

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Imunolokalizace mitogenem aktivovaných protein
kináz a cytoskeletálních proteinů u vojtěšky
(*Medicago sativa*) v interakci s *Rhizobium***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Hlaváčková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok:	2019

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

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Kateřina Hlaváčková

Velké poděkování patří především mé školitelce, Mgr. Olze Šamajové, Dr., za její odborné vedení, cenné rady, diskuse, přístup a vstřícnost při vypracování této práce. Ráda bych poděkovala i celému Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za ochotu vždy pomoci. Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA_PrF_2018_031 a IGA_PrF_2019_011.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení	Kateřina Hlaváčková
Název práce	Imunolokalizace mitogenem aktivovaných protein kinas a cytoskeletálních proteinů u vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>) v interakci s <i>Rhizobium</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Teoretická část diplomové práce se zabývá symbiotickou interakcí mezi rostlinami z čeledi bobovitých a bakteriemi rodu *Rhizobium*. Jsou popsány rostliny *M. sativa* a *M. truncatula* jako modelové organismy pro studium symbiotického vztahu, včetně jeho jednotlivých procesů. Další část je věnována MAPKs identifikovaných u *M. sativa* a *M. truncatula* a také roli MAPK signální kaskády během symbiózy. Pozornost je věnována také obecně rostlinnému cytoskeletu, konkrétně aktinu a mikrotubulům, stejně jako jeho reorganizaci v hlízkách během symbiotické interakce. Nakonec jsou popsány imunolokalizační metody, jejich význam a využití v buněčné biologii. Prvním cílem experimentální části bylo optimalizovat imunolokalizační metodu “whole-mount“ tak, aby ji bylo možné využívat u vojtěšky k lokalizaci proteinů. Optimalizovaná „whole-mount“ metoda byla následně využita pro zjištění subcelulární lokalizace SIMK a sledování vlivu abiotických stresů a inhibitoru MAPKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci SIMK a fosforylaci MAPKs. Druhým cílem byla imunohistochemická kolokalizace cytoskeletu a MAPKs u vojtěšky v hlízkách při symbiotické interakci s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Posledním cílem bylo odvození transgenní linie *SIMK RNAi in vitro* procesem somatické embryogeneze a její následné využití pro Western blot analýzu, při které byla ověřována přítomnost proteinů SIMK a MMK3 a vyhodnocena abundance proteinů v kontrolních podmínkách a v podmínkách během symbiotické interakce.

Klíčová slova	symbióza, <i>Medicago</i> , <i>Rhizobium</i> , cytoskelet, mikrotubuly, MAPK kaskáda, imunolokalizace, voskové řezy
Počet stran	113
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Hlaváčková
Title	Immunolocalization of mitogen activated protein kinases and cytoskeletal proteins in interactions of alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) with <i>Rhizobium</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Deptment of cell biology CRH
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2019

Abstract

Theoretical part of the diploma thesis is dealing with symbiotic interaction between legumes and *Rhizobium*. *M. sativa* and *M. truncatula* as model organisms for study of the symbiotic relationship, including its processes are described. This part also includes overview of MAPKs in *M. sativa* and *M. truncatula* as well as their role during symbiosis. Last part is devoted to the plant cytoskeleton, namely actin filaments and microtubules and their reorganization during symbiotic interactions. Importance and use of immunolocalization methods in cell biology closes the theoretical part of this diploma thesis. The first goal of the experimental part of this work was to modify „whole-mount“ immunolocalization method for proteins localization in *M. sativa*. Optimized „whole-mount“ method was subsequently used to observe SIMK subcellular localization as well as cytoskeleton organization, SIMK localization and phosphorylation of MAPKs after abiotic stresses and MAPKKs inhibitor treatments. Immunohistochemical colocalization of MAPKs and cytoskeleton was examined in nodules of *M. sativa* during symbiotic interaction with *Rhizobium*. The last goal included preparation of transgenic line *SIMKK RNAi in vitro* by somatic embryogenesis and detection of SIMK and MMK3 proteins in regenerated plants by Western blot analysis, as well as quantification of SIMK and MMK3 abundance in control conditions compared with those during symbiosis.

Keywords	symbiosis, <i>Medicago</i> , <i>Rhizobium</i> , cytoskeleton, microtubules, MAPK cascade, immunolocalization, wax sections
Number of pages	113
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	12
2	Současný stav řešené problematiky	14
2.1	<i>Medicago sativa</i>	14
2.2	Symbióza.....	14
2.2.1	Organogeneze hlízek.....	16
2.2.2	Rhizobiální infekce	18
2.2.3	Intracelulární osídlování rostlinných buněk rhizobii	20
2.3	Mitogen- aktivované protein kinázy	21
2.3.1	Mitogen- aktivované protein kinázy u <i>M. truncatula</i> a <i>M. sativa</i>	22
2.3.2	Signalizace MAPKs při symbiotické interakci	23
2.4	Rostlinný cytoskelet.....	24
2.4.1	Aktin	25
2.4.2	Mikrotubuly	26
2.5	Rostlinný cytoskelet během symbiotické interakce.....	30
2.5.1	Reorganizace aktinového cytoskeletu uvnitř hlízek	31
2.5.2	Reorganizace mikrotubulového cytoskeletu uvnitř hlízek.....	32
2.6	Imunolokalizační metody.....	35
3	Materiál a metody	37
3.1	Materiál	37
3.1.1	Bakteriální materiál.....	37
3.1.2	Rostlinný materiál.....	37
3.1.3	Chemikálie	38
3.1.4	Roztoky a média	41
3.1.5	Přístroje.....	48
3.1.6	Software	49
3.2	Metody	50
3.2.1	Příprava médií pro kultivaci rostlin <i>in vitro</i>	50
3.2.1.1	B5H médium indukující tvorbu kalusů	50
3.2.1.2	B50 médium indukující tvorbu embryí	50
3.2.1.3	MMS médium indukující klíčení a vývoj rostlin	50
3.2.1.4	MS médium na kultivaci rostlin v <i>in vitro</i> podmínkách.....	51

3.2.1.5	Pevné Fahreus médium bez N ₂	51
3.2.2	Příprava médií pro kultivaci <i>S. meliloti</i>	51
3.2.2.1	Tekuté Fahreus médium bez N ₂	51
3.2.2.2	LB médium pro kultivaci <i>S. meliloti</i>	51
3.2.3	Příprava kultury <i>S. meliloti</i>	52
3.2.4	Kultivace bakterií <i>S. meliloti</i> v tekutém Fahreus médiu bez N ₂	52
3.2.5	Indukce symbiotické interakce mezi kořeny <i>M. sativa</i> a bakteriemi <i>S. meliloti</i>	52
3.2.6	Optimalizace imunolokalizační metody „whole- mount“	53
3.2.7	Imunolokalizace tubulinu a SIMK.....	54
3.2.8	Imunolokalizace tubulinu, SIMK a fosforylovaných MAPKs po působení stresů a inhibitoru MAPKKs	55
3.2.9	Imunolokalizace tubulinu, MAPKs a fosforylovaných MAPKs na zafixovaných řezech ve Steedmanovém vosku.....	57
3.2.9.1	Příprava vzorků a zalévání do Steedmanova vosku	57
3.2.9.2	Řezání vzorků zalitých ve Steedmanovém vosku	58
3.2.9.3	Odvoskování a rehydratace řezů	59
3.2.9.4	Imunolokalizace tubulinu a MAPKs	59
3.2.10	Indukce transgenní linie <i>in vitro</i> procesem somatické embryogeneze	61
3.2.11	Western blot.....	62
4	Výsledky.....	64
4.1	Optimalizace imunolokalizační metody „whole- mount“.....	64
4.2	Subcelulární lokalizace SIMK	68
4.3	Vliv působení abiotických stresů a inhibitoru MAPKKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci SIMK a úroveň fosforylace.....	72
4.4	Imunohistochemická kolokalizace cytoskeletu a MAPKs u vojtěšky v interakci s <i>Rhizobium</i>	84
4.5	Odvození transgenní linie <i>in vitro</i> procesem somatické embryogeneze.....	93
4.6	Detekce proteinů analýzou Western blot	95
5	Diskuze.....	98
6	Závěr	101
7	Literatura	103

8	Seznam použitých zkratek	112
----------	---------------------------------------	------------

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

1. Vypracování literární rešerše na téma úloha MAPK signálu a cytoskeletu u vojtěšky v interakci s prospěšnými mikroorganismy rodu *Rhizobium*

Experimentální část

1. Modifikace imunolokalizačních technik pro lokalizaci proteinů v různých typech pletiv, orgánů a semenáčků vojtěšky
2. Imunohistochemická kolokalizace MAPKs a cytoskeletu u vojtěšky v interakci s *Rhizobium*
3. Odvození somatické embryogeneze z transgenní linie *SIMKK RNAi*

1 ÚVOD

Omezená dostupnost dusíkatých sloučenin v půdě je často hlavní limitací růstu a produktivity rostlin. Rostlinám z čeledi bobovitých se daří tento problém řešit vytvořením symbiotického vztahu s půdními bakteriemi, patřícími do rodu *Rhizobium*. Rhizobia jsou schopna pro rostliny fixovat dusík. K fixaci dusíku a výměně živin potom dochází ve specializovaných kořenových orgánech, hlízkách (nodulech). Hlízky jsou tvořeny koordinovaným a kontrolovaným procesem, který kombinuje bakteriální infekci a organogenezi hlízek (Oldroyd a Downie, 2008; Mortier *et al.*, 2012). Signály z prostředí jsou v buňkách přenášeny prostřednictvím signálních transdukčních drah, ve kterých hrají jako signální molekuly důležitou roli také mitogen-aktivované protein kinázy (MAPKs), (Ovečka *et al.*, 2014). Několik MAPKs je zapojeno do buněčných odpovědí na abiotický nebo biotický stres (Moustafa *et al.*, 2014). Tyto stresy negativně ovlivňují tvorbu hlízek, které vznikají jako výsledek symbiotické interakce (Lopez-Gomez *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2012). Na druhou stranu, rhizobiální infekce aktivuje MAPK signalizační kaskády a reakce spojené s obranou nebo stresem během raných fází infekce (Lopez-Gomez *et al.*, 2012). Při kontaktu rostlin s některými mikroorganismy, představující jejich potencionální partnery nebo naopak patogeny, hraje rostlinný cytoskelet velmi důležitou roli. Při vzniku symbiotického vztahu s rhizobii se objevují změny v cytoskeletu u kořenových vlásků a kortikálních buněk. Mikrotubuly a aktinová filamenta jsou zapojena do zatočení kořenových vlásků, růstu infekčního vlákna a vývoje kořenových hlízek (Takemoto a Hardham, 2004). Reorganizace rostlinného cytoskeletu tedy pravděpodobně hraje během ontogeneze hlízek důležitou roli (Timmers *et al.*, 1998).

Prvním cílem experimentální části mé diplomové práce byla optimalizace imunolokalizační metody „whole-mount“ tak, aby bylo možné pomocí této metody lokalizovat u vojtěšky proteiny nejen v semenáčcích, ale také v různých typech pletiv a orgánů. Imunolokalizační metoda „whole-mount“ byla poté použita na zjištění subcelulární lokalizace SIMK v kořenech *M. sativa*. Byl také sledován vliv krátkodobého působení abiotických stresů a inhibitoru MAPKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci proteinu SIMK a úroveň fosforylace. Druhým cílem byla imunohistochemická kolokalizace tubulinu a SIMK u vojtěšky v interakci s bakteriemi rodu *Rhizobium* na voskových řezech hlízek ve Steedmanovém vosku. Posledním cílem bylo odvození transgenní linie *SIMKK RNAi in vitro* procesem somatické

embryogeneze a využití těchto regenerovaných rostlin na Western blot analýzu, která byla využita na detekci proteinů SIMK a MMK3, které jsou součástí signální dráhy, do které je SIMKK zapojena a to jak u rostlin kultivovaných v kontrolních podmínkách, tak u rostlin inokulovaných rhizobiální tekutou kulturou *Sinorhizobium meliloti*.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 *Medicago sativa*

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) zvaná také jako alfalfa je jednou z nejdůležitějších píceňin, která je rozsáhle pěstována především v oblasti Středomoří (Barbulova *et al.*, 2002; Molero *et al.*, 2019). Na rozdíl od *Medicago truncatula*, která je diploidní a autogamní s poměrně malým genomem, je alfalfa tetraploidní rostlinou (Barker *et al.*, 1990). Jedná se o cizosprašnou rostlinu, pro kterou je typická nekompatibilita vlastního pylu (Chen *et al.*, 2016). Kromě toho, že je *M. sativa* nejrozšířenější píceňinou na světě, hraje také klíčovou roli v řadě oblastí, včetně ochrany vodních a půdních zdrojů, zvyšování úrodnosti půdy a sekvestraci půdního uhlíku. Alfalfa má mnoho výhodných vlastností, které ji činí vhodnou surovinou na výrobu biopaliv, včetně vysokého výnosu biomasy. Díky schopnosti biologické fixace dusíku nepotřebuje alfalfa žádná dusíkatá hnojiva a je tak schopna poskytovat veškerý potřebný dusík (Samac *et al.*, 2015). Semena píceňin jsou bohatá na bílkoviny a jsou proto důležitá nejen pro výživu lidí, ale také zvířat (Oldroyd *et al.*, 2011).

2.2 Symbióza

Na základě potřeby udržitelných zemědělských postupů roste zájem o biologickou fixaci dusíku a symbiózu mezi bakteriemi rodu *Rhizobium* a rostlinami čeledi bobovitých (Laranjo *et al.*, 2014). Tyto symbiotické půdní bakterie také bývají kolektivně nazývány rhizobia (Kitaeva *et al.*, 2015). Jako rhizobia byly původně označovány bakterie spadající především do rodu *Rhizobium*, avšak dnes k tomuto rodu patří už jen několik bakterií. Později byly identifikovány další rody jako *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988) a *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997). Přestože je symbióza prospěšná pro oba partnery symbiotického vztahu, je řízena přísnými pravidly ze strany rostliny (Oldroyd *et al.*, 2011). Symbiotická fixace dusíku je energeticky náročným procesem a v případě, že jsou k dispozici dostatečné hladiny fixovaného dusíku, dochází k její silné inhibici (Lin *et al.*, 2018). Důležitá je symbióza, která se týká hospodářsky významných plodin, využívaných v potravinářství nebo jako krmivo (Laranjo *et al.*, 2014).

V rostlinné biologii se jako modelová rostlina z čeledi bobovitých využívá *M. truncatula*. Bylo zjištěno, že schopnost účinně fixovat dusík je u *M. truncatula* ve srovnání s jejím geneticky blízkým příbuzným druhem *M. sativa* výrazně nižší. Nízká

účinnost symbiotického systému u *M. truncatula* souvisí se sníženou specifickou aktivitou hlízek, sníženou schopností tvořit organické kyseliny a omezeným výdejem dusíku z hlízek (Sulieman a Schulze, 2010).

Výsledkem symbiózy je vznik hlízek na kořenech rostlin (Wang *et al.*, 2018). Jedná se o nové rostlinné laterální orgány, které rhizobiím poskytují ekologickou niku pro jejich přežití (Minchin *et al.*, 2008). V hlízkách bakterie převádí atmosférický dusík na amoniak, který může rostlina využívat. Pro dokonalou symbiózu je nutné, aby byli oba symbionti vzájemně kompatibilní v průběhu celého procesu vývoje symbiotického vztahu (Wang *et al.*, 2018). Tvorba symbiotických hlízek fixujících N₂ vyžaduje dva vývojové procesy, a to organogenezi hlízek a bakteriální infekci. Aby došlo k organogenezi hlízek v místě bakteriální infekce, je nutné, aby byly tyto dva procesy prostorově i časově koordinovány (Oldroyd a Downie, 2008).

Kromě této koordinace musí dojít k rozpoznání signálních molekul, tzv. Nod faktorů (NFs), rostlinou (Oldroyd a Downie, 2004). Z kořenů leguminóz se do rhizosféry vylučují flavonoidy, které jsou vnímány rhizobii a které jsou schopny utvářet mikroflóru rhizosféry tím, že zvyšují chemotaktickou povrchovou pohyblivost prospěšných mikroorganismů (Mortier *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2017; Singla a Garg, 2017). Flavonoidy potenciálně regulují transkripční aktivitu některých mikrobiálních genů (např. *nod* genů), které iniciují tvorbu NFs (Singla a Garg, 2017). NFs jsou produkovány rhizobii a jedná se o lipochito-oligosacharidy, obvykle se čtyřmi až pěti zbytky 1,4- propojeného N-acetyl-glukosaminu (Dénarié *et al.*, 1996). Epidermální buňky u *M. truncatula* rozpoznávají NFs prostřednictvím receptorům podobným kinázám (RLKs) NFP/LYK3/LYK4, které se vážou na extracelulární LysM doménu (Amor *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2007). Po rozpoznání NFs dochází k přívalu Ca²⁺ do špičky kořenových vlásků, což je doprovázeno současným odtokem Cl⁻ a K⁺. Takové toky iontů potom indukují deformace a zatočení kořenových vlásků, aby v nich mohlo dojít k zachycení bakteriálních kolonií (Kijne *et al.* 1992; Emons a Mulder, 2000). Skupinou proteinů je aktivována oscilace vápníku, do které je zapojena také vápníkem- aktivovaná kináza CCaMK (Oldroyd *et al.*, 2011). CCaMK přímo interaguje a fosforyluje CYCLOPS protein, čímž dochází k aktivaci symbiotických transkripčních regulátorů (Kelly *et al.*, 2017). CCaMK společně s některými transkripčními faktory aktivuje genovou expresi (Oldroyd *et al.*, 2011). Tyto transkripční faktory jsou zahrnuty v aktivaci *ENOD* genů (EARLY NODULATION), jejichž funkcí je iniciace infekce

a tvorba hlízkového primordia (Mortier *et al.*, 2012). Aktivace CCaMK má tedy v této signalizační dráze důležitou úlohu vedoucí k morfogenezi hlízek (Oldroyd *et al.*, 2011).

Mezi transkripční faktory, které se podílejí na rhizobiální infekci patří například ERN1 (Required for Nodulation 1). U rostlin *M. truncatula*, defektních v ERN1, nedochází k procesu tvorby hlízek, ale přesto vykazují časně symbiotické odpovědi. ERN1 má blízký homolog ERN2, který vyazuje částečně podobnou expresi. ERN1/ERN2 hrají důležitou roli v indukci rhizobiální infekce a organogenezi hlízek, tedy během velmi raných stádií vývoje kořenových hlízek (Ceri *et al.*, 2016).

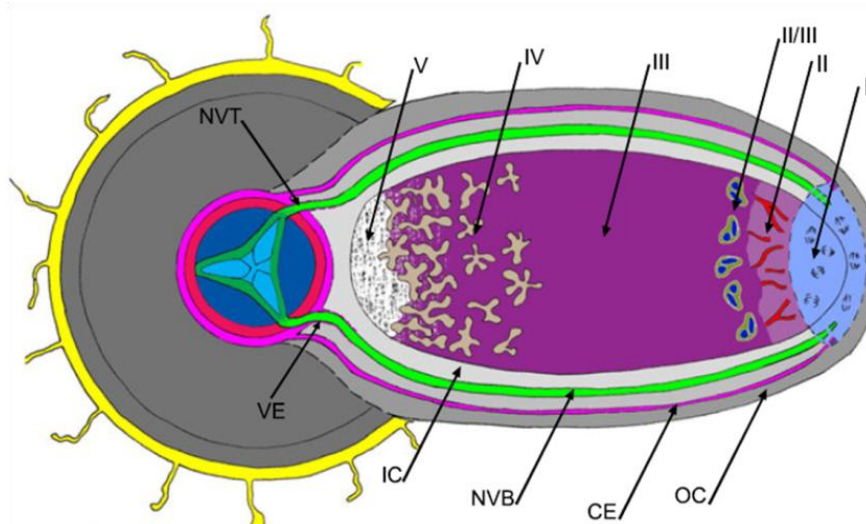
Transkripční faktor NIN (Nodule inception), který patří do rodiny NIN podobným proteinům (NIN-like-proteins; NLPs), je pro proces tvorby hlízek nezbytně nutný. Mutace nebo snížená regulace *NLP* genů zabraňuje nitrátové inhibici infekce, tvorbě hlízek a fixaci dusíku. Bylo zjištěno, že NIN a NLPs spolu fyzicky interagují prostřednictvím jejich PB1 (Phox a Bem1) domén. NLP1 může potlačit aktivaci *CRE1* genu (Cytokinin Response1- gen nezbytný pro vývoj hlízek) prostřednictvím NIN (Lin *et al.*, 2018).

2.2.1 Organogeneze hlízek

Hlízky se u leguminóz obecně dělí na dva základní typy, tzv. determinované a nedeterminované (Gage, 2004). Příkladem rostlin, u kterých dochází ke vzniku nedeterminovaných hlízek, jsou *M. sativa*, *M. truncatula*, *Vicia sativa* a *Pisum sativum* (Maróti a Kondorosi, 2014). U *M. truncatula* a *P. sativum* je proces tvorby hlízek v obou případech velmi podobný a jeho výsledkem je vznik nedeterminovaných hlízek s trvalým apikálním meristémem a charakteristickými jednotlivými zónami (Vasse *et al.*, 1990). Nedeterminované hlízky vznikají z vnitřních kortikálních buněk přiléhajících k endodermis (Oldroyd *et al.*, 2011). Mají trvalý meristém, jsou neustále infikovány půdními bakteriemi a dají se rozdělit na 4-5 základních zón (Obr. 1). Mezi charakteristické zóny nedeterminovaných hlízek patří zóna meristematická, infekční, fixace dusíku, senescence a saprofytní (Popp a Ott, 2011). Naopak determinované hlízky (např. u *Lotus japonicus* a *Glycine max*) se vyvíjejí ze středního kortexu, mají definovanou životnost a postrádají střední meristém, stejně jako schopnost být během svého dozrávání kontinuálně infikovány půdními bakteriemi (Oldroyd *et al.*, 2011; Popp a Ott, 2011).

Jelikož se v případě procesu tvorby hlízek i fixace dusíku jedná o energeticky náročné procesy, vzniká u leguminóz minimální množství hlízek, které jsou potřebné pro zajištění optimálního růstu (Mortier *et al.*, 2012). Počet hlízek na kořenech kontrolují pozitivní a negativní regulační dráhy. Mezi pozitivní regulátory patří cytokininy a auxiny, které jsou pro organogenezi hlízek velmi důležité (Frugier *et al.*, 2008; Suzaki *et al.*, 2013). Organogeneze hlízek je iniciována rozpoznáním rhizobií na povrchu kořene, což zahrnuje aktivaci cytokininové signalizace, ke které dochází ve velmi raném stádiu iniciace hlízkového meristému (Oldroyd *et al.*, 2011; Plet *et al.*, 2011). Fytohormony cytokininy mají důležitou úlohu v různých aspektech raných symbiotických fází (Gamas *et al.*, 2017). Primárními cíli cytokininové signalizace jsou regulátory odpovědi (Lohar *et al.*, 2004). U *M. truncatula* dochází k nejčasnější indukci těchto regulátorů odpovědi ve vnitřních kortikálních buňkách a buňkách pericyklu, ve kterých na začátku tvorby hlízek dochází k buněčnému dělení (Timmers *et al.*, 1999, Plet *et al.*, 2011). V důsledku této signalizace se změny polárního transportu auxinu závislé na CRE1, který je potlačován jak rhizobii, tak NFs (van Noorden *et al.*, 2006; Grunewald *et al.*, 2009; Plet *et al.*, 2011). Inhibitory auxinového transportu mohou indukovat organogenezi hlízek, a proto jsou indukované změny polárního transportu auxinu velmi významné (Hirsch *et al.*, 1989). Bylo zjištěno, že u rhizobií, u kterých není proces nodulace závislý na NFs, není produkce bakteriálních cytokininů dostatečná pro zahájení tvorby hlízek (Kisiala *et al.*, 2013; Podlešáková *et al.*, 2013). Naopak do negativní regulace jsou zapojeny kyseliny salicylová, jasmonová, abscisová nebo ethylen, které negativně kontrolují signalizaci NFs nebo infekci (Ryu *et al.*, 2012).

Rostliny využívají RLKs ke sledování environmentálních změn a k přenosu signálu do rostlinných buněk. Jako koreceptor rhizobiálních signálů k zahájení vývoje hlízek a rhizobiální infekce během symbiózy funguje u *M. truncatula* protein DMI2 (DOES NOT MAKE INFECTIONS2), jehož množství se během fixace dusíku mění. DMI2 se akumuluje v hlízkách a jeho indukce není závislá na rozpoznání NFs vylučovaných rhizobii. Modulací DMI2 je u leguminóz kontrolován vývoj hlízek (Pan *et al.*, 2018).



Obr. 1: Anatomie nedeterminovaného nodulu rostlin čeledi bobovitých. I- meristém nodulu, II- infekční zóna, II/III- přechodná zóna, III- zóna fixace dusíku, IV- zóna senescence, V- saprofytní zóna. OC- parenchymatický vnější kortex, CE- kortikální endodermis, IC- vnitřní kortex, NVB- vaskulární svazky vnitřního kortexu, NVT- vaskulární pletivo, VE- vaskulární endodermis (Upravené podle Łotocka *et al.*, 2012).

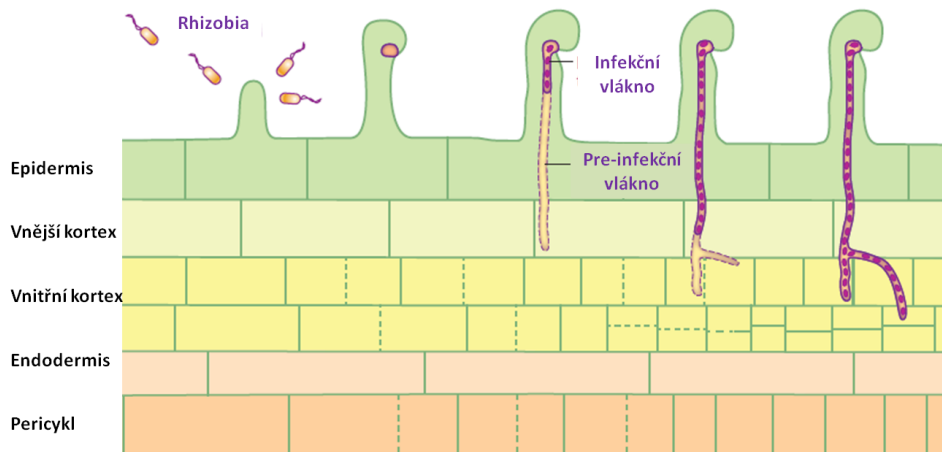
2.2.2 Rhizobiální infekce

Poté, co rostlina rozpozná NFs vylučované rhizobii, dochází k iniciaci několika preinfekčních procesů. Mezi ty patří reorganizace cytoskeletu, zatočení špičky kořenového vlásku a vznik preinfekčních vláken (preinfection threads; PITs) ve vnějších kortikálních buňkách kořene (Murray, 2011).

U leguminóz začíná tvorba hlízek obvykle po připojení rhizobií k rostoucí buňce kořenového vlásku (Murray, 2011). U *M. truncatula* pronikají rhizobia do kořene hostitele epidermálními kořenovými vlásky, což následně vede ke vzniku infekčních vláken (infection threads- ITs), (Fournier *et al.*, 2008; Oldroyd *et al.*, 2011). Ta mají tubulární strukturu a jsou ohraničena membránou, která se nachází mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou kořenového vlásku. Tím jsou rhizobia izolována od cytoplazmy hostitelské buňky (Gage, 2004). ITs jsou navíc konstruována tak, aby byla schopna doručit bakteriálního symbionta z povrchu kořene do jeho vnitřních buněk a vyvíjející se hlízky (Monahan-Giovanelli *et al.*, 2006). Aby se rhizobia do vyvíjejícího hlízkového primordia dostala, musí projít přes epidermis a kortex kořene. V buňkách hlízkového primordia poté dojde k uvolnění bakterií do buněk hlízky, ve kterých fixují N_2 (Gage, 2004).

Po zachycení bakterií v zatočeném kořenovém vlásku dochází k iniciaci IT, které postupně prorůstá až do trichoblastu a začne se přibližovat k jádru přilehlé kortikální buňky. Poté se začínají vytvářet PITs, což jsou cytoplazmatické subdomény propojené s cytoskeletem, které určují směr růstu ITs (Timmers *et al.*, 1999). Následně prorůstá IT do další buněčné vrstvy, což vyžaduje lokalizovanou degradaci rostlinné buněčné stěny. Enzymy pro degradaci rostlinné buněčné stěny mohou být rostlinného nebo bakteriálního původu. Mezi takové enzymy, které jsou indukovány během infekce rhizobiemi, patří pektinmethylesteráza nebo polygalakturonáza. Enzymy degradující rostlinnou buněčnou stěnu jsou vylučovány do lokalizovaného místa na membráně, a tím dojde k lokalizovanému uvolnění nebo degradaci buněčné stěny (Munoz *et al.*, 1998; Vissenberg *et al.*, 2001; Lievens *et al.*, 2002). K této degradaci dochází opakovaně, což umožňuje šíření infekce až do vnitřního kortexu, ve kterém vzniká prostřednictvím několika buněčných dělení hlízkové primordium (Timmers *et al.*, 1999; Oldroyd *et al.*, 2011). Z těchto rozdělených buněk následně vzniká nodulový meristém (Obr. 2), (Timmers *et al.*, 1999).

Podle Newman- Griffis *et al.* (2019) jsou LINC komplexy (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), které řídí jaderný pohyb v mnoha buněčných a vývojových procesech, nezbytné také pro správné tvarování jádra a pro jeho pohyb v kořenových vláscích *M. truncatula*. Tyto komplexy jsou důležité také pro iniciaci ITs a tvorbu hlízek. LINC komplexy se skládají z proteinů vnitřní (Sad1/UNC-84= SUN proteiny) a vnější (Klarsicht/ANC-1/Syne Homology= KASH proteiny) jaderné membrány. Bylo zjištěno, že jádra kořenových vlásků *M. truncatula* exprimující dominantně negativní SUN proteiny (SUNDN) se pohybují rychleji a různými směry. Kromě jaderného pohybu je ovlivněna také rhizobiální symbióza. Na kořenech exprimujících SUNDN se po inokulaci *Sinorhizobium meliloti* vytváří výrazně méně hlízek. Nicméně vzniklé ITs postupují přes vrstvu epidermálních buněk až do kortexu normálně a nevykazují žádné deformace (Newman- Griffis *et al.*, 2019).



Obr. 2: Proces nodulace (Upraveno podle Oldroyd *et al.*, 2011).

2.2.3 Intracelulární osídlování rostlinných buněk rhizobii

Vnitrobuněčné osídlování rhizobii, spojené s vývojem bakteroidů fixujících N_2 je časo- prostorový vývojový proces (Fournier *et al.*, 2008).

Rhizobia nejdříve jako volně žijící bakterie rostou směrem dolů po ITs, přičemž k dělení bakteriálních buněk dochází v oblasti za rostoucím vrcholem ITs. To nakonec vede ke vzniku mikrosymbiotů obklopených membránou rostlinného původu (Fournier *et al.*, 2008). Během růstu po ITs dochází k redoxnímu stresu a k možné akumulaci polyhydroxybutyrátu, který je využíván v metabolismu uhlíku v průběhu tvorby bakteroidu (Jamet *et al.*, 2003; Lodwig *et al.*, 2005). Růst v ITs představuje kontrolní bod, jelikož bakterie, u kterých dochází k mutaci v některých komponentech buněčného povrchu (např. lipopolysacharidy, exopolysacharidy), postrádají schopnost být uvolněny z ITs nebo vytvořit zralý symbiozóm (Gibson *et al.*, 2008).

Symbiozomy z nedeterminovaných hlízek u *M. truncatula* obsahují obvykle jeden bakteroid, který může mít pleomorfní tvar (Lodwig *et al.*, 2005; Oono *et al.*, 2010). V hlízkách *M. truncatula* dochází během diferenciaci bakterioidů *S. meliloti* k endoreplikaci, čímž se počet jejich chromozómů zvýší na 24. Naopak, volně žijící bakterie vlastní obvykle jen 1 nebo 2 chromozómy (Mergaert *et al.*, 2006). V tomto ohledu vykazují bakteroidy podobnost s hostitelskými kortikálními buňkami, ve kterých taktéž dochází k procesu endoreduplikace. Tím mají rostliny z čeledi bobovitých kontrolu nad bakteriálním buněčným cyklem a určují tak endoreduplikační stav bakteroidů. Kromě toho je endoreduplikace důležitá pro zajištění normálního vývoje hlízek. Bylo zjištěno, že snížením regulace genu *ccs52A* docházelo u transgenních linií

M. truncatula k výraznému ovlivnění vývoje hlízek. To se projevilo nižší ploidií, sníženou velikostí buněk, neefektivní invazí rhizobii a zráním symbiotických buněk, což bylo doprovázeno časným stárnutím a nakonec smrtí bakterií i rostlinných buněk. (Vinardell *et al.*, 2003)

Transkriptomovou analýzou hlízek *M. truncatula* byla zjištěna indukce více než 400 specifických peptidů bohatých na cystein, které jsou indukovány také v jiných, blízce příbuzných druzích vytvářejících nedeterminované hlízky. Naopak, u druhů vytvářejících determinované hlízky (např. *L. japonicus*) tyto peptidy bohaté na cystein přítomny nejsou (Mergaert *et al.*, 2003; Alunni *et al.*, 2007; Kereszt *et al.*, 2011).

2.3 Mitogen- aktivované protein kinázy

Kaskády mitogen- aktivovaných protein kináz (MAPKs) představují univerzální signální moduly přítomné u kvasinek, zvířat i rostlin (Chen *et al.*, 2017). MAPKs překládají informace z prostředí na příslušnou odpověď tím, že fosforylují své substrátové proteiny (Pitzschke, 2015). Kromě toho jsou MAPKs zapojeny do odpovědi na různé biotické a abiotické stresy, hormony nebo vývojové procesy (Smékalová *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Komis *et al.*, 2018). Hrají důležitou úlohu také při regulaci buněčného dělení, růstu, diferenciaci nebo programované buněčné smrti (Franklin- Tong a Gourlay, 2008; Müller *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011; Sasabe a Machida, 2012).

