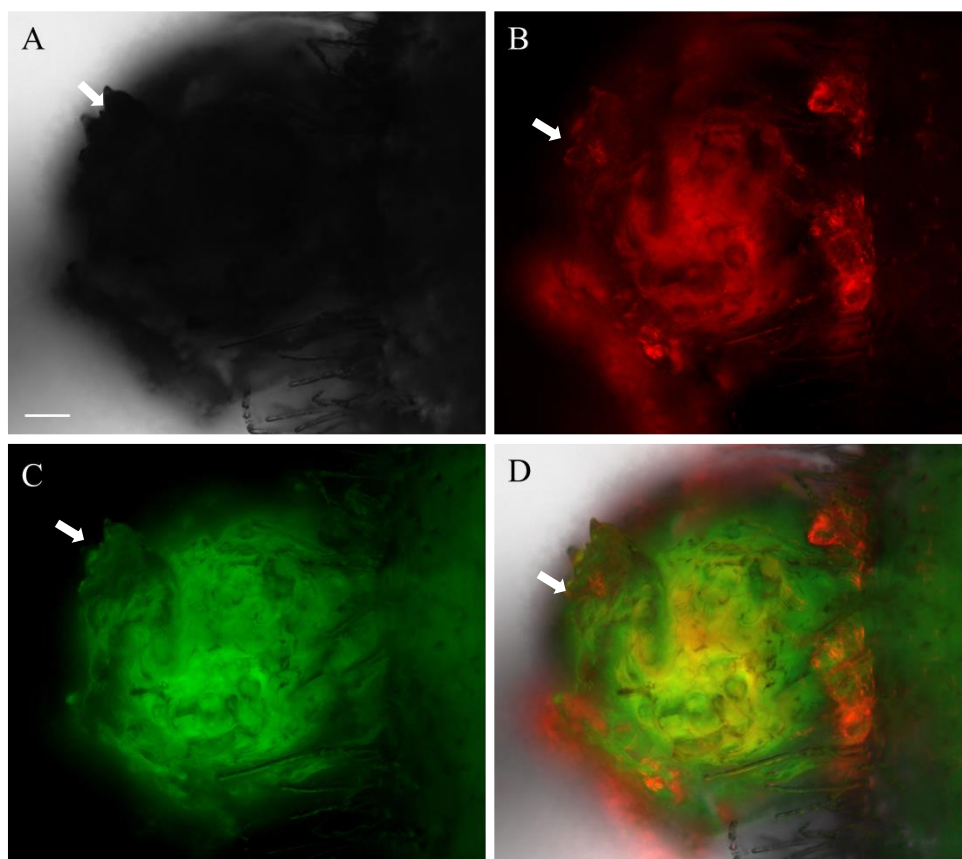


Obr. 23: Hlízky *M. sativa* transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – mRFP + GFP. Měřítko = 500  $\mu$ m.



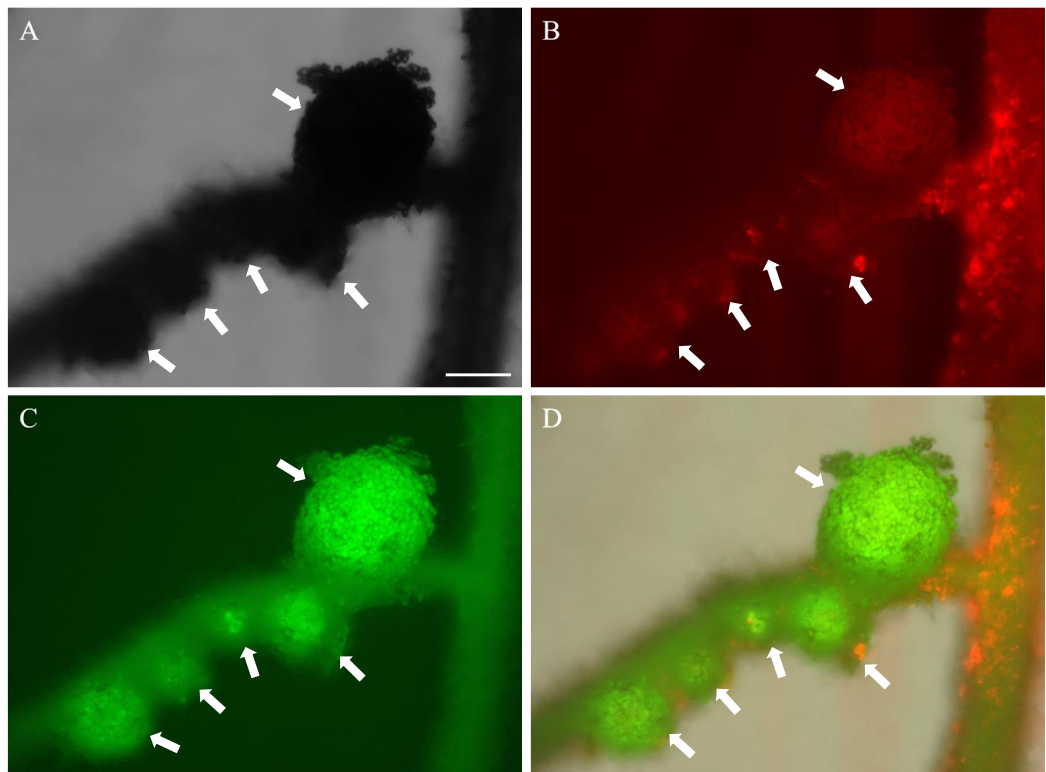
Obr. 24: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP:MMK2* kultivovaný na FAH médiu na 15 DAI se *S. meliloti*. Infekční vlákna označena šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítko = 100  $\mu$ m.

Na obrázku 25 je zdokumentován detail vyvíjející se hlízky u transgenní linie *35S::GFP::MMK2* dvanáctý den po inokulaci. Díky pozorování této hlízky pomocí fluorescenčního mikroskopu v různých kanálech, bylo možné zaznamenat rozdíly v signálech z bakterií a MMK2 (Obr. 25B, C, D). Červený signál bakterií (Obr. 25B) i zelený z MMK2 (Obr. 25C) se akumuloval především ve střední části hlízky. Kolokalizace těchto signálů byla potvrzena žlutým signálem na obrázku 25D.

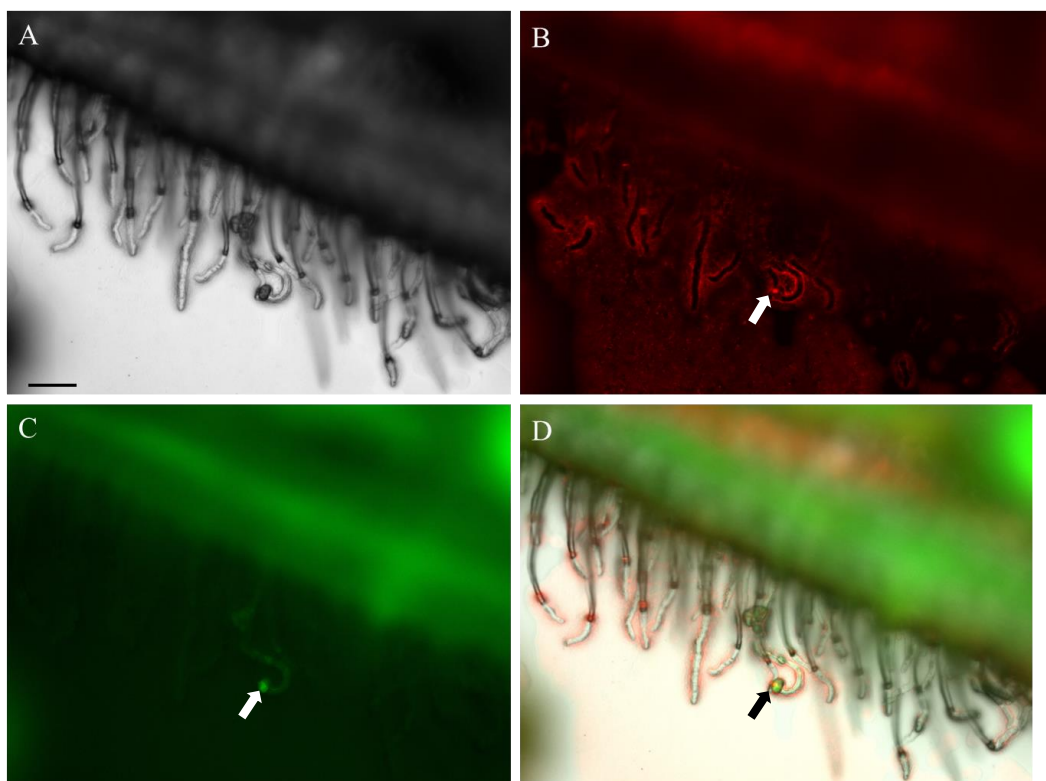


Obr. 25: Detail hlízky *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP::MMK2* – 12 DAI na FAH médiu. Hlízka označena šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítko = 100  $\mu$ m.