Každá MAPK kaskáda se skládá ze tří sekvenčně působících protein kináz. Nejvýše umístěným členem MAPK kaskády je MAPK kináza kináza (MAPKKK nebo MEKK). MAPKKK přijímá přímo nebo nepřímo signál z receptorů a fosforylací MAPKKK je regulována aktivita MAPK kinázy (MAPKK, MKK nebo MEK). MAPKK potom fosforyluje a tím aktivuje MAPK (MPK), (Xu a Zhang, 2015). Tyrosin a serin/threonin specifické fosfatázy řídí aktivaci i deaktivaci MAPKs (Rodriguez *et al.*, 2010). Úloha těchto kináz ve vývojových a fyziologických procesech byla intenzivně studována u různých organismů (Chen *et al.*, 2017). Kontrola transkripční, post- transkripční a translační regulace, buněčná lokalizace a re-kompartmentalizace proteinů na místo jejich aktivace nebo působení je také kontrolní funkcí MAPKs (Lee *et al.*, 2015). MAPK signalizace je mimo jiné zahrnuta také v rostlinné imunitě (Rodriguez *et al.*, 2010). Konkrétně je známo zapojení MAPK kaskády do interakcí mezi rostlinou a patogenem (Meng a Zhang, 2013). Transmembránové receptory, které

bývají označovány jako rozpoznávací receptory (pattern recognition receptors- PRRs), zaznamenávají patogenem asociované molekulární vzory (patogen- associated molecular patterns- PAMPs) a tím vyvolávají obrannou odpověď, která spočívá v přeprogramování genové exprese hostitele a vytvoření sloučenin antimikrobiální povahy (Rodriguez *et al.*, 2010).

Mezi dobře prostudované MAPKs patří zejména MPK3 a MPK6, k jejichž aktivaci dochází při abiotickém stresu nebo v přítomnosti patogenů (Ren *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2012). U *Arabidopsis thaliana* jsou mitogen- aktivované protein kinázy MPK3, MPK4 a MPK6 důležité při buněčném dělení, vývoji a vrozené imunitě (Rayapuram *et al.*, 2018). MPK3 a MPK6 jsou lokalizovány zejména v jádře, zatímco MPK4 a MPK6 jsou přítomny v cytoskeletu (Šamajová *et al.*, 2013). MPK6 interaguje s preprofázními svazky (pre- prophase band; PPB) a fragmoplasty a podílí se tedy na determinaci roviny buněčného dělení (Müller *et al.*, 2010; Komis *et al.*, 2017). Funkci plní ale také při signalizaci rostlinného růstu nebo při odpovědi na působení různých abiotických či biotických stresů (Meng a Zhang, 2013; Xu a Zhang, 2015; Komis *et al.*, 2017).

Aktivované MAPKs lze detekovat pomocí anti- pERK (Phospho-p44/p42 MAPK, ERK1/2, Thr202/Tyr204) protilátky. Anti- pERK specificky rozpoznává aktivované MAPKs fosforylované na threoninových (T) nebo tyrozinových (Y) zbytcích ve specifickém TEY fosforylačním motivu (Bequette *et al.*, 2018).

2.3.1 Mitogen- aktivované protein kinázy u *M. truncatula* a *M. sativa*

Ačkoliv je fosforylační kaskáda zprostředkovaná MAPKs pro rostlinnou buněčnou signalizaci nepostradatelná, ví se o nich u leguminóz podstatně méně informací. Na základě fylogenomické analýzy bylo u *M. truncatula* identifikováno celkem 73 MAPKKKs, 7 MAPKKs a 25 MAPKs (Li *et al.*, 2016; Purayannur *et al.*, 2017). Podle Neupane *et al.* (2013) je MAPK signalizační kaskáda u *M. truncatula* důležitá pro vývoj listů, kořene i hlízek.

Stresem indukovaná MAPK (SIMK) je u *M. sativa* zapojena do signalizace při působení solného stresu nebo patogenních elicitorů (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000). Její aktivace může být spuštěna také v přítomnosti sorbitolu, oxidativního stresu nebo při poranění, přičemž ve všech případech je stresem indukovaná MAPKK (SIMKK) nejsilnějším aktivátorem SIMK (Kiergerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002).

SIMK o molekulové hmotnosti 46 kDa představuje vysoce konzervovaný homolog MPK6 z *A. thaliana* s identickou karboxyterminální oblastí (Ovečka *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že při působení elicitorů SIMKK aktivuje SIMK a MMK3 (mitogen-aktivovaná protein kináza z *M. sativa*), (Cardinale *et al.*, 2002). MMK3 je lokalizována k rovině buněčného dělení a k její aktivaci dochází během mitózy (Rodriguez *et al.*, 2010). Při solném stresu však aktivuje SIMKK pouze SIMK, přičemž k této aktivaci dochází poměrně rychle v závislosti na koncentraci (Cardinale *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014). V neaktivním stavu spolu SIMKK a SIMK kolokalizují v jádře a cytoplazmě. Bylo však prokázáno, že při působení solného stresu dochází k částečné relokizaci SIMKK i SIMK z jádra do bodových cytoplazmatických kompartmentů (Ovečka *et al.*, 2014). SIMK má také spolu s aktinovým cytoskeletem významnou úlohu při růstu kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002).

Využitím metod reverzní genetiky byl u *M. truncatula* identifikován MtMAPKK4 mutant. Exprese MtMAPKK4 byla detekována v kořenech, stoncích, listech, ale také v hlízkách nebo květech. U heterozygotních *mapkk4/+* rostlin docházelo k růstovým anomáliím a chlorózám. Alelická mutace MtMAPKK4 by byla pro rostliny letální, a proto je MtMAPKK4 důležitá pro růst a vývoj *M. truncatula*. Metodou bimolekulární fluorescenční komplementace byla prokázána fyzická interakce mezi MtMAPKK4, MtMPK6 a MtMPK3, které jsou subcelulárně lokalizovány v plazmatické membráně, cytoplazmě a v jádře (Chen *et al.*, 2017).

Dále bylo zjištěno, že protein MtMCK5 z *M. truncatula* má pravděpodobně podobné funkce jako AtMCK4/5 a SIMKK, jelikož je z 69,2% identický s AtMCK4, ze 72% s AtMCK5 a z 95% se SIMKK. MtMCK5 aktivuje MtMPK3/6, které jsou tedy pravděpodobně zahrnuty v signalizačních drahách aktivovaných MtMCK5. Později bylo prokázáno, že při solném stresu dochází v kořenech *M. truncatula* k silnější aktivaci MtMPK6 než v případě MtMPK3 (Ryu *et al.*, 2017).

2.3.2 Signalizace MAPKs při symbiotické interakci

Do buněčných odpovědí na abiotický nebo biotický stres je zapojeno několik MAPKs (Moustafa *et al.*, 2014). Tyto stresy potom negativně ovlivňují tvorbu hlízek, které vznikají jako výsledek symbiotické interakce (Lopez-Gomez *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2012). Na druhou stranu, rhizobiální infekce vede k aktivaci MAPK signalizačních

kaskád a reakcí spojených s obranou nebo stresem během raných fází infekce (Lopez- Gomez *et al.*, 2012).

Například LjSIP2 (MAPKK) u *L. japonicus* interaguje se symbiotickou receptorovou kinázou SymRK a hraje v brzkých stádiích symbiózy a organogeneze hlízek důležitou roli (Chen *et al.*, 2012). Kromě toho, že je MtMAPKK4 nezbytná pro růst a vývoj *M. truncatula* (viz výše), plní pravděpodobně úlohu také při symbiotické interakci. U heterozygotních *mapkk4/+* rostlin bylo pozorováno menší množství ITs i vytvořených hlízek (Chen *et al.*, 2017).

U *M. truncatula* reguluje signalizační kaskáda MtMKK5-MPK3/MPK6 negativně tvorbu hlízek. Bylo zjištěno, že po aktivaci MtMPK3 a MtMPK6 solným stresem vzniká menší počet hlízek. MtMPK3 a MtMPK6 v jádře fyzicky interagují se dvěma transkripčními faktory, MtERN1 a MtNSP1 (Nod factor Signaling Pathway 1), které jsou při tvorbě hlízek zapojeny do raných stádií. MtMPK6 aktivovaná MtMKK5 navíc fosforyluje MtERN1, přičemž k potlačení této fosforylace dochází záměnou serinu za alanin na pozici 93. MAPK kaskády jsou tedy pravděpodobně zahrnuty v regulaci transkripčních procesů nutných pro rozpoznání symbionta, rhizobiální infekci nebo organogenezi hlízek (Ryu *et al.*, 2017).

2.4 Rostlinný cytoskelet

Rostlinný cytoskelet funguje jako velmi dynamická a univerzální intracelulární podpora rostlin, která je zahrnuta v mnoha důležitých aspektech, včetně růstu rostlinných buněk, vývoje, buněčného dělení, buněčné expanze, intracelulární organizace nebo pohybu (Staiger, 2000; Wasteneys a Galway, 2003). Cytoskelet je tvořen propojenou sítí polymerů a regulačních proteinů a mimo jiné poskytuje eukaryotickým buňkám schopnost odolávat deformacím, přepravovat mezibuněčný náklad nebo během pohybu uzpůsobovat tvar buněk (Fletcher a Mullins, 2010). Úlohou motorových proteinů, které jsou součástí cytoskeletu, je transport buněčných organel a molekul (Kost a Chua, 2002). Kromě toho je cytoskelet důležitý také pro správný průběh mitózy a meiózy (Staiger a Lloyd, 1991). Pro morfogenezi rostlinných orgánů je důležitá kontrola polarity, směru polárního růstu a roviny buněčného dělení (Kropf *et al.*, 1998, Smith, 1999).

Mezi dvě hlavní dynamicky propojené komponenty rostlinného cytoskeletu patří mikrotubuly (MT) a aktinová filamenta (AF), (Smertenko a Franklin- Tong, 2011).

Aktinová filamenta se skládají ze dvou navzájem propojených aktinových řetězců, zatímco mikrotubuly představují duté supramolekulární struktury sestávající z protofilament (Schmidt a Panstruga, 2007). MT i AF jsou zapojeny do organizace intracelulárních procesů a usnadňují jejich rychlou reorganizaci. V rostlinných buňkách jsou důležité pro buněčný růst a morfogenezi (Sampathkumar *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2013). Mikrotubulární i aktinový cytoskelet mění během buněčného cyklu své uspořádání, hustotu i distribuci (Timmers, 2008). Mezi nejvýznamnější rozdíly hlavních typů cytoskeletálních polymerů patří mechanická pevnost, dynamika jejich seskupování, polarita a motorové proteiny, se kterými asociují (Fletcher a Mullins, 2010).

Studium symbiotických interakcí mezi rhizobii a rostlinami z čeledi bobovitých představuje v rostlinné biologii velké téma. Různá vývojová stádia během ontogeneze hlízek zahrnují procesy významné z hlediska rostlinného cytoskeletu (Timmers, 2008). Při kontaktu s patogenními nebo symbiotickými mikroby dochází k rychlým změnám v pravidelném uspořádání cytoskeletu. V případě patogenů se předpokládá, že polarizované přeskupení cytoskeletu umožňuje doručení nákladu potřebného na obranu rostlin. Zatímco v případě symbiotické interakce může reorganizace cytoskeletu předcházet vytvoření symbiotického vztahu (Schmidt a Panstruga, 2007).

2.4.1 Aktin

Aktin, o molekulové hmotnosti 42 kDa, je globulárním a nukleotid- vázajícím proteinem, představující jeden z hlavních cytoskeletálních proteinů (Staiger a Blanchoin, 2006; Li *et al.*, 2015).

Filamentární aktin (F-aktin) je složen z monomerních nebo globulárních aktinových (G-aktinových) podjednotek do dvouvláknové a spirálovité struktury o průměru 5 až 7 nm (Pollard *et al.*, 1986; Pollard *et al.*, 2000; Blanchoin *et al.*, 2014). Aktinový cytoskelet je tvořen neustále se měnící sítí jednotlivých vláken a struktur, označovaných jako aktinové svazky. U rostlin je úlohou těchto aktinových svazků zajišťování pohybu a umístění organel jako chloroplastů, mitochondrií nebo Golgiho aparátu (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Aktinové svazky jsou orientovány převážně k ose buňky a oproti jednotlivým aktinovým vláknům jsou zářivější, mají rovnější tvar a delší životnost (Staiger *et al.*, 2009). Síť jednotlivých aktinových vláken a aktinových svazků se neustále reorganizuje a odpovídá na různé buněčné stresy (Li *et al.*, 2015). Rostlinný

aktin se dělí na vegetativní a reprodukční třídu, přičemž každá z nich obsahuje několik aktinových isoform. Zatímco geny reprodukční třídy se nacházejí především ve zralém pylu a pylových láčkách, geny patřící do vegetativní třídy jsou přítomny téměř ve všech vegetativních orgánech (Kandasamy *et al.*, 2002).

Nová vlákna aktinu mohou vznikat různými způsoby. Prvním z nich je vznik *de novo* v cytoplazmě, druhým způsobem je vznik z jiného aktinového vlákna či svazku a poslední způsob představuje vznik aktinového vlákna z konce pre- existujícího vlákna nebo fragmentu (Staiger *et al.*, 2010). Vznik nového vlákna aktinu řídí tři podjednotky na obou koncích. Polarita aktinových vláken je dána asymetrickými podjednotkami AF a rozdíly nukleotidů v monomerech, které jsou orientovány podél vláken (Li *et al.*, 2015). Aktinová vlákna mají (+) a (-) konec. Bylo zjištěno, že k prodlužování (+) konce dochází rychleji než v případě (-) konce (Chou a Pollard, 2019). Monomery obsahující adenosin trifosfát (ATP) jsou rychle přidávány na rostoucí (+) konec AF, zatímco monomery obsahující adenosin difosfát (ADP) jsou rozkládány na pomalu rostoucím (-) konci. Po připojení podjednotky k (+) konci dochází k hydrolýze ATP za vzniku ADP a fosfátu. Fosfát je po určité době z aktinu uvolněn. Pro rovnováhu aktinu *in vitro* je důležitá jedna z jeho vlastností, označována jako treadmilling. Tato rovnováha je potom zajišťována zkracováním aktinového vlákna na (-) konci současně během růstu na (+) konci AF (Li *et al.*, 2015). Kromě toho treadmilling koordinuje změny aktinu a kontroluje velikost aktinových sítí (Carlier a Shekhar, 2017).

Aktinová filamenta poskytují buňkám mechanickou oporu a hnací síly potřebné pro pohyb (Pollard a Cooper, 2009). Jsou nezbytné také pro doručení proteinů a sekretorických vezikul obsahujících polysacharidy na plazmatickou membránu a mají ústřední úlohu v endocytóze (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Rostlinné buňky využívají pro transport na delší vzdálenosti spíše aktinová vlákna než mikrotubuly. Aktinová filamenta jsou důležitá také v odpovědi na abiotický a biotický stres, například při vrozené imunitní reakci proti patogenům, ale také při vytváření polarity, při buněčné morfogenezi nebo vzniku buněčné stěny (Henty- Ridilla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

2.4.2 Mikrotubuly

MT jsou vysoce konzervované polární polymery a velmi důležité komponenty eukaryotického cytoskeletu, které mají zásadní úlohu v různých buněčných funkcích (Hashimoto, 2015). Jedná se o polymery, složené z heterodimerů

α - a β - tubulinu. Dimery tubulinu jsou podélně uspořádány tak, aby vytvářely protofilamenta, z nichž 12-15 bočními interakcemi vytváří tubus o průměru 25 nm (Nogales *et al.*, 1999).

Základní stavební jednotkou MT je heterodimer, obsahující jeden strukturní a jeden hydrolyzovatelný a výměnný guanozintrifosfát (GTP), který je tvořený sekvenčním působením několika molekulárních chaperonů (Hashimoto, 2015). Bylo zjištěno, že α - tubulin a β - tubulin mají ze 40% stejnou aminokyselinovou sekvenci a jejich molekulární struktura je v podstatě identická (Nogales *et al.*, 1998). Každý monomer je tvořen dvěma β - listy obklopenými α - helixy a kyselým C- terminálním koncem (Kopczak *et al.*, 1992). Uspořádáním tubulinových dimerů v MT jsou α - tubulin a β - tubulin vystaveny na opačných koncích, což mikrotubulům uděluje vlastnost označovanou jako vnitřní strukturní polarita (Nogales *et al.*, 1999). Heterodimery α - a β -tubulinu se na sebe tedy skládají vždy pravidelně, a to α -tubulin s β -tubulinem a obráceně. MT obsahují (+) a (-) konec a výsledkem takového skládání je přítomnost β -tubulinu na (+) konci MT, zatímco α -tubulin se nachází na (-) konci MT (Nogales *et al.*, 1999; Wade, 2009). Přednostně dochází k přidávání heterodimerů tubulinu na (+) konec (Hashimoto, 2015). Dimery tubulinu depolymerizují a polymerizují a tak mohou mikrotubuly procházet rychlými cykly vzniku a zániku. Jak α - tubulin, tak β - tubulin vážou GTP, které reguluje polymerizaci (Cooper, 2000). Polymerizace mikrotubulů začíná ve specifických místech, označovaných jako mikrotubuly organizující centra (MTOCs), se kterými asociuje (-) konec každého MT (Goddard *et al.*, 1994). Během nebo krátce po polymerizaci hydrolyzuje GTP navázané na β -tubulinu na guanozindifosfát (GDP). Podobně jako aktinová filamenta, procházejí i MT dynamickým procesem, označovaným jako „treadmilling“. Při něm dochází k neustálému zániku tubulinu navázaného na GDP z (-) konce a naopak přidáváním tubulinu navázaného na GTP na (+) konec stejného MT (Cooper, 2000).

Hydrolyza GTP také mění konformaci tubulinu, a tím je zodpovědná za složitou dynamiku mikrotubulů, které tak mohou na volném (+) konci náhodně přepínat mezi dvěma stavy - jejich stálým růstem a rychlým zkracováním (Fletcher a Mullins, 2010; Horio a Murata, 2014). Tento stav bývá označován jako dynamická nestabilita MT a je regulován s mikrotubuly- asociovanými proteiny včetně rodiny EB proteinů (plus-end tracking end-binding protein). Bylo zjištěno, že EB proteiny modulují změny na rostoucích koncích MT rozpoznáním a podporou přechodného stavu, vytvářeného během hydrolyzy GTP (Zhang *et al.*, 2015). To, zda mikrotubuly rostou nebo dochází

k jejich zkracování, je určeno rychlostí přidávání tubulinu vzhledem k rychlosti hydrolýzy GTP (Cooper, 2000).

U vyšších rostlin je známá celá řada proteinů asociovaných s MT (microtubule- associated- proteins, MAP), (Hamada, 2007). Některé proteiny interagují s MT prostřednictvím domény vázající MT a modulují jak dynamiku, tak organizaci MT (Buschmann a Lloyd, 2008; Krtková *et al.*, 2016). Kromě toho zprostředkovávají jejich strukturní a funkční interakci s jinými buněčnými strukturami. Konkrétně u *A. thaliana* je známých několik MAP, například MAP65- 1, MAP65- 2, MAP65- 3 nebo MAP65-6 (Krtková *et al.*, 2016). Přítomnost nebo absence MAPs může modulovat stabilitu mikrotubulů, vytváření svazků, případně jejich schopnost samoorganizace (Zhang *et al.*, 2014).

De novo tvorba MT v buňkách vyžaduje komplex obsahující γ - tubulin a cílené nebo aktivované regulační proteiny, které přispívají ke struktuře MT. Dynamika a organizace MT během buněčného cyklu a odpovědí na vývojové a environmentální signály je kontrolována regulátory MT a prostřednictvím modifikace tubulinu (Hashimoto, 2015). Síť mikrotubulů je vysoce dynamická a je schopna během několika minut změnit svůj tvar (Mirabet *et al.*, 2018).

Mikrotubuly jako takové jsou zahrnuty v klíčových procesech rostlinných buněk, jakými jsou buněčné dělení, růst nebo vývoj (Krtková *et al.*, 2016). Mnoho buněčných funkcí závisí na schopnosti samoorganizace MT do komplexních sítí. U rostlin jsou pro determinaci tvaru buněk nezbytné kortikální mikrotubuly, které řídí ukládání celulósových mikrofibril, a tím kontrolují mechanickou anizotropii buněčné stěny (Mirabet *et al.*, 2018).

U rostlin vytvářejí mikrotubuly specifické struktury před, během a po buněčném dělení (Ledbetter, 1963). Nejvýznamnějšími z nich jsou interfázní kortikální MT, PPB, mitotické vřeténko a fragmoplast. Během preprofáze a cytokineze existují kromě PPB a fragmoplastu ještě soubory MT, které jsou spojené s obvodem jádra. Všechny tyto struktury, kromě mitotického vřeténka, jsou jedinečné výhradně pro rostlinné buňky (Goddard *et al.*, 1994). Rostlinné mikrotubuly vytvářejí během interfáze na obvodu buňky husté a uspořádané soubory označované jako kortikální mikrotubuly (Ledbetter, 1963; Brandizzi a Wasteneys, 2013). Když buňka vstoupí do buněčného dělení, mění mikrotubuly své uspořádání na základě toho, jakou fází buněčného cyklu aktuálně procházejí (Goddard *et al.*, 1994).

V nedělicích se, interfázních buňkách se mikrotubuly obvykle nacházejí pod plazmatickou membránou (Ledbetter, 1963). Během interfáze jsou kortikální mikrotubuly navzájem orientovány paralelně a uspořádány kolmo na primární osu buněčné expanze (Williamson, 1991). Kortikální mikrotubuly jsou zahrnuty v orientaci celulósových mikrofibril během syntézy nové buněčné stěny a hrají tak velmi důležitou roli při vytváření primární osy buněčné elongace (Giddings a Staehelin, 1991; Hush a Overall; 1992).

Před mitózou jsou kortikální mikrotubuly postupně nahrazovány PPB, který ve svém nejrozvinutějším stádiu představuje hustý kruh kortikálních mikrotubulů, obklopující jádro a přesně předpovídá místo vzniku buněčné přepážky během cytokineze (Wick, 1991; Rasmussen *et al.*, 2011; Smertenko *et al.*, 2018). PPB se skládá z prstence kortikálních MT, AF, organel (endoplazmatické retikulum) a z několika proteinů, které asociují s cytoskeletem a dalšími organelami (Smertenko *et al.*, 2018). Při symetrickém buněčném dělení se PPB vytváří u středové roviny buňky, zatímco u asymetrického dělení je PPB orientován v nakloněném úhlu (Rasmussen *et al.*, 2011). PPB se pravděpodobně vyvinul pro kontrolu přesné orientace buněčného dělení, ke kterému dochází během tvorby komplexních pletiv u vyšších rostlin (Rasmussen *et al.*, 2013; Smertenko *et al.*, 2018).

K zániku PPB dochází ke konci profáze a postupně dochází k jeho nahrazení mitotickým vřeténkem. Mitotické vřeténko je komplexní, vysoce organizované a skládá se z kinetochorových mikrotubulů, stejně jako z jiných mikrotubulů. Ty mohou, ale nemusí končit na jednom nebo druhém pólu vřeténka. V rostlinných buňkách nejsou přítomny centrioly, vřeténka u rostlin jsou tedy širší a tvořena několika MT. Mitotická vřeténka jsou zodpovědná za přenos kompletních sad chromozómu do somatických buněk zralé rostliny, proto je jejich význam velmi důležitý (Lambert *et al.*, 1991; Smirnova a Bajer, 1992; van Damme, 2009; Smertenko *et al.*, 2018). MT vřeténka zanikají v pozdní anafázi a na pomezí anafáze a telofáze se v jeho středu vytvářejí bipolární struktury MT. Ty od sebe potom oddělují dceřiné chromozómy k pólům vřeténka (Lee a Liu, 2013).

Když se od sebe oddělí dceřiné chromozómy a zaniknou kinetochorové svazky mikrotubulů, začínají se vytvářet MT tvořící fragmoplast na nebo v blízkosti středové roviny vřeténka. Fragmoplast se skládá z dvojitého prstence mikrotubulů. MT jednoho prstence jsou antiparalelní k MT druhého prstence (Vantard *et al.*, 1990;

Smertenko *et al.*, 2018). Fragmoplast, vznikající v telofázi, slouží k syntéze buněčné přepážky (Lee a Liu, 2013; Smertenko *et al.*, 2018).

2.5 Rostlinný cytoskelet během symbiotické interakce

Během evoluce si rostliny vyvinuly mechanismy jak využít, přežít nebo minimalizovat negativní dopady různých environmentálních faktorů, přičemž právě rostlinný cytoskelet zprostředkovává v mnoha případech odpověď rostlin na tyto faktory. Rostliny se dostávají do kontaktu také s řadou mikroorganismů, které představují jejich potencionální partnery nebo naopak patogeny. I v tomto případě hraje rostlinný cytoskelet velmi důležitou roli. Při vzniku symbiotického vztahu s rhizobii se objevují změny v cytoskeletu u kořenových vlásků a kortikálních buněk. MT a AF jsou zapojeny do zatočení kořenových vlásků, růstu infekčního vlákna a vývoje kořenových hlízek (Takemoto a Hardham, 2004).

Před kontaktem rostlinných buněk s bakteriemi nebo aplikací NFs, vykazují MT i AF v kortikální i endoplazmatické cytoplazmě kořenových vlásků typické paralelní nebo helikální uspořádání (Miller *et al.*, 1997; Timmers *et al.*, 1999; Geitmann a Emons, 2000; Sieberer *et al.*, 2002; Ditengou *et al.*, 2003; Weerasinghe *et al.*, 2003). Během několika minut v přítomnosti rhizobií nebo NFs dochází ve špičce kořenových vlásků k lokalizované depolymerizaci jak MT, tak AF (Cárdenas *et al.*, 1998; Cárdenas *et al.*, 2003; Weerasinghe *et al.*, 2003). Ve vnějším kortexu leguminóz, vytvářejících nedeterminované typy hlízek, jsou MT v PITs uspořádány paralelně a vytvářejí antiklinální řadu. IT je během růstu kortikálními buňkami obklopeno AF a sítí mikrotubulů, které jej spojují s jádrem hostitelské buňky (Timmers *et al.*, 1999). Když dosáhne infekční vlákno nodulového primordia, jsou bakterie, obklopené rostlinnou plazmatickou membránou, uvolněny do hostitelské cytoplazmy a tvoří symbiozomy. Uspořádání MT a AF v těchto buňkách je spojené s jejich úlohou při určování architektury buněk uvnitř hlízek (Takemoto a Hardham, 2004).

Předpokládá se tedy, že reorganizace rostlinného cytoskeletu hraje během ontogeneze hlízek důležitou roli (Timmers *et al.*, 1998). U rostlinných mikrotubulů dochází v reakci na symbiotické a patogenní organismy k rozsáhlé reorganizaci (Hardham, 2013). *In situ* imunolokalizací tubulinu bylo zjištěno, že v determinovaných i nedeterminovaných nodulech dochází ke změnám cytoskeletu.

Tyto změny zahrnují dočasnou dezorganizaci a následně vytvoření nového vzoru cytoskeletální reorganizace. Změny cytoskeletu v hlízkách vojtěšky jsou doprovázeny znaky symbiotické diferenciaci, spojených s infekcí buněk, uvolněním bakterií, endopolyploidizací, zvětšováním buněk nebo organizací buněčného prostoru (Timmers *et al.*, 1998). Změny v organizaci cytoskeletu mohou být vyvolány také NFs nebo inokulací bakteriemi (Timmers, 2008).

2.5.1 Reorganizace aktinového cytoskeletu uvnitř hlízek

U rostlin hraje aktinový cytoskelet důležitou roli především v intracelulárním transportu a v endomembránovém systému. Předpokládá se, že aktinový cytoskelet řídí několik buněčných procesů zapojených do vývoje hlízek fixujících dusík (Zhang *et al.*, 2018).

Při tvorbě hlízek má F- aktin funkci v přeprogramování růstu kořenových vlásků, a tím řízení růstu infekčního vlákna směrem dovnitř a migrace jader kořenových vlásků (Timmers *et al.*, 1999; Sielberer *et al.*, 2005). Při percepci NFs uvolňovaných rhizobii prochází F- aktin v kořenových vláscích reorganizací ještě před indukcí deformace kořenových vlásků, jejich zatočením a vznikem infekčního vlákna (Cárdenas *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2012; Zepeda *et al.*, 2014).

Mezi tři hlavní zóny hlízek patří zóna I (meristém), zóna II (infekční zóna) a zóna III (zóna fixace dusíku), přičemž infikované buňky jsou obvykle přítomny zejména v zónách II a III. Mikroskopií živých buněk bylo zjištěno, že meristemické buňky hlízky jsou malé a obsahují perinukleární síť aktinu. Aktinová síť meristemických buněk je asociována s cytoplazmatickými proudy a buněčným kortexem. V buňkách zóny II jsou přítomny krátké fragmenty aktinu, zatímco v zóně III dochází k silné fragmentaci aktinu (Zhang *et al.*, 2018). Navíc buňky zóny II a III jsou viditelně větší se zvětšenými jádry (Truchet, 1978; Cebolla *et al.*, 1999; Vinardell, 2003). Během vývoje hlízek tedy aktinový cytoskelet prochází dynamickou reorganizací (Zhang *et al.*, 2018).

Vývoj nedeterminovaných hlízek u *Medicago* se dá rozdělit na pět po sobě následujících fází, charakterizovaných specifickou organizací aktinového cytoskeletu a úrovní diferenciaci rhizobií. Během první fáze připomíná aktinový cytoskelet jemnou síť s hustými perinukleárními soubory aktinu. Ve druhé fázi dochází k fragmentaci F- aktinu na okrajích infikovaných buněk. Ve třetí fázi se obvykle zvyšuje hustota dlouhých fragmentů F- aktinu, přičemž některé z nich se mohou rozpadnout na kratší

nebo vytvářet bodové struktury aktinu. Pro čtvrtou fázi jsou typické krátké fragmenty a bodové struktury aktinu především v infikovaných buňkách. Naopak pátá fáze je charakterizována pouze přítomností aktinu v bodových strukturách (Zhang *et al.*, 2018).

2.5.2 Reorganizace mikrotubulového cytoskeletu uvnitř hlízek

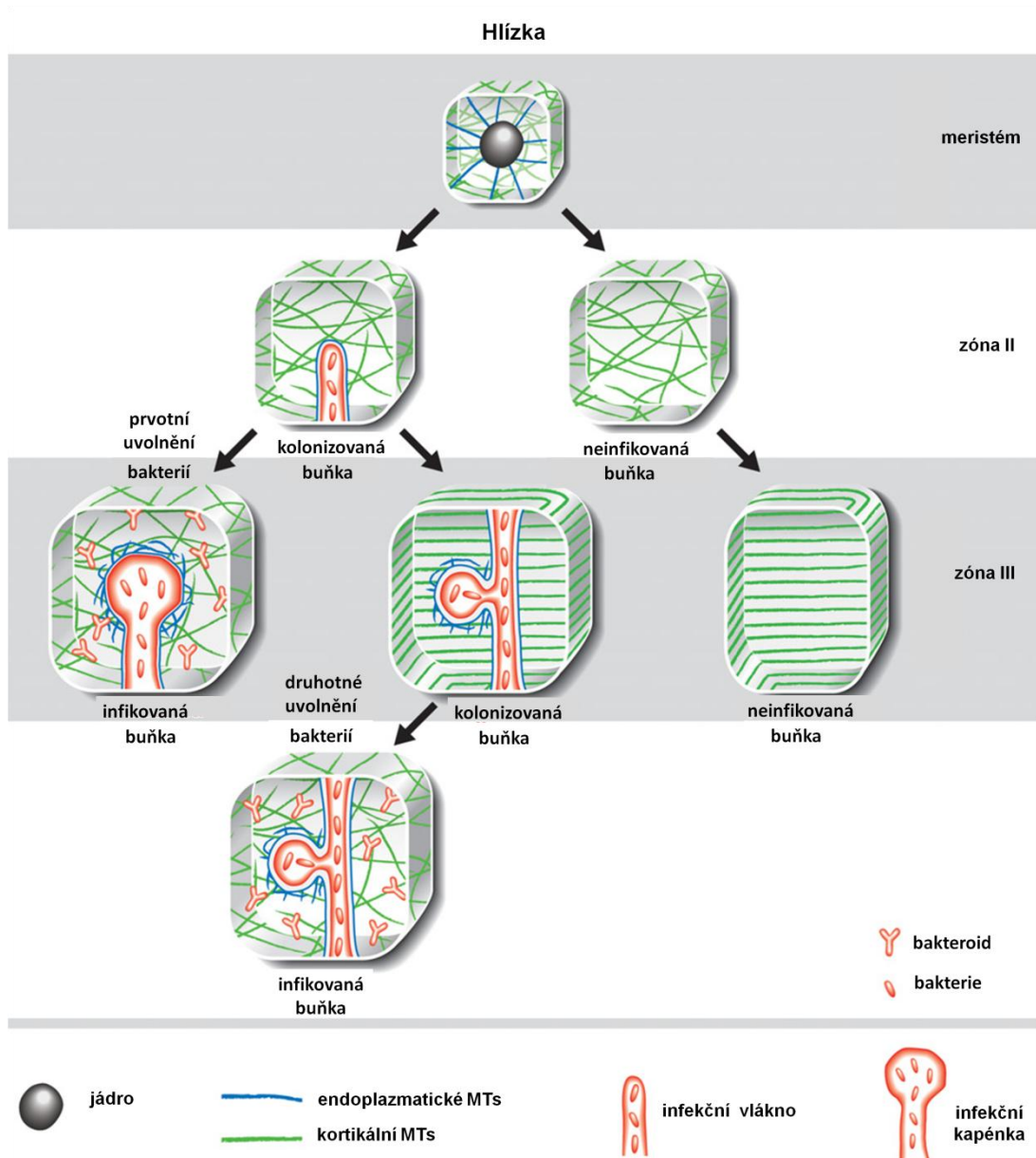
Vzhledem k významu tubulinového cytoskeletu při buněčném dělení, diferenciaci a fungování rostlinných buněk je zřejmé, že změna v jeho uspořádání má pro organogenezi a funkci hlízek zásadní roli. Struktura a organizace cytoskeletu se neustále přizpůsobuje funkci, kterou rostlinný cytoskelet na daném místě a v daném čase vykonává (Kitaeva *et al.*, 2015).

Typické uspořádání MT v meristematických buňkách sestává z perinukleárních MT obklopujících buněčné jádro, které spojují s obvodem buňky. Kortikální MT v těchto buňkách vykazují nepravidelné uspořádání (Kitaeva *et al.*, 2015). Stejně uspořádání MT je také v meristematické oblasti kořenových buněk (Baluška *et al.*, 1992).

V zóně II se vyvíjejí a začínají větvit infekční vlákna. V kolonizovaných buňkách zóny II je infekční vlákno obklopeno endoplazmatickými mikrotubuly a kortikální mikrotubuly vykazují nepravidelné uspořádání. Ve vzdálenější oblasti zóny II jsou MT v neinfikovaných buňkách, stejně jako v případě meristematických buněk, uspořádány nepravidelně. To se ale v oblasti, která je blíže středu mění a kortikální MT přecházejí do paralelního uspořádání, které u neinfikovaných buněk přetrvává i v zóně III (Kitaeva *et al.*, 2015).