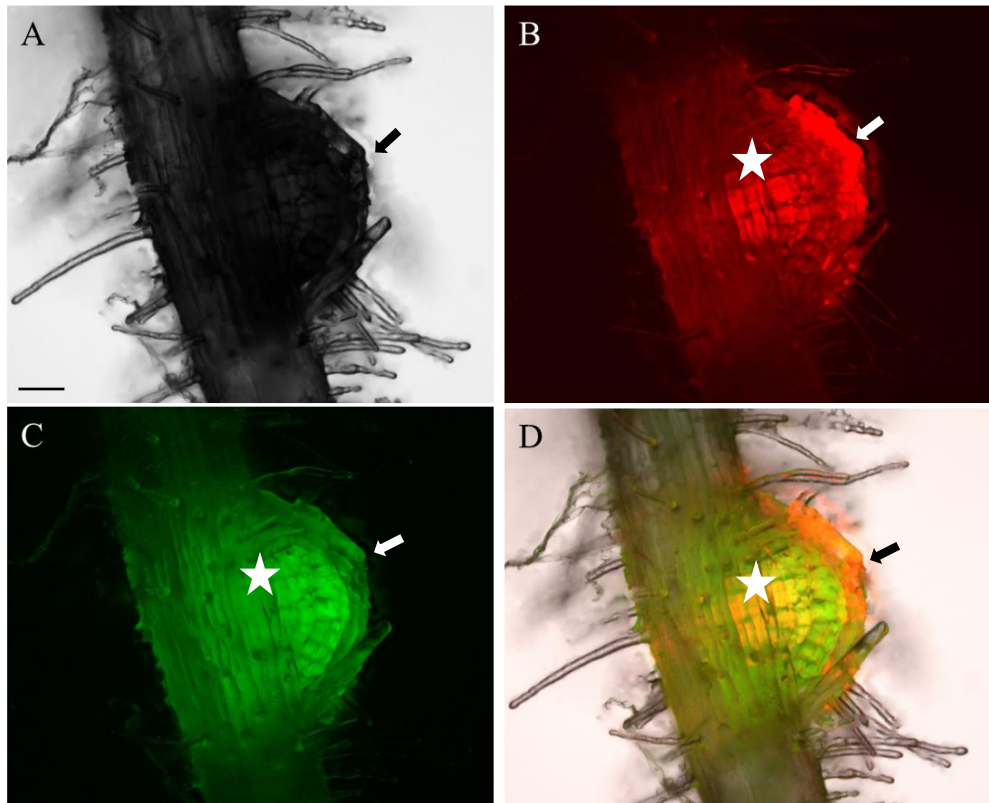


Obr. 26: Hlízky *M. sativa* transgenní linie 35S::*GFP:MMK2* – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítko = 500  $\mu$ m.

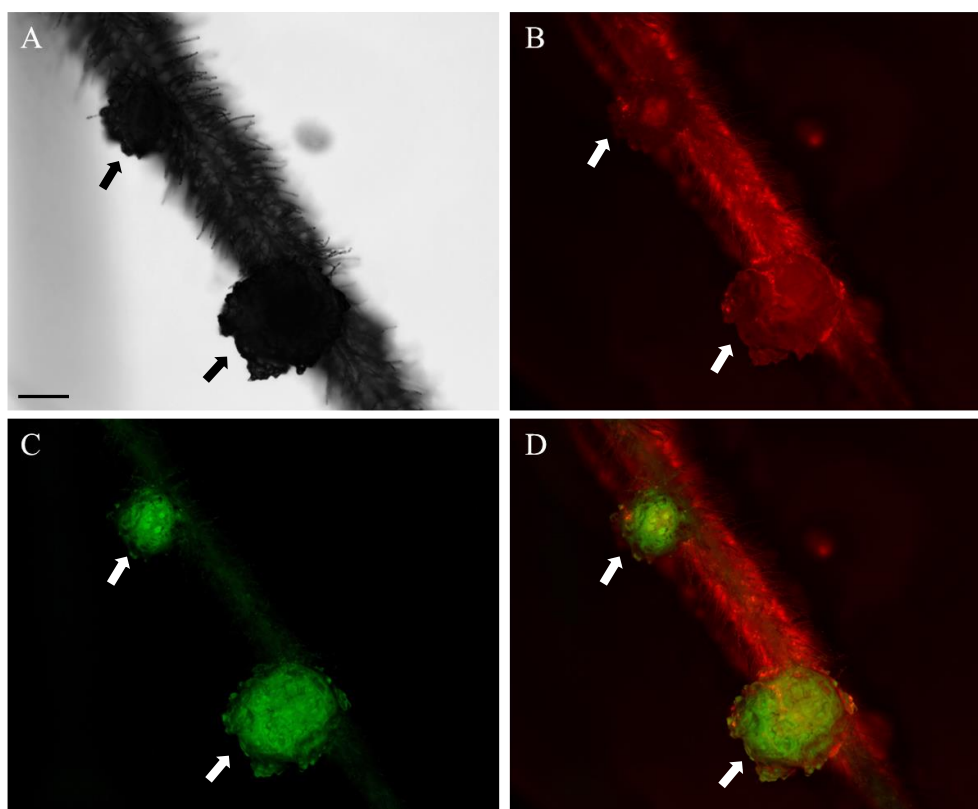


Obr. 27: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* kultivovaný na FAH médiu na 15 DAI se *S. meliloti*. Signál MMK2 označen šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítko = 100  $\mu$ m.

Podobně jako u linie *35S::GFP::MMK2*, byl 12. den po inokulaci *S. meliloti* zaznamenán detail hlízky i u transgenní linie *AtUBQ10::GFP::MMK2* (Obr. 28). Tuto hlízku se podařilo zachytit v brzkém stádiu vývoje, tudíž nejvyšší signál bakterií i MMK2 byl pozorován na rozhraní kořene a vyrůstající hlízky (Obr. 28B, C, D – hvězdičky). Vysoký signál bakterií se mimo jiné nacházel i na povrchu hlízky (Obr. 28B – šipka).



Obr. 28: Detail hlízky *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP::MMK2* – 12 DAI na FAH médiu. Hlízka označena šipkou. Nejintenzivnější signál označen hvězdičkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu$ m.



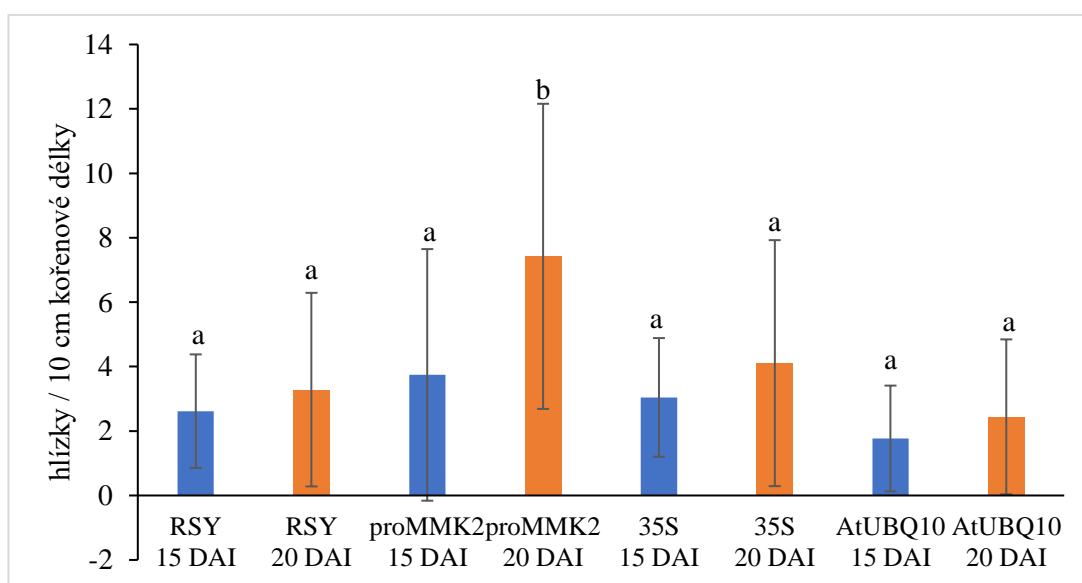
Obr. 29: Hlízky *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 500  $\mu$ m.