V mnoha buňkách vznikají infekční kapénky („infection droplets“), ze kterých jsou bakterie uvolňovány do rostlinných buněk a diferenciovány do bakteroidů fixujících dusík. V zóně III jsou v kolonizovaných buňkách infekční vlákna a infekční kapénky obklopeny endoplazmatickými mikrotubuly a kortikální mikrotubuly vykazují paralelní uspořádání, stejně jako v případě neinfikovaných buněk. Z toho vyplývá, že organizace kortikálních MT v hlízkách není závislá na přítomnosti struktur, jako jsou infekční vlákna nebo infekční kapénky. Naopak v infikovaných buňkách v zónách II a III si kortikální MT zachovávají nepravidelné uspořádání. Navíc, v zóně III může dojít k opětovnému uvolnění bakterií, které je spojeno s reorganizací MT, které při uvolnění bakterií přecházejí z paralelního do nepravidelného uspořádání (Obr. 3), (Kitaeva *et al.*, 2015).

Na základě toho se předpokládá, že uvolnění bakterií v mladých infikovaných buňkách zóny III inhibuje kortikální MT, což vede k jejich paralelnímu uspořádání. Když potom později dojde k uvolnění bakterií, dojde k reorganizaci MT, které přecházejí z paralelního do nepravidelného uspořádání (Kitaeva *et al.*, 2015).



Obr. 3: Reorganizace MT při uvolnění bakterií v hlízkách *M. truncatula* (Upraveno podle Kitaeva *et al.*, 2015).

2.6 Imunolokalizační metody

Rychlý pokrok v oblasti mikroskopie posílil výzkum buněčné biologie. Hlavní výzvu imunolokalizačních metod představuje příprava vzorků umožňující vynikající a reprodukovatelné zachování pletiv a značení buněk, které umožňuje analýzu vnitřních buněčných vrstev (Pasternak *et al.*, 2015). Více násobné imunolokalizace se v rostlinné biologii využívají například pro analýzu lokalizace proteinů, studium interakce mezi proteiny, sledování anatomie buněk, vizualizaci pletiv nebo buněčné distribuce některých nízkomolekulárních molekul (Sauer *et al.*, 2006; Fukao, 2012; Bustos- Sanmamed *et al.*, 2013; Forestan a Varotto, 2013; Šamajová *et al.*, 2014).

Imunolokalizační metodu „whole- mount“ je možné aplikovat u širokého spektra rostlinných druhů. Za nejdůležitější krok je považována fixace pletiv, jejímž cílem je zachovat buněčnou strukturu co nejvíce intaktní. Efektivní a rychlá penetrace fixačního roztoku do vnitřních buněčných vrstev má primární význam pro všechny následující kroky imunolokalizačního protokolu. Proto je pro úspěšnou fixaci rostlinného materiálu rozhodující vhodná kombinace vakua a fixačního roztoku (Pasternak *et al.*, 2015). V případě, že se při fixaci používá glutaraldehyd je zapotřebí redukovat nezreagované aldehydové skupiny, které by mohly způsobit autofluorescenci. Jelikož jsou rostlinné buňky obklopeny tuhou buněčnou stěnou, je potřeba ji alespoň částečně natrávit pro zajištění účinné penetrace protilátek. Proto se provádí inkubace pletiv enzymy degradujícími buněčnou stěnu. Po částečném natrávení buněčných stěn musí být permeabilizovány buněčné membrány. Membránová permeabilizace vytváří v membránách póry, které umožňují lepší pronikání protilátek. Poté následuje krok blokování, jehož hlavním cílem je minimalizovat nespecifické vazby protilátek a následně je provedena inkubace konkrétními protilátkami. Nakonec jsou vzorky umístěny mezi podložní a krycí skličko do zalévacího média, které zachovává fluorescenci vzorku. Doporučuje se používat zalévací médium s velmi podobným refrakčním indexem imerzního oleje, který se používá pro mikroskopické pozorování. Tím se předchází optickým artefaktům, silné emisi fluorescence nebo ztrátě signálu (Pasternak *et al.*, 2015).

Jednoduchým a účinným způsobem subcelulární lokalizace různých proteinů, včetně MAPKs, je imunolokalizace na zafixovaných řezech rostlinných vzorků, na které pro jejich velikost není možné použít „whole- mount“ metodu. Tato imunolokalizační metoda je založená na zalití rostlinného materiálu do Steedmanova vosku,

polyesterového vosku s nízkou teplotou tání, který udržuje vysokou antigenicitu studovaných proteinů. Odvoskované řezy navíc umožňují účinnou penetraci protilátek (Ovečka *et al.*, 2014). Steedmanův vosk byl v histochemii zaveden roku 1957 a představuje vynikající způsob nepřímé imunofluorescenční detekce proteinů (Steedman, 1957; Vitha *et al.*, 1997; Ovečka *et al.*, 2014). Výhodou Steedmanova vosku je především schopnost excelentní penetrace protilátek a zachování antigenicity proteinů (Ovečka *et al.*, 2014).

Imunocytochemické techniky v kombinaci s voskovými řezy lze aplikovat téměř na všechny buňky, pletiva a orgány rostlin pro vizualizaci širokého spektra proteinů s vysokým rozlišením a specifitou. Zejména je vhodné jejich využití u rostlin s komplexní architekturou pletiv a orgánů, jako jsou například kořenové hlízky nebo apikální meristém (Sauer *et al.*, 2006).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální materiál

S. meliloti divého typu, kmen Rm2011 (tetR) a *S. meliloti*, kmen Rm2011 obsahující plazmid pHC60 (strR) kódující mRFP.

3.1.2 Rostlinný materiál

V experimentech na imunolokalizaci byla použita:

- semena divého typu *M. sativa* L., kultivar Europe
- hlízky *M. sativa*, transgenní linie *SIMKK RNAi* s potlačenou expresí proteinu SIMKK metodou RNA interference a hlízky divého typu *M. sativa* L., kultivaru Regen SY (RSY) inokulované rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti*, kmen Rm2011 obsahující plazmid pHC60 (strR) kódující mRFP ($OD_{600} = 0,5$), transgenní linie i divý typ byly odvozeny *in vitro* procesem somatické embryogeneze

Pro Western blot analýzu byly použity:

- rostliny transgenní linie *SIMKK RNAi* s potlačenou expresí proteinu SIMKK metodou RNA interference a kořeny divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY inokulované rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* divého typu ($OD_{600} = 0,5$); transgenní linie i divý typ *M. sativa* L. byly odvozeny *in vitro* procesem somatické embryogeneze

Semena i listy byly nejdříve vysterilizovány následujícím způsobem:

Postup sterilizace semen:

- 1) promytí semen po dobu 30 s v 70% ethanolu
- 2) promytí semen po dobu 10 min. ve sterilizačním roztoku (70% ethanol, 10% hypochlorid sodný a 0,1% Tween)
- 3) promytí semen 5x po dobu 2 min. v destilované vodě, mezi jednotlivým promýváním byla vždy napipetována čistá destilovaná voda.

Vysterilizovaná semena byla přenesena do čisté miliQ vody v Eppendorf zkumavce a uložena na 6 h do lednice při teplotě 4°C pro zajištění homogenního klíčení semen. Semena byla poté nasazena na pevné MS médium a kultivována za konstatních podmínek (21°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h).

Postup sterilizace listů na indukci somatické embryogeneze:

- 1) promytí listů po dobu 5 s v 70% ethanolu
- 2) promytí listů po dobu 2 min. ve sterilizačním roztoku (1% hypochlorid sodný a 0,05% Tween)
- 3) promytí listů 3x po dobu 5 min v destilované vodě, mezi jednotlivým promýváním byla vždy napipetována čistá destilovaná voda.

Vysterilizované listy byly přeneseny na Petriho misku s filtračním papírem a pomocí skalpelu rozřezány na polovinu. Takto připravené listové explantáty byly umístěny na B5H médium, které indukuje tvorbu kalusu.

3.1.3 Chemikálie

<i>Abcam:</i>
Alexa Fluor 555
Alexa Fluor 647

<i>Alfa Aesar:</i>
Gellan Gum

<i>BioRad:</i>
4x Laemmli vzorkový pufr
Protein Assay Dye Reagent Concentrate
standard: Precision Plus Protein TM Dual Color Standards

<i>Desert Biologicals:</i>
celuláza R10
macerozym

meiceláza

<i>Duchefa Biochemie:</i>

1000x Gamborg vitamíny

1000x Nitsch & Nitsch vitamíny

2,4-D (2,4- dichlor- fenoxo octová kyselina)
--

4-(2- hydroxyethyl)- 1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)

Gamborg B5 základní směs solí

kinetin

kyselina boritá

mikroagar

Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)

myoinositol

<i>Roche:</i>

cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets

PhosSTOP

<i>Invitrogen:</i>

Alexa Fluor 488

<i>Sigma Aldrich:</i>

1- hexadekanol

2- merkaptoethanol

agaróza

DAPI (4',6- diamidin-2- fenylindol)

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

dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

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

dilaktát (DAPI)

dimethylsulfoxid (DMSO)

ditiotreitól (DTT)

dodecylsíran sodný (SDS)

dusičnan draselný (KNO ₃)
fluorid sodný (NaF)
glycin
glutaraldehyd
glycerol
heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO ₄ · 7H ₂ O)
hovězí sérový albumin (BSA)
hydroxid draselný (KOH)
hydroxid sodný (NaOH)
hypochlorid sodný
chlorid draselný (KCl)
chlorid hořečnatý (MgCl ₂)
chlorid sodný (NaCl)
kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA)
kyselina chlorovodíková (37%)
kyselina octová
LB Broth (Miller)
L- prolin
methanol
N, N, N, N- Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Nonidet P40
parafenylendiamin
paraformaldehyd
penta hydrát síranu měďnatého (CuSO ₄ ·5H ₂ O)
peroxodisíran amonný (APS)
PD98059
PIPES
polyethylenglykol 400 (PEG 400)
polyethylenimin (PEI)
Ponceau S
sacharosa
síran zinečnatý (ZnSO ₄ ·H ₂ O)
tetrahydridoboritan sodný (NaBH ₄)

toluidinová modř
Tris báze
Triton X-100
Tween 20

3.1.4 Roztoky a média

Médium B50

3,1 g.l ⁻¹	Gamborg B5 základní směs solí
0,5 g.l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g.l ⁻¹	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,5 g.l ⁻¹	prolin
30 g.l ⁻¹	sacharóza
4,5 g.l ⁻¹	Gellan Gum
1 ml. l ⁻¹	1000x Gamborg vitamíny (přidává se po autoklávování)
30 ml. l ⁻¹	roztok aminokyselin (přidává se po autoklávování)
1000 ml	miliQ voda
	pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

Médium B5H

3,1 g.l ⁻¹	Gamborg základní směs solí
0,5 g.l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g.l ⁻¹	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,5 g.l ⁻¹	prolin
30 g.l ⁻¹	sacharóza
4,5 g.l ⁻¹	Gellan Gum
1 ml. l ⁻¹	1000x Gamborg vitamíny (přidává se po autoklávování)
30 ml. l ⁻¹	roztok aminokyselin (přidává se po autoklávování)
1 ml. l ⁻¹	2,4-D (přidává se po autoklávování)
1 ml. l ⁻¹	kinetin (přidává se po autoklávování)
1000 ml	miliQ voda
	pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

MMS médium

4,3 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
0,1 g. l ⁻¹	myoinositol
30 g. l ⁻¹	sacharóza
4,5 g. l ⁻¹	Gellan Gum
1 ml. l ⁻¹	Nitsch & Nitsch vitamíny (přidává se po autoklávování)
1000 ml	miliQ voda

pH 5,7; sterilizace média byla provedena autoklávováním

MS médium

4,3 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
30 g. l ⁻¹	sacharóza
4,5 g. l ⁻¹	Gellan Gum
1000 ml	miliQ 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	miliQ voda

sterilizace roztoku přes bakteriální filtr, uchováváno v lednici při teplotě 4°C

Roztok 2,4-D

10 mg	2,4-D
50 µl	ethanol
150 µl	1M NaOH
10 ml	miliQ voda

sterilizace roztoku přes bakteriologický filtr, uchováváno v mrazáku při teplotě -20°C

Roztok kinetinu

1 mg	kinetin
20 μ l	1M NaOH
10 ml	miliQ voda

sterilizace roztoku přes bakteriologický filtr, uchováváno v mrazáku při teplotě -20°C

Tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium

2,2 g.l^{-1}	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l^{-1}	sacharosa
1000 ml	dH ₂ O

pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

Tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium s obsahem 250 mmol.l^{-1} NaCl

0,219 g	NaCl
15 ml	tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium

Tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium s obsahem 15 mmol.l^{-1} H₂O₂

23 μ l	H ₂ O ₂
14 977 μ l	tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium

Tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium s obsahem 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PD98059

6 μ l	PD98059
14994 μ l	tekuté $\frac{1}{2}$ MS

Tekuté Fahreus médium bez N₂

Zásobní roztoky:

Makronutrienty:

do pracovního roztoku bylo přidáno:

0,1232 g.ml^{-1}	MgSO ₄ · 7H ₂ O	(1 ml. l^{-1})
0,00953 g.ml^{-1}	KH ₂ PO ₄	(1 ml. l^{-1})

0,00712 g.ml ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	(2 ml. l ⁻¹)
0,0013 g.ml ⁻¹	Fe-EDTA	(2,5 ml. l ⁻¹)

Mikronutrienty:

do pracovního roztoku bylo přidáno:

0,001 g.ml ⁻¹	MnSO ₄ · H ₂ O	(100 µl. l ⁻¹)
0,0015 g.ml ⁻¹	CuSO ₄ · 5H ₂ O	(100 µl. l ⁻¹)
0,0017 g.ml ⁻¹	ZnSO ₄ · H ₂ O	(100 µl. l ⁻¹)
0,001 g.ml ⁻¹	H ₃ BO ₃	(100 µl. l ⁻¹)
0,0011 g.ml ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	(100 µl. l ⁻¹)

0,11 g.ml⁻¹ CaCl₂ (přidáno po autoklávování)
pH 6,5 pomocí HCl, sterilizováno autoklávováním

Pevné Fahreus médium bez N₂

Zásobní roztoky:

Makro- a mikronutrienty viz Tekuté Fahreus médium bez N₂

13 g.ml ⁻¹	mikroagar
0,11 g.ml ⁻¹	CaCl ₂ (přidáno po autoklávování) pH 6,5 pomocí Hcl, sterilizováno autoklávováním

LB médium pro kultivaci *S. meliloti*

40 g.l ⁻¹	LB Broth (Miller) s agarem pH 7,2 pomocí HCl, sterilizováno autoklávováním
50 mg.l ⁻¹	tetracyklin nebo
400 mg.l ⁻¹	streptomycin

Mikrotubuly stabilizující pufr (1x MTSB)

15,1 g.l ⁻¹	PIPES pevný KOH
1,23 g.l ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O

10 ml.l ⁻¹	EGTA
1000 ml	miliQ voda

pH 6,9 pomocí KOH; sterilizace přes bakteriologický filtr

EGTA (0,5 M zásobí roztok)

3,8 g	EGTA
10 ml	miliQ voda

pH 8 pomocí pevného KOH; sterilizace přes bakteriologický filtr

Fosfátový pufr (10x PBS)

80 g.l ⁻¹	NaCl
2 g.l ⁻¹	KCl
11,5 g.l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O
2 g.l ⁻¹	KH ₂ PO ₄
1000 ml	miliQ voda

pH 7,3 pomocí HCl

Fixační roztok- kořeny (2% paraformaldehyd; 0,2% glutaraldehyd; ½ MTSB, Tween)

500 µl	1x MTSB
125 µl	16 % paraformaldehyd
8 µl	25 % glutaraldehyd
367 µl	miliQ voda
3 µl	Tween 20

Fixační roztok- hlízky (3% paraformaldehyd; 0,25% glutaraldehyd; 0,3% Tween; 0,3% Triton X-100; 1/6 MTSB s 10% DMSO)

167 µl	1x MTSB
100 µl	DMSO
187,5 µl	16% paraformaldehyd
10 µl	25 % glutaraldehyd
3 µl	Tween 20

3 μ l	Triton X-100
529,5 μ l	miliQ voda

Redukční roztok

50 mg	NaBH ₄
50 ml	PBS

Extrakční pufr

0,6 g	50 mM HEPES (pH 7,5 pomocí NaOH)
0,22 g	75 mM NaCl
0,019 g	1 mM EGTA
50 μ l	1 mM MgCl ₂
0,002 g	1 mM NaF
5 ml	10 % glycerol
45 ml	miliQ voda

Před použitím se na 1 ml extrakčního pufru přidává:

1 μ l	1 mM DTT
20 μ l	cOmplete (inhibitor proteáz)
100 μ l	PhoStop (inhibitor fosfatáz)

10x elektroforetický pufr (Running buffer- RB)

30 g.l ⁻¹	Tris
144 g.l ⁻¹	Glycin
10 g.l ⁻¹	SDS
1000 ml	miliQ voda

Pracovní RB pufr

100 ml	RB
900 ml	miliQ voda

10x Přenosový pufr (Transfer buffer- TB)

30 g.l ⁻¹	Tris
----------------------	------

144 g.l ⁻¹	Glycin
1000 ml	miliQ voda

Pracovní TB pufr

100 ml	10x TB
100 ml	methanol
800 ml	miliQ voda

10x TBS pufr

24,2 g.l ⁻¹	Tris
87,8 g.l ⁻¹	NaCl
1000 ml	miliQ voda
	pH 7,4 pomocí koncentrované HCl

1x TBST pufr

100 ml	TBS
899 ml	miliQ voda
1 ml	Tween 20

Ponceau S barvicí roztok

1 g	Ponceau S
50 ml	kyselina octová
950 ml	miliQ voda

0,01% Toluidinová modř

0,01 g	Toluidinová modř
100 ml	96% ethanol

Zalévací médium

0,1%	parafenylendiamin
------	-------------------

90%	glycerol
10%	PBS (pH= 8,3-8,5)

Steedmanův vosk

450 g	PEG 400
50 g	1- hexadekanol

3.1.5 Přístroje

analytické váhy XA110/2X	Radwag
aparatura na přípravu gelů	BioRad
aparatura na SDS-PAGE a Western Blot	BioRad
centrifuga Allegra 64R	BECKMAN COULTER
digestoř	Merci
dokumentační systém ChemiDoc™ MP	BioRad
elektromagnetická míchačka MSH- 420	BOECO
fotoaparát	Nikon
fytotronová komora	Weiss Gallenkamp
inkubátor s nastavitelnou teplotou	Memmert
konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710	Zeiss
laboratorní předvážky S1502	BEL- Engineering
laserový skenovací mikroskop s Airyscan	Zeiss
membránová vývěva	Fisher scientific
mikrocentrifuga Model 16K	BioRad
mikroskop AXIO Zoom V.16	Zeiss
mikrotom HYRAX M 40	Zeiss
orbitální třepačka s inkubací ES- 20	Biosan
pH metr PC 2700	Eutech Instruments
stereolupa MSZ5000	Krüss
sterilní laminární box	Merci
vakuum	Bachofer

3.1.6 Software

Office PowerPoint 2007, ZEN Blue 2011, ZEN Black 2011, ImageLab (BioRad), i-control™ Microplate Reader Software (Tecan).

3.2 Metody

3.2.1 Příprava médií pro kultivaci rostlin *in vitro*

3.2.1.1 B5H médium indukující tvorbu kalusů

V 1 l miliQ vody byla za stálého míchání na elektromagnetické míchače rozpuštěna základní směs solí Gamborg, KNO₃, MgSO₄.7H₂O, prolin, sacharóza a Gellan Gum. Pomocí KOH se upravilo pH média na hodnotu 5,7. Do každé ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování byl ke sterilnímu a vychladlému médiu ve sterilním laminárním boxu přidán roztok aminokyselin, hormony (2,4-D a kinetin) a ze zásobního roztoku 1000x Gamborg vitamíny. Médium bylo rozlito na Petriho misky. Kultivace listových explantátů na tomto médiu trvala 2 týdny a probíhala ve fytotronové komoře za konstantních podmínek (21°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h).

3.2.1.2 B50 médium indukující tvorbu embryí

V 1 l miliQ vody byla za stálého míchání na elektromagnetické míchače rozpuštěna základní směs solí Gamborg, KNO₃, MgSO₄.7H₂O, prolin, sacharóza a Gellan Gum. Pomocí KOH se upravilo pH média na hodnotu 5,7. Do každé ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování bylo ke sterilnímu a vychladlému médiu ve sterilním laminárním boxu přidán roztok aminokyselin a ze zásobního roztoku 1000x Gamborg vitamíny. Médium bylo rozlito na Petriho misky. Kultivace kalusů na tomto médiu probíhala ve fytotronové komoře za konstantních podmínek (viz výše) a trvala 3 týdny.

3.2.1.3 MMS médium indukující klíčení a vývoj rostlin

V 1 l miliQ vody byla za stálého míchání na elektromagnetické míchače rozpuštěna základní směs solí MS salts, myoinositol, sacharóza a Gellan Gum. Pomocí KOH se upravilo pH média na hodnotu 5,7. Do každé ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování byly ke sterilnímu a vychladlému médiu ve sterilním laminárním boxu přidány Nitsch & Nitsch vitamíny. Médium bylo rozlito na Petriho misky.

Kultivace embryí na tomto médiu probíhala ve fytotronové komoře za konstantních podmínek (viz výše) a trvala 2-3 týdny.

3.2.1.4 MS médium na kultivaci rostlin v *in vitro* podmínkách

V 1 l miliQ vody byla za stálého míchání na elektromagnetické míchačce rozpuštěna základní směs solí MS salts, sacharóza a Gellan Gum. Pomocí KOH se upravilo pH média na hodnotu 5,7. Do každé ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování bylo médium rozlito na Petriho misky, na které byly přeneseny rostliny z MMS média pro jejich další kultivaci v *in vitro* podmínkách.

3.2.1.5 Pevné Fahreus médium bez N₂

V 1 l miliQ vody byly za stálého míchání na elektromagnetické míchačce rozpuštěny makro- a mikronutrienty ze zásobních roztoků a mikroagar. Pomocí HCl se upravilo pH média na hodnotu 6,5. Do každé ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování byl ke sterilnímu a vychladlému médiu ve sterilním laminárním boxu přidán roztok CaCl₂. Na tomto médiu byly kultivovány rostliny, u kterých byla později indukována symbiotická interakce s bakteriemi *S. meliloti*.

3.2.2 Příprava médií pro kultivaci *S. meliloti*

3.2.2.1 Tekuté Fahreus médium bez N₂

V 1 l miliQ vody byly za stálého míchání na elektromagnetické míchačce rozpuštěny makro- a mikronutrienty ze zásobních roztoků. Pomocí HCl se upravilo pH média na hodnotu 6,5. Do každé ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování byl ke sterilnímu a vychladlému médiu ve sterilním laminárním boxu přidán roztok CaCl₂.

3.2.2.2 LB médium pro kultivaci *S. meliloti*

V 1 l miliQ vody byly za stálého míchání na elektromagnetické míchačce rozpuštěn LB Broth agar (Miller). Pomocí HCl se upravilo pH média na hodnotu 7,2. Do každé

ze 4 lahví o objemu 500 ml se odměřilo 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po autoklávování bylo médium rozlito na nízké kulaté Petriho misky. Na jednu Petriho misku bylo odměřeno 20 ml média, do kterého se přidalo 20 μ l tetracyklinu nebo streptomycinu.

3.2.3 Příprava kultury *S. meliloti*

Ve sterilním laminárním boxu byla sterilní bakteriologickou kličkou odebrána část kultury *S. meliloti* a rozetřena na Petriho misku s pevným LB médiem. Jelikož je *S. meliloti* bakterie žijící ve tmě, byla miska pro zajištění těchto podmínek obalena alobalem. Takto připravená miska s bakteriemi byla přenesena do inkubátoru, kde byly bakterie kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin. Po nárůstu bakteriálních kolonií byla Petriho miska přenesena do chladničky (4 °C), aby došlo ke zpomalení růstu bakterií.

3.2.4 Kultivace bakterií *S. meliloti* v tekutém Fahreus médiu bez N₂

Do sterilní zkumavky s 20 ml tekutého Fahreus média byla sterilním párátkem naočkovaná část narostlé kultury *S. meliloti* z LB média na Petriho misce. Zkumavka byla utěsněna parafilmem a obalena alobalem, aby se zamezilo průniku světla do zkumavky s bakteriemi. Takto připravené zkumavky byly přeneseny na orbitální třepačku s inkubací, kde byly suspenzní kultury kultivovány přes noc při teplotě 30 °C a rychlosti třepání 150 otáček/min.

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

Inokulace rostlin *M. sativa* kultivovaných na pevném Fahreus médiu bez dusíku kulturou *S. meliloti* probíhala ve sterilním laminárním boxu. Na povrch kořenů 14 dní starých rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY byla automatickou pipetou nanesena kultura *S. meliloti* (2 ml, OD₆₀₀= 0,5). Misky byly uzavřeny parafilmem, a poté obaleny černou folií tak, aby byly kořeny kultivovány ve tmě. Rostliny inokulované bakteriemi *S. meliloti* byly později použity pro imunolokalizaci a Western blot analýzu.

Na imunolokalizaci byly použity rostliny s vytvořenými hlízkami 28 dní po inokulaci rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti*. Na Western blot analýzu byly použity kořeny rostlin 15 dní po inokulaci rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti*.

3.2.6 Optimalizace imunolokalizační metody „whole-mount“

Pro modifikaci imunolokalizační „whole-mount“ metody u *M. sativa* byly použity kořenové špičky 4 dny starých semenáčků divého typu *M. sativa* L., kultivar Europe, které byly kultivovány ve vertikální poloze na pevném MS médiu. Kultivace pobíhala ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách (viz výše).

U jednotlivých semenáčků byly ve fixačním roztoku odřezány kořenové špičky, které byly umístěny do 12 jamkových destiček s čerstvým fixačním roztokem a fixovány v digestoři 1 h při pokojové teplotě. Na začátku fixace bylo aplikováno vakuum 4x3 min. Destičky se zafixovanými vzorky byly přes noc uloženy do lednice při teplotě 4°C. Ráno byly vzorky promyty po dobu 3x5 min ½ MTSB pufrém, a následně 4x5 min PBS pufrém.

Redukce aldehydových skupin byla provedena použitím NaBH₄ v PBS (1 mg. ml⁻¹) po dobu 3x5min. Následně byly vzorky promyty 3x5 min PBS pufrém.

Pro natrávení buněčných stěn byl ke vzorkům přidán enzymatický roztok (1% (w/v) meiceláza, 1% (w/v) celulóza a 1% (w/v) macerozym v PBS pufru). Vzorky byly inkubovány 25 min při teplotě 30°C, a poté promyty 4x5 min PBS pufrém.

Permeabilizace plazmatické membrány byla provedena použitím 10% (v/v) DMSO a 2% (v/v) Nonidet P-40 v PBS. Vzorky byly inkubovány v permeabilizačním roztoku 1 h při pokojové teplotě, a poté promyty 4x10 min PBS pufrém.

Pro blokaci bylo použito 5% (w/v) BSA v PBS. Vzorky se nechaly inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.

Vzorky byly inkubovány s primární protilátkou krysí anti- tubulin α v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Na začátku inkubace bylo aplikováno vakuum 4x3 min. Inkubace poté probíhala přes noc při teplotě 4°C. Ráno byly vzorky vloženy na 45 min do inkubátoru při teplotě 37°C, a poté byly promyty 3% (w/v) BSA v PBS (6x10 min).

Následovala inkubace vzorků se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 kozí anti- krysí v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1).

Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C. Poté byly vzorky promyty PBS pufrům (6x10min).

Pro barvení DNA a jader bylo použito DAPI (10 mmol.l⁻¹) v PBS pufru v poměru 1:1000. Inkubace probíhala 15 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky 3x10 min promyty PBS pufrům.

Na jedno podložní sklíčko byly do zalévacího média umístěny 2-3 kořenové špičky, které byly zakryty krycím sklíčkem. Takto připravený preparát byl kolem krycího sklíčka uzavřen lakem na nehty. Vzorky byly umístěny do složky na mikroskopické preparáty a uloženy při -20°C.

Jednotlivé preparáty byly nasnímány s přednastavenými parametry konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 pomocí programu Zen 2011 a laserovým skenovacím mikroskopem LSM s Airyscan. Před snímáním byly nastaveny jednotlivé parametry (laser pro DAPI: 405 nm, Alexa Fluor 488: 488 nm; filtr pro DAPI: 410-495 nm, Alexa Fluor 488: 493-551 nm).

3.2.7 Imunolokalizace tubulinu a SIMK

Pro imunolokalizaci tubulinu a SIMK byly použity kořenové špičky čtyřdenních semenáčků divého typu *M. sativa* L., kultivar Europe. Semenáčky byly kultivovány ve vertikální poloze na pevném MS médiu ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách (viz výše).

Fixace i následná imunolokalizace byla provedena podle modifikovaného protokolu (viz kapitola 3.2.2 Optimalizace imunolokalizační metody „whole-mount“).

Vzorky byly nejdříve inkubovány s primární protilátkou krysí anti-tubulin α v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Na začátku inkubace bylo aplikováno vakuum 4x3 min. Inkubace poté probíhala přes noc při teplotě 4°C. Ráno byly vzorky vloženy na 45 min do inkubátoru při teplotě 37°C, a poté byly promyty 3% (w/v) BSA v PBS (6x10 min).

Následovala inkubace vzorků se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 kozí anti-krysí v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C. Poté byly vzorky promyty 3% (w/v) BSA v PBS (6x10min).

Následně byly vzorky inkubovány s primární protilátkou králičí anti-MPK6 v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala

nejprve 30 min při pokojové teplotě, poté 1 h při 36°C, a poté opět 1 h při pokojové teplotě. Vzorky byly promyty v 3% (w/v) BSA v PBS (6x10 min).

Následovala inkubace vzorků se sekundární protilátkou Alexa Fluor 647 kozí anti-králičí v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C. Poté byly vzorky promyty PBS puřem (6x10min).

Pro barvení DNA a jader bylo použito DAPI (10 mmol.l⁻¹) v PBS puřru v poměru 1:1000. Inkubace probíhala 15 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky po dobu 3x10 min promyty PBS puřem.

Na jedno podložní sklíčko byly do zalévacího média umístěny 2-3 kořenové špičky, které byly zakryty krycím sklíčkem. Takto připravený preparát byl kolem krycího sklíčka uzavřen lakem na nehty. Vzorky byly umístěny do složky na mikroskopické preparáty a uloženy při -20°C.

Jednotlivé preparáty byly nasnímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 pomocí programu Zen 2011. Před snímáním byly nastaveny jednotlivé parametry (laser pro DAPI: 405 nm, Alexa Fluor 488: 488 nm, Alexa Fluor 647: 633 nm; filtr pro DAPI: 410-495 nm, Alexa Fluor 488: 493-551 nm; Alexa Fluor 647: 638-755 nm). Intenzita fluorescence byla změřena v programu Zen Black 2011 využitím funkce „Profil“.

3.2.8 Imunolokalizace tubulinu, SIMK a fosforylovaných MAPKs po působení stresů a inhibitoru MAPKs

Pro imunolokalizaci tubulinu, SIMK a fosforylovaných MAPKs (Phospho-p44/42 MAPK= pERK) po působení solného stresu, oxidativního stresu a inhibitoru MAPKs byly použity kořenové špičky čtyřdenních semenáčků *M. sativa* L., kultivar Europe. Semenáčky byly kultivovány ve vertikální poloze na pevném MS médiu ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách (viz výše).

Před samotnou fixací byly 4 dny staré semenáčky vystaveny po dobu 2 h působení 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ inhibitoru MAPKs PD98059. Jedná se o selektivní inhibitor, který brání aktivaci MEK1 a MAPK kaskády. Po dobu 30 min byly 4 dny staré semenáčky vystaveny působení 250 mmol.l⁻¹ NaCl a 15 mmol.l⁻¹ H₂O₂. Část semenáčků byla použita jako kontrola. Fixace i následná imunolokalizace byla provedena podle modifikovaného protokolu (viz kapitola 3.2.2 Optimalizace imunolokalizační metody „whole-mount“).

Vzorky byly inkubovány s primárními protilátkami myší anti- pERK a králičí anti- MPK6 v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Na začátku inkubace bylo aplikováno vakuum 4x3 min. Inkubace poté probíhala přes noc při teplotě 4°C. Ráno byly vzorky vloženy na 45 min do inkubátoru při teplotě 37°C, a poté byly promyty 5% (w/v) BSA v PBS (6x10 min).

Následovala sekvenční inkubace vzorků, nejprve se sekundární protilátkou Alexa Fluor 647 králičí anti- myší v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Vzorky byly promyty 5% BSA (w/v) v PBS a následovala inkubace se sekundární protilátkou Alexa Fluor 555 kozí anti- králičí v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C. Poté byly vzorky promyty 5% (w/v) BSA v PBS (6x10min).

Následně byly vzorky inkubovány s primární protilátkou krysí anti- tubulin α v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při teplotě 4°C. Ráno byly vzorky vloženy na 45 min do inkubátoru při teplotě 37°C, a poté byly promyty 5% (w/v) BSA v PBS (6x10 min).

Následovala inkubace vzorků se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 kozí anti- krysí v 2,5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C. Poté byly vzorky promyty PBS pufrem (6x10min).

Pro barvení DNA a jader bylo použito DAPI (10 mmol.l⁻¹) v PBS pufru v poměru 1:1000. Inkubace probíhala 15 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky po 3x10 min promyty PBS pufrem.

Na jedno podložní sklíčko byly do zalévacího média umístěny 2-3 kořenové špičky, které byly zakryty krycím sklíčkem. Takto připravený preparát byl kolem krycího sklíčka uzavřen lakem na nehty. Vzorky byly umístěny do složky na mikroskopické preparáty a uloženy při -20°C.

Jednotlivé preparáty byly nasnímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 pomocí programu Zen 2011. Před snímáním byly nastaveny jednotlivé parametry (laser pro DAPI: 405 nm, Alexa Fluor 488: 488 nm, Alexa Fluor 555: 561 nm, Alexa Fluor 647: 633 nm; filtr pro DAPI: 410-495 nm, Alexa Fluor 488: 493-551 nm, Alexa Fluor 555: 561-639 nm, Alexa Fluor 647: 638-755 nm). Intenzita fluorescence byla změřena v programu Zen Black 2011 využitím funkce „Profil“ a kolokalizace mezi SIMK a pERK prostřednictvím funkce „Kolokalizace“. Intenzita fluorescence pERK byla měřena u každého ošetření v 10 rizodermálních buňkách kořene.

3.2.9 Imunolokalizace tubulinu, MAPKs a fosforylovaných MAPKs na zafixovaných řezech ve Steedmanovém vosku

3.2.9.1 Příprava vzorků a zalévání do Steedmanova vosku

Pro imunolokalizaci tubulinu, SIMK a pERK byly použity hlízky transgenní linie *SIMKK RNAi* a rostliny divého typu *M. sativa* L., kultivar RSY, které byly inokulovány rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* (OD₆₀₀= 0,5). Hlízky byly odebrány 28 dní po inokulaci.

Před fixací byly z rostlin odřezány hlízky, které byly zafixovány ve fixačním roztoku. Hlízky byly fixovány 1,5 h při pokojové teplotě v digestoři a každých 10 minut bylo na dobu 5 min aplikováno vakuum. Vialky se zafixovanými vzorky byly přes noc uloženy do lednice při teplotě 4°C. Ráno byly vzorky promyty 3x10 min MTSB pufrem, a následně 3x10 min PBS pufrem.