Hodnocen byl také počet hlízek na 15. a 20. DAI. Byly vypočítány průměrné počty hlízek na 10 cm délky kořenového systému pro každou transgenní linii a také pro divý typ. Patnáctý den po inokulaci vytvořily jednotlivé linie průměrně 1 až 4 hlízky na 10 cm délky kořenového systému bez významného statistického rozdílu mezi liniemi (Obr. 30). Dvacátý den po inokulaci bylo zjištěno, že linie RSY, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* tvořily mezi dvěma až čtyřmi hlízkami na 10 cm délky kořenového systému. Významný rozdíl byl pozorován u linie *proMMK2::GFP:MMK2*, u které se průměrný počet hlízek pohyboval kolem sedmi.

Dále byl vyhodnocen celkový počet hlízek na jednu rostlinu, a následně počet a poměr růžových a hnědých hlízek na jednu rostlinu (Obr. 31 a 32). Bylo zjištěno, že 15. DAI nejmenší celkový počet hlízek (8) na rostlinu tvořila linie *proMMK2::GFP:MMK2*. U ostatních linií se celkový počet hlízek pohyboval mezi 10 a 14, přičemž linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* vykazovala nejvyšší počet. Dvacátý den po inokulaci tvořila nejméně hlízek linie *35S::GFP:MMK2*, podobné počty tvořily linie RSY a *proMMK2::GFP:MMK2* a nejvíce hlízek na jednu rostlinu opět vykazovala linie *AtUBQ10::GFP:MMK2*. U všech linií v obou hodnocených dnech výrazně převažoval

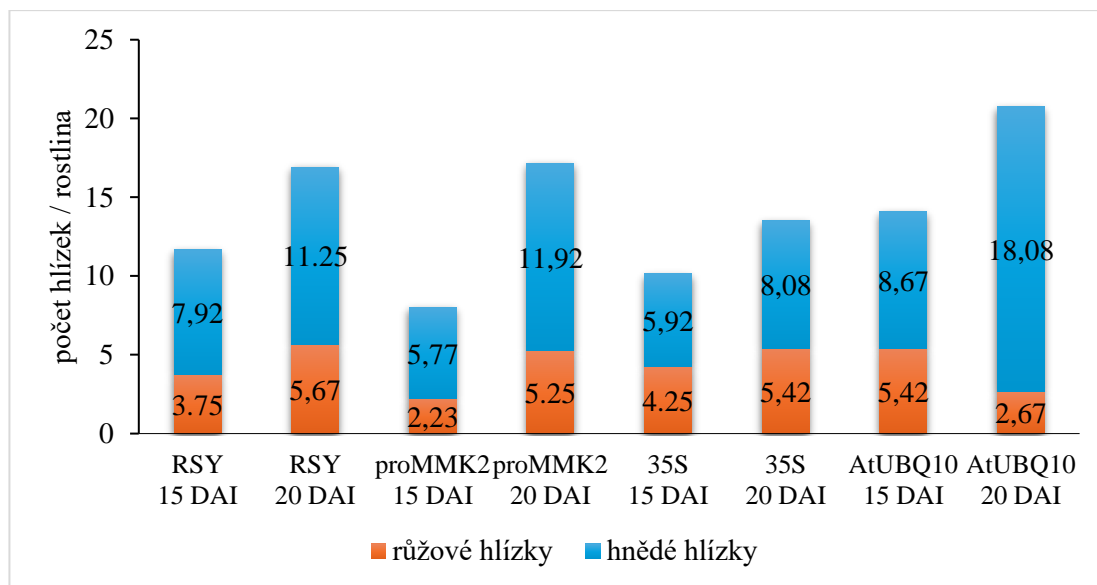
počet hnědých hlízek nad růžovými. Avšak 15. DAI se u linie *35S::GFP:MMK2* poměry růžových a hnědých hlízek téměř vyrovnaly.

V druhém experimentu bylo opět zjištěno, že 15. DAI tvořily všechny linie podobné počty hlízek na 10 cm kořenové délky. Vzhledem k prvnímu experimentu však průměrný počet na 10 cm kořenové délky klesl na 1 až 2 hlízky (Obr. 33). Při hodnocení počtu hlízek na rostlinu byla 15. DAI největší hodnota zaznamenaná u linie *35S::GFP:MMK2* (Obr. 34). V případě poměru růžových a hnědých hlízek opět převažovaly počty hlízek hnědých, a tedy neaktivních (Obr. 34 a 35).

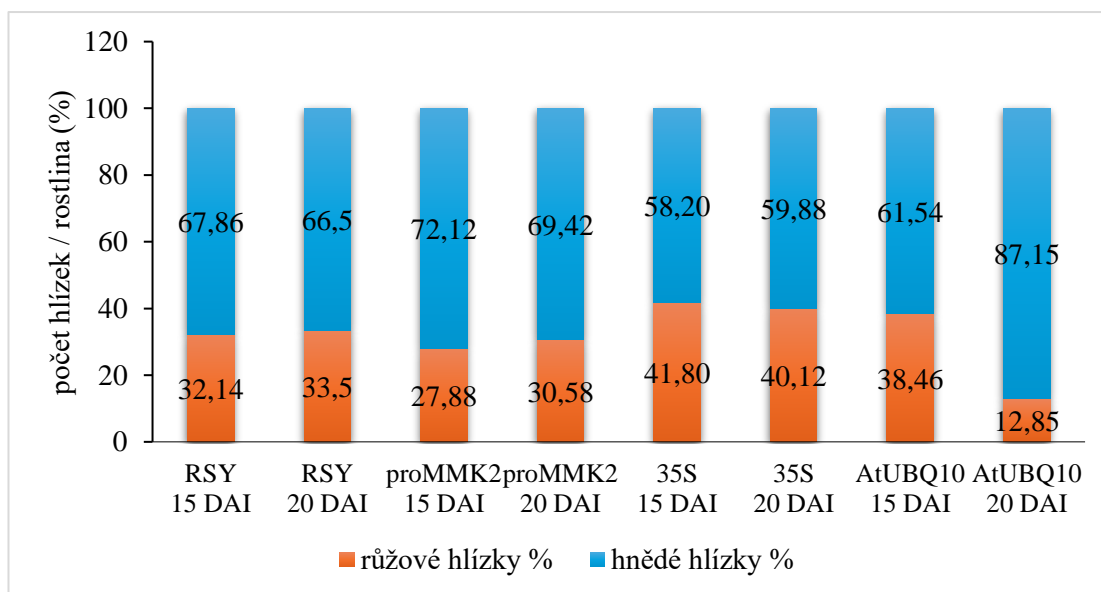


Obr. 30: Graf 1. experimentu s průměrnými počty hlízek na 10 cm délky kořenového systému u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. a 20. den po inokulaci *S. meliloti*. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).