Redukce aldehydových skupin byla provedena použitím NaBH₄ v PBS (1 mg.ml⁻¹) po dobu 3x5min. Následně byly vzorky promyty (3x5 min) PBS pufrem.

Vzorky byly dehydratovány pomocí vzestupné ethanolové řady v PBS, následujícím způsobem: 30%, 50%, 70%, 90% (v/v) ethanol v PBS a nakonec 97% (v/v) ethanol. V každém kroku probíhala dehydratace 30 min při teplotě 4°C. Po posledním dehydratačním kroku v 97% (v/v) ethanolu byly vzorky obarveny 0,01% (w/v) toluidinovou modří po dobu 10 min. Po obarvení byla toluidinová modř nahrazena 97% (v/v) ethanolem a vialky byly vloženy na 10 min do inkubátoru při teplotě 37°C pro jejich zahřátí.

Poté byla ke vzorkům při teplotě 37°C přidána směs ethanolu a Steedmanova vosku pro postupné a úplné vytěsnění ethanolu ze vzorků a jeho nahrazení 100% Steedmanovým voskem. Do vialek se vzorky byl proto nejprve na 3h přidán ethanol a Steedmanův vosk v poměru 2:1. Vzorky byly přes noc ponechány v ethanolu a Steedmanovém vosku v poměru 1:1 a na druhý den byla tato směs nahrazena na 3 h etanolem a Steedmanovým voskem v poměru 1:2. Ve finálním kroku byl ke vzorkům 3x na 2 h přidán 100% Steedmanův vosk.

Do silikonových zalévacích formiček umístěných v inkubátoru na 37°C byl přidán 100% Steedmanův vosk, do kterého byly opatrně pomocí pinzety a preparační jehly přemístěny vzorky z vialek. Nakonec se přidal znovu 100% Steedmanův vosk tak, aby byly všechny vzorky zality Steedmanovým voskem a došlo k vyplnění celého prostoru

jednotlivých zalévacích bloků ve formičkách. Vzorky ve Steedmanovém vosku se nechaly na suchém místě při pokojové teplotě ztuhnout.

Po vyjmutí voskových bloků se vzorky ze zalévacích formiček byl u každého bloku pomocí skalpelu odstraněn přebytečný vosk a takto připravené voskové bloky se vzorky byly skladovány při teplotě 4°C.

3.2.9.2 Řezání vzorků zalitých ve Steedmanovém vosku

Před samotným řezáním na mikrotomu byly voskové bloky připevněny na dřevěný bloček pomocí čistého Steedmanova vosku. Zahřátým skalpelem byl na povrchu dřevěného bločku rozpuštěn čistý Steedmanův vosk a jakmile začal vosk tuhnout, byl do něj umístěn voskový blok se vzorkem a ponechal se zcela ztuhnout. Po stranách voskového bločku byl ještě přidán Steedmanův vosk pro lepší fixaci na dřevěném bloku (Obr. 4B,C). Velikost voskového bloku byla dle potřeby upravena pomocí žiletky.

Dřevěný bloček s připevněným voskovým blokem se vzorkem byl umístěn do držáku na mikrotomu tak, aby byl voskový blok k noži na mikrotomu paralelní (Obr. 4A). Tloušťka řezů byla nastavena na 8 μm . Při řezání se na hraně nože začala vyvíjet páska jednotlivých řezů, která byla poté pomocí štětců oddělena od nože a umístěna na čistý nelepivý povrch, např. dostatečně dlouhý kus kartonu (Obr. 4D). Mezitím byla připravena podložní sklíčka, jejichž povrch byl pokrytý polyethyleniminem (PEI). Vosková páska byla žiletkou rozdělena na části tak, aby byly jednotlivé řezy seřazeny za sebou, a poté byly umístěny pomocí štětců na podložní sklíčko pokryté s PEI. K boční straně pásy bylo přidáno pár kapek vody tak, aby došlo k postupnému roztažení a narovnání jednotlivých řezů na podložním sklíčku (Obr. 4E, F). Takto připravena sklíčka s jednotlivými řezy se nejprve ponechala zcela uschnout, a poté umístila přes noc do lednice při teplotě 4°C.



Obr 4: Příprava a řezání vzorků na mikrotomu. Dřevěný bloček s voskovým blokem v držáku mikrotomu (A), dřevěné bločky s voskovými bloky (B, C), páska jednotlivých řezů (D), podložní sklíčka s voskovými řezy (E, F).

3.2.9.3 Odvoskování a rehydratace řezů

Aby byla umožněna penetrace protilátek pro následnou imunolokalizaci, musí být jednotlivé řezy nejdříve odvoskovány a rehydratovány (Ovečka *et al.*, 2014).

Odvoskování probíhalo ve skleněných kyvetách. Do těch byla umístěna podložní sklíčka s řezy, ke kterým byl nejdříve na dobu 3x10 min přidán 97% (v/v) ethanol, poté na 10 min 90% (v/v) ethanol v PBS, na 10 min 70% (v/v) ethanol v PBS a nakonec byl přidán čistý PBS pufr na 2x10 min. Po promytí byla sklíčka ze skleněné kyvety vyjmuta a následná imunolokalizace probíhala už na jednotlivých podložních sklíčkách s řezy. Po celou dobu byla sklíčka se vzorky uchovávána v horizontální poloze ve vlhké komůrce, aby se zamezilo jejich vysychání. Takto byla sklíčka se vzorky připravena na imunolokalizaci.

3.2.9.4 Imunolokalizace tubulinu a MAPKs

Pro zablokování nespecifické vazby protilátek bylo použito 5% (w/v) BSA v PBS. Inkubace probíhala 1 h při pokojové teplotě.

Následně byly vzorky inkubovány s primární protilátkou krysí anti-tubulin α v 5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala

přes noc při teplotě 4°C. Ráno byla sklíčka se vzorky vložena na 30 min do inkubátoru při teplotě 25°C, a poté promyta po dobu 3x10 min 2% (w/v) BSA v PBS.

Následovala inkubace vzorků se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 kozí anti- krysí v 5% (w/v) BSA v PBS odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala po dobu 2 h při teplotě 37°C .Vzorky byly poté 3x10 min promyty 2% (w/v) BSA v PBS.

Následovala inkubace vzorků s primárními protilátkami myší anti-pERK a králičí anti- MPK6 v 5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Po inkubaci, která probíhala 1 h při pokojové teplotě, následovalo promytí vzorků 3x10 min 2% (w/v) BSA v PBS a inkubace se sekundárními protilátkami. Nejprve se sekundární protilátkou Alexa Fluor 647 králičí anti- myší v 5% (w/v) BSA v PBS odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C, a poté následovalo promytí vzorků 3x10 min 2% (w/v) BSA v PBS a inkubace se sekundární protilátkou Alexa Fluor 555 kozí anti- králičí v 5% (w/v) BSA v PBS v odpovídajícím poměru (viz Tabulka 1). Inkubace probíhala 2 h při teplotě 37°C. Následně byly vzorky 3x10 min promyty PBS pufrem.

Pro barvení DNA a jader bylo použito DAPI (10 mmol.l⁻¹) v PBS pufru v poměru 1:1000. Inkubace probíhala 15 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky po dobu 2x10 min promyty PBS pufrem.

Na podložní sklíčka bylo přidáno zalévací médium a ta byla následně zakryta krycím sklíčkem. Takto připravený preparát byl kolem krycího sklíčka uzavřen lakem na nehty. Vzorky byly umístěny do složky na mikroskopické preparáty a uloženy při -20°C.

Jednotlivé preparáty byly nasnímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 použitím programu Zen 2011. Před snímáním byly nastaveny jednotlivé parametry (laser pro DAPI: 405 nm, Alexa Fluor 488: 488 nm, Alexa Fluor 555: 561 nm, Alexa Fluor 647: 633 nm; filtr pro DAPI: 410-495 nm, Alexa Fluor 488: 493-551 nm, Alexa Fluor 555: 561-639 nm, Alexa Fluor 647: 638-755 nm).

Tabulka 1: Přehled použitých primárních a sekundárních protilátek a jejich ředění

Primární protilátka	Ředění
Kryší anti- tubulin α	1:300
Myší anti-pERK	1:400
Králičí anti-MPK6	1:750
Sekundární protilátka	Ředění
Alexa Fluor 488 kozí anti-kryší	1:500
Alexa Fluor 555 kozí anti-králičí	
Alexa Fluor 647 králičí anti-myší	

3.2.10 Indukce transgenní linie *in vitro* procesem somatické embryogeneze

Procesem somatické embryogeneze byla odvozena transgenní linie *SIMKK RNAi* se sníženou expresí proteinu SIMKK metodou RNA interference.

Po sterilizaci listů byly připraveny listové explantáty tak, že každý list byl pomocí skalpelu rozdělen na dvě poloviny. Takto připravené listové explantáty byly umístěny na B5H médium, jehož hlavními složkami jsou syntetický auxinový růstový regulátor 2,4-D a cytokinin kinetin. Na B5H médiu byly listové explantáty kultivovány ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách 2 týdny, během kterých došlo k indukci kalusů.

Vytvořené kalusy byly po 2 týdnech přeneseny na B50 médium, které obsahuje roztok aminokyselin a indukuje tvorbu somatických embryí. Na B50 médiu byly kalusy kultivovány ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách 3 týdny, během kterých došlo k tvorbě embryí.

Jednotlivá somatická embrya byla poté umístěna na MMS médium, které obsahuje Nitsch & Nitsch vitamíny a je důležité pro klíčení a vývoj rostlin. Na MMS médiu byla somatická embrya kultivována ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách 2-3 týdny, během kterých došlo k růstu kořenů.

Rostliny s kořeny byly následně přeneseny na MS médium pro jejich udržování v *in vitro* podmínkách a dále kultivovány ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách.

Jednotlivá stádia somatické embryogeneze byla zdokumentována mikroskopem AXIO Zoom.V16 pomocí programu Zen 2011 a nově regenerované rostliny byly následně použity pro Western blot analýzu.

3.2.11 Western blot

Western blot analýzou byla provedena detekce proteinů SIMK a MMK3. Byly použity kořeny 14 dní starých rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* odvozené ze somatické embryogeneze a jako kontrola byly použity kořeny rostlin 14 dní starých rostlin divého typu *M. sativa* L., kultivar RSY, které byly taktéž indukovány somatickou embryogenezí. Část rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a kultivaru RSY byla kultivována v kontrolních podmínkách na Fahreus médiu bez dusíku. Druhá část rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a kultivaru RSY byla inokulována rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* divého typu ($OD_{600} = 0,5$) a kultivována na Fahreus médiu bez dusíku. Pro Western blot analýzu byly použity kořeny rostlin 15 dní po inokulaci.

Kořeny a listy byly zmrazeny v tekutém dusíku, následně homogenizovány a přeneseny do mikrozkušavek. Proteiny z rostlinného materiálu byly extrahovány pomocí extrakčního pufru E, do kterého byly těsně před použitím přidány inhibitory proteáz a fosfatáz. Proteiny byly extrahovány po dobu 30 min na ledu. Vzorky byly centrifugovány při 13 000 g, 20 min, při teplotě 4°C a získaný supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkušavky.

Koncentrace proteinů byla stanovena použitím mikrodestičkového spektrofotometru pomocí softwaru i-controlTM. Koncentrace proteinů byla měřena při vlnové délce 595 nm a obsah proteinů byl vypočítán z rovnice lineární regrese. Bylo vypočítáno potřebné množství proteinu a MiliQ do 75 μ l vzorku, pro docílení stejné koncentrace (30 μ g/ μ l) proteinů ve všech vzorcích. K těmto 75 μ l vzorku bylo v digestoři napipetováno 20 μ l 4x Laemmli pufru, a poté 5 μ l 2-merkptoethanolu. Vzorky byly následně denaturovány po dobu 10 min při teplotě 95°C a následně naneseny na gel.

Pro SDS-PAGE byl připraven podle instrukcí výrobce „stain-free“ gel (viz Tabulka 2). Připravený gel byl vložen do elektroforetického aparátu a elektroforetické vany, která byla stejně jako vnitřní cela naplněna 1x elektrodovým pufrem. Do první jamky bylo napipetováno 5 μ l proteinového standardu (Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards) a do každé následující jamky bylo naneseno 15 μ l proteinového vzorku. SDS-PAGE elektroforéza probíhala při 160V po dobu 1 h.

Pro Western blot byly použity PVDF membrány, které bylo nutné předem aktivovat ponořením do 100% methanolu po dobu 30 sekund, následně byly ekvilibrovány v 1x transferovém pufru bez methanolu po dobu 10 min. Přenos proteinů probíhal přes noc při teplotě 4°C. Do tanku byl vložen chladicí box, celý tank byl naplněn transfer pufrům s methanolem, vložen do lednice a zapojen do zdroje napětí na 24 V. Po přenosu se membrány nechaly uschnout. Úspěšnost přenosu byla ověřena obarvením membrány barvivem Ponceau S v 5% kyselině octové po dobu 1 min. Membrány byly následně několikrát promyty 1x TBS-T pufrům až do úplného vymytí barviva.

Poté byly membrány blokovány pomocí 5% (w/v) BSA a 5% (w/v) sušeného mléka v 1x TBS-T pufru. Blokování probíhalo 7h při pokojové teplotě na třepačce. Následně byly membrány 2x5min promyty v 1x TBS-T pufru. Pro inkubaci s primární protilátkou bylo připraveno 1 % (w/v) BSA v 1x TBS-T, do kterého byla přidána protilátka králičí anti- MPK6 (1:15000) a 3% (w/v) sušené mléko v 1x TBS-T pufru, do kterého byla přidána protilátka králičí anti- MMK3 (1:3000). Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc na třepačce při teplotě 4°C.

Následovalo promytí membrán 5x10 min v 1x TBS-T pufru. Nakonec byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou kozí anti-králičí konjugovanou s křenovou peroxidasou (HPR). Sekundární protilátka byla ředěna v roztoku 1% (w/v) BSA v TBS-T v poměru 1:5000. Po inkubaci se sekundární protilátkou, která probíhala 1,5 h při pokojové teplotě na třepačce, následovalo opět promytí membrán v 1x TBS-T pufru po dobu 5x10 min. Detekce membrán byla zprostředkována reakcí křenové peroxidasy s chemiluminescenčním substrátem (ECL, inkubace 1 min). Chemiluminescenční signál byl získán pomocí dokumentačního zařízení Chemidoc™ MP systém a programu ImageLab.

Tabulka 2: Příprava „stain- free“ gelu

Separační gel		Zaostřovací gel	
„Resolver A“	3 ml	„Stacker A“	1 ml
„Resolver B“	3 ml	„Stacker B“	1 ml
10% APS	30 µl	10% APS	10 µl
TEMED	3 µl	TEMED	1 µl

4 VÝSLEDKY

V této kapitole jsou představeny výsledky, které byly získány během experimentální části diplomové práce.

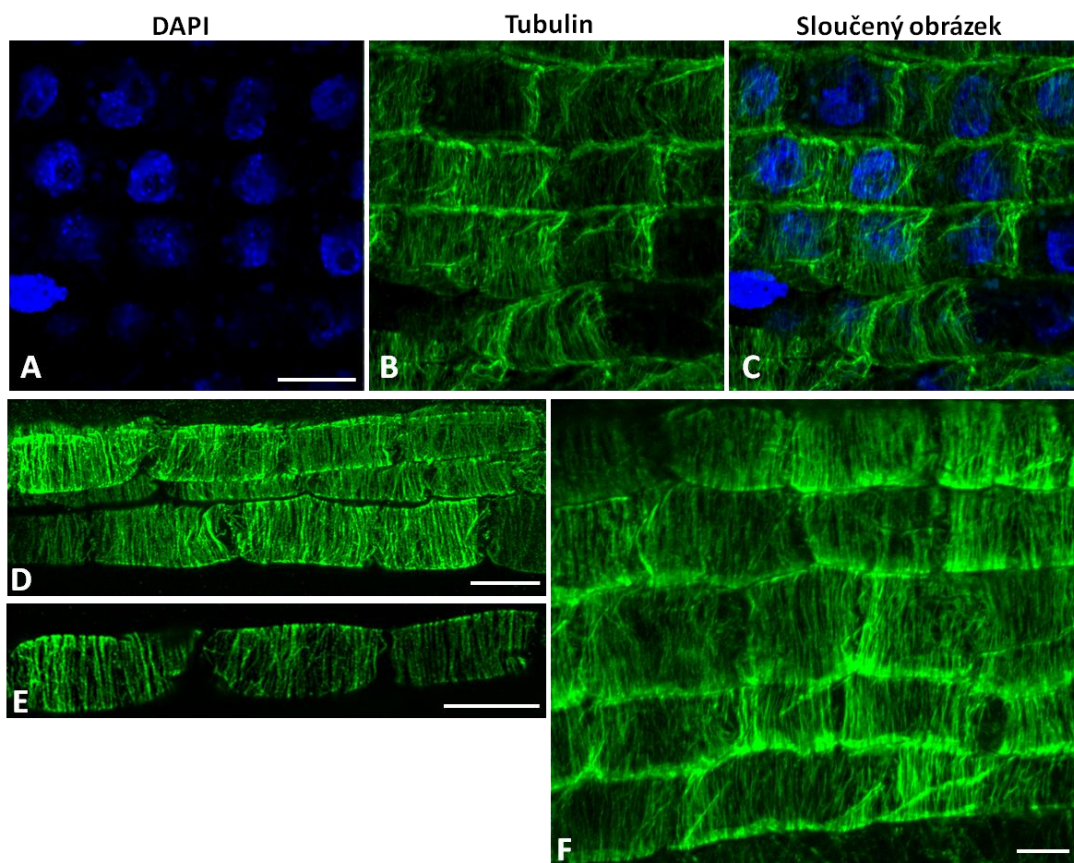
V první části této kapitoly je popsána modifikace a optimalizace imunolokalizační metody „whole-mount“ pro *M. sativa*. Tato imunolokalizační metoda byla použita ke studiu organizace a uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu, subcelulární lokalizace SIMK a pERK v kořenových špičkách *M. sativa* v kontrolních podmínkách a po působení abiotických stresů a inhibitoru MAPKKs. Další část diplomové práce byla zaměřena na imunolokalizaci tubulinu, SIMK a pERK na voskových řezech hlízek *M. sativa* při symbiotické interakci s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Závěr této kapitoly je věnován procesu *in vitro* somatické embryogeneze u *M. sativa*, kterým byla odvozena transgenní linie *SIMKK RNAi*, která byla následně použita pro ověření přítomnosti proteinů SIMK, MMK3 analýzou Western blot.

4.1 Optimalizace imunolokalizační metody „whole-mount“

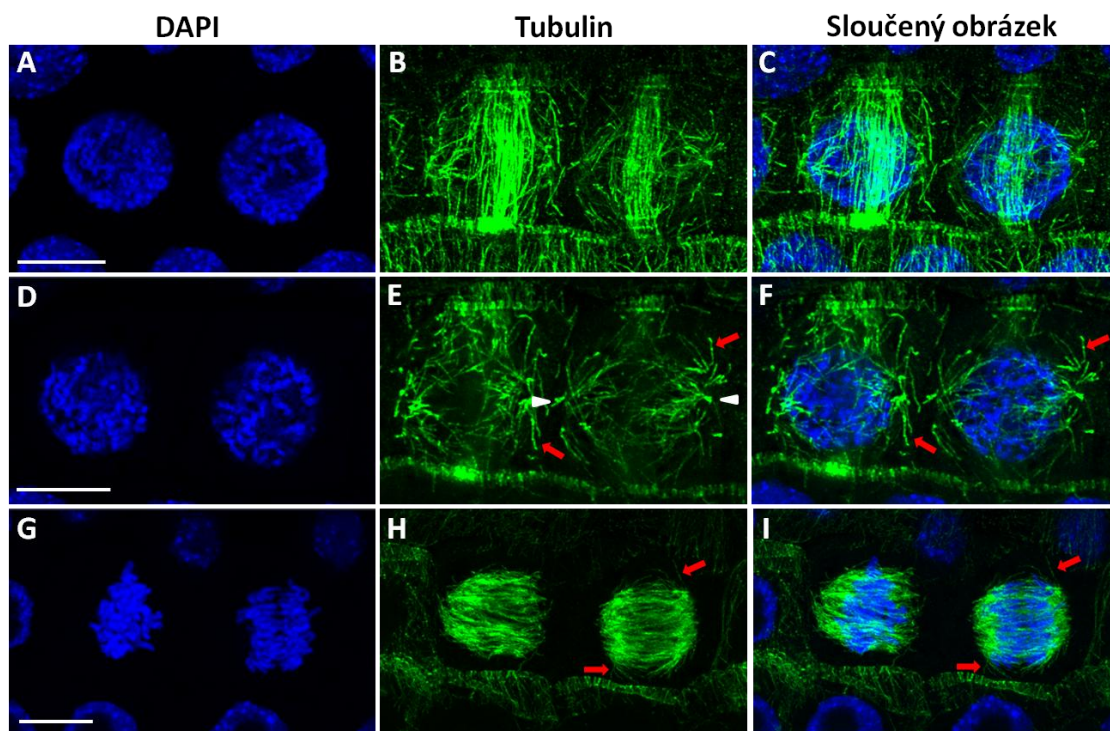
Pro optimalizaci „whole-mount“ metody byly použity kořenové špičky čtyřdenních semenáčků *M. sativa*, kultivar Europe. Bylo vyzkoušeno několik protokolů (Sauer *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2014; Pasternak *et al.*, 2015), několik koncentrací jednotlivých komponentů fixačního roztoku (1,5% PFA a 0,5% GA; 2% PFA a 0,5% GA; 2% PFA a 0,2% GA; 4% PFA a 0,1% GA) a doby aplikace vakua (3x2 min, 3x3 min, 4x3 min). Bylo také změněno několik parametrů imunolokalizačního protokolu. Při odběru rostlinného materiálu byly celé semenáčky přeneseny do fixačního roztoku, ve kterém byly pomocí skalpelu odřezány kořenové špičky, které byly následně přeneseny do čersvého fixačního roztoku a zafixovány. Doba fixace byla prodloužena z 1h při RT na 1h při RT a následně 24-72h při teplotě 4°C. Nakonec se podařilo „whole-mount“ metodu úspěšně modifikovat tak, aby ji bylo možné využívat u *M. sativa* pro lokalizaci proteinů.

Tubulin byl vizualizován pomocí primární protilátky proti tubulinu α a DNA v jádrech byla vizualizována pomocí DAPI. Bylo pozorováno paralelní uspořádání kortikálních mikrotubulů v rizodermálních buňkách kořene a v buňkách boční kořenové čepičky (Obr. 5). Bylo také možné zachytit mitoticky a cytokineticky aktivní buňky a pozorovat tak organizaci mikrotubulů během jednotlivých fází buněčného dělení (Obr. 6, 7, 8). Využitím LSM s Airyscan byly pozorovány mikrotubuly tvořící

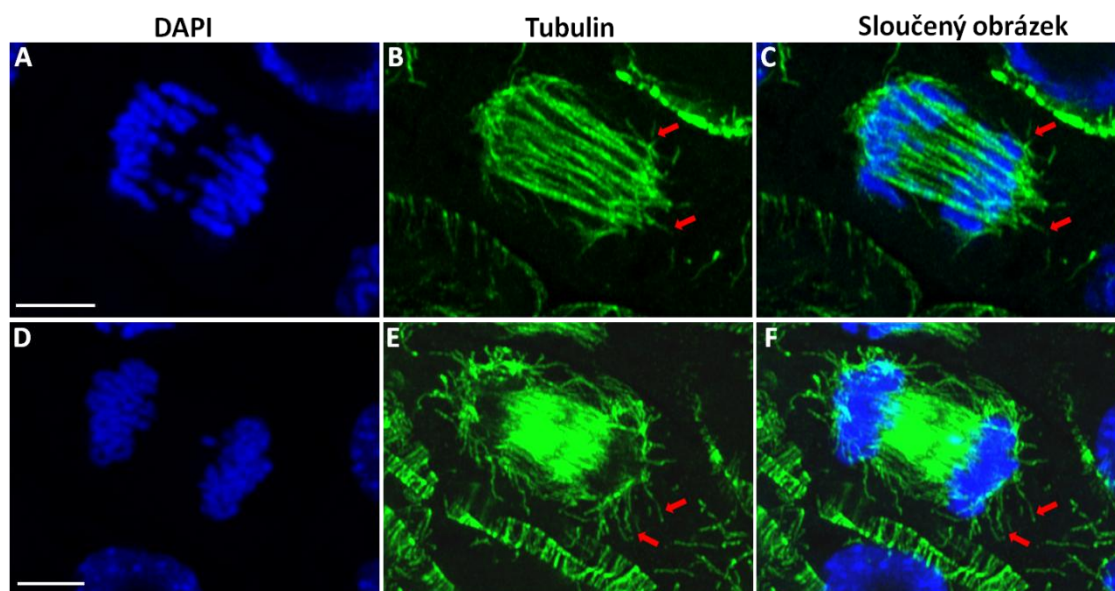
PPB (Obr. 6B), organizace mikrotubulů během profáze (Obr. 6E) a tvořící se mitotické vřeténko (Obr. 6E, hlavičky šipek) a mikrotubuly tvořící strukturu mitotických vřetének (Obr. 6H). Během anafáze byly zaznamenány rozestoupené sesterské chromatidy podél jednotlivých vláken vřeténka (Obr. 7B) a dvě skupiny chromozómů, které dosáhly opačných pólů buňky v telofázi a byly oddělené raným fragmoplastem (Obr. 7F). Pomocí LSM s Airyscan bylo dosaženo většího rozlišení snímaných zafixovaných preparátů a na základě toho bylo možné pozorovat jednotlivé chromozómy a jednotlivá vlákna MT (Obr. 6, 7; červené šipky). Byly pozorovány i mikrotubuly vytvářející raný fragmoplast mezi dceřinými jádry, uvnitř fragmoplastu začíná vznikat buněčná přepážka (Obr. 8B; bílá šipka; Obr. 8E; bílá hlavička šipky). Podářilo se také imunolokalizovat mikrotubuly v kořenových vláscích *M. sativa*. V tomto případě byly pozorovány endoplazmatické mikrotubuly uspořádané do sítí v cytoplazmaticky husté subapikální části kořenových vlásků (Obr. 9A-C).



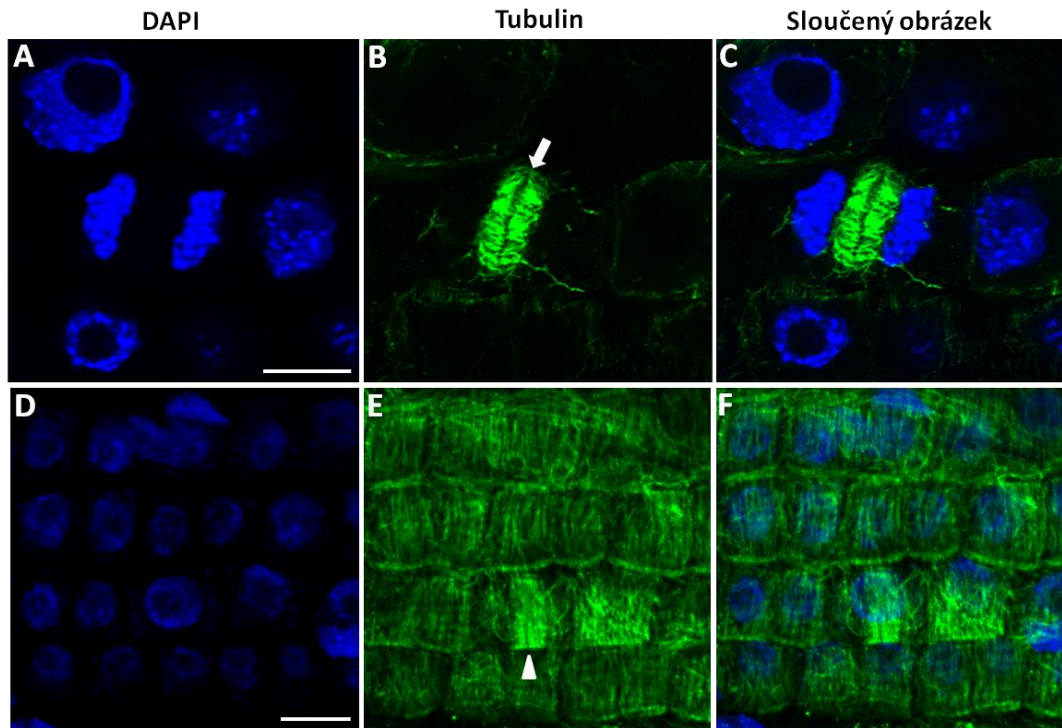
Obr. 5: Imunolokalizace MT. Paralelní uspořádaní kortikálních mikrotubulů v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* (B, F) a v buňkách boční kořenové čepičky (D, E), barvení DNA a jader (A), sloučený obrázek (C). Měřítka odpovídají 10 μ m.



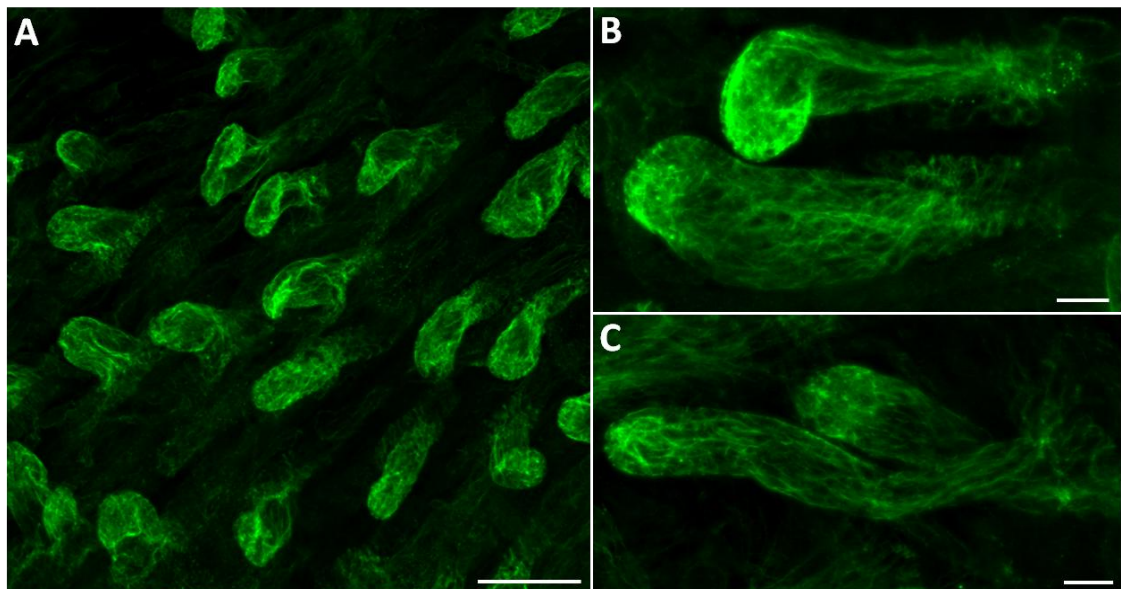
Obr. 6: Imunolokalizace MT v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa*. Barvení DNA a jader (A, D, G), dva PPB (B), profáze a začátek tvorby mitotického vřeténka (E, bílé hlavičky šipek), mitotická vřeténka (H), sloučený obrázek (C, F, I). Jednotlivá vlákna MT jsou označena červenými šipkami. Měřítko odpovídá 10 μm .



Obr. 7: Imunolokalizace MT v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa*. Barvení DNA a jader (A, D), uspořádání MT během anafáze (B) a telofáze (E), sloučený obrázek (C, F). Jednotlivá vlákna MT jsou označena červenými šipkami. Měřítko odpovídá 5 μm .



Obr. 8: Imunolokalizace MT v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa*. Uspořádání mikrotubulů tvořících raný fragmoplast (B, šipka; E, hlavička šipky). Barvení DNA a jader (A, D), sloučený obrázek (C, F). Měřítko odpovídá 10 μm (A-C) a 20 μm (D-F).

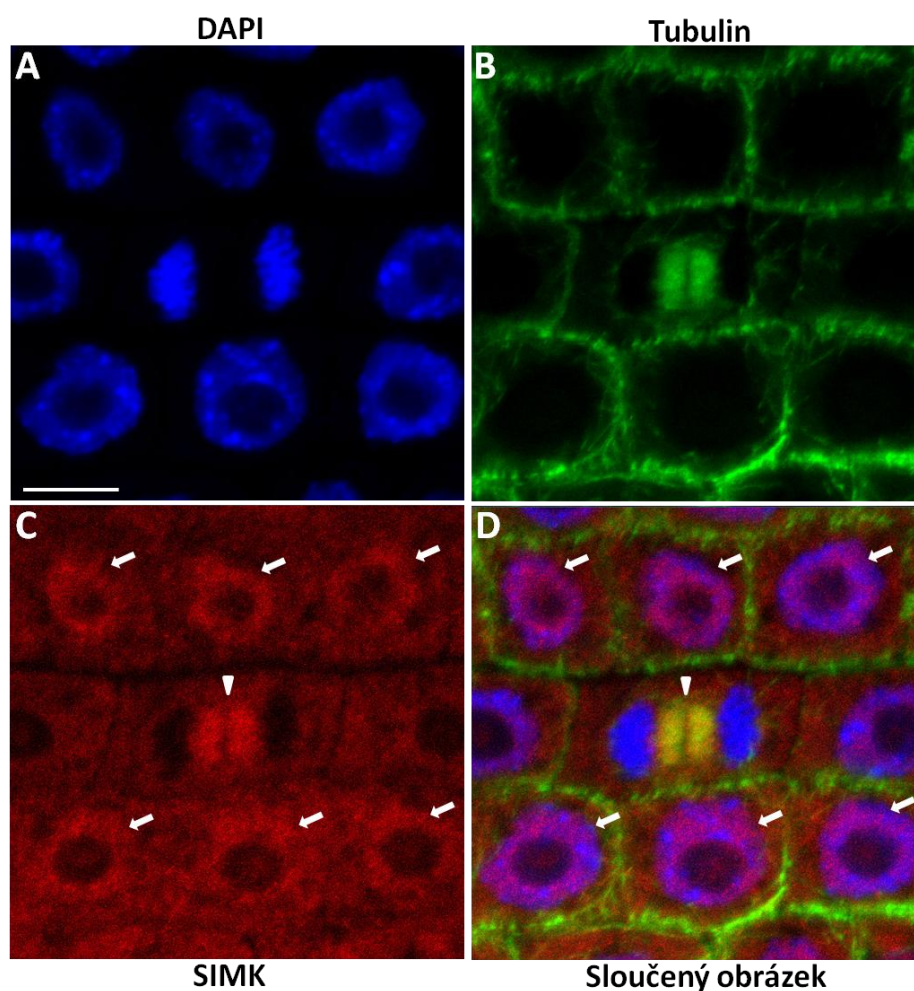


Obr. 9: Imunolokalizace MT v subapikální oblasti kořenových vlásků *M. sativa*. Měřítko odpovídá 10 μm (B, C) a 50 μm (A).