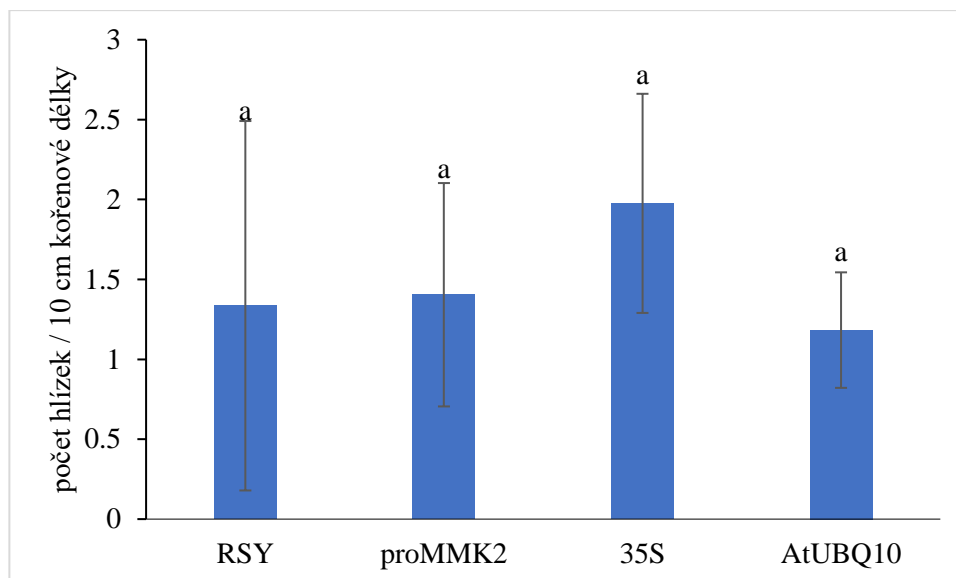




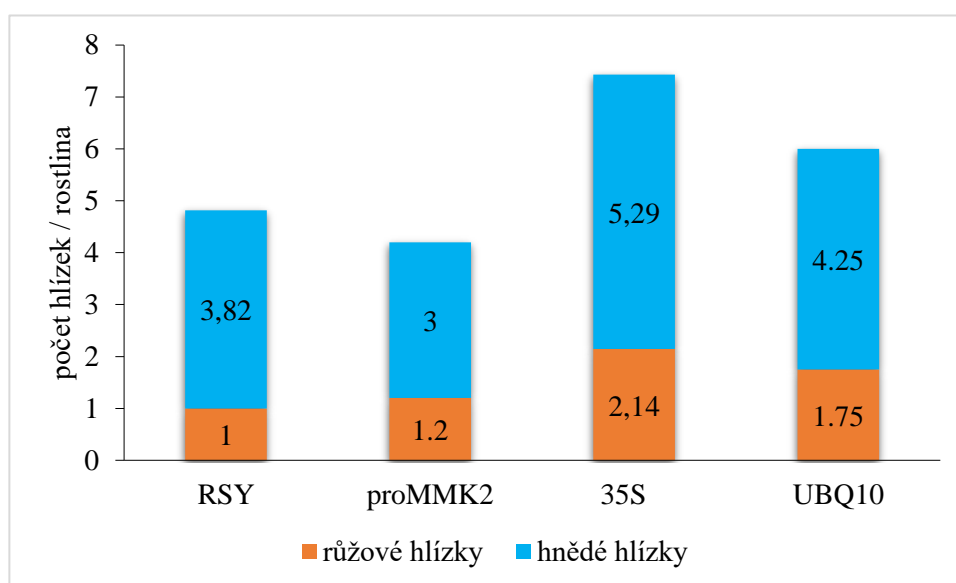
Obr. 31: Graf 1. experimentu s průměrnými počty růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. a 20. den po inokulaci bakteriemi.



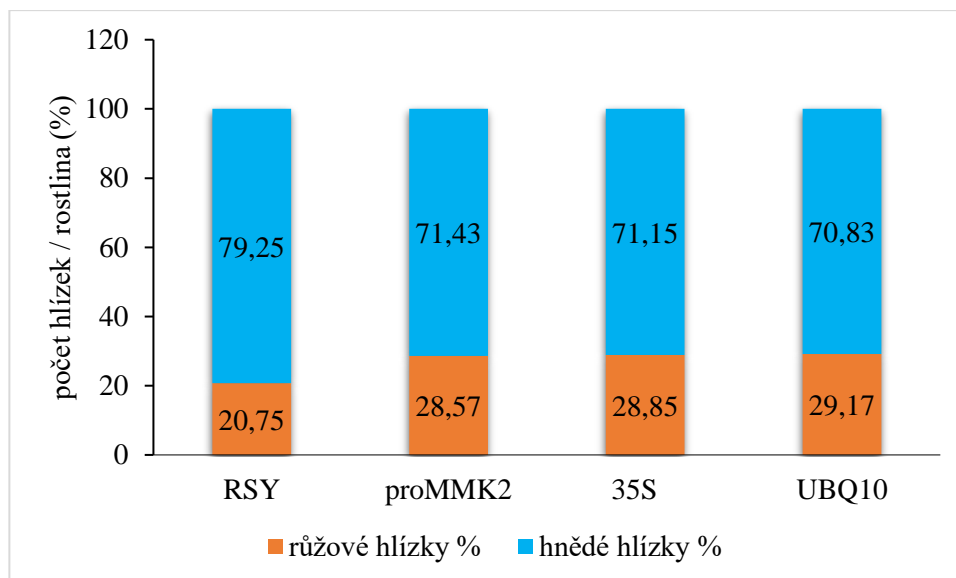
Obr. 32: Graf 1. experimentu zobrazující procentuální poměry růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocené 15. a 20. den po inokulaci *S. meliloti*.



Obr. 33: Graf 2. experimentu s průměrnými počty hlízek na 10 cm kořenové délky u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. den po inokulaci bakteriemi. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).



Obr. 34: Graf 2. experimentu s průměrnými počty růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. den po inokulaci bakteriemi.



Obr. 35: Graf 2. experimentu zobrazující procentuální poměry růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocené 15. den po inokulaci bakteriemi.

## 5 DISKUZE

Primárním úkolem experimentální části mé bakalářské práce byla příprava rostlin divého typu a transgenních linií *M. sativa* exprimujících *GFP:MMK2* pod nativním, a také konstitutivními promotory. Embryogenní potenciál se mezi jednotlivými genotypy může lišit, přesto se pomocí nepřímé SE podařilo získat rostliny všech požadovaných linií (Sangra *et al.*, 2019). SE lze u vojtěšky indukovat ze všech částí rostliny (Tichá *et al.*, 2020). Pro tuto práci byly jako výchozí materiál použity pouze listy dospělých *in vivo* rostoucích rostlin transgenních linií, a také divého typu.

U divého typu RSY a také transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* byla v průběhu SE pozorována zvýšená produkce větších somatických embryí. To se projevilo i v následném vývoji somatických embryí v kompletní rostliny, kdy vždy alespoň jedna z těchto linií vykazovala v kontrolních podmínkách delší kořenový systém než transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* a *35S::GFP:MMK2*.

V případě analýzy délky kořenového systému po ošetření kulturou *S. meliloti*, byly zjištěny nejvyšší průměrné hodnoty u linie *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Na rozdíl od výsledků získaných v kontrolních podmínkách, byl tento rozdíl od ostatních linií statisticky významný, a byl zaznamenán ve všech dnech měření. Kořenový systém transgenní linie *35S::GFP:MMK2* překvapivě vykazoval délky podobné divému typu RSY.

V kontrastu s předešlými výsledky, byly zjištěny hodnoty relativních přírůstků kořenových systémů mezi jednotlivými dny po ošetření se *S. meliloti*. Přestože nebyly statisticky významné, nejvyšší RP byly zjištěny u linií *proMMK2::GFP:MMK2* a *35S::GFP:MMK2*.

Při opakovaném experimentu vycházely hodnoty průměrných délek i RP kořenových systémů velmi podobně u všech linií a bez významných statistických rozdílů. Údaje však byly zpracovávány pouze 0, 5, 10 a 15 DAI oproti prvnímu experimentu.

Pro získání dalších informací týkajících se fenotypu transgenních linií byly změřeny plochy prvních tří trojlístků na výhonku. Pro tuto část byl použit materiál z dospělých rostlin. Očekávané větší plochy listů u linií *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2*, podobně jako u *35S::GFP:SIMK* (Hrbáčková *et al.*, 2021), byly potvrzeny pouze u prvního z trojlístků. U druhého a třetího trojlístku pak byly zjištěny velmi podobné rozměry u linií RSY, *proMMK2::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2*, na rozdíl

od linie *35S::GFP:MMK2*, jejíž listy vykazovaly až o 50 mm<sup>2</sup> menší plochu oproti ostatním liniím.