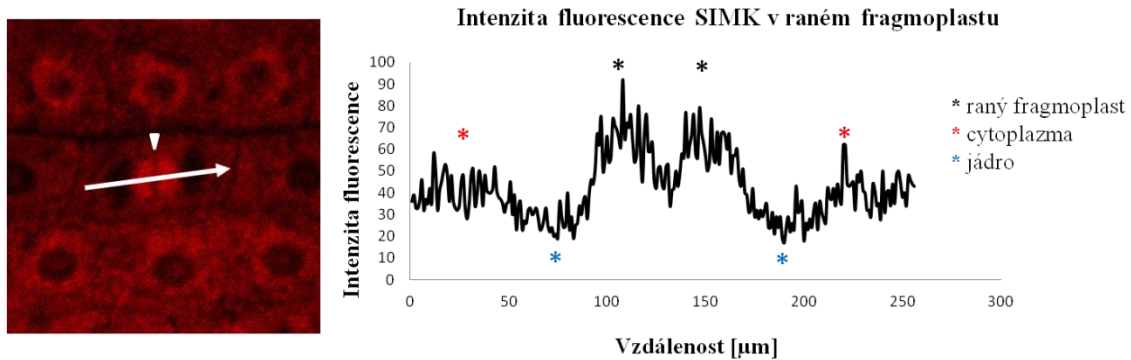
4.2 Subcelulární lokalizace SIMK

Pro zjištění subcelulární lokalizace SIMK byly použity kořenové špičky čtyřdenních semenáčků *M. sativa*, kultivar Europe. Imunolokalizace SIMK byla provedena metodou „whole-mount“ použitím primární protilátky proti MPK6. Tubulin byl vizualizován primární protilátkou proti tubulinu α a DNA použitím DAPI.

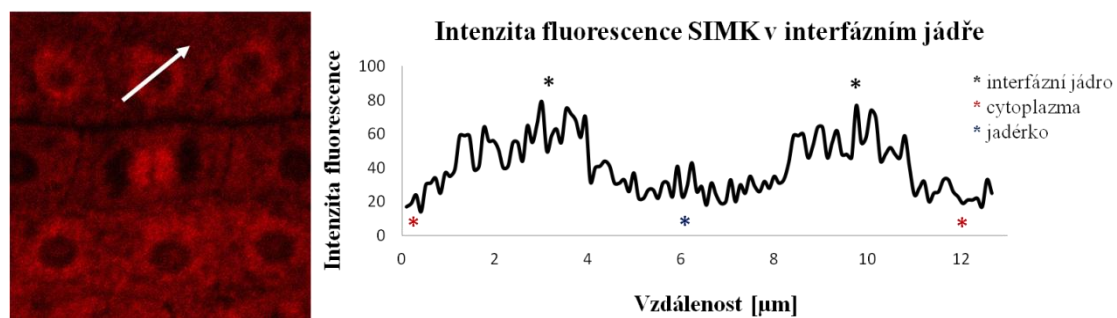
Jelikož je SIMK vysoce konzervovaným homologem MPK6 z *A. thaliana*, byla pozorována typická subcelulární lokalizace, a to zejména v jádrech (Obr. 10C; bílé šipky) a raných fragmoplastech (Obr. 10C; bílá hlavička šipky). Přičemž z měření intenzity fluorescence SIMK bylo zjištěno, že signál v raném fragmoplastu a interfázních jádrech je silnější než v cytoplazmě (Obr. 11, 12). Naopak v mitotickém vřeténku a pozdním fragmoplastu byla intenzita fluorescence SIMK srovnatelná s intenzitou fluorescence naměřenou v cytoplazmě (Obr. 13- 16).



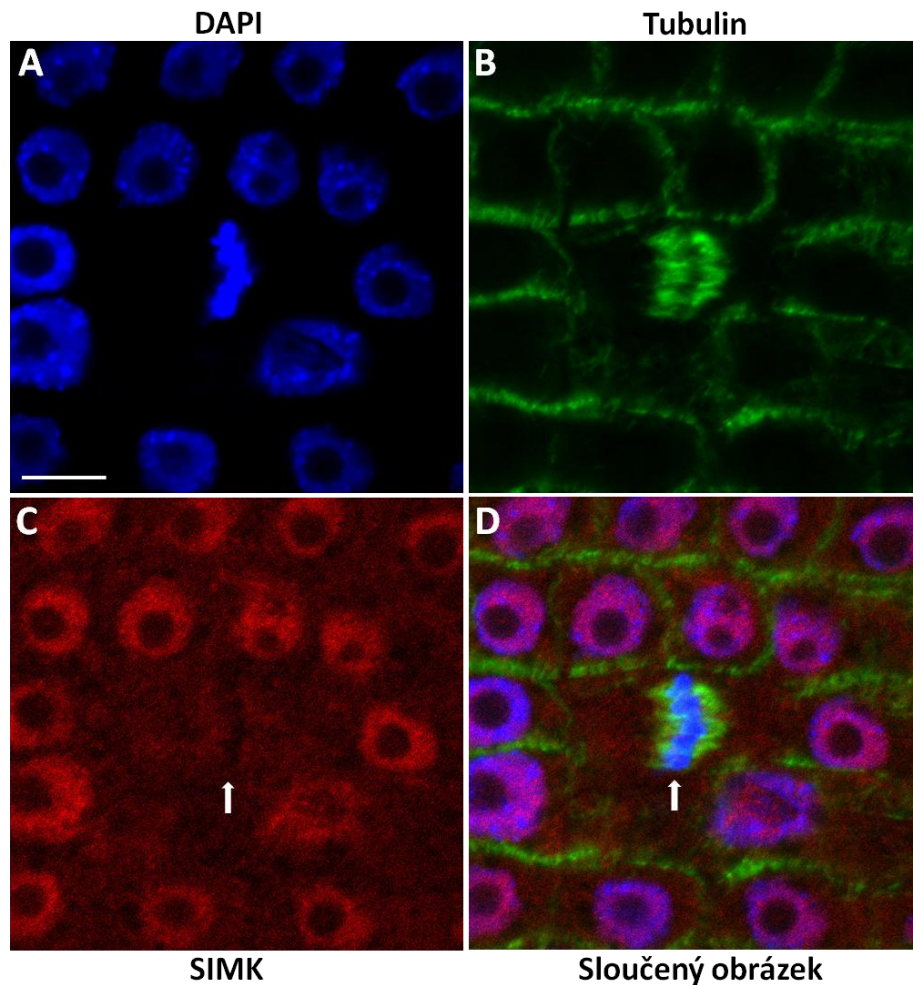
Obr. 10: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa*. Subcelulární lokalizace SIMK v cytoplazmě, raném fragmoplastu a jádrech (C), barvení DNA a jader (A), MT (B), SIMK (C), sloučený obrázek (D). Měřítka odpovídá 10 μm .



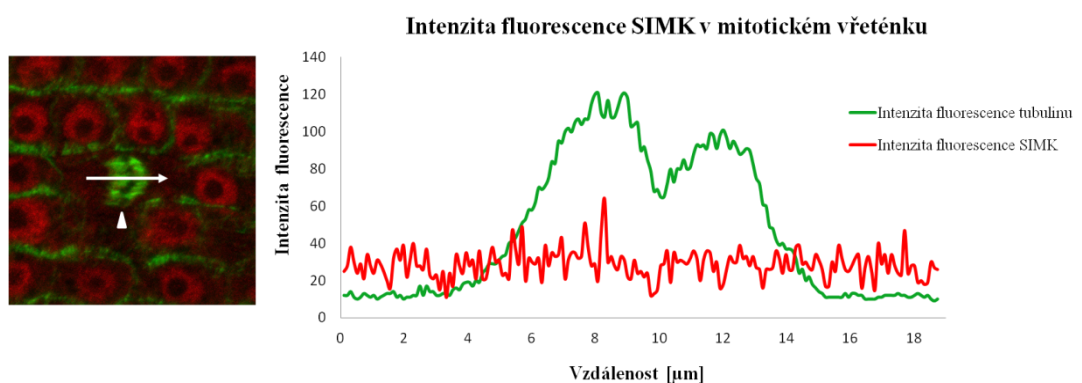
Obr. 11: Intenzita fluorescence SIMK v raném fragmoplastu. Hlavička šipky označuje fragmoplast. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Symboly * a * odpovídají ranému fragmoplastu a cytoplazmě, ve kterých je intenzita fluorescence SIMK oproti jádrům (*) zvýšena.



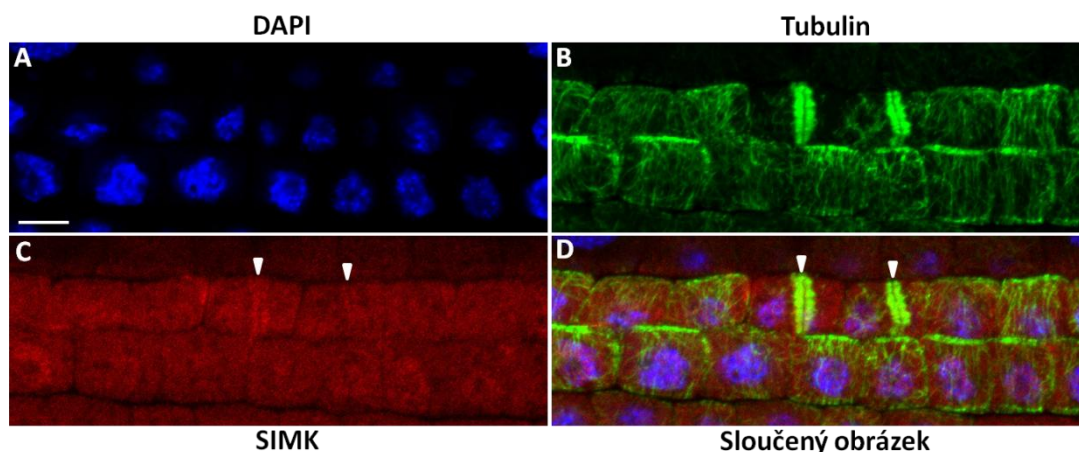
Obr. 12: Intenzita fluorescence SIMK v interfázním jádře. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Symbol * odpovídá interfáznímu jádru, ve kterém je intenzita fluorescence SIMK oproti jádérku (*) a cytoplazmě (*) zvýšena.



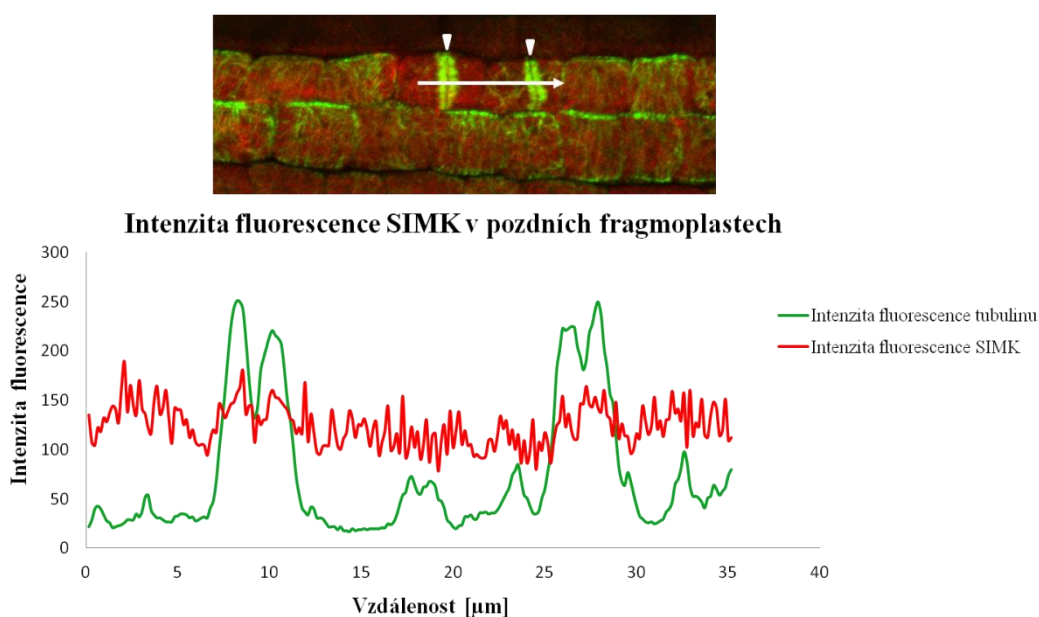
Obr. 13: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa*. Subcelulární lokalizace SIMK v jádrech (C), šipka označuje mitotické vřeténko (C), barvení DNA a jader (A), MT (B), SIMK (C), sloučený obrázek (D). Měřítka odpovídá 10 μm .



Obr. 14: Intenzita fluorescence SIMK v mitotickém vřeténku. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Hlavička šipky označuje oblast mitotického vřeténka. Červená datová řada reprezentuje intenzitu fluorescence SIMK, jejíž hodnota je v mitotickém vřeténku a v cytoplazmě srovnatelná.



Obr. 15: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa*. Hlavičky šipek označují pozdní fragmoplasty (C), barvení DNA a jader (A), MT (B), SIMK (C), sloučený obrázek (D). Měřítko odpovídá 10 μ m.



Obr. 16: Intenzita fluorescence SIMK v pozdních fragmoplastech. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Hlavičky šipek označují pozdní fragmoplasty. Červená datová řada reprezentuje intenzitu fluorescence SIMK, jejíž hodnota je v pozdních fragmoplastech a v cytoplasmě srovnatelná.

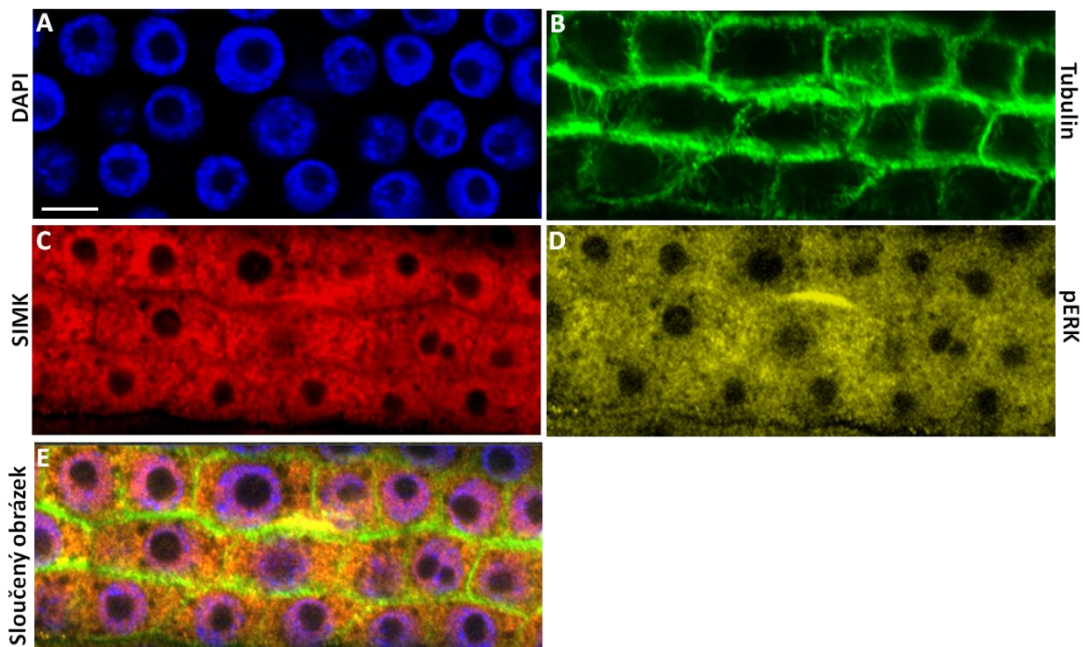
4.3 Vliv působení abiotických stresů a inhibitoru MAPKKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci SIMK a úroveň fosforylace

Pro otestování vlivu působení solného a oxidativního stresu a též inhibitoru MAPKKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci či případnou relokací SIMK a taktéž fosforylaci MAPKs byly použity kořenové špičky čtyřdenních semenáčků *M. sativa*, kultivar Europe. MAPKs byly u rostlin aktivovány solným stresem použitím NaCl (250 mmol.l^{-1}) a oxidativním stresem pomocí H_2O_2 (15 mmol.l^{-1}). Naopak aktivace MAPK byla potlačena inhibitorem MAPKKs PD98059 ($20 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Tubulin byl vizualizován pomocí primární protilátky proti tubulinu α , SIMK použitím primární protilátky proti MPK6, fosforylované MAPKs primární protilátkou proti pERK a DNA byla vizualizována použitím DAPI.

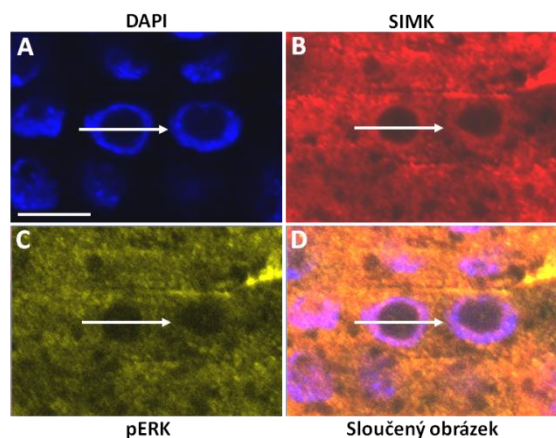
V kontrolních podmínkách byla pozorována typická subcelulární lokalizace SIMK v jádrech a cytoplazmě rizodermálních buněk kořene (Obr. 17). pERK vykazuje identický vzor lokalizace jako SIMK (Obr. 17). Intenzita fluorescence SIMK i pERK v kontrolních podmínkách byla v jádrech ve srovnání s cytoplazmou vyšší (Obr. 18). Nebyly pozorovány změny v cytoskeletu a kortikální mikrotubuly v rizodermálních buňkách kořene vykazovaly paralelní uspořádání (Obr. 19A). Bylo také možné zachytit mitoticky a cytokineticky aktivní buňky a pozorovat tak organizaci mikrotubulů během jednotlivých fází buněčného dělení. Konkrétně bylo pozorováno uspořádání mikrotubulů tvořících mitotické vřeténko (Obr. 20E), rozestoupené chromatidy podél jednotlivých vláken vřeténka během anafáze (Obr. 20J) a rané fragmoplasty oddělující dvě skupiny chromozómů, které dosáhly opačných pólů buňky v telofázi (Obr. 20O, T).

Po 30 minutách působení solného stresu byla SIMK lokalizována v cytoplazmě (Obr. 21C, bílé šipky) a byla pozorována změna tvaru jader (Obr. 21A). SIMK vykazovala také typickou subcelulární lokalizaci v jádře, pozorována byla také její částečná relokace do cytoplazmatických kompartmentů okolo jader (Obr. 22B a F, bílé šipky). Stejný vzor lokalizace vykazovala i pERK a bylo zjištěno, že SIMK a pERK v těchto cytoplazmatických kompartmentech kolokalizují (Obr. 23). Oproti kontrolním podmínkám byla po působení solného stresu intenzita fluorescence SIMK a pERK v jádře srovnatelná s jejich intenzitou fluorescence v cytoplazmě (Obr. 24). Po působení solného stresu byla navíc pozorována lokalizace SIMK také v mitotickém vřeténku (Obr. 25B), ve kterém byla intenzita fluorescence SIMK oproti cytoplazmě zvýšená (Obr. 26). Působení solného stresu ovlivnilo také uspořádání

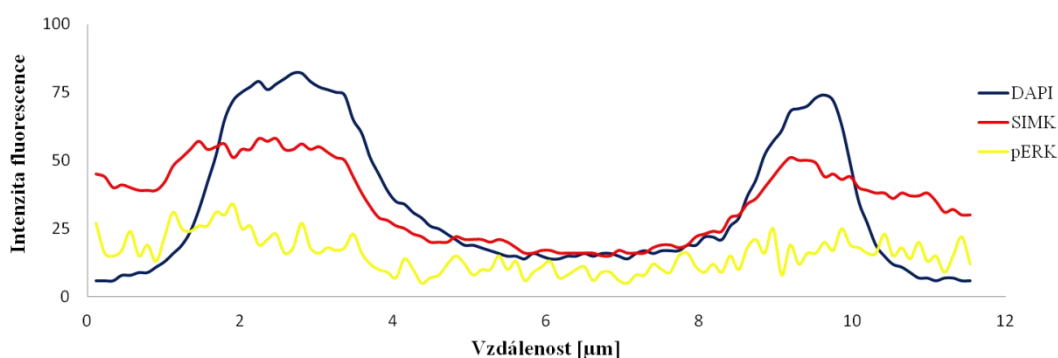
cytoskeletu. V rizodermálních buňkách kořene došlo ke svazkování kortikálních mikrotubulů (Obr. 19B) a byl pozorován výrazně nižší počet mitoticky a cytokineticky aktivních buněk.



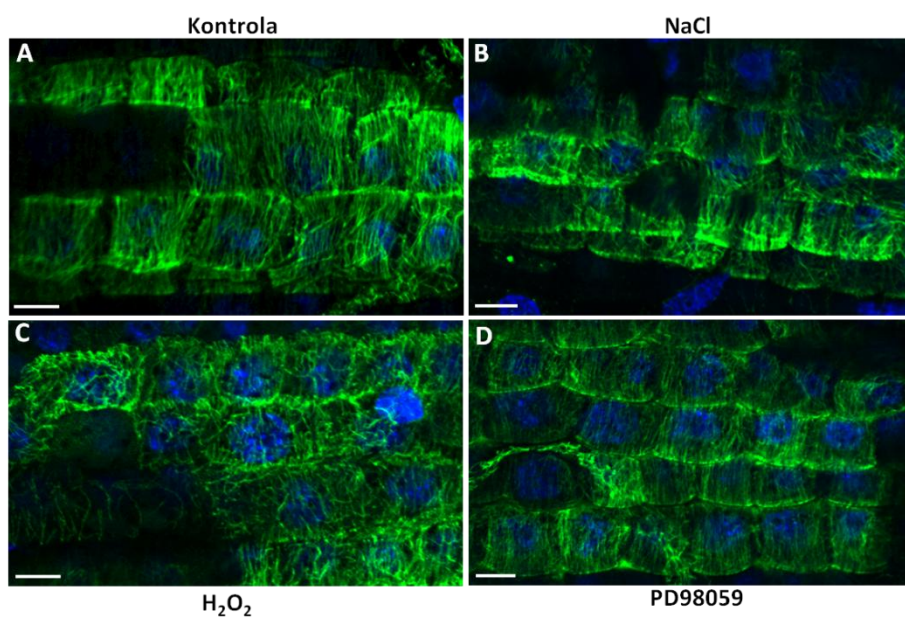
Obr. 17: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* v kontrolních podmínkách. Subcelulární lokalizace SIMK a pERK v jádrech a cytoplasmě (C, D), barvení DNA a jader (A), MT (B), sloučený obrázek (E). Měřítko odpovídá 10 μm .



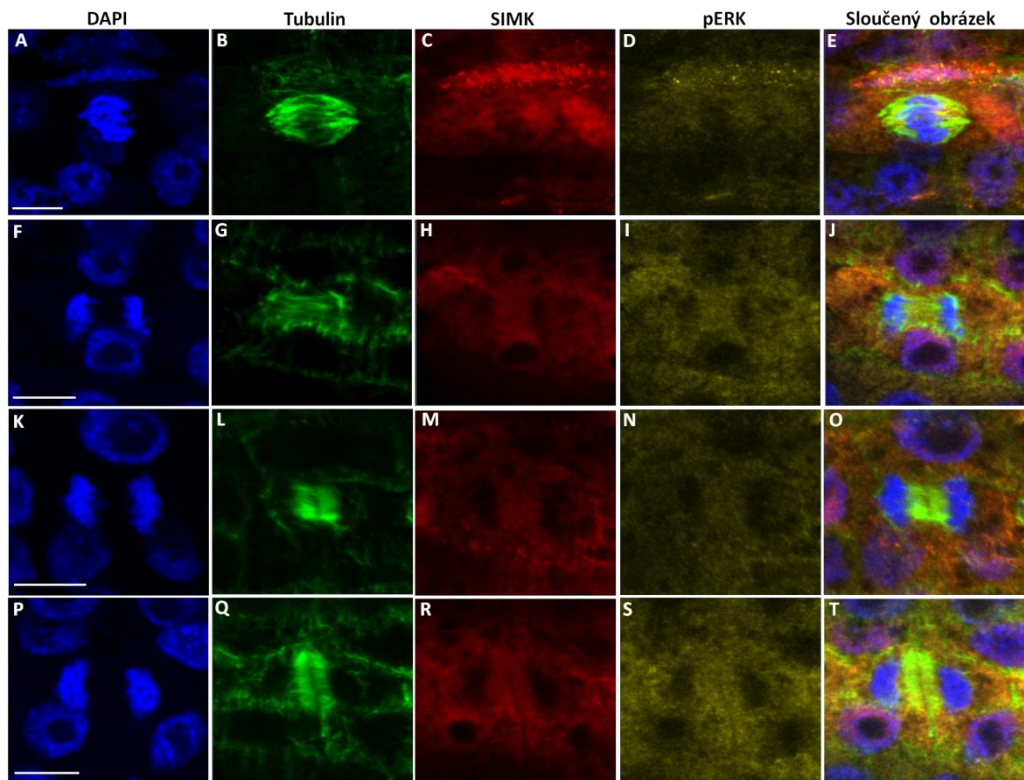
Intenzita fluorescence v kontrolních podmínkách



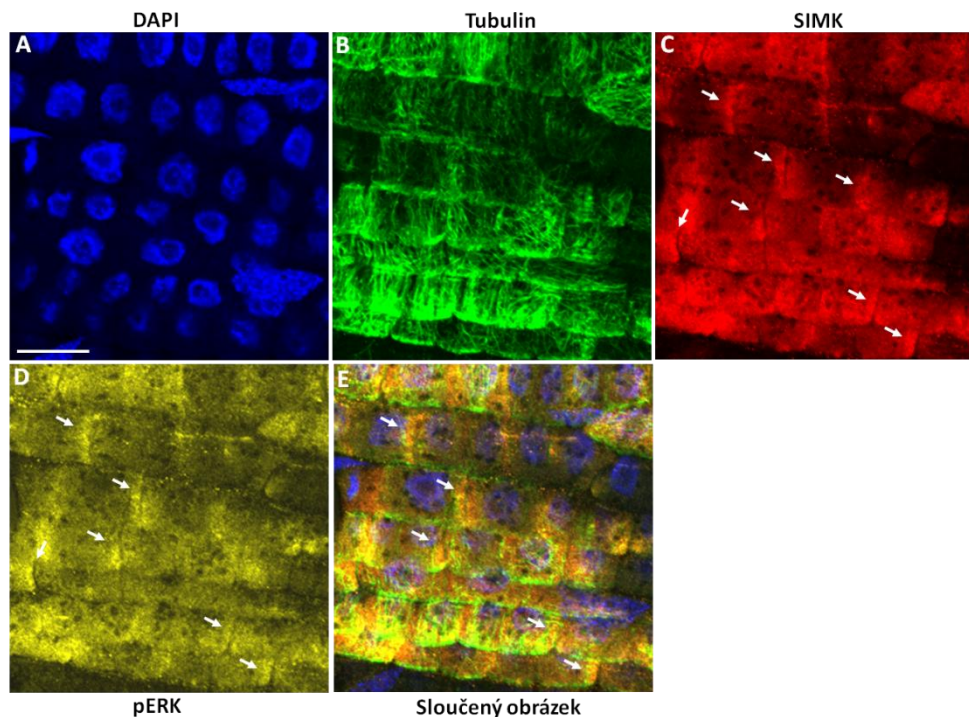
Obr. 18: Intenzita fluorescence DAPI, SIMK a pERK v interfázním jádře v kontrolních podmínkách. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Červená a žlutá datová řada představuje SIMK a pERK, jejichž intenzita fluorescence je v jádře oproti cytoplazmě zvýšená. Barvení DNA a jader (A), SIMK (B), pERK (C), sloučený obrázek (D). Měřítka odpovídá 10 µm.



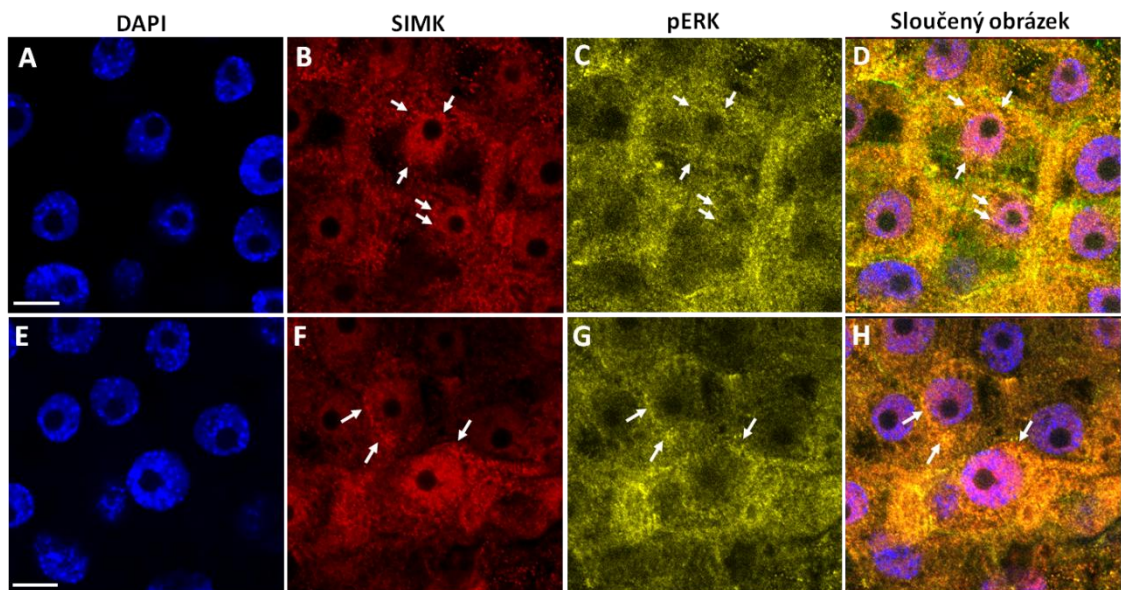
Obr. 19: Uspořádání kortikálních MT v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* po působení abiotických stresů a inhibitoru MAPKKs. Paralelní uspořádání MT v kontrolních podmínkách (A), svazkování kortikálních MT po působení solného stresu (B), nepravidelné uspořádání a částečná depolymerizace kortikálních MT po působení oxidativního stresu (C) a paralelní uspořádání kortikálních MT po působení inhibitoru PD98059 (D). Měřítka odpovídá 10 µm.



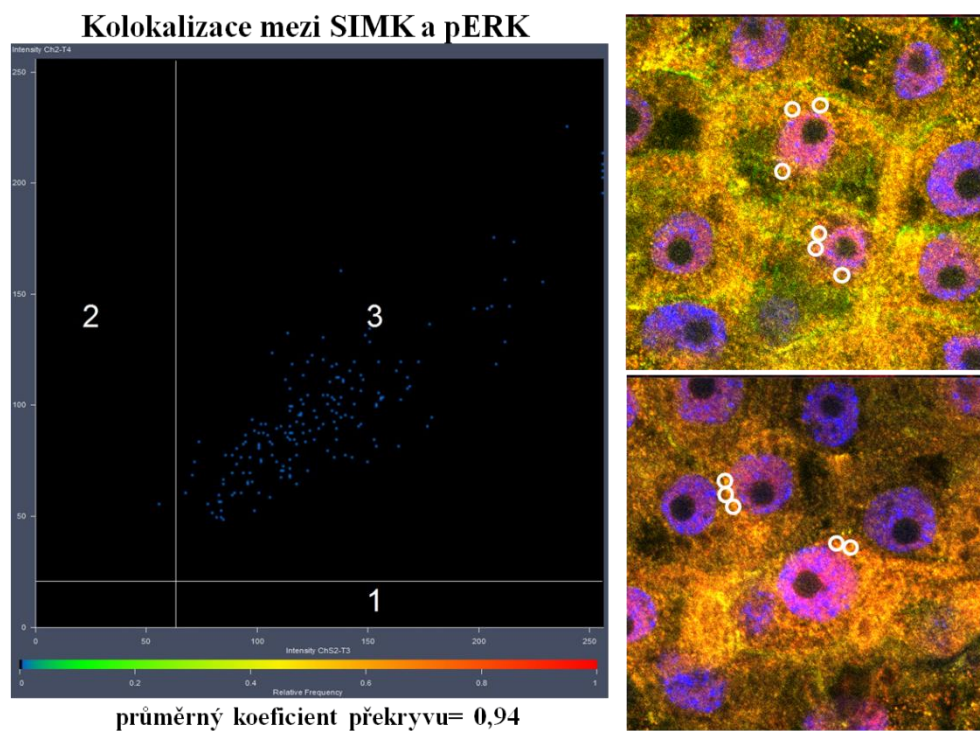
Obr. 20: Mitoticky a cytokineticky aktivní meristematické buňky kořene *M. sativa* v kontrolních podmínkách. MT tvořící mitotické vřeténko (E), rozestoupené chromatidy podél jednotlivých vláken vřeténka během anafáze (J) a rané fragmoplasty oddělující dvě skupiny chromozómů, které dosáhly opačných pólů buňky v telofázi (O, T). Barvení Dna a jader (A, F, K, P), MT (B, G, L, Q), SIMK (C, H, M, R), pERK (D, I, N, S), sloučený obrázek (E, J, O, T). Měřítka odpovídá 10 μ m.