Vzhledem k aktuálním požadavkům na zvýšení schopnosti rostlin růst a vyvíjet se v půdách s nedostatkem dusíku za použití bakterií fixujících vzdušný dusík, byly dále sledovány interakce transgenních linií vojtěšky a *S. meliloti* (Roy *et al.*, 2020). Stočením kořenových vlásků dochází k zachycení bakterií a vytvoření infekčního vlákna pro jejich transport do kořene. Následně je spuštěna samotná tvorba hlízek. Jelikož symbiotické procesy vyžadují velké množství energie, jsou zahájeny pouze při deficitu dusíku (Oldroyd *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Z tohoto důvodu bylo v experimentech pro indukci symbiomy použito FAH médium bez obsahu dusíku.

Analyzován byl také počet vytvořených hlízek na 15. DAI a 20. DAI. V souladu s předchozími výsledky vykazovala linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* nejvyšší produkci hlízek v obou zmíněných dnech. Avšak při přepočtu hlízek na 10 cm délky kořenového systému, vzhledem k dlouhému kořenovému systému, vyšly u této linie hodnoty nejnižší. Opačná situace nastala u linie *proMMK2::GFP:MMK2*, která měla kořenový systém nejkratší, zároveň však tvořila srovnatelný počet hlízek s liniemi *35S::GFP:MMK2* (15 DAI) a RSY (20DAI).

Rostliny si z celkového počtu vytvořených hlízek udržovaly větší množství hnědých, tedy neaktivních hlízek. Množství aktivních (růžových) hlízek se pohybovalo okolo 30 %, avšak u linie *35S::GFP:MMK2* se jednalo až o 40 % z celkového počtu hlízek.

Do interakcí mezi vojtěškou a symbiotickými bakteriemi, a tedy i do vývoje hlízek, jsou mimo jiné zapojeny i MAPK (Grimsrud *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2020). Cílem této práce tedy bylo pozorovat zapojení MMK2 do symbiotických vztahů *M. sativa* – *S. meliloti*. Díky fúznímu proteinu GFP-MMK2 a *S. meliloti* značeného s červeným fluorescenčním proteinem, bylo možné sledovat tyto interakce fluorescenčním mikroskopem.

Tvorba infekčních vláken byla pozorována již desátý den po inokulaci bakteriemi u transgenních linií SIMK.GFP a SIMKKi (Hrbáčková *et al.*, 2021). V této práci však, i přes prokazatelný vývoj hlízek již 12. DAI, žádná IT pozorována nebyla. Kolem stáječících se kořenových vlásků bylo 15. DAI možné pozorovat červený signál bakterií. Zároveň se na špičkách těchto vlásků akumuloval signál GFP-MMK2, což dokazuje jeho zapojení do brzkých stádií interakcí se *S. meliloti*. Zřetelné IT bylo poté pozorováno u *35S::GFP:MMK2*, které vykazovalo signál MMK2 i *S. meliloti*, což potvrzuje účast

této MAPK na tvorbě IT podobně jako u GFP-SIMK (Hrbáčková *et al.*, 2021). Kolokalizace signálů z MMK2 a bakterií pak byla pozorována u všech hodnocených hlízek, čímž se projevila asociace MMK2 s tvorbou hlízek.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byly popsány rostlinné MAPK, konkrétně MAPK u *M. sativa*, a dále jejich zapojení do interakcí se symbiotickými bakteriemi. Další část byla věnována symbiotickým bakteriím, jejich interakcím s hostitelskými organismy, signalizaci v symbiotických procesech a organogenezi hlízek. Poslední kapitola teoretické části se zabývala popisem somatické embryogeneze a transgenních linií rodu *Medicago*.

V první části experimentální práce byly pomocí nepřímé SE připraveny rostliny *M. sativa* divého typu a transgenních linií exprimujících *GFP-MMK2* pod nativním, a také konstitutivními promotory. Rostliny byly kultivovány *in vitro* a použity pro fenotypovou analýzu.

Nejprve byl hodnocen fenotyp jednotlivých linií v kontrolních podmínkách. Analyzována byla délka a RP kořenových systémů, vývoj kořenových vlásků a plocha listů.

Následně byl hodnocen fenotyp rostlin po inokulaci *S. meliloti*. Opět byly zpracovány údaje o délce a RP kořenových systémů, a dále o průběhu organogeneze hlízek. Interakce mezi *S. meliloti* a kořenovými vlásky rostlin byly sledovány pomocí fluorescenčního mikroskopu, a stejně tak následná asociace bakterií a MMK2 při tvorbě IT a hlízek.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Amini, M., Deljou, A., & Nabiabad, H. S. (2016). Improvement of in vitro embryo maturation, plantlet regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(3), 321-330. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0374-y>

Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D. G., & de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor-dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *The Plant Cell*, 19(9), 2866-2885. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052944>

Araújo, S. de S., Duque, A. S. R. L. A., Santos, D. M. M. F. dos, & Fevereiro, M. P. S. (2004). An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(2), 123-131. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000022540.98231.f8>

Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichanté, J. L., Chabaud, M., Carrere, S., Crespi, M., Chan, R. L., & Frugier, F. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 24(9), 3838-3852. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103267>

Aung, B., Gao, R., Gruber, M. Y., Yuan, Z. -C., Sumarah, M., & Hannoufa, A. (2017). MsmiR156 affects global gene expression and promotes root regenerative capacity and nitrogen fixation activity in alfalfa. *Transgenic Research*, 26(4), 541-557. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0024-3>

Bardwell, L., & Shah, K. (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods*, 40(3), 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.06.008>

Brown, D.C.W., Finstad, K.I., Watson, E.M. (1995). Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: Thorpe, T.A. (eds) *in vitro* embryogenesis in plants. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 20. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_10)

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., & Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36734-36740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>



Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., & Hirt, H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell*, *14*(6), 703–711. <https://doi.org/10.1105/tpc.010256>

Cerri, M. R., Frances, L., Kelner, A., Fournier, J., Middleton, P. H., Auriac, M. -C., Mysore, K. S., Wen, J., Erard, M., Barker, D. G., Oldroyd, G. E., & de Carvalho-Niebel, F. (2016). The symbiosis-related ERN transcription factors act in concert to coordinate rhizobial host root infection. *Plant Physiology*, *2*(171), 1037-1054. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00230>

Cerri, M. R., Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., Li, X., Heckmann, A. B., Wang, T. L., Downie, J. A., Klingl, A., de Carvalho-Niebel, F., Xie, F., & Parniske, M. (2017). The ERN 1 transcription factor gene is a target of the CC a MK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, *215*(1), 323-337. <https://doi.org/10.1111/nph.14547>

Condic, M. L. (2014). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells and Development*, *23*(8), 796-812. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>

Dénarié, J., Debellé, F., & Promé, J. C. (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, *65*(1), 503-535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>

D'Haese, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, *12*(6), 79R-105R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.6.79R>

Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, *43*(1), 27-47. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb>

Gavrin, A., Jansen, V., Ivanov, S., Bisseling, T., & Fedorova, E. (2015). ARP2/3-mediated actin nucleation associated with symbiosome membrane is essential for the development of symbiosomes in infected cells of *Medicago truncatula* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, *28*(5), 605-614. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0402-R>

Godiard, L., Lepage, A., Moreau, S., Laporte, D., Verdenaud, M., Timmers, T., & Gamas, P. (2011). MtbHLH1, a bHLH transcription factor involved in *Medicago*

*truncatula* nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges. *New Phytologist*, 191(2), 391-404. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03718.x>

Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., & Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, 18(10), 2680-2693. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778>

Grimsrud, P. A., den Os, D., Wenger, C. D., Swaney, D. L., Schwartz, D., Sussman, M. R., Aneć, J. -M., & Coon, J. J. (2010). Large-scale phosphoprotein analysis in *Medicago truncatula* roots provides insight into *in vivo* kinase activity in Legumes. *Plant Physiology*, 152(1), 19-28. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149625>