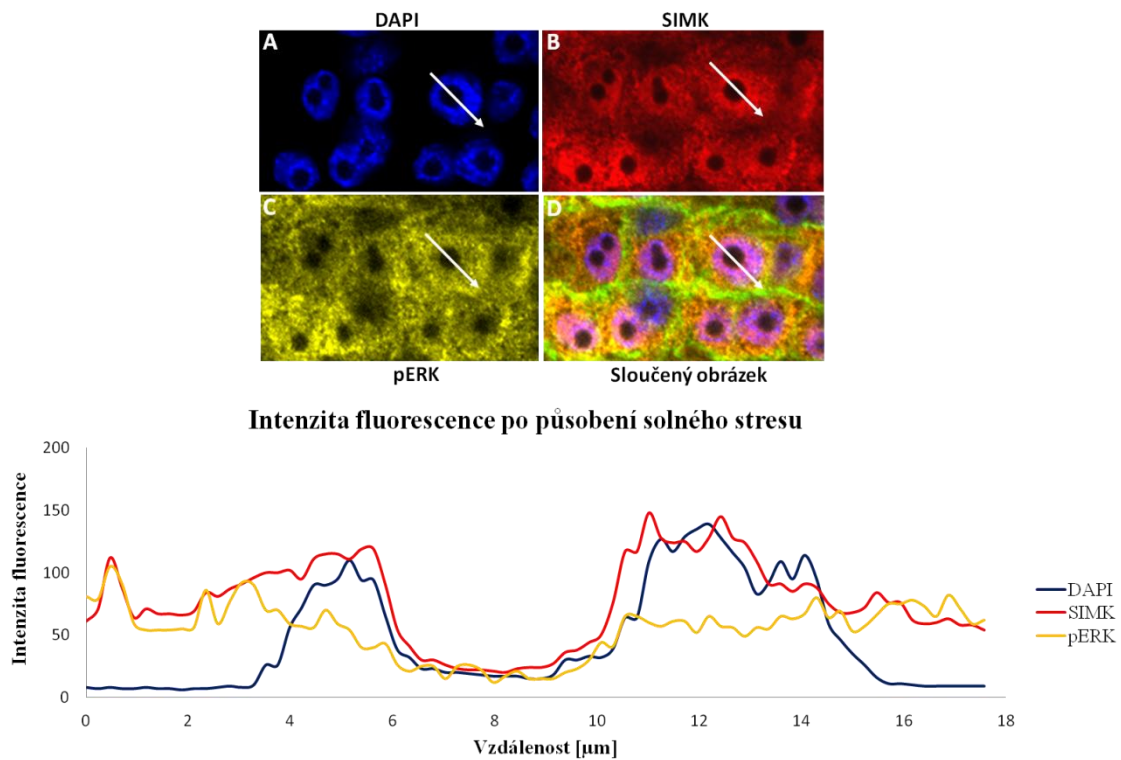
Obr. 21: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* po působení solného stresu. Subcelulární lokalizace SIMK a pERK v cytoplazmě (C a D, bílé šipky), barvení DNA a jader (A), MT (B), sloučený obrázek (E). Měřítka odpovídá 10 μ m.



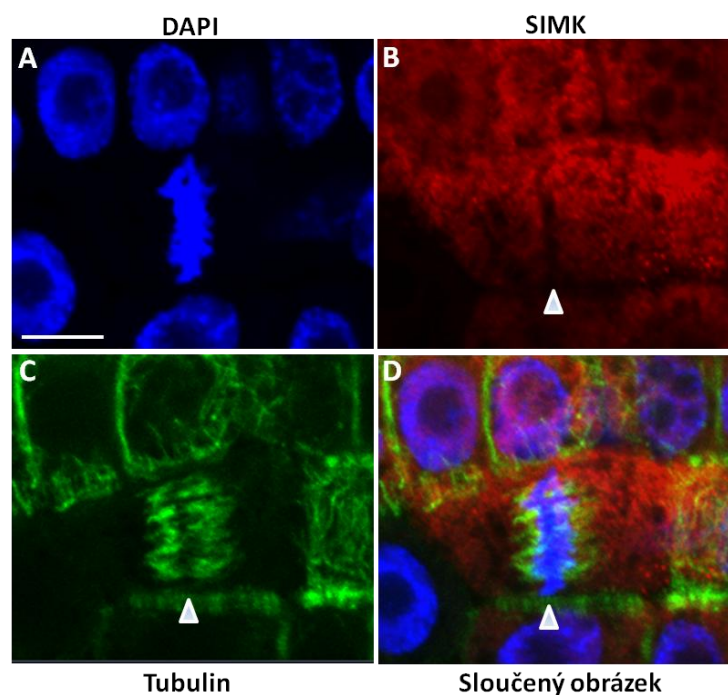
Obr. 22: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* po působení solného stresu. Subcelulární lokalizace SIMK v jádrech a relokalizace SIMK do cytoplazmatických kompartmentů okolo jader (B, F, bílé šipky), barvení DNA a jader (A), pERK (C, G), sloučený obrázek (D, H). Měřítko odpovídá 10 μm .



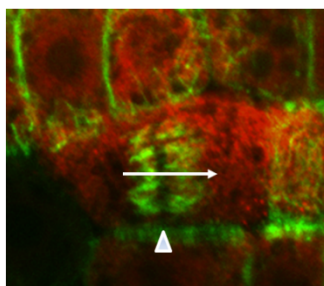
Obr. 23: Bodový diagram ukazuje kolokalizaci SIMK a pERK v cytoplazmatických kompartmentech okolo jader (označeno) v rizodermálních buňkách kořene. Cytoplazmatické kompartmenty (Obr. 22D a H, bílé šipky) charakterizují hodnoty bodového grafu v poli 1, 2 a 3. Pole 1 a 2 představují prahové hodnoty, které označují nepřítomnost kolokalizace dvou kanálů. Kolokalizace se vyskytuje v poli 3, kde jsou modře označeny pixely vyjadřující shodu žlutého a červeného kanálu.



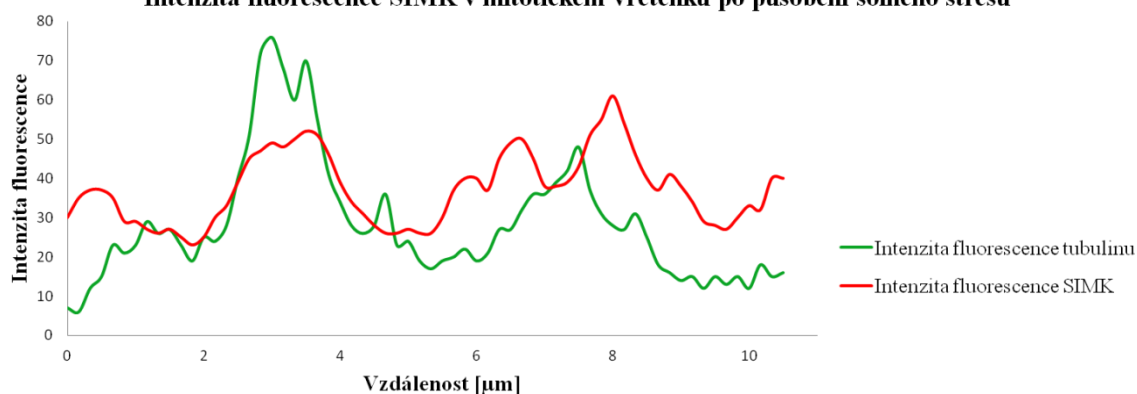
Obr. 24: Intenzita fluorescence DAPI, SIMK a pERK v interfázním jádře po působení solného stresu. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Červená a žlutá datová řada představuje SIMK a pERK, jejichž intenzita fluorescence v jádře je srovnatelná s intenzitou fluorescence v cytoplasmě. Barvení DNA a jader (A), SIMK (B), pERK (C), sloučený obrázek (D). Měřítko odpovídá 10 μm .



Obr. 25: Subcelulární lokalizace SIMK v mitotickém vřeténku v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* po působení solného stresu, hlavička šipky označuje mitotické vřeténko (B-D). Barvení DNA a jader (A), SIMK (B), MT (C), sloučený obrázek (D). Měřítko odpovídá 10 μm .



Intenzita fluorescence SIMK v mitotickém vřeténku po působení solného stresu

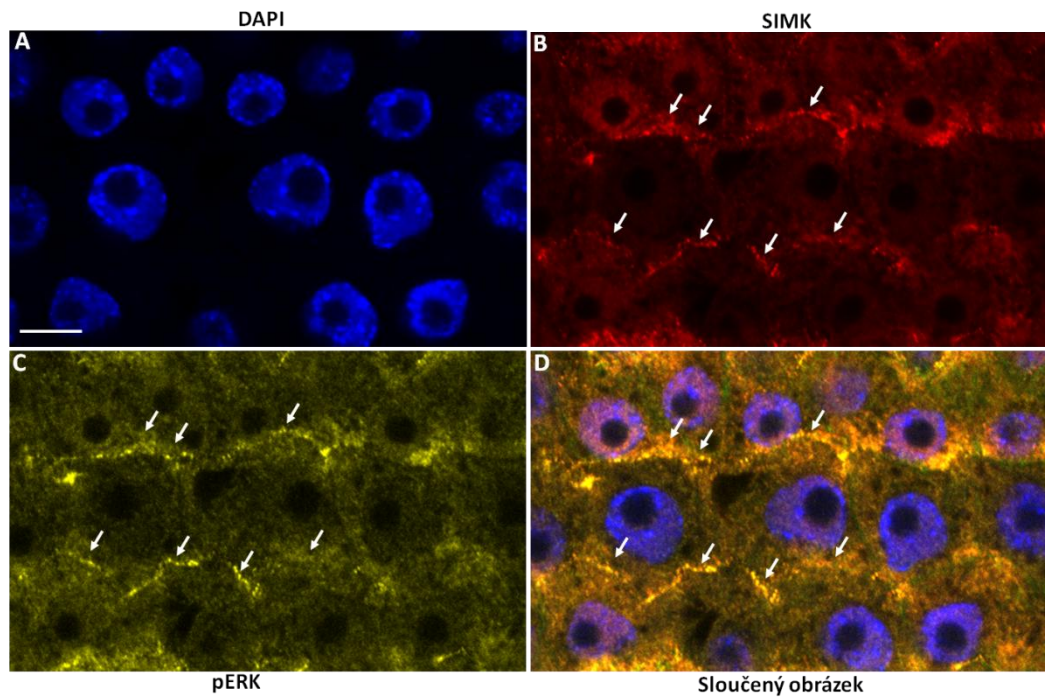


Obr. 26: Intenzita fluorescence SIMK v mitotickém vřeténku po působení solného stresu. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Hlavička šipky označuje oblast mitotického vřeténka. Červená datová řada reprezentuje intenzitu fluorescence SIMK, jejíž hodnota je v mitotickém vřeténku ve srovnání s cytoplazmou zvýšená.

Po 30 minutách působení oxidativního stresu vykazovala SIMK typickou lokalizaci v jádrech, byla však pozorována přítomnost kompartmentů bodové struktury především na buněčných membránách (Obr. 27B, bílé šipky). I v těchto kompartmentech byla zjištěna kolokalizace mezi SIMK a pERK (Obr. 28). Stejně jako v kontrolních podmínkách vykazovala pERK i po působení oxidativního stresu identickou lokalizaci jako SIMK, přičemž intenzita fluorescence SIMK byla v jádře ve srovnání s cytoplazmou vyšší (Obr. 29). Naopak intenzita fluorescence pERK byla v jádře a v cytoplazmě srovnatelná (Obr. 29). Oxidativní stres ovlivnil i organizaci kortikálních mikrotubulů v rizodermálních buňkách kořene, které oproti kontrolním podmínkám byly nepravidelně uspořádané a částečně depolymerizované (Obr. 19C). Byly také pozorovány cytokineticky aktivní buňky, ve kterých byly fragmoplasty orientovány šikmo na osu růstu kořene (Obr. 30, bílé šipky).

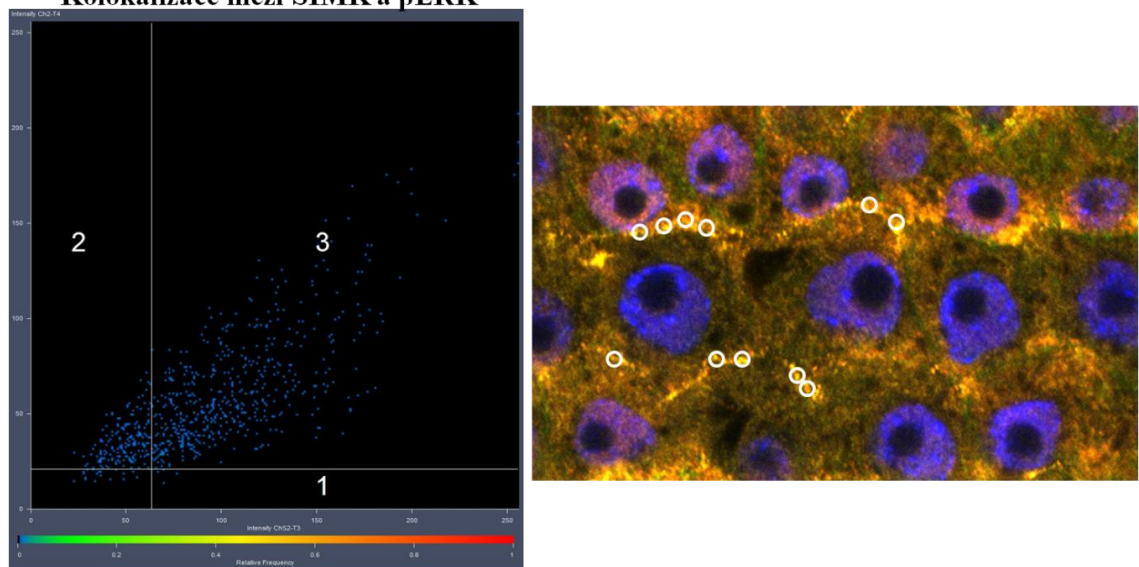
Sledoval se také vliv působení MAPKs inhibitoru PD98059 po dobu 2 h. Tento selektivní inhibitor brání aktivaci MEK1 a MAPK kaskády. SIMK jeho vlivem vykazovala typickou lokalizaci v jádře a v cytoplazmě bylo viditelné velké množství kompartmentů bodové struktury (Obr. 31B). Intenzita fluorescence SIMK a pERK byla v jádře oproti cytoplazmě zvýšená (Obr. 31). Po působení inhibitoru nebyly pozorovány změny v cytoskeletu a kortikální mikrotubuly byly v rizodermálních buňkách kořene uspořádány paralelně (Obr. 19D). Bylo také možné zachytit mitoticky a cytokineticky aktivní buňky a pozorovat tak organizaci mikrotubulů během jednotlivých fází buněčného dělení. Bylo pozorováno uspořádání mikrotubulů tvořících PPB (Obr. 32B), mitotické vřetenko (Obr. 32B) a pozdní fragmoplasty (Obr. 32G).

Úroveň fosforylace byla vyhodnocena naměřením intenzity fluorescence pERK v rizodermálních buňkách kořene. MAPKs byly aktivovány ošetřením rostlin solným a oxidativním stresem, a proto byla u rostlin po působení těchto stresů pozorována oproti kontrole zvýšená intenzita fluorescence pERK (Obr. 33). Působení inhibitoru PD98059 výrazně neovlivnilo intenzitu fluorescence, která byla srovnatelná s intenzitou fluorescence pERK naměřenou u kontroly (Obr. 33).



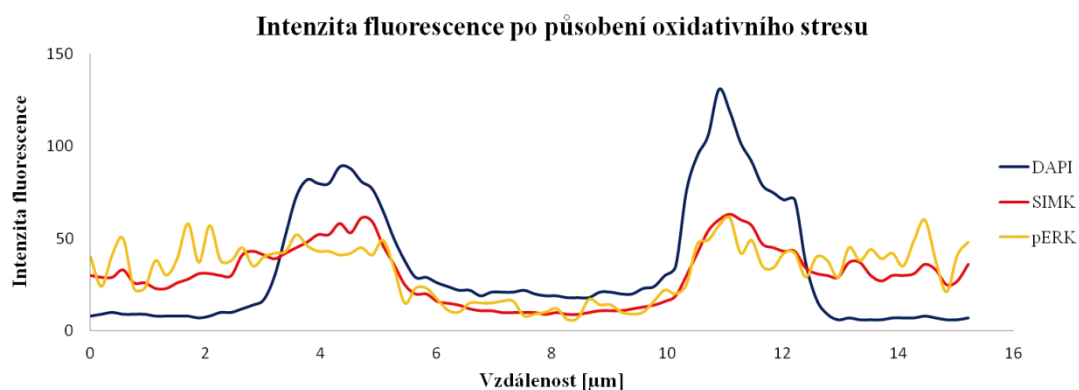
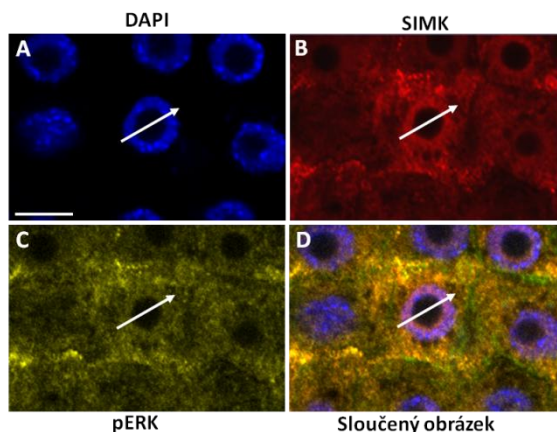
Obr. 27: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK po působení oxidativního stresu. Kompartenty bodové struktury v buněčných membránách (B a C, bílé šipky), barvení DNA a jader (A), SIMK (B), pERK (C), sloučený obrázek (D). Měřítko odpovídá 10 μ m.

Kolokalizace mezi SIMK a pERK

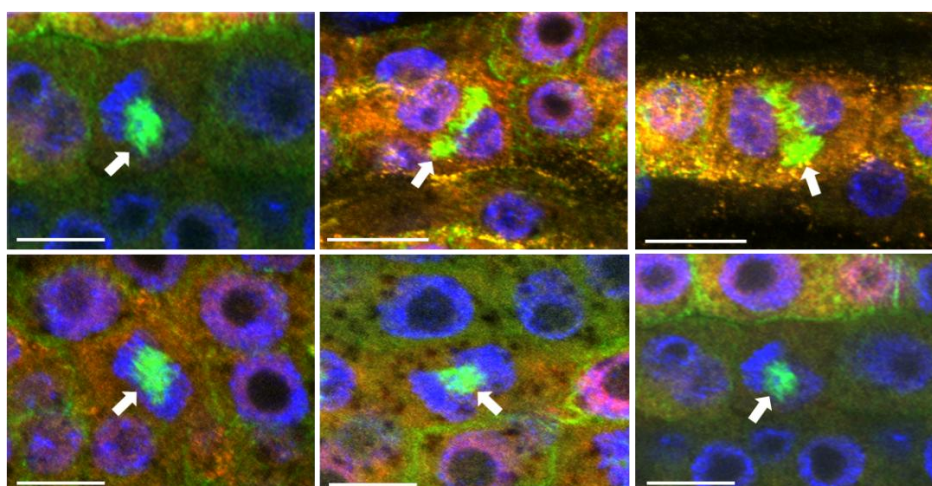


průměrný koeficient překryvu= 0,9

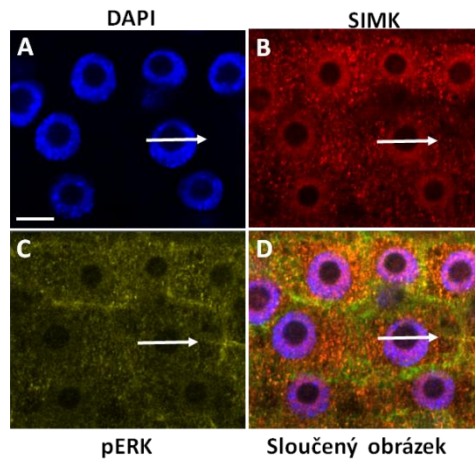
Obr. 28: Bodový diagram ukazuje kolokalizaci SIMK a pERK v cytoplazmatických kompartmentech bodové struktury v rizodermálních buňkách kořene (označeno). Kompartenty bodové struktury (Obr. 27D, bílé šipky) charakterizují hodnoty bodového grafu v poli 1, 2 a 3. Pole 1 a 2 představují prahové hodnoty, které označují nepřítomnost kolokalizace dvou kanálů. Kolokalizace se vyskytuje v poli 3, kde jsou modře označeny pixely vyjadřující shodu žlutého a červeného kanálu.



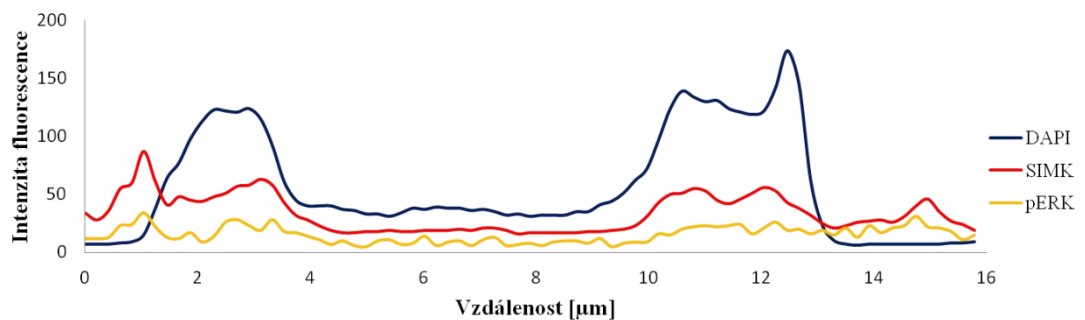
Obr. 29: Intenzita fluorescence DAPI, SIMK a pERK v interfázním jádře po působení oxidativního stresu. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Červená datová řada představuje SIMK, jejíž intenzita fluorescence v jádře je vyšší než intenzita fluorescence v cytoplazmě. Žlutá datová řada představuje pERK, jejíž intenzita fluorescence je v jádře a v cytoplazmě srovnatelná. Barvení DNA a jader (A), SIMK (B), pERK (C), sloučený obrázek (D). Měřítko odpovídá 10 µm.



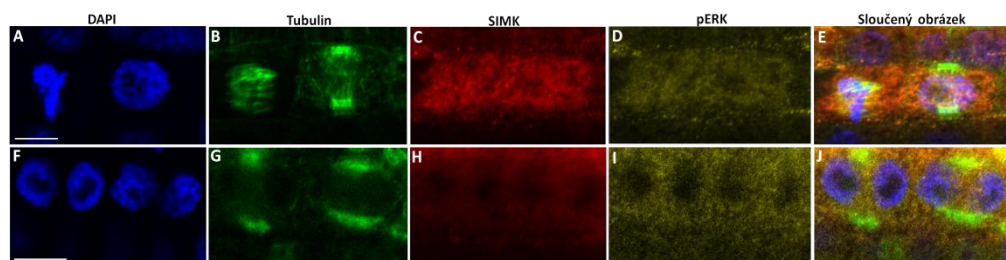
Obr. 30: Cytokineticky aktivní buňky kořenového meristému *M. sativa*, ve kterých jsou fragmoplasty po působení oxidativního stresu orientovány šikmo na osu růstu kořene (bílé šipky). Měřítko odpovídá 10 µm.



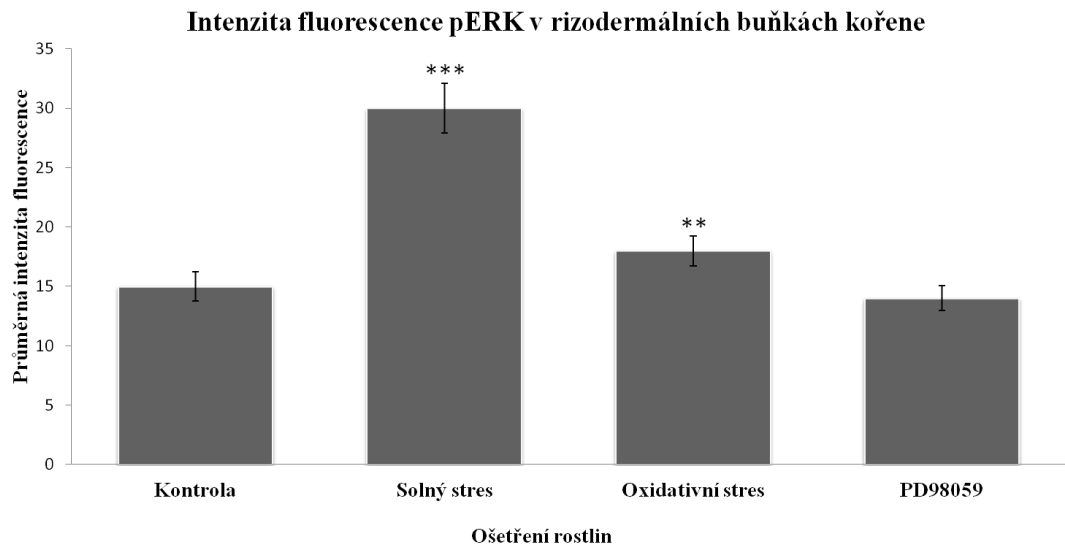
Intenzita fluorescence po působení inhibitoru PD98059



Obr. 31: Intenzita fluorescence DAPI, SIMK a pERK v interfázním jádře po působení inhibitoru PD98059. Bílá šipka označuje oblast, ve které byla intenzita fluorescence měřena. Červená a žlutá datová řada představuje SIMK a pERK, jejichž intenzita fluorescence v jádře je vyšší než intenzita fluorescence v cytoplasmě. Barvení DNA a jader (A), SIMK (B), pERK (C), sloučený obrázek (D). Měřítko odpovídá 10 µm.



Obr. 32: Mitoticky a cytokineticky aktivní buňky v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* po působení inhibitoru PD98059. MT tvořící PPB (B), mitotické vřeténko (B) a fragmoplasty (G). Barvení DNA a jader (A, F), MT (B, G), SIMK (C, H), pERK (D, I) a sloučený obrázek (E, J). Měřítko odpovídá 10 µm.

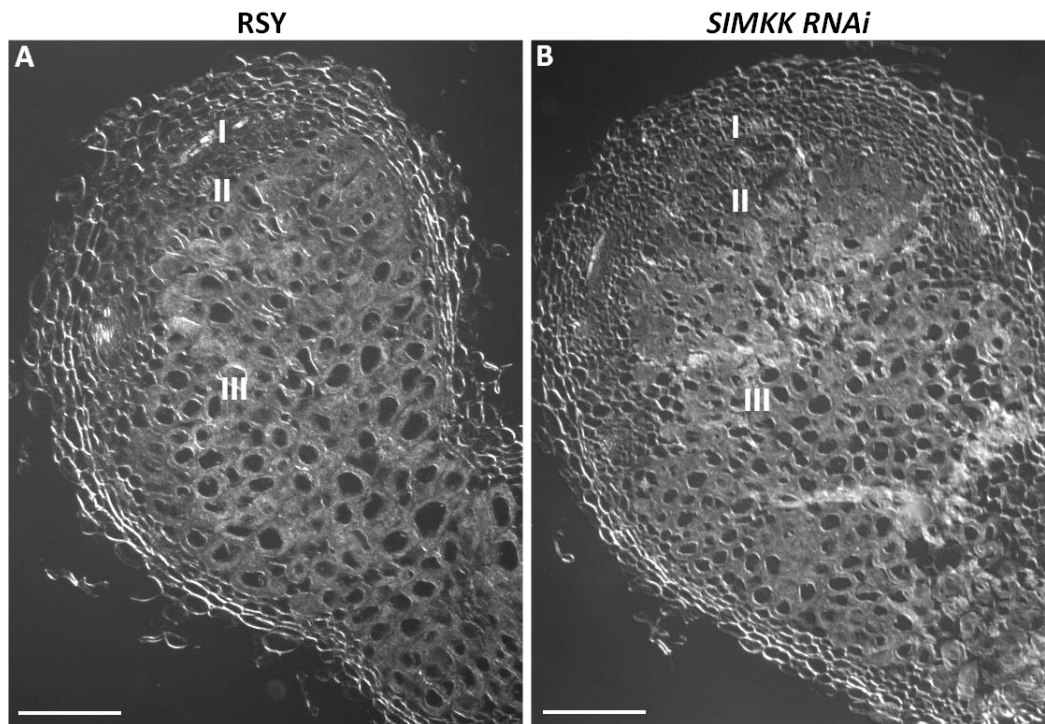


Obr. 33: Naměřená intenzita fluorescence pERK v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* v kontrolních podmínkách, po působení solného a oxidativního stresu a inhibitoru PD98059. Hvězdičky označují rozdíly v průkaznosti vyhodnocené Studentovým *t*-testem (solný stres $p < 0,001$; oxidativní stres $p < 0,01$).

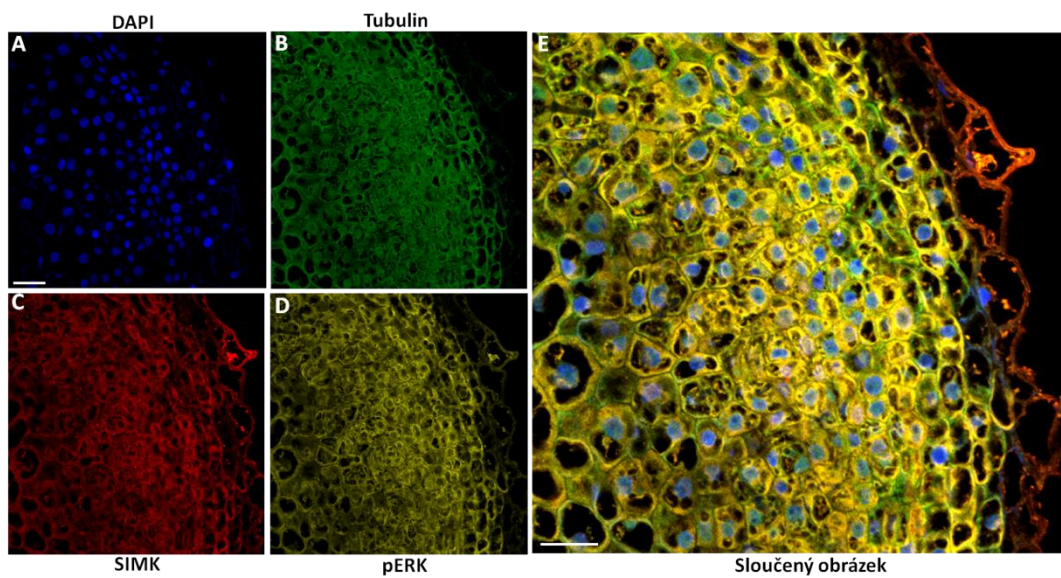
4.4 Imunohistochemická kolokalizace cytoskeletu a MAPKs u vojtešky v interakci s *Rhizobium*

Pro sledování imunohistochemické kolokalizace tubulinu a SIMK byly použity voskové řezy hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivar RSY odebrané po 28 dnech od inokulace tekutou rhizobiální kulturou *S. meliloti*. Tubulin byl vizualizován pomocí primární protilátky proti tubulinu α , SIMK použitím primární protilátky proti MPK6, fosforylované MAPKs primární protilátkou proti pERK a DNA byla vizualizována použitím DAPI.

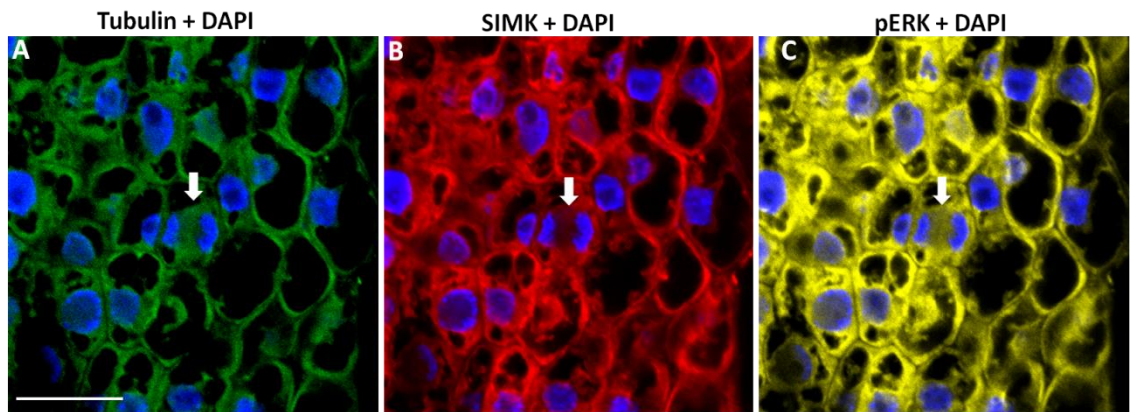
U hlízek divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY byla pozorována meristematická zóna (I) v apikální oblasti hlízky, infekční zóna (II) a zóna fixace dusíku (III), (Obr. 34A). V meristematické zóně hlízky byly pozorovány malé a aktivně se dělicí buňky, které zajišťují kontinuální růst a prodloužený tvar hlízky (Obr. 35). V hlízkovém meristému byl v cytokineticky aktivní buňce viditelný fragmoplast a lokalizace SIMK v jádře (Obr. 36). pERK vykazovala stejný lokalizační vzor jako SIMK (Obr. 35C-D, 36 B-C). Intenzita fluorescence pERK v meristematických buňkách divého typu byla ve srovnání s intenzitou fluorescence pERK transgenní linie vyšší (Obr. 35D a 40D). V submeristematických buňkách infekční zóny bylo možné pozorovat organizaci mikrotubulů a lokalizaci SIMK. SIMK byla v těchto buňkách infekční zóny hlízek lokalizována v cytoplazmě (Obr. 37B). Mikrotubuly byly uspořádány spíše paralelně a v dlouhých svazcích (Obr. 37C, bílé šipky). V zóně fixace dusíku byly mikrotubuly orientovány nepravidelně u obvodu symbiotických buněk (Obr. 38-39C). SIMK vykazovala stejný vzor lokalizace v jádře a cytoplazmě jako v meristematické a infekční zóně (Obr. 38-39B).



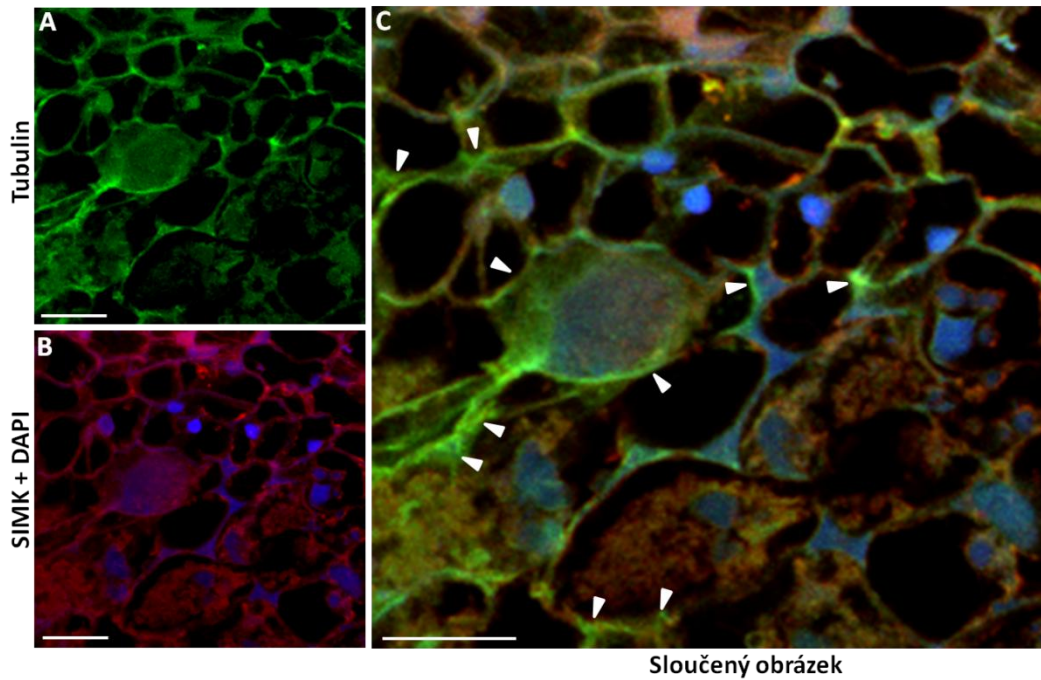
Obr. 34: Hlízky divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY (A) a transgenní linie *SIMKK RNAi* (B) s rozdělením na jednotlivé zóny. I- meristematická zóna, II- infekční zóna, III- zóna fixace dusíku. Měřítko odpovídá 200 μ m.



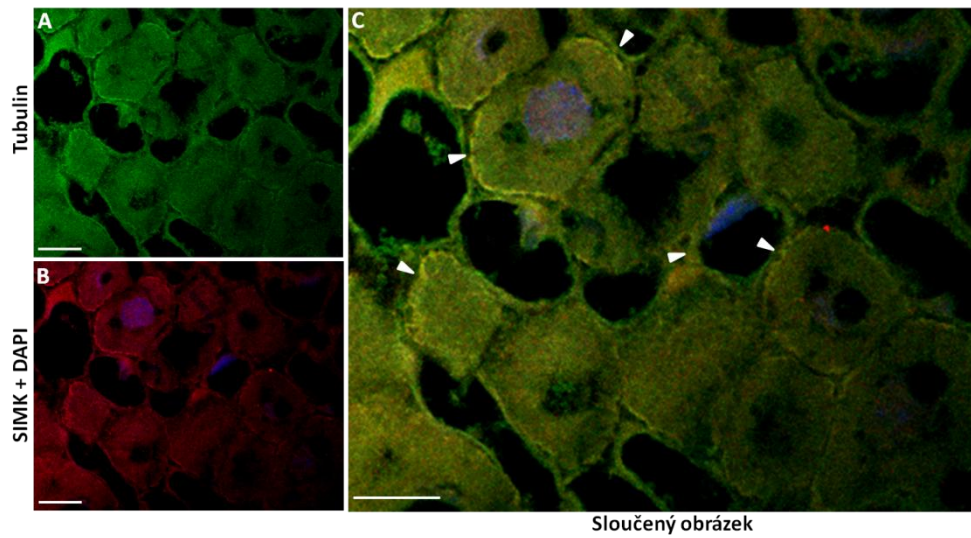
Obr. 35: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK v hlízkách divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY. Barvení DNA a jader (A), MT (B), SIMK (C) a pERK (D) a sloučený obrázek (E). Měřítko odpovídá 20 μ m.



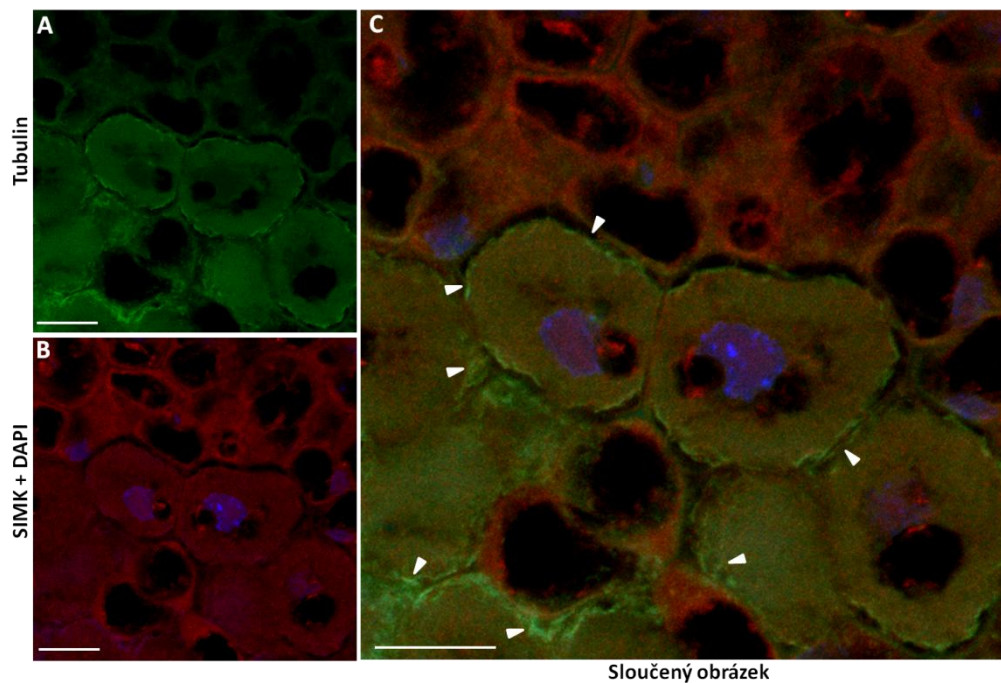
Obr. 36: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK v hlízkách divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY. Fragmoplast v meristematické zóně hlízky (bílá šipka). Tubulin + DAPI (A), SIMK + DAPI (B), pERK + DAPI (C). Měřítko odpovídá 20 μ m.



Obr. 37: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v submeristematických buňkách infekční zóny hlízky divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY. MT (A; C, bílé hlavičky šipky), SIMK + DAPI (B), sloučený obrázek (C). Měřítko odpovídá 20 μ m.

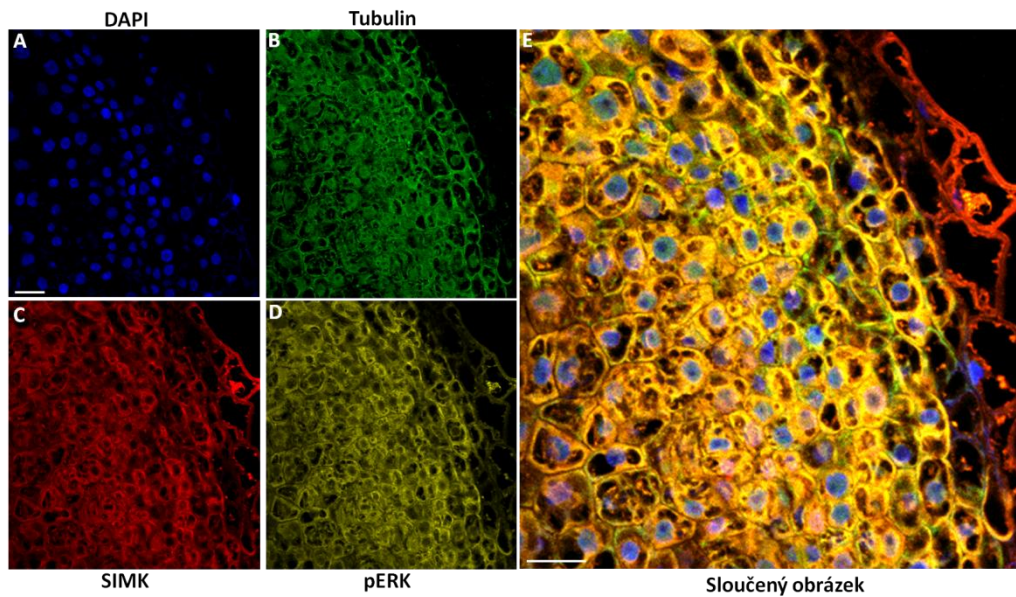


Obr. 38: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v symbiotických buňkách zóny fixace dusíku u hlízek divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY. MT (A; C, bílé hlavičky šipky), SIMK + DAPI (B), sloučený obrázek (C). Měřítko odpovídá 20 μ m.

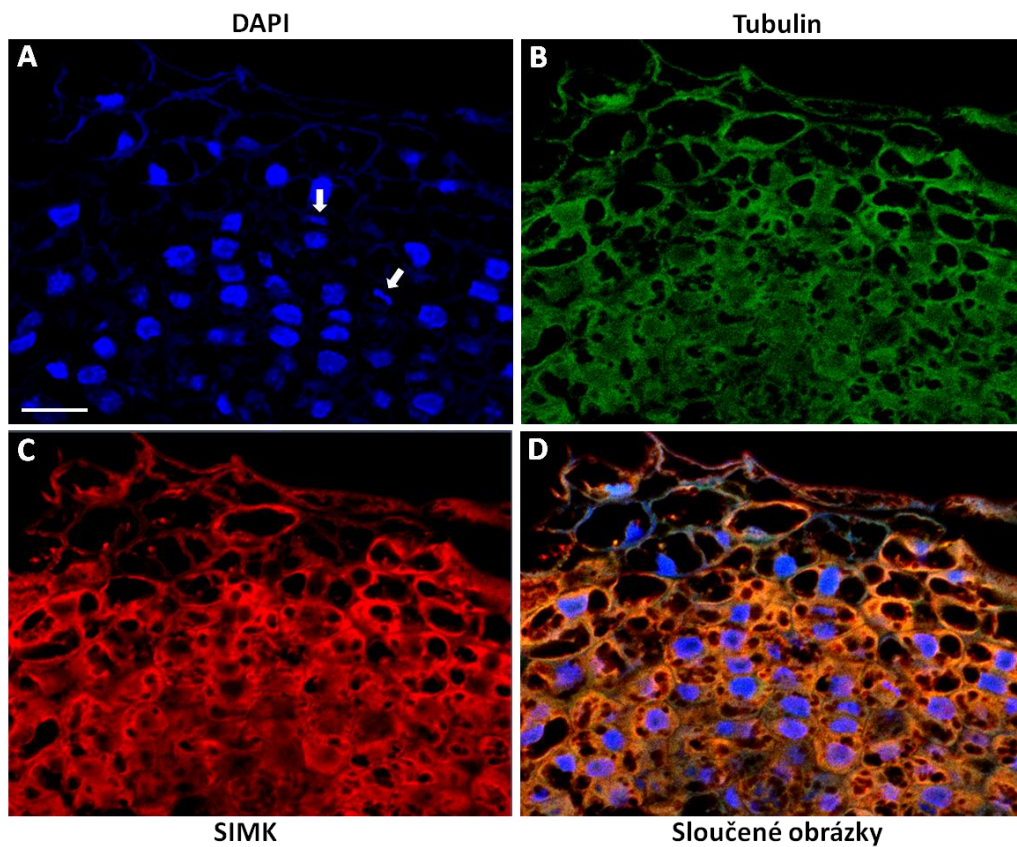


Obr. 39: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v symbiotických buňkách zóny fixace dusíku u hlízek divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY. MT (A; C, bílé hlavičky), SIMK + DAPI (B), sloučený obrázek (C). Měřítko odpovídá 50 μ m.

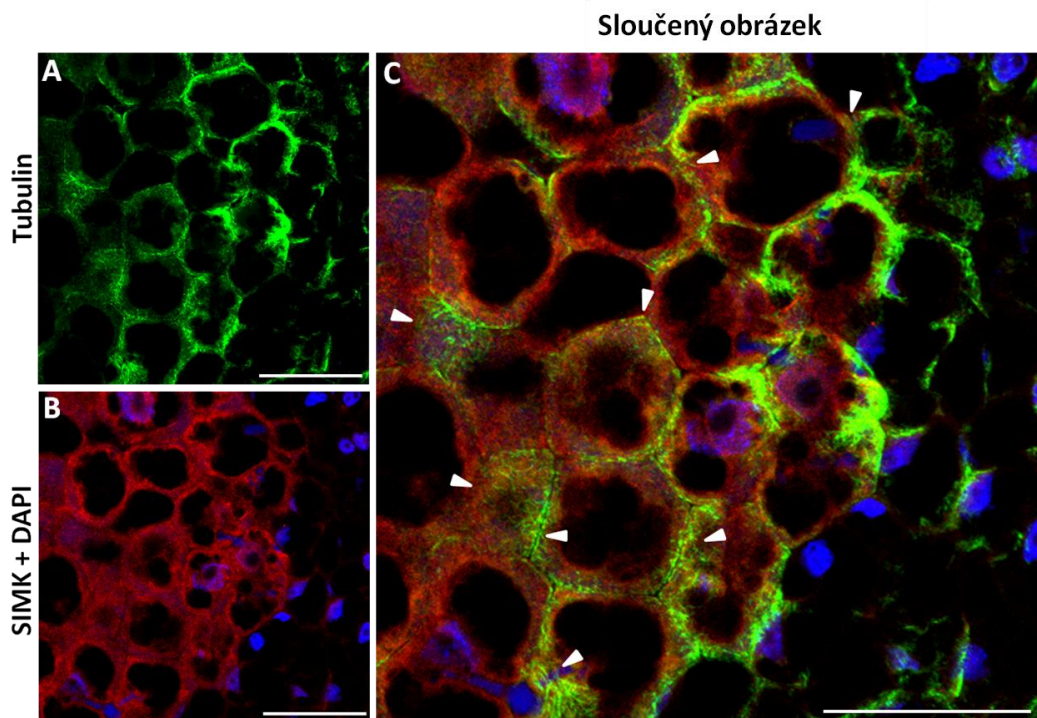
U hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi* byla taktéž pozorována meristemická zóna (I) v apikální oblasti hlízky, infekční zóna (II) a zóna fixace dusíku (III), (Obr. 34B). V meristemické zóně hlízky byly pozorovány malé a aktivně se dělící buňky (Obr. 40). pERK vykazovala stejný vzor lokalizace jako SIMK (Obr. 40 C a D). Konkrétně byly viditelné mitotické vřeténka (Obr. 41A). V submeristemických buňkách infekční zóny bylo možné pozorovat organizaci mikrotubulů a lokalizaci SIMK. SIMK byla v těchto buňkách infekční zóny hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi* lokalizována v především v jádře a potom také cytoplazmě (Obr. 42-44B). Mikrotubuly byly uspořádány nepravidelně (Obr. 42-44C, bílé hlavičky šipek). V zóně fixace dusíku byly mikrotubuly orientovány paralelně od okrajů buněk směrem k jejich středu (Obr. 45C). SIMK vykazovala stejný vzor lokalizace v jádře a cytoplazmě jako v meristemické a infekční zóně (Obr. 45B).



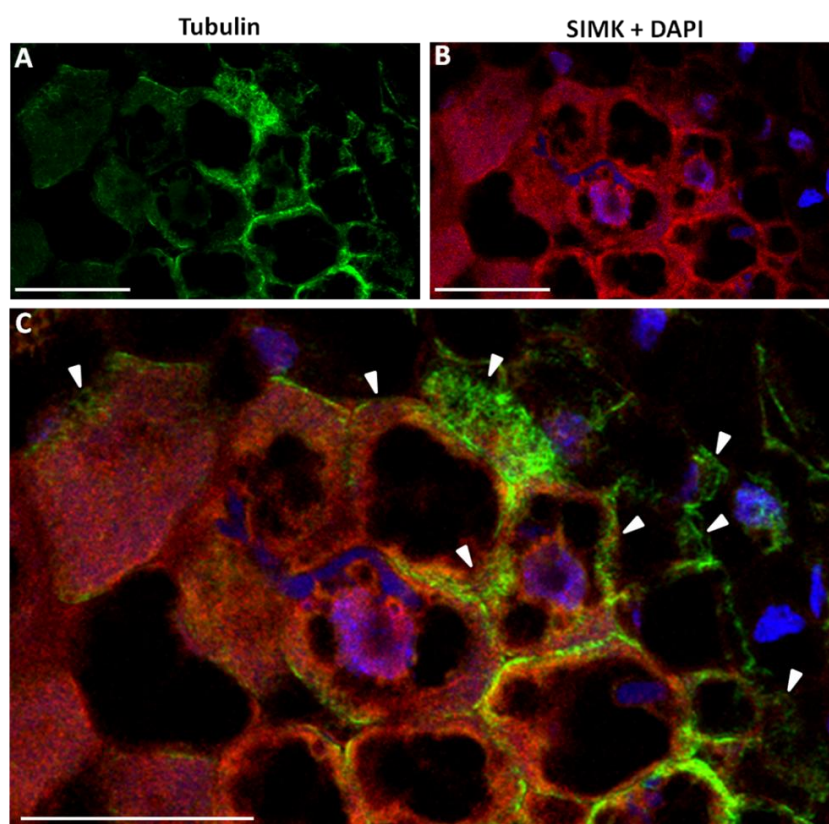
Obr. 40: Imunolokalizace tubulinu, SIMK a pERK v hlízkách transgenní linie *SIMKK RNAi*. Barvení DNA a jader (A), MT (B), SIMK (C) a pERK (D) a sloučený obrázek (E). Měřítka odpovídá 20 μm .



Obr. 41: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v hlízkách transgenní linie *SIMKK RNAi*. Barvení DNA a jader, struktura mitotických vřetének (A), MT (B), SIMK (C) a sloučený obrázek (D). Měřítka odpovídá 20 μm .

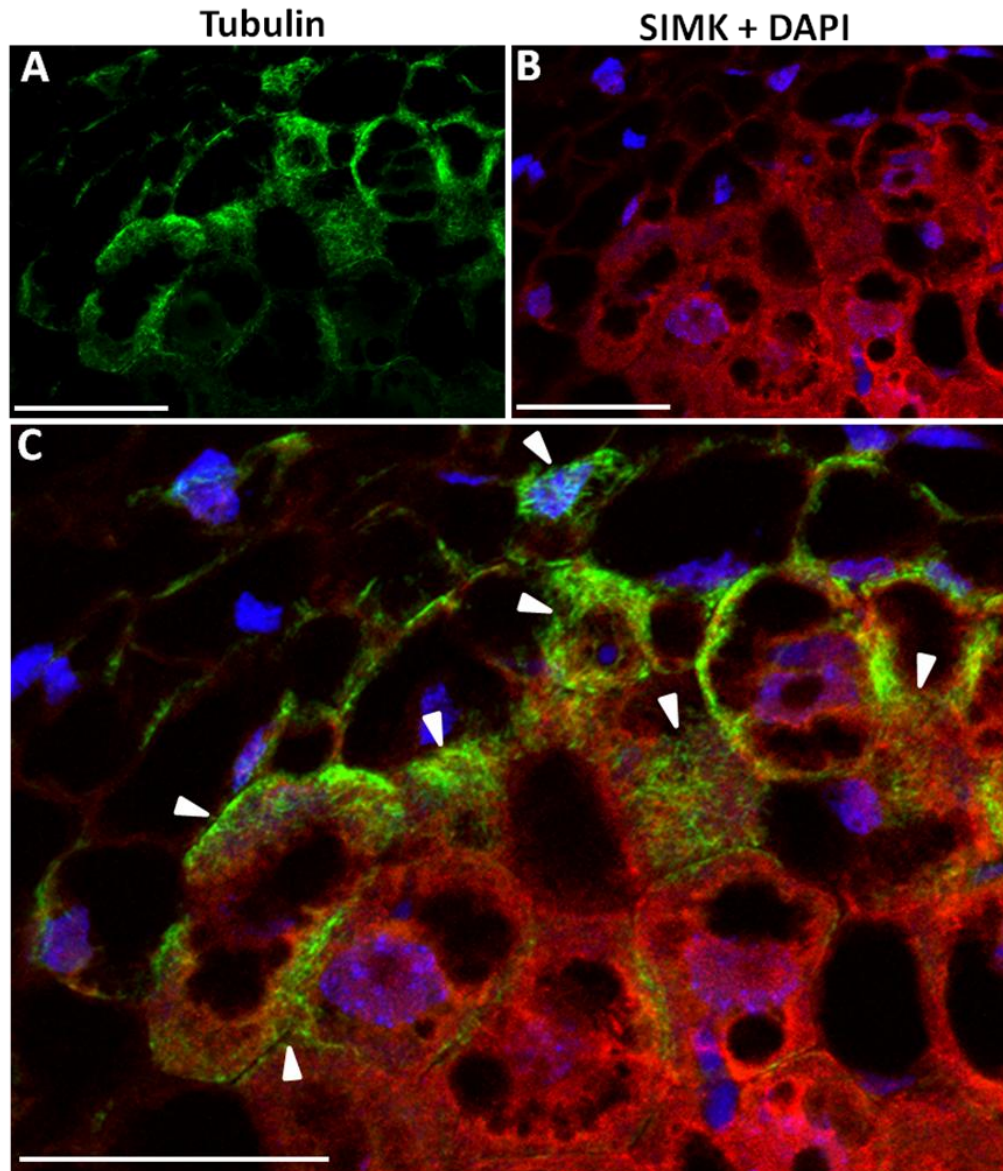


Obr. 42: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v submeristemických buňkách infekční zóny hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi*. MT (A; C, bílé hlavičky šipek), SIMK + DAPI (B), sloučený obrázek (C). Měřítko odpovídá 50 μ m.



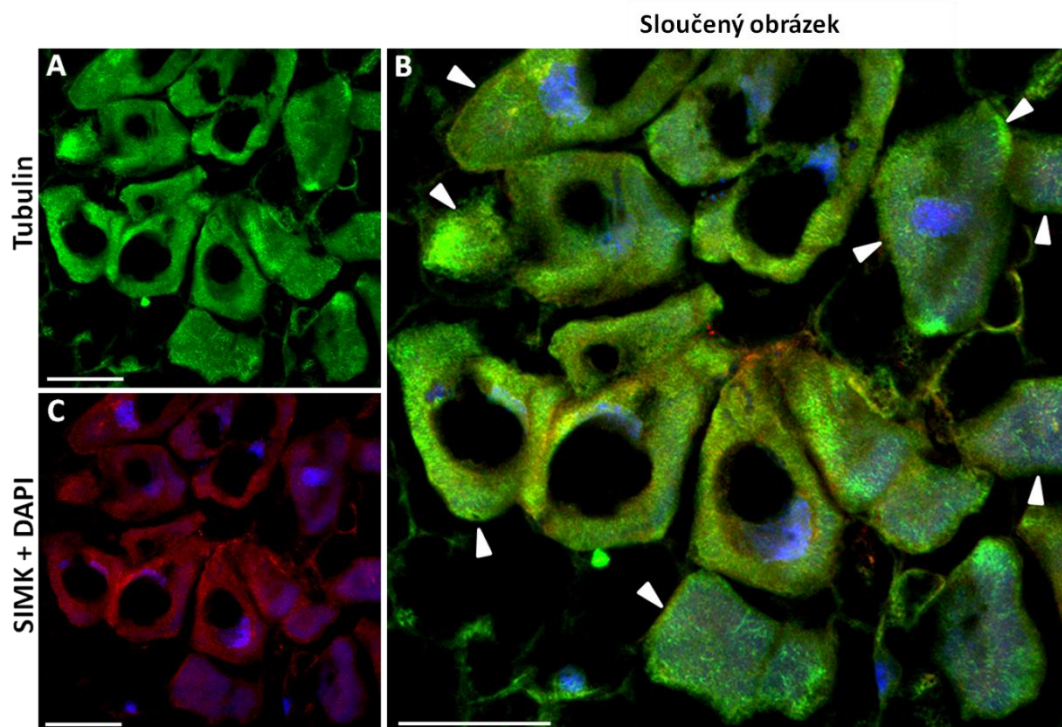
Sloučený obrázek

Obr. 43: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v submeristemických buňkách infekční zóny hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi*. MT (A; C, bílé hlavičky šipek), SIMK + DAPI (B), sloučený obrázek (C). Měřítko odpovídá 50 μ m.



Sloučený obrázek

Obr. 44: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v submeristemických buňkách infekční zóny hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi*. MT (A; C, bílé hlavičky šipek), SIMK + DAPI (B), sloučený obrázek (C). Měřítko odpovídá 50 μm .

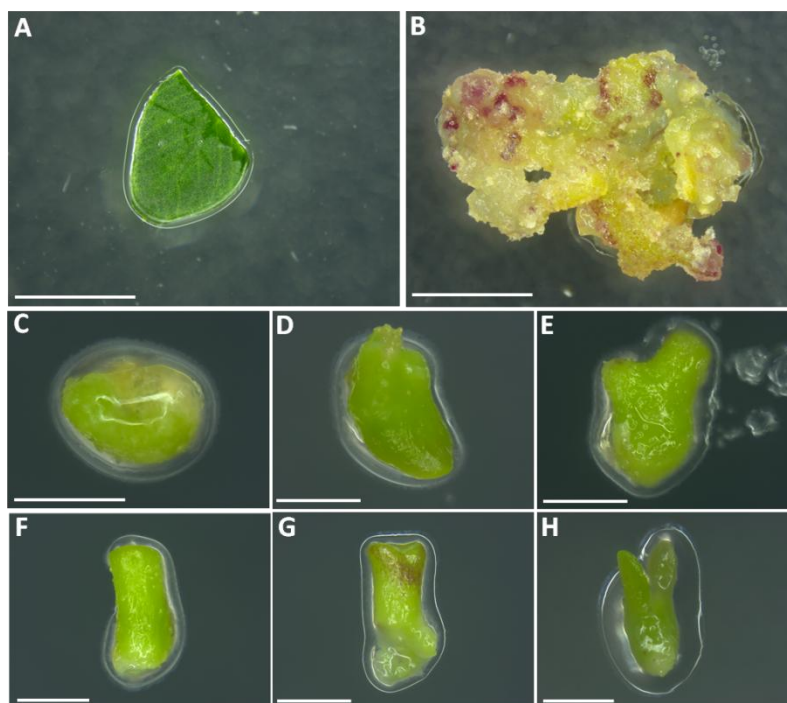


Obr. 45: Imunolokalizace tubulinu a SIMK v symbiotických buňkách zóny fixace dusíku u hlízek transgenní linie *SIMKK RNAi*. MT (A; B bílé hlavičky šipek), SIMK + DAPI (C), sloučený obrázek (B). Měřítko odpovídá 50 μm .

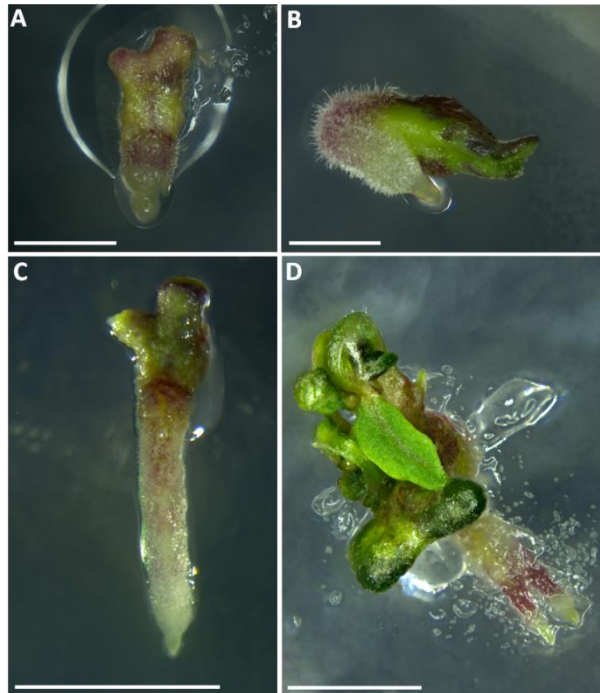
4.5 Odvození transgenní linie *in vitro* procesem somatické embryogeneze

Regenerace rostlin *in vitro* procesem somatické embryogeneze byla indukována u transgenní linie *SIMKK RNAi*. Z mateřských rostlin byly odebrány listy, ze kterých se připravily listové explantáty (Obr. 46A). Ty byly dále kultivovány na jednotlivých kultivačních médiích.

Nejdříve byly připravené listové explantáty kultivovány na B5H médiu obsahujícím syntetický auxin a cytokinin. Vývoj embryí probíhal přes stádium kalusů, které se na tomto médiu začaly z listových explantátů vytvářet po 2 týdenní kultivaci (Obr. 46B). Po přenesení kalusů na B50 médiu docházelo po 3 týdnech kultivace k tvorbě embryí. Ta byla zdokumentována v jednotlivých stádiích vývoje- globulární stádium (Obr. 46C), přechodné stádium mezi globulárním a srdčítým (Obr. 46D) srdčité stádium (Obr. 46E), torpédovité stádium (Obr. 46F, G) a zralé somatické embryo (Obr. 46H). Zralá embrya byla přenesena a dále kultivována na MMS médiu, na kterém se u embryí začaly po 7- 14 dnech kultivace formovat kořeny (Obr. 47). Nakonec byla tato embrya přeložena na MS médium, na kterém se postupně vyvíjela celá regenerovaná rostlina (Obr. 48).



Obr. 46: Indukce transgenní linie *SIMKK RNAi* procesem somatické embryogeneze. Listový explantát (A), stádium kalusu (B), globulární embryo (C), embryo přecházející z globulárního na srdčité stádium (D), srdčité embryo (E), torpédovité embryo (F, G), zralé embryo (H). Měřítka odpovídá 5 mm (A, B) a 1 mm (C-G).



Obr. 47: Regenerované rostliny transgenní linie *SIMKK RNAi* vyvíjející se ze zralých somatických embryí. Rostliny s vytvářejícími se kořeny 7 dní (A, B) a 14 dní (C, D) po přenosu na MMS médium. Měřítko odpovídá 2 mm (A, B) a 5 mm (C, D).



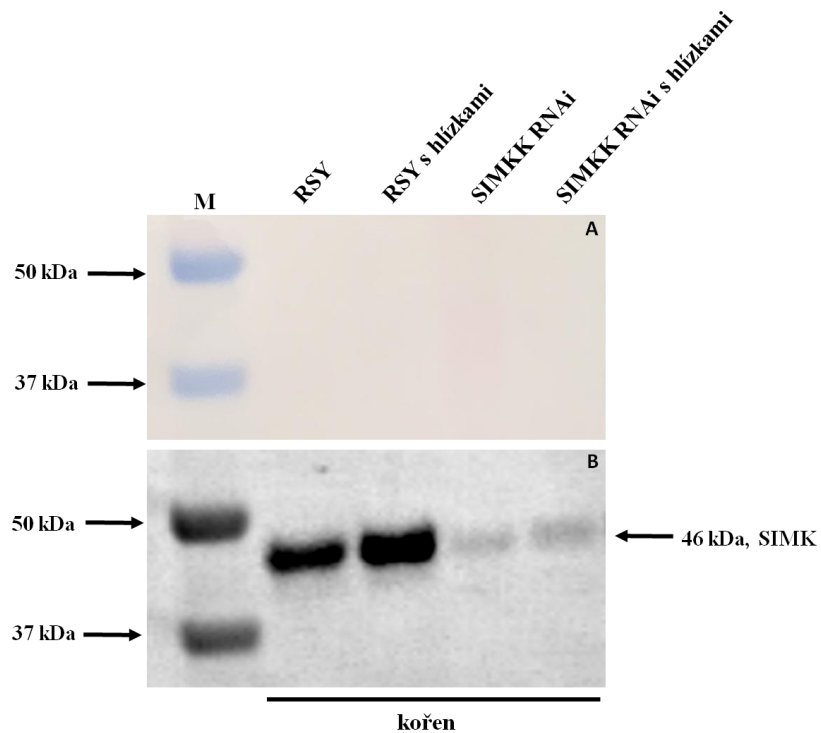
Obr. 48: Rostliny transgenní linie *SIMKK RNAi* indukované procesem somatické embryogeneze 20 dní (A, B, C) a 44 dní (D, E) po přenosu na MS médium.

4.6 Detekce proteinů analýzou Western blot

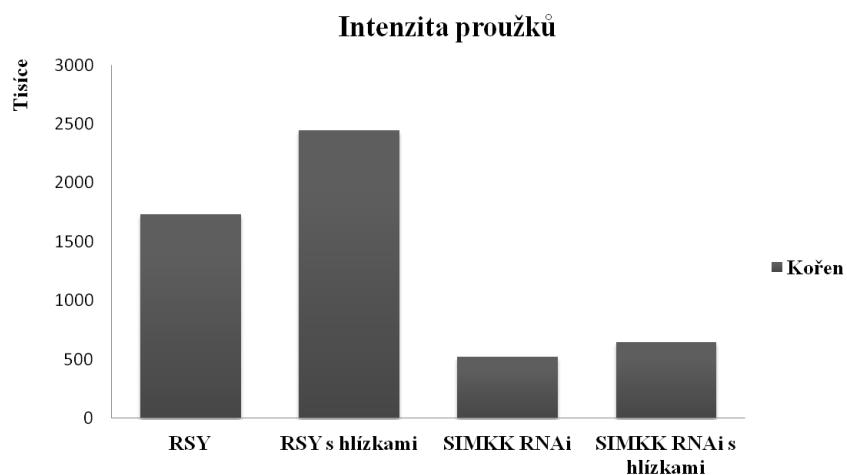
V kořenech rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY byla 15 dní po inokulaci rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* ověřena přítomnost proteinů SIMK a MMK3. Kvantitativně byla také vyhodnocena intenzita detekovaných proužků u rostlin kultivovaných v kontrolních podmínkách (vzorky RSY a *SIMKK RNAi*) a u rostlin inokulovaných rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* (rostliny kultivaru RSY s vytvořenými hlízkami a rostliny transgenní linie *SIMKK RNAi* s vytvořenými hlízkami). Proteinové extrakty byly separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla reverzibilně obarvena Ponceau S pro ověření správnosti nanesení proteinů (Obr. 49A, 51A). Následně byla membrána inkubována s primárními, a poté se sekundárními protilátkami, konjugovanými s křenovou peroxidázou, díky které byl získán chemiluminiscenční signál.

Ve všech vzorcích byl detekován proužek o velikosti 46 kDa odpovídající velikosti proteinu SIMK (Obr. 49B), který je vysoce konzervovaným homologem proteinu MPK6 z *A. thaliana*. Měřením intenzity detekovaných proužků bylo zjištěno, že abundance proteinu SIMK v obou vzorcích transgenní linie *SIMKK RNAi* byla ve srovnání s abundancí proteinu SIMK v obou vzorcích divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY výrazně nižší (Obr. 50). Přičemž u rostlin inokulovaných rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti* byla abundance proteinu SIMK ve srovnání s rostlinami kultivovanými v kontrolních podmínkách zvýšená (Obr. 50).