Guan, D., Stacey, N., Liu, C., Wen, J., Mysore, K. S., Torres-Jerez, I., Vernié, T., Tadege, M., Zhou, C., Wang, Z.-yu, Udvardi, M. K., Oldroyd, G. E. D., & Murray, J. D. (2013). Rhizobial infection is associated with the development of peripheral vasculature in nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 162(1), 107-115. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215111>

Hadri, A. -E., Spaink, H. P., Bisseling, T., & Brewin, N. J. (1998). Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes in the Rhizobiaceae. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Haney, C. H., & Long, S. R. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 478-483. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910081107>

Hasnain, A., Iqra Ayesha, S., Atif Hasan Naqvi, S., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Zeeshan Hassan, M., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., G. M., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., & M. A. Abdelhamid, M. (2022). Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, (13). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>

Hlaváčková, K., Šamajová, O., Hrbáčková, M., Šamaj, J., Ovečka, M. (2023). Advanced microscopy resolves dynamic localization patterns of stress-induced mitogen-activated protein kinase (SIMK) during alfalfa root hair interactions with *Ensifer meliloti*. *Journal of Experimental Botany*, 74(12), 3729-3748. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad111>

Hrbáčková, M., Dvořák, P., Takáč, T., Tichá, M., Luptovčíak, I., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2020). Biotechnological perspectives of omics and genetic

engineering methods in alfalfa. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00592>

Hrbáčková, M., Luptovčíak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., Novák, D., Bednarz, H., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal*, 19(4), 767-784. <https://doi.org/10.1111/pbi.13503>

Huo, X., Schnabel, E., Hughes, K., & Frugoli, J. (2006). RNAi phenotypes and the localization of a protein::GUS fusion imply a role for *Medicago truncatula* PIN genes in nodulation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2), 156-165. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0106-y>

Hussain, M. I., Naeem, M., Khan, Z. I., Akhtar, S., Nadeem, M., Alnuwaiser, M. A., Ahmad, K., Vicente, O., & Yang, H. -H. (2022). Cadmium (Cd) and copper (Cu) exposure and bioaccumulation arrays in farm ruminants: impact of forage ecotypes, ecological sites and body organs. *Sustainability*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/su141912595>

Checucci, A., Azzarello, E., Bazzicalupo, M., Galardini, M., Lagomarsino, A., Mancuso, S., Marti, L., Marzano, M. C., Mocali, S., Squartini, A., Zanardo, M., & Mengoni, A. (2016). Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00835>

Chen, T., Zhou, B., Duan, L., Zhu, H., & Zhang, Z. (2017). MtMAPKK4 is an essential gene for growth and reproduction of *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum*, 159(4), 492-503. <https://doi.org/10.1111/ppl.12533>

Chen, T., Zhu, H., Ke, D., Cai, K., Wang, C., Gou, H., Hong, Z., & Zhang, Z. (2012). A MAP kinase kinase interacts with SymRK and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell*, 24(2), 823-838. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095984>

Cheng, H. -P., & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5183-5191. <https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5183-5191.1998>

Iantcheva, A., Revalska, M., Zehirov, G. *et al.* (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Medicago truncatula* cell suspension culture provides a system for

functional analysis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 50, 149–157. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9554-4>

Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B. E., Morris, P. C., Innes, R. W., Ecker, J. R., Scheel, D., Klessig, D. F., Machida, Y., Mundy, J., et al. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7), 301-308. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02302-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02302-6)

Ivanov, S., Fedorova, E. E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., & Bisseling, T. (2012). *Rhizobium* –legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8316-8321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200407109>

Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology*, 136(2), 3276–3283. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>

Kawaharada, Y., James, E. K., Kelly, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2017). The ethylene responsive factor required for nodulation 1 (ERN1) transcription factor is required for infection-thread formation in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 30(3), 194-204. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-16-0237-R>

Kępczyńska, E., & Kępczyński, J. (2023). Hormonal regulation of somatic embryogenesis in *Medicago* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(3), 613-625. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02593-5>

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. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2247>

Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2018). Cell and developmental biology of plant mitogen-activated protein kinases. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 237-265. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040314>

Kuppusamy, K. T., Ivashuta, S., Bucciarelli, B., Vance, C. P., Gantt, J. S., & VandenBosch, K. A. (2009). Knockdown of CELL DIVISION CYCLE16 reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 151(3), 1155-1166. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143024>

Küster, H. (2013). *Medicago truncatula*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 335-337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00915-3>

Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Hervé, C., Tóth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J. D., Udvardi, M. K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A., & Ott, T. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2343-2348. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913320107>

Li, H., Wang, Z., Ke, Q., Ji, C. Y., Jeong, J. C., Lee, H. -S., Lim, Y. P., Xu, B., Deng, X. -P., & Kwak, S. -S. (2014). Overexpression of *codA* gene confers enhanced tolerance to abiotic stresses in alfalfa. *Plant Physiology and Biochemistry*, 85, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.10.010>

Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor-induced infection. *Science*, 302(5645), 630-633. <https://doi.org/10.1126/science.1090074>

Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., & Bisseling, T. (2009). *Medicago* N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *The Plant Cell*, 21(9), 2811-2828. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064410>

Liu, C. -W., & Murray, J. (2016). The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/plants5030033>

Liu, W., Aung, B., Hannoufa, A., Xing, T., & Tian, L. (2018). Recent progress of transgenic technology development for alfalfa. *American Journal of Plant Sciences*, 09(03), 467-482. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.93035>

Ma, X. -F., Tudor, S., Butler, T., Ge, Y., Xi, Y., Bouton, J., Harrison, M., & Wang, Z. -Y. (2012). Transgenic expression of phytase and acid phosphatase genes in alfalfa (*Medicago sativa*) leads to improved phosphate uptake in natural soils. *Molecular Breeding*, 30(1), 377-391. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9628-0>

Maróti, G., & Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00326>

Matthews, C., Arshad, M., & Hannoufa, A. (2019). Alfalfa response to heat stress is modulated by microRNA156. *Physiologia Plantarum*, 165(4), 830-842. <https://doi.org/10.1111/ppl.12787>

McKersie, B. D., & Brown, D. C. W. (1996). Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research*, 6(03). <https://doi.org/10.1017/S0960258500003135>

Meijer, E. G. M., & Brown, D. C. W. (1987). A novel system for rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiologia Plantarum*, 69(4), 591-596. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb01971.x>

Middleton, P. H., Jakab, J., Penmetsa, R. V., Starker, C. G., Doll, J., Kaló, P., Prabhu, R., Marsh, J. F., Mitra, R. M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S. R., Cook, D. R., Kiss, G. B., & Oldroyd, G. E. D. (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *The Plant Cell*, 19(4), 1221-1234. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048264>

Mir, A. R., Pichtel, J., & Hayat, S. (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *BioMetals*, 34(4), 737-759. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>

Mortier, V., Wasson, A., Jaworek, P., De Keyser, A., Decroos, M., Holsters, M., Tarkowski, P., Mathesius, U., & Goormachtig, S. (2014). Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 202(2), 582-593. <https://doi.org/10.1111/nph.12681>

Murray, J. D., Karas, B. J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., & Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science*, 315(5808), 101-104. <https://doi.org/10.1126/science.1132514>

Ng, J. L. P., & Mathesius, U. (2018). Acropetal auxin transport inhibition is involved in indeterminate but not determinate nodule formation. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00169>

Nichol, J. W., Slade, D., Viss, P., & Stuart, D. A. (1991). Effect of organic acid pretreatment on the regeneration and development (conversion) of whole plants from callus cultures of alfalfa, *Medicago sativa* L. *Plant Science*, 79(2), 181-192. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90105-H](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90105-H)

Nolan, K. E., Rose, R. J., & Gorst, J. R. (1989). Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Reports*, 8(5). <https://doi.org/10.1007/BF00274129>

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>

Peck, M. C., Fisher, R. F., & Long, S. R. (2006). Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5417-5427. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-06>

Radovic, J., Sokolovic, D., & Markovic, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475. <https://doi.org/10.2298/BAH0906465R>

Reid, D. E., Heckmann, A. B., Novák, O., Kelly, S., & Stougaard, J. (2016). CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE3 maintains cytokinin homeostasis during root and nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 170(2), 1060-1074. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00650>

Rodriguez, M. C. S., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 621-649. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112252>

Roth, L. E., & Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology*, 1989(49), 13-23. <https://europepmc.org/article/med/2759097>

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15-41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

Roy, S., Robson, F., Lilley, J., Liu, C. -W., Cheng, X., Wen, J., Walker, S., Sun, J., Cousins, D., Bone, C., Bennett, M. J., Downie, J. A., Swarup, R., Oldroyd, G., & Murray, J. D. (2017). MtLAX2, a functional homologue of the *Arabidopsis* auxin influx transporter AUX1, is required for nodule organogenesis. *Plant Physiology*, 174(1), 326-338. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01473>

Ryu, H., Laffont, C., Frugier, F., & Hwang, I. (2017). MAP kinase-mediated negative regulation of symbiotic nodule formation in *Medicago truncatula*. *Molecules and Cells*, 40(1), 17-23. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2211>

Salaün, C., Lepiniec, L., & Dubreucq, B. (2021). Genetic and molecular control of somatic embryogenesis. *Plants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/plants10071467>

Sangra, A., Shahin, L., & Dhir, S. K. (2019). Long-term maintainable somatic embryogenesis system in alfalfa (*Medicago sativa*) using leaf explants: embryogenic sustainability approach. *Plants*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/plants8080278>

Saunders, J. W., & Bingham, E. T. (1972). Production of alfalfa plants from callus tissue 1. *Crop Science*, 12(6), 804-808. <https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200060026x>

Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Bandyopadhyay, K., Kereszt, A., Pislariu, C. I., Nakashima, J., Benedito, V. A., Kondorosi, E., & Udvardi, M. K. (2013). The C2H2 transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 25(9), 3584-3601. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114017>

Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., & Bisseling, T. (2007). *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiology*, 145(1), 183-191. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100495>

Šamaj, J., Ovečka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., & Hirt, H. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal*, 21(13), 3296-3306. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf349>

Šamajová, O., Komis, G., & Šamaj, J. (2013). Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science*, 18(3), 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.11.004>

Šamajová, O., Plíhal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., & Šamaj, J. (2013). Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances*, 31(1), 118-128. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.002>

Tichá, M., Illéssová, P., Hrbáčková, M., Basheer, J., Novák, D., Hlaváčková, K., Šamajová, O., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2020). Tissue culture, genetic



transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1265-1280. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1814689>

Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Albrektsen, A. S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., & Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, 315(5808), 104-107. <https://doi.org/10.1126/science.1132397>

Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334-342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>

Wang, Z., Li, H., Ke, Q., Jeong, J. C., Lee, H. -S., Xu, B., Deng, X. -P., Lim, Y. P., & Kwak, S. -S. (2014). Transgenic alfalfa plants expressing AtNDPK2 exhibit increased growth and tolerance to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.025>

Wang, Q., Yang, S., Liu, J., Terecskei, K., Ábrahám, E., Gombár, A., Domonkos, Á., Szűcs, A., Körmöczi, P., Wang, T., Fodor, L., Mao, L., Fei, Z., Kondorosi, É., Kaló, P., Kereszt, A., & Zhu, H. (2017). Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(26), 6854-6859. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700715114>

Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>

Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., & Bisseling, T. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development*, 141(18), 3517-3528. <https://doi.org/10.1242/dev.110775>

Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T. L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., & Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20540-20545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806858105>

Yang, S., Wang, Q., Fedorova, E., Liu, J., Qin, Q., Zheng, Q., Price, P. A., Pan, H., Wang, D., Griffitts, J. S., Bisseling, T., & Zhu, H. (2017). Microsymbiont discrimination

mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(26), 6848-6853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700460114>

Yin, J., Guan, X., Zhang, H., Wang, L., Li, H., Zhang, Q., Chen, T., Xu, Z., Hong, Z., Cao, Y., & Zhang, Z. (2019). An MAP kinase interacts with LHK1 and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Science China Life Sciences*, 62(9), 1203-1217. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9444-9>

Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., & Kong, Z. (2019). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 221(2), 1049-1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>

Zheng, G., Fan, C., Di, S., Wang, X., Xiang, C., & Pang, Y. (2017). Over-expression of *Arabidopsis* EDT1 gene confers drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02125>

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2,4,5-T	2,4,5-trichlorfenoxyoctová
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
ABA	kyselina abscisová
<i>AtEDT1</i>	Arabidopsis Enhanced Drought Tolerance 1
<i>AtNDPK2</i>	<i>NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 2</i>
ATP	adenosintrifosfát
BA	6-benzyladenin
BAP	6-benzylaminopurin
CaM	kalmodulin
<i>CaMV35S</i>	konstitutivní promotor 35S viru kvěťákové mozaiky
CCaMK	protein kináza závislá na vápníku
<i>CODA</i>	<i>CHOLINE OXIDASE A</i>
cm	centimetr
DAI	dny po inokulaci
DAT	dny po přenosu
DMI3	DOES NOT MAKE INFECTION 3
ENOD11, 12	EARLY NODULATION 11, 12
ERN1, 2	REQUIRED FOR NODULATION 1, 2
FAH médium	Fahraeus médium
FLS2	receptor na flagellin
g . l <sup>-1</sup>	gram na litr
GA	gibereliny
GFP	zelený fluorescenční protein
GTPázy	enzymy ze skupiny hydroláz
h	hodina

IAA	kyselina indol-octová
IEDC	indukované embryogenní determinované buňky
IPD3	interakční protein genu DMI3
IT	infekční vlákno
JA	kyselina jasmonová
LAX2	auxinový importní přenašeč LIKE AUXIN 2
LCO	lipochitooligosacharid
LjCYCLOPS	transkripční faktor u <i>L. japonicus</i>
LjMPK6	mitogenem aktivovaná protein kináza 6 u <i>L. japonicus</i>
LjSIP2	MAPKK z <i>L. japonicus</i>
LSFM	light sheet fluorescence microscopy
MAPK	mitogenem aktivované protein kinázy
MAPKK	mitogenem aktivované protein kinázy kinázy
MAPKKK	mitogenem aktivované protein kinázy kinázy kinázy
MBP	myelinový bazický protein
mg	miligram
min	minuta
ml . l <sup>-1</sup>	mililitr na litr
MMK2, 3	mitogenem aktivovaná protein kináza 2, 3 u <i>M. sativa</i>
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
MS médium	Murashige and Skoog médium
<i>MtARP3</i>	ACTIN RELATED PROTEIN u <i>M. truncatula</i>
<i>MtbHLH476</i>	základní helix-loop-helix transkripční faktor 476 u <i>M. truncatula</i>
<i>MtbHLH1</i>	základní helix-loop-helix transkripční faktor 1 u <i>M. truncatula</i>
<i>MtCDC16</i>	CELL DIVISION CYCLE u <i>M. truncatula</i>
<i>MtCRE1</i>	cytokininový receptor u <i>M. truncatula</i>

<i>MtFLOT2/4</i>	flotillin like genes 2/4 u <i>M. truncatula</i>
MtLYK3	LYSIN MOTIF KINASE u <i>M. truncatula</i>
MtMAPK3, 6	mitogenem aktivovaná protein kináza 3, 6 u <i>M. truncatula</i>
MtMAPKK4, 5	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza 4, 5 u <i>M. truncatula</i>
MtNFP	NOD FACTOR PERCEPTION u <i>M. truncatula</i>
MtNSP2	Nod Factor Signaling Pathway 2 u <i>M. truncatula</i>
<i>MtPAP1</i>	kyselá fosfatáza u <i>M. truncatula</i>
<i>MtPHY1</i>	fytaza u <i>M. truncatula</i>
<i>MtPT1</i>	fosfátový transportér 1 u <i>M. truncatula</i>
MtRab7	Ras-related protein in brain
<i>MtRSD</i>	REGULATOR OF SYMBIOSOME DEVELOPMENT u <i>M. truncatula</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
<i>MtSYMREM1</i>	protein Remorin rodiny u <i>M. truncatula</i>
<i>MtVAMP721d, e</i>	VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 721d, e u <i>M. truncatula</i>
N	počet
NAA	1-naftalenoctová
NGS	next generation sequencing
NIN	NODULE INCEPTION
NodD	regulátor transkripce <i>nod</i> genů <i>L. japonicus</i> <i>Lotus japonicus</i>
Nod faktor	nodulační faktor
<i>nod</i> genes	nodulační geny
PAMP	s patogeny asociované molekulární vzory
PEDC	preembryogenní determinované buňky
PIN2, 3, 4	auxinové reportéry PINFORMED 2, 3, 4

PRKK	na patogen responzivní protein kináza kináza
PRR	receptory rozpoznávající vzory
RFP	červený fluorescenční protein
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky za minutu
RSY	kultivar Regen SY
SAMK	stresem aktivovaná MAPK
SE	somatická embryogeneze
SIMK	stresem indukovaná MAPK
SIMKK	stresem indukovaná MAPKK
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
<i>SPL13i</i>	<i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 13</i>
<i>SWPA2</i>	<i>SWEETPOTATO PEROXIDASE ANIONIC 2</i>
SymRK	symbiotická receptorová kináza
μl	mikrolitr
μl . l <sup>-1</sup>	mikrolitr na litr
μm	mikrometr
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Konvergence a divergence signálů vyvolaných solí a elicitory na úrovni MAPKK. Zdroj: (Cardinale *et al.*, 2002)..... 15
- Obr. 2: Signalizace u symbiózy a rostlinná imunita zapojená do rozpoznávání specifity v interakcích luštěniny a rhizobií (označeno červenými hvězdami). Upraveno dle: Wang *et al.*, 2018..... 17
- Obr. 3: Schéma postupu nepřímé SE u *M. sativa*. Proces začíná výběrem mladých listů (A, B), které jsou po povrchové sterilizaci nařezány a umístěny na vhodné kultivační médium (C). Dalším krokem je tvorba kalusu na médiu obsahujícím hormony (D). Následuje indukce embryogenního potenciálu kalusu (E) a samotná tvorba somatických embryí (F) na médiu bez hormonů. Na médiu bohatém na vitamíny a aminokyseliny je indukováno klíčení embryí (G), které se po přenosu na MS médium vyvinou v kompletní rostliny (H). Měřítka = 1 cm (B, C, H), 2 mm (D, E), 1 mm (F, G)..... 24
- Obr. 4: Kalusy vytvořené na listových explantátech *M. sativa* po 3 týdnech kultivace na B5H médiu: A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Měřítka = 2 mm. .... 38
- Obr. 5: Kalusy se somatickými embryi *M. sativa* po 2 týdnech kultivace na B50 médiu: A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Nejvyvinutější embrya jsou označena šipkami. Měřítka = 2 mm. .... 39
- Obr. 6: Detaily somatických embryí *M. sativa* po 2 týdnech kultivace na B50 médiu: A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Embrya jsou označena šipkami. Měřítka = 500  $\mu$ m. .... 39
- Obr. 7: Detaily somatických embryí *M. sativa* po týdnu kultivace na MMS médiu (A) a po 2 týdnech kultivace na B50 médiu (B, C, D). A – RSY (TL), B – *proMMK2::GFP:MMK2* (TL + GFP), C – *35S::GFP:MMK2* (TL + GFP), D – *AtUBQ10::GFP:MMK2* (TL + GFP). Měřítka = 1 mm (A), 200  $\mu$ m (B), 500  $\mu$ m (C, D). .... 40
- Obr. 8: Graf s průměrnými délkami kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* naměřených v průběhu 14 dnů po přenosu na MS médium.

Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ). .....41

Obr. 9: Graf s relativními přírůstky kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* v průběhu 14 dnů. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ). .....42

Obr. 10: Trojlístky *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* rostoucích *in vivo*. A – RSY, B – *proMMK2::GFP:MMK2*, C – *35S::GFP:MMK2*, D – *AtUBQ10::GFP:MMK2*. Měřítko = 1 cm. ....44

Obr. 11: Graf s průměrnými plochami trojlístků *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* po 14 dnech od zastřihnutí ( $N = 11 - 12$ ). Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ). .....44

Obr. 12: Kořen *M. sativa* divý typ RSY na 5. DAT na FAH médiu. Měřítko = 200  $\mu$ m. ....45

Obr. 13: Kořen *M. sativa* transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* na 5. DAT na FAH médiu. Měřítko = 200  $\mu$ m. ....45

Obr. 14: Kořen *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP:MMK2* na 5. DAT na FAH médiu. Měřítko = 200  $\mu$ m. ....46

Obr. 15: Kořen *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* na 5. DAT na FAH médiu. Měřítko = 200  $\mu$ m. ....46

Obr. 16: Graf 1. experimentu s průměrnými délkami kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* naměřených v průběhu 20 dnů po inokulaci *S. meliloti*. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ). .....47



Obr. 17: Graf 1. experimentu s vypočítanými relativními přírůstky kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* v průběhu 20 dnů po inokulaci *S. meliloti*. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).....47

Obr. 18: Graf 2. experimentu s průměrnými délkami kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* naměřených v průběhu 15 dnů po inokulaci bakteriemi. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ). .....48

Obr. 19: Graf 2. experimentu s vypočítanými relativními přírůstky kořenových systémů *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* v průběhu 15 dnů po inokulaci bakteriemi. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).....48

Obr. 20: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* divý typ RSY kultivovaný na FAH médiu na 15. DAI se *S. meliloti*. Zatočený kořenový vlásek označen šipkou. A – TL, B – mRFP, C – TL + mRFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu$ m. ....49

Obr. 21: Hlízky *M. sativa* divý typ RSY – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – RFP, C – TL + mRFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 500  $\mu$ m. ...50

Obr. 22: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* kultivovaný na FAH médiu na 15 DAI se *S. meliloti*. Zatočený kořenový vlásek označen šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu$ m. ....50

Obr. 23: Hlízky *M. sativa* transgenní linie *proMMK2::GFP:MMK2* – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 500  $\mu$ m. ....51

- Obr. 24: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP:MMK2* kultivovaný na FAH médiu na 15 DAI se *S. meliloti*. Infekční vlákna označena šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ ..... 51
- Obr. 25: Detail hlízky *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP:MMK2* – 12 DAI na FAH médiu. Hlízka označena šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ . ..... 52
- Obr. 26: Hlízky *M. sativa* transgenní linie *35S::GFP:MMK2* – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítka = 500  $\mu\text{m}$ . ..... 53
- Obr. 27: Kořen s kořenovými vlásky *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* kultivovaný na FAH médiu na 15 DAI se *S. meliloti*. Signál MMK2 označen šipkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ . ..... 53
- Obr. 28: Detail hlízky *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* – 12 DAI na FAH médiu. Hlízka označena šipkou. Nejintenzivnější signál označen hvězdičkou. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – TL + mRFP + GFP. Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ ..... 54
- Obr. 29: Hlízky *M. sativa* transgenní linie *AtUBQ10::GFP:MMK2* – 15 DAI na FAH médiu. Hlízky označeny šipkami. A – TL, B – mRFP, C – GFP, D – mRFP + GFP. Měřítka = 500  $\mu\text{m}$ . ..... 55
- Obr. 30: Graf 1. experimentu s průměrnými počty hlízek na 10 cm délky kořenového systému u *MMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. a 20. den po inokulaci *S. meliloti*. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm\text{SD}$ ). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ). ..... 56
- Obr. 31: Graf 1. experimentu s průměrnými počty růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. a 20. den po inokulaci bakteriemi..... 57
- Obr. 32: Graf 1. experimentu zobrazující procentuální poměry růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií

*proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocené 15. a 20. den po inokulaci *S. meliloti*.....57

Obr. 33: Graf 2. experimentu s průměrnými počty hlízek na 10 cm kořenové délky u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. den po inokulaci bakteriemi. Analýza byla provedena pomocí ANOVA a Tukey testu. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku ( $\pm$ SD). Malá písmena označují statistickou významnost ( $P < 0,05$ ).....58

Obr. 34: Graf 2. experimentu s průměrnými počty růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocenými 15. den po inokulaci bakteriemi.....58

Obr. 35: Graf 2. experimentu zobrazující procentuální poměry růžových a hnědých hlízek na rostlinu u *M. sativa* divého typu RSY a transgenních linií *proMMK2::GFP:MMK2*, *35S::GFP:MMK2* a *AtUBQ10::GFP:MMK2* hodnocené 15. den po inokulaci bakteriemi. ....59