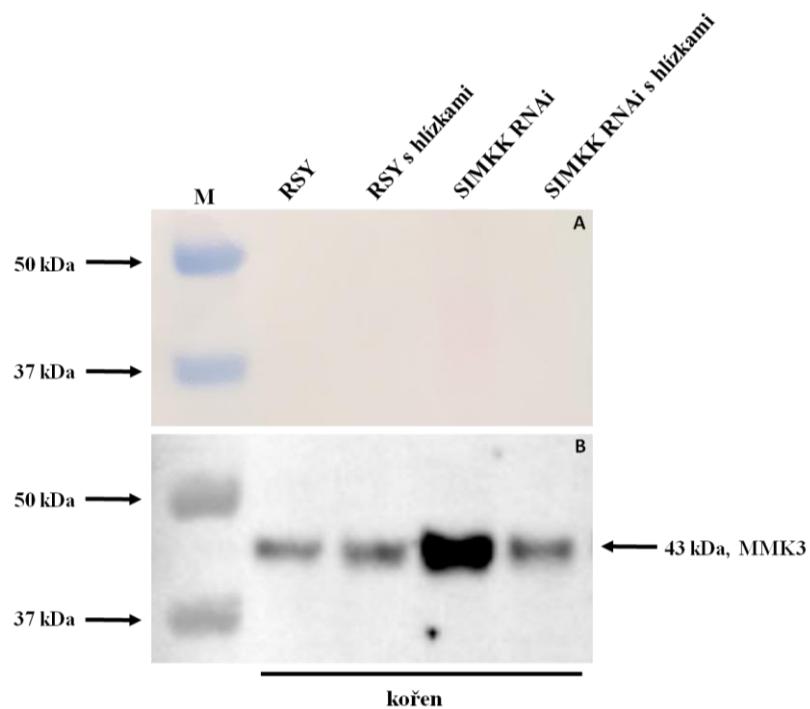
Ve všech vzorcích byl detekován také proužek o velikosti 43 kDa, který odpovídá velikosti proteinu MMK3 (Obr. 51B). Měřením intenzity jednotlivých proužků bylo zjištěno, že abundance proteinu MMK3 u rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* kultivovaných v kontrolních podmínkách byla ve srovnání s divým typem, taktéž kultivovaným v kontrolních podmínkách, výrazně zvýšená (Obr. 52). Mezi rostlinami transgenní linie a divého typu s vytvořenými hlízkami nebyl v abundanci proteinu MMK3 výrazný rozdíl (Obr. 52).



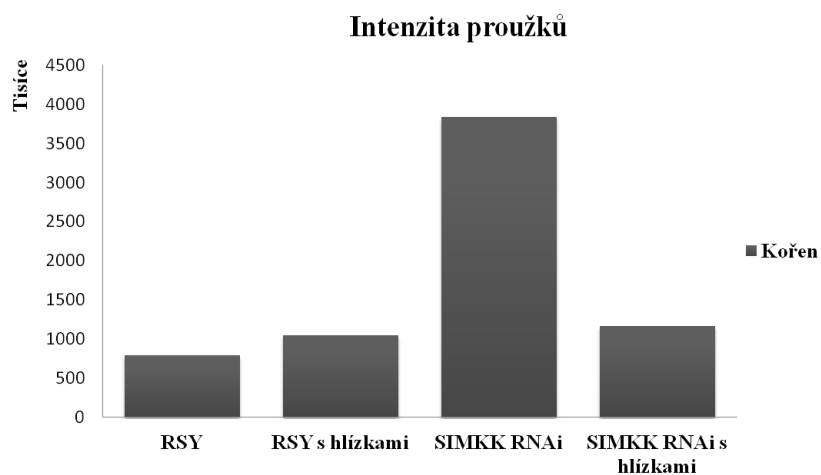
Obr. 49: Kontrola přenosu proteinů ze „Stain free“ gelu na PVDF membránu pomocí reverzibilního barvení Ponceau S, M= marker (A). Detekce proteinu SIMK pomocí Western blot analýzy v kořenech rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a rostlin divého typu *M. sativa* L., kultivar RSY. Proužek o velikosti 46 kDa odpovídá velikosti proteinu SIMK (B).



Obr. 50: Naměřená intenzita detekovaných proužků odpovídajících proteinu SIMK o velikosti 46 kDa u rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY kultivovaných v kontrolních podmínkách a u rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY inokulovaných rhizobiální tekutinou kulturovou *S. meliloti*.



Obr. 51: Kontrola přenosu proteinů ze „Stain free“ gelu na PVDF membránu pomocí reverzibilního barvení Ponceau S, M= marker (A). Detekce proteinu MMK3 pomocí Western blot analýzy v kořenech rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a rostlin divého typu *M. sativa* L., kultivar RSY. Proužek o velikosti 43 kDa odpovídá velikosti proteinu MMK3 (B).



Obr. 52: Naměřená intenzita detekovaných proužků odpovídajících proteinu MMK3 o velikosti 43 kDa u rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY kultivovaných v kontrolních podmínkách a u rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY inokulovaných rhizobiální tekutou kulturou *S. meliloti*.

5 DISKUZE

První úlohou experimentální části byla optimalizace imunolokalizační „whole-mount“ metody pro její využití k lokalizaci cytoskeletálních proteinů a MAPKs v kořenech a hlízkách *M. sativa*. Bylo vyzkoušeno několik imunolokalizačních protokolů a změněny jejich jednotlivé parametry. Protože se lokalizace proteinů pomocí „whole-mount“ metody prováděla na kořenech a hlízkách *M. sativa* a architektura pletiv a orgánů u těchto rostlin je poměrně komplexní, byla zásadním krokem celé optimalizace fixace. Jen vhodná kombinace vakua a fixačního roztoku zajistí rychlou a efektivní penetraci fixačního roztoku do vnitřních buněčných vrstev a zachová buněčnou strukturu intaktní (Pasternak *et al.*, 2015). I v tomto experimentu bylo vyzkoušeno několik koncentrací jednotlivých komponentů fixačního roztoku a délky aplikace vakua a nakonec se metodu „whole-mount“ podařilo pro *M. sativa* úspěšně optimalizovat.

Dále byla touto optimalizovanou imunolokalizační metodou zjištěna subcelulární lokalizace SIMK v kořenech *M. sativa*. Je známo, že SIMK vykazuje vysokou strukturní a sekvenční homologii k již dobře prostudované AtMPK6 z *A. thaliana* (Bekešová *et al.*, 2015). AtMPK6 je lokalizována zejména v jádře a interaguje s PPB a fragmoplasty, čímž se podílí na determinaci roviny buněčného dělení (Müller *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013; Komis *et al.*, 2017). Ze získaných výsledků vyplývá, že SIMK, jako vysoce konzervovaný homolog AtMPK6, vykazuje u *M. sativa* stejnou subcelulární lokalizaci, a to v jádře, PPB a raných fragmoplastech.

Byl také sledován vliv krátkodobého působení abiotických stresů a inhibitoru MAPKKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci SIMK a fosforylovaných MAPKs. Bylo prokázáno, že SIMKK aktivuje SIMK při odpovědi na solný stres (Kiergerl *et al.*, 2000). Po aktivaci solným stresem se část SIMKK i SIMK relokalizuje z jádra do cytoplazmy, kde spolu kolokalizují ve specifických cytoplazmatických kompartmentech (Ovečka *et al.* 2014). Z výsledků této diplomové práce je patrné, že po působení solného stresu (250 mmol.l^{-1}), došlo v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* k částečné relokalizaci SIMK z jádra do cytoplazmy v podobě cytoplazmatických kompartmentů okolo jader. Navíc bylo zjištěno, že SIMK v těchto cytoplazmatických kompartmentech kolokalizuje s pERK. Je známé, že u semenáčků *A. thaliana* dochází při solném stresu k depolymerizaci MT (Wang *et al.*, 2011). Kortikální mikrotubuly jsou rozhodující pro determinaci osy růstu rostlinných buněk

a během buněčného cyklu jsou organizovány do specifických struktur (Shoji *et al.*, 2006). Po krátkodobém působení solného stresu došlo v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* ke svazkování mikrotubulů a tím i podstatně nižšímu počtu aktivně se dělicích buněk. Navíc bylo po solném stresu možné lokalizovat SIMK také v mitotickém vřeténku. K oxidativnímu stresu a tvorbě ROS dochází při narušení redoxní homeostáze (Asada, 1994). MPK3 a MPK6 jsou zahrnuty v několika procesech týkajících se ROS a podílejí se například na regulaci odpovědi vůči patogenům nebo vývoji průduchů (Pitzschke a Hirt, 2009). Oxidativní stres ($15 \text{ mmol.l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$) ovlivnil subcelulární lokalizaci SIMK a organizaci cytoskeletu. Po krátkodobém působení oxidativního stresu byla patrná lokalizace SIMK v bodových kompartmentech především na plazmatických membránách, ve kterých byla potvrzena kolokalizace SIMK a pERK. Oxidativní stres také způsobil částečnou depolymerizaci kortikálních mikrotubulů v rizodermálních buňkách kořene *M. sativa* a ovlivnil také polohu fragmoplastů, které byly orientovány šikmo na osu růstu kořene. Působením těchto abiotických stresů došlo k aktivaci MAPKs, které je možné detekovat pomocí pERK protilátky (Bequette *et al.*, 2018). U *A. thaliana* je na rozdíl od *M. sativa* známo, že lze pomocí této protilátky detekovat aktivitu u MPK3 a MPK6. V tomto experimentu byla vyhodnocena intenzita fluorescence pERK a tím i aktivita MAPKs. Mezi dobře prostudované MAPKs patří zejména MPK3 a MPK6, k jejichž aktivaci dochází při abiotickém stresu nebo v přítomnosti patogenů (Ren *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2012). To odpovídá i výsledkům získaných během tohoto experimentu, jelikož intenzita fluorescence pERK a tím i aktivita MAPKs byla po působení solného a oxidativního stresu zvýšená. Jako poslední byl sledován vliv působení inhibitoru MAPKs PD98059. Tento inhibitor neovlivnil výrazně lokalizaci SIMK ani organizaci cytoskeletu. Po působení inhibitoru PD98059 byla intenzita fluorescence pERK přibližně stejná jako u kontroly. To je způsobeno pravděpodobně tím, že se jedná o selektivní inhibitor, který neinhibuje všechny MAPKs.

Předpokládá se, že reorganizace rostlinného cytoskeletu hraje během ontogeneze hlízek důležitou roli (Timmers *et al.*, 1998). Vzhledem k významu tubulinového cytoskeletu při buněčném dělení, diferenciaci a fungování rostlinných buněk je zřejmé, že změna v jeho uspořádání má pro organogenezi a funkci hlízek zásadní roli. Podle Kitaeva *et al.*, (2015) vykazují kortikální mikrotubuly v infekční zóně nepravidelné uspořádání. To se ale v oblasti, která je blíže středu mění a kortikální MT přecházejí do paralelního uspořádání, které u neinfikovaných buněk přetrvává i v zóně III

(Kitaeva *et al.*, 2015). U transgenní linie *SIMKK RNAi* bylo pozorováno nepravidelné uspořádání MT infekční zóně. Paralelně byly mikrotubuly uspořádány v zóně fixace dusíku a směřovaly od obvodu buněk směrem do jejich středu. SIMK byla v hlízkách této transgenní linie lokalizována především v jádře a v cytoplazmě. V infekční zóně hlízek divého typu *M. sativa* L., kultivaru RSY byly mikrotubuly uspořádány paralelně v dlouhých svazcích a SIMK byla lokalizována v cytoplazmě. V zóně fixace dusíku byly mikrotubuly uspořádány nepravidelně a SIMK byla lokalizována v jádře. Z toho vyplývá, že mezi transgenními liniemi a kontrolními rostlinami je pravděpodobně rozdíl v organizaci cytoskeletu a lokalizaci SIMK při symbiotické interakci.

Nakonec byly u regenerovaných rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* se sníženou expresí proteinu SIMKK metodou RNA interference detekovány proteiny SIMK a MMK3, které jsou zapojeny do signální dráhy, které se SIMKK účastní. Byla vyhodnocena intenzita detekovaných proužků u rostlin kultivovaných v kontrolních podmínkách i u rostlin, které byly kokultivovány s půdními bakteriemi *S. meliloti*. Nízká abundance proteinu SIMK u transgenní linie *SIMKK RNAi* je způsobena potlačením exprese proteinu SIMKK, který funguje jako hlavní aktivátor SIMK. Naopak abundance proteinu MMK3 byla u této transgenní linie kultivované v kontrolních podmínkách výrazně zvýšená, který může v rostlině nahrazovat částečně chybějící SIMK.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části byla představena modelová rostlina *M. sativa*, která se využívá ke studiu symbiotické interakce mezi rostlinami z čeledi bobovitých a půdními bakteriemi. Dále byl vypracovaný literární přehled na téma úlohy MAPK signalizace a cytoskeletu u vojtěšky v interakci s prospěšnými mikroorganismy rodu *Rhizobium*. V poslední části byl zmíněn význam a využití imunolokalizačních metod v rostlinné biologii pro lokalizaci proteinů.

Experimentální část byla zaměřena na imunolokalizaci tubulinu a SIMK a to jak v kontrolních podmínkách, tak při symbiotické interakci s bakteriemi *S. meliloti*. Podařilo se úspěšně modifikovat imunolokalizační „whole-mount“ metodu a vizualizovat cytoskeletální proteiny včetně jednotlivých fází buněčného dělení v mitoticky a cytokineticky aktivních buňkách. Modifikovanou „whole-mount“ metodou byla také určena subcelulární lokalizace proteinu SIMK, který je u *M. sativa* přítomný v cytoplazmě, jádrech, PPB a fragmoplastech. Byl také sledován vliv krátkodobého působení abiotických stresů (solný, oxidativní) a inhibitoru MAPKs na organizaci cytoskeletu, lokalizaci SIMK a fosforylaci MAPKs. Po působení solného stresu docházelo ke svazkování mikrotubulů a částečné relokizaci proteinu SIMK z jádra do cytoplazmatických kompartmentů okolo jader, ve kterých byla potvrzena kolokalizace SIMK a pERK. Byla také pozorována lokalizace SIMK v mitotickém vřeténku. Oxidativní stres způsobil nepravidelné uspořádání mikrotubulů a jejich částečnou depolymerizaci. Kromě jaderné lokalizace proteinu SIMK byly pozorovány kompartmenty bodové struktury především na plazmatických membránách, ve kterých SIMK a pERK kolokalizují. Po solném a oxidativním stresu byla hladina fosforylovaných MAPKs oproti kontrole a inhibitoru PD98059 zvýšená. Inhibitor PD98059 nezpůsobil změny v organizaci cytoskeletu, SIMK jeho vlivem vykazovala typickou lokalizaci v jádře a v cytoplazmě bylo viditelné velké množství kompartmentů bodové struktury.

Podařilo se také imunolokalizovat tubulin a SIMK v hlízkách transgenní linie *SIMKK RNAi*. U transgenní linie *SIMKK RNAi* bylo pozorováno nepravidelné uspořádání MT infekční zóně a paralelní uspořádání mikrotubulů v zóně fixace dusíku, kde směřovaly od obvodu buněk směrem do jejich středu. SIMK byla v hlízkách této transgenní linie lokalizována především v jádře a v cytoplazmě. V infekční zóně hlízek divého typu

M. sativa L., kultivaru RSY byly mikrotubuly uspořádány paralelně v dlouhých svazcích a SIMK byla lokalizována v cytoplazmě. V zóně fixace dusíku byly mikrotubuly uspořádány nepravidelně a SIMK byla lokalizována v jádře. Z toho vyplývá, že mezi transgenní linií a kontrolními rostlinami je pravděpodobně rozdíl v organizaci cytoskeletu a lokalizaci SIMK při symbiotické interakci.

U rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* a taktéž divého typu kultivaru RSY, odvozených somatickou embryogenezí byly analýzou Western blot detekovány proteiny SIMK a MMK3 v kontrolních podmínkách i v podmínkách symbiotické interakce s *S. meliloti*. Abundance proteinu SIMK byla u transgenní linie *SIMKK RNAi* v případech obou podmínek nižší. U rostlin transgenní linie i divého typu s vytvořenými hlízkami byla abundance proteinu SIMK ve srovnání s rostlinami transgenní linie i divého typu kultivovaných v kontrolních podmínkách zvýšená. Abundance proteinu MMK3 u rostlin transgenní linie *SIMKK RNAi* kultivovaných v kontrolních podmínkách byla ve srovnání s divým typem, taktéž kultivovaným v kontrolních podmínkách, výrazně zvýšená. Mezi rostlinami transgenní linie a divého typu s vytvořenými hlízkami nebyl v abundanci proteinu MMK3 výrazný rozdíl.

7 LITERATURA

- Alunni B., Kevei Z., Redondo-Nieto M., Kondorosi A., Mergaert P., Kondorosi E. (2007): Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. *Molecular. Plant-Microbe Interactions* **20**, 1138- 1148.
- Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Denarie J., Gough C. (2003): The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal* **34**, 495- 506.
- Arrighi J.F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Soriano L.C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E.P., Gherardi M., Huguet T. (2006): The *Medicago truncatula* lysin motif-receptorlike kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *The Plant Physiology* **142**, 265- 279.
- Asada K. (1994): Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: *In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Vol. 1, (Foyer C. H. and Mullineaux P. M., eds), Boca Raton, CRC Press, 77-104.
- Baluška F., Parker J.S., Barlow P.W. (1992): Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cell Science* **103**, 191- 200.
- Barbulova A., Iantcheva A., Zhiponova M., Vlahova M., Atanassov A. (2002): Establishment of Embryogenic Potential of Economically Important Bulgarian Alfalfa Cultivars (*Medicago Sativa* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **16**, 55- 63.
- Barker D. G., Bianchi S., Blondon F., Dattde Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Gdnier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Ddnarid J., Huguet T. (1990): *Medicago truncatula*, a Model Plant for Studying the Molecular Genetics of the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. *The Plant Molecular Biology Reporter* **8**, 40- 49.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. **189**, 1069- 1083.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vyplelová P., Ovečka M., Luptovčíak I., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Frontiers in plant science* **6**, 336-336.
- Bequette C.J., Hind S.R., Pulliam S., Higgins R., Stratmann J.W. (2018): MAP kinases associate with high molecular weight multiprotein complexes. *Journal of Experimental Botany* **69**, 643- 654.
- Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., Sykes C., Plastino J. (2014): Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*. **94**, 235- 63.
- Brandizzi F., Wasteneys G.O. (2013): Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *The Plant Journal*. **75**, 339- 49.
- Buschmann H., Lloyd, C.W. (2008): Arabidopsis mutants and the network of microtubule-associated functions. *Molecular Plant* **1**, 888–898.
- Bustos-Sanmamed P., Laffont C., Frugier F., Lelandais-Brière C., Crespi M. (2013): Analyzing protein distribution in plant tissues using “Whole-Mount” immunolocalization. In: *Plant organogenesis* (De Smet I, ed.). New York: Humana Press, 317- 322.
- Cárdenas L., Vidali L., Domínguez J., Pérez H., Sánchez F., Hepler P.K., Quinto C. (1998): Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiology* **116**, 871- 877.
- Cárdenas L., Thomas-Oates J.E., Nava N., López-Lara I.M., Hepler P.K., Quinto C. (2003): The role of Nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **16**, 326- 334.
- 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**, 36734- 36740.

- Carrier M.F., Shekhar S. (2017): Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks. *Nature reviews Molecular Cell Biology* **18**, 389- 401.
- Cebolla A., Vinardell J.M., Kiss E., Olah B., Roudier F., Kondorosi A., Kondorosi E. (1999): The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidydependent cell enlargement in plants. *EMBO Journal* **18**, 4476- 4484.
- Cerri M.R., Frances L., Kelner A., Fournier J., Middleton P.H., Auriac M-Ch., 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. *The Plant Physiology* **171**, 1037- 1054.
- Cooper GM. (2000): Microtubules. In: *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition Sunderland (MA): Sinauer Associates; Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9932/>.
- Ditengou F.A., Raudaskoski M., Lapeyrie F. (2003): Hypaphorine, an indole-3- acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus ssp bicostata* root hairs. *Planta* **218**, 217- 225.
- Emons A.M.C. a Mulder B.M. (2000): How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends in Plant Science* **5**, 35- 40.
- Fletcher D. A., Mullins R. D. (2010): Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492.
- Forestan C., Varotto S. (2013): Auxin immunolocalization in plant tissues. In: *Plant organogenesis* (: De Smet I, ed.). New York: Humana Press, 223- 233.
- Fournier J., Timmers A.C.J., Sieberer B.J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D.G. (2008): Mechanism of Infection Thread Elongation in Root Hairs of *Medicago truncatula* and Dynamic Interplay with Associated Rhizobial Colonization. *The Plant Physiology* **148**, 1985- 1995.
- Franklin-Tong V. E., Gourlay C. W. (2008): A role for actin in regulating apoptosis programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochemical Journal* **413**, 389- 404.
- Frugier F., Kosuta S., Murray J.D., Crespi M., Szczyglowski K. (2008): Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science* **13**, 115- 120.
- Fukao Y. (2012): Protein–protein interactions in plants. *Plant Cell Physiology* **53**, 617- 625.
- Gage D.J. (2004): Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280- 300.
- Geitmann A., Emons A.M.C. (2000): The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. *Journal of Microscopy* **198**, 218- 245.
- Goddard R. H., Wick S. M., Silflow C. D., Snustad D. P. (1994): Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiology* **104**, 1-6.
- Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C. (2008): Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual. Review of. Genetics* **42**, 413- 441.
- Giddings T.H. Jr., Staehelin L.A. (1991): Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis. In: *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form* (CW Lloyd, ed.) Academic Press, London, 85- 99.
- Grunewald W., van Noorden G., van Isterdael G., Beekman T., Gheysen G., Mathesius U. (2009): Manipulation of auxin transport in plant roots during *rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell* **21**, 2553- 2562.
- Hamada T. (2007): Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research* **120**, 79-98.
- Hardham A.R. (2013): Microtubules and biotic interactions. *The Plant Journal* **75**, 278- 289.
- Hashimoto, T. (2015): Microtubules in plants. *The Arabidopsis Book* e0179, 2-20.
- Henty-Ridilla J. L., Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2013): Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 678-687.
- Higaki T., Sano T., Hasezawa S. (2007): Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 549–556.

- Hirsch A.M., Bhuvanewari T.V., Torrey J.G., Bisseling T. (1989): Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**, 1244–1248.
- Huber F., Schnauß J., Rönicke S., Rauch P., Müller K., Fütterer C., Käs J. (2013): Emergent complexity of the cytoskeleton: From single filaments to tissue. *Advances in Physics* **62**, 1-112.
- Hush J.M., Overall R.L. (1992): Re-orientation of cortical F-actin is not necessary for wound induced microtubule re-orientation and cell polarity establishment. *Protoplasma* **169**, 97-106.
- Horio T., Murata T. (2014): The role of dynamic instability in microtubule organization. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-10.
- Hossain M.S., Liao J.Q., James E.K., Sato S., Tabata S., Jurkiewicz A., Madsen L.H., Stougaard J., Ross L., Szczyglowski K. (2012): *Lotus japonicus* ARPC1 is required for rhizobial infection. *Plant Physiology* **160**, 917- 928.
- Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. (1988): Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 392- 397.
- Chen T., Zhu H., Ke D., Cai K., Wang C., Gou H., Hong Z., Zhang Z. (2012) A MAP kinase interacts with SymRK and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* **24**, 823- 838.
- Chen L., Chen Q., Zhu Y., Hou L., Mao P. (2016): Proteomic Identification of Differentially Expressed Protein during Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flower Development. *Frontiers in Plant Science* **7**:1502.
- 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**, 492- 503.
- Chou S.Z., Pollard T.D. (2019): Mechanism of actin polymerization revealed by cryo-EM structures of actin filaments with three different bound nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States*, 1-10.
- Jamet A., Sigaud S., Van de Sype G., Puppo A., Herouart D. (2003): Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 217- 225.
- Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C. (1997): Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 895- 898.
- Jordan D.C. (1982): Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen.nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**, 136- 139.
- Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. (2002): Functional nonequivalency of actin isovariants in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 251-261.
- Kelly S., Radutoiu S., Stougaard J. (2017): Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **39**, 152- 158.
- Kereszt A., Mergaert P., Maroti G., Kondorosi E. (2011): Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis. *Current. Opinion. Microbiology.* **14**, 76- 81.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan Ch., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklof S., Till S., Bogre 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**, 2247-2258.
- Kijne J.W., Bakhuizen R., van Brussel A.A.N. (1992): The *Rhizobium* trap: root hair curling in root-nodule symbiosis. In *Perspectives in Plant Cell Recognition, (Society for Experimental Biology, Seminar Serie)*, Vol. 48 (J.A. Callow & J.R. Green eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 267–284.
- Kisiala A., Laffont C., Emery R.J.N., Frugier F. (2013): Bioactive Cytokinins Are Selectively Secreted by *Sinorhizobium meliloti* Nodulating and Nonnodulating Strains. *Molecular Plant Microbe Interactions* **26**, 1225- 1231.

- Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., V.E. Tsyganov (2015): Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytologist* **210**, 168- 183.
- Komis G., Luptovčiak I., Ovečka M., Samakovli D., Šamajová O., Šamaj J. (2017): Katanin effects on dynamics of cortical microtubules and mitotic arrays in *Arabidopsis thaliana* revealed by advanced live-cell imaging. *Frontiers in Plant Science* **8**, 866.
- 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**, 237-265.
- Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D., and Snustad, D.P. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell* **4**, 539-547.
- Kost B., Chua N. H. (2002): The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell Press* **108**, 9-12.
- Kropf D. L., Bisgrove S. R. & Hable W. E. (1998): Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 117–122.
- Krtková J., Benáková M., Schwarzerová K (2016): Multifunctional Microtubule-Associated Proteins in Plants. *Frontiers In Plant Science* **7**, 1-13.
- Lambert A.M., Vantard M., Schmit A.C., Stoeckel H. (1991): Mitosis in plants. In: The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form (CW Lloyd, ed.) Academic Press, London, 199-208.
- Laranjo M, Alexandre A., Oliveira S. (2014): Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research* **169**, 2- 17.
- Ledbetter M.C. (1963): A „microtubule“ in plant cell fine structure. *The Journal of Cell Biology* **19**, 239- 250.
- Lee Y.R J., Liu B. (2013): The rise and fall of the phragmoplast microtubule array. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 757- 763.
- Lee J., Eschen-Lippold L., Lassowskat I., Böttcher Ch., Scheel D. (2015): Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1- 11.
- Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2015): Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 415-440.
- Li W., Xu H., Liu Y., Song L., Guo C., Shu Y. (2016): Bioinformatics Analysis of MAPKKK Family Genes in *Medicago truncatula*. *Genes* **7**:13.
- Lievens S., Goormachtig S., Herman S., Holsters M. (2002): Patterns of pectin methylesterase transcripts in developing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *Molecular. Plant-Microbe Interactions* **15**, 164- 68.
- 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**, 630- 633.
- Lin J.S., Li X., Luo Z., Mysore K.S., Wen J., Xie F. (2018): NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in *Medicago truncatula*. *Nature Science* **4**, 942- 952.
- Lodwig E.M., Leonard M., Marroqui S., Wheeler T.R., Findlay K. (2005): Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 67- 74.
- Lohar D.P., Schaff J.E., Laskey J.G., Kieber J.J., Bilyeu K.D., Bird D.M. (2004): Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *The Plant Journal* **38**, 203- 214.
- Lopez-Gomez M., Sandal N., Stougaard J., Boller T. (2012): Interplay of flg22- induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 393- 401.
- Łotocka B., Kopcińska J., Skalniak M. (2012): The meristem in indeterminate root nodules of *Faboideae*. *Springer* **58**, 63- 72.
- 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**, 1- 6.

- Meng X., Zhang S. (2013): MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245- 266.
- Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E. (2003): A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology*. **132**, 161- 173.
- Mergaert P., Uchiyumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A. (2006): Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* **103**, 5230- 5235.
- Miller D.D., De Ruijter N.C.A., Emons A.M.C. (1997): From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips. *Journal of Experimental Botany* **4**, 1881- 1896.
- Minchin F.R., James E.K., Becana M. (2008): Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In: *Nitrogen-fixing leguminous symbioses* (Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I., Newton W.E., eds.). Berlin, Germany: Springer Science+Business Media B.V., 321- 362.
- Mirabet V., Krupinski P., Hamant O., Meyerowitz E.M., Jönsson H., Boudaoud A. (2018): The self-organization of plant microtubules inside the cell volume yields their cortical localization, stable alignment, and sensitivity to external cues. *PLoS Computational Biology* **14**: e1006011.
- Molero G., Tcherkez G., Roca R., Mauvee C., Cabrera-Bosquet L., Araus J.L., Nogués S., Aranjuelo I. (2019): Do metabolic changes underpin physiological responses to water limitation in alfalfa (*Medicago sativa*) plants during a regrowth period?. *Agricultural Water Management* **212**, 1- 11.
- Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J. (2006): Architecture of Infection Thread Networks in Developing Root Nodules Induced by the Symbiotic Bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **140**, 661- 670.
- Mortier V., Holsters M., Goormachtig S. (2012): Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell and Environment* **35**, 245- 258.
- Moustafa K., AbuQamar S., Jarrar M., Al- Rajab A.J., Tremouillaux- Guiller J. (2014): MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **33**, 1217- 1225.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant Journal* **61**, 234- 248.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H. (1999): Distinct osmosensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyperosmotic stress. *The Plant Journal* **20**, 381- 388.
- Munoz J.A., Coronado C., Perez-Hormaeche J., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A.J. (1998): MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa *Rhizobium meliloti* interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9687- 92.
- Murray J.D. (2001): Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes. *Molecular Plant Microbe Interactions* **6**, 631-639.
- Neupane, A., Nepal, M.P., Piya, S., Benson, B.V., MacArthur, K.J. (2013): Evolutionary history of mitogen-activated protein kinase (MAPK) genes in Lotus, Medicago, and Phaseolus. *Plant Signaling and Behavior* **8**: e27189.
- Newman- Griffis A.H., del Cerro P., Charpentier M., Meier I. (2019): Medicago LINC Complexes Function in Nuclear Morphology, Nuclear Movement, and Root Nodule Symbiosis. *Plant Physiology* **179**, 491- 506.
- Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the ab-tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-203.
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R. A., Downing K. H. (1999): High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.

- Oldroyd G.E.D., Downie J.A. (2004): Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 566- 576.
- Oldroyd G.E.D., Downie J.A. (2008): Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review in Plant Biology* **59**, 519- 546.
- Oldroyd G.E.D., J.D. Murray, Poole P.S., Downie J.A. (2011): The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *The Annual Review of Genetics* **45**, 119- 144.
- Oono R., Schmitt I., Sprent J.I., Denison R.F. (2010): Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytologist* **187**, 508- 520.
- Ovečka M., Šamajová O., Baluška F., Šamaj J. (2014): Immunofluorescent Localization of MAPKs in Steedman's Wax Sections. In: *Plant MAP Kinases. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 1171, (Komis G., Šamaj J., eds.). Humana Press, New York, NY.
- Pan H., Stonoha-Arther C., Wang D. (2018): *Medicago* Plants Control Nodulation by Regulating Proteolysis of the Receptor-Like Kinase DMI2. *Plant Physiology* **177**, 792-802.
- Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., (2011): MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **65**, 622- 633.
- Pitzsche A. (2015): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* **20**, 49-55.
- Podlešáková K., Fardoux J., Patrel D., Bonaldi K., Novák O., Strnad M., Giraud E., Spíchal L., Nouwen N. (2013): Rhizobial Synthesized Cytokinins Contribute to But Are Not Essential for the Symbiotic Interaction Between Photosynthetic Bradyrhizobia and *Aeschynomene* Legumes. *Molecular Plant Microbe Interactions* **26**, 1232-1238.
- Pollard T.D., Cooper J.A. (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 987- 1035.
- Pollard T.D., Blanchoin L., Mullins R.D. (2000): Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29**, 545- 76 78.
- Pollard T.D., Cooper J.A. (2009): Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* **326**, 1208- 1212.
- Popp C., Ott T. (2011): Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 458-467.
- Purayannur S., Kumar K., Kaladhar V.C., Verma P.K. (2017): Phylogenomic analysis of MKKs and MAPKs from 16 legumes and detection of interacting pairs in chickpea divulge MAPK signalling modules. *Scientific Reports* **7**: 5026.
- Rasmussen C.G., Humphries J.A., Smith, L.G. (2011): Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 387-409.
- Rasmussen M.W., Roux M., Petersen M., Mundy J. (2012): MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**: 169.
- Rasmussen C.G., Wright A.J., Müller S. (2013) The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *The Plant Journal* **75**, 258- 269.
- Rayapuram N., Bigeard J., Alhoraibi H., Bonhomme L., Hesse A.m., Vinh J., Hirt H., Pflieger D. (2018): Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Shared and Specific Targets of *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6. *Molecular and cellular proteomics* **17**, 61- 80.
- Ren D., Liu Y., Yang K.Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S. (2008): A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* **105**, 5638- 5643.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621- 649.
- Ryu H., Cho H., Choi D., Hwang I. (2012): Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Molecules and Cells* **34**, 117-126.
- 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**, 17- 23.

- Samac D. A., Bucciarelli B., Miller S.S., Samuel Yang S., O'Rourke J.A., Shin S., Vance C.P. (2015): Transgene silencing of sucrose synthase in alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem vascular tissue suggests a role for invertase in cell wall cellulose synthesis. *BMC Plant Biology* **15**, 1- 13.
- Sampathkumar A., Lindeboom J.L., Debolt S., Gutierrez R., Ehrhardt D.W., Ketelaar T., Persson S. (2011): Live Cell Imaging Reveals Structural Associations between the Actin and Microtubule Cytoskeleton in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**, 2302- 2313.
- Sasabe M., Machida Y. (2012): Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**, 913- 918.
- Sauer M., Paciorek T., Benková E., Friml E. (2006): Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *Nature Protocols* **1**, 98- 103.
- Shoji T., Suzuki K., Abe T., Kaneko Y., Shi H., Zhu J.K., Rus A., Hasegawa P.M., Hashimoto T. (2006): Salt Stress Affects Cortical Microtubule Organization and Helical Growth in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 1158- 1168.
- Sieberer B.J., Timmers A.C.J., Lhuissier F.G.P., Emons A.M.C. (2002): Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiology* **130**, 977- 988.
- Sielberer B.J., Timmers A.C.J., Emons A.M.C. (2005): Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1195–1204.
- Singla P., Garg N. (2017): Plant Flavonoids: Key Players in Signaling, Establishment, and Regulation of Rhizobial and Mycorrhizal Endosymbioses. In: *Mycorrhiza - Function, Diversity* (Varma A., Prasad R., Tuteja N., eds.), State of the Art. Springer, Cham., 133-176.
- Směkalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Smertenko A., Franklin-Tong V.E. (2011): Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* **18**, 1263- 1270.
- Smertenko A., Assaad F., Baluška F., Bezanilla M., Buschmann H., Drakakaki G., Hauser M. T., Janson M., Mineyuki Y., Moore I., Müller S., Murata T., Otegui M. S., Panteris E., Rasmussen C., Schmit A.C., Šamaj J., Samuels L., Staehelin L.A., Van Damme D., Wasteneys G., Žárský V. (2018): Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends in Cell Biology* **27**, 885- 894.
- Smimova E.A., Bajer A.S. (1992): Spindle poles in higher plant mitosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **23**, 1-7.
- 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. *The Plant Physiology* **145**, 183-191.
- Smith L. G. (1999): Divide and conquer: cytokinesis in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 447–453.
- Staiger C.J. (2000): Signalling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 257- 288.
- Staiger C. J., Blanchoin L. (2006): Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 554-562.
- Staiger C. J., Poulter N. S., Henty J. L., Franklin-Tong V. E., Blanchoin L. (2010): Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1969-1986.
- Steedman H.F. (1957): Polyester wax; a new ribboning embedding medium for histology. *Nature* **179**:1345.
- Suliman S., Schulze J. (2010): The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 683- 692.

- Suzaki T., Ito M., Kawaguchi M. (2013): Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Frontiers in Plant Science* **4**:42.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavačka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal* **21**, 3296-3306.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140- 148.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2014): Immunofluorescent Localization of MAPKs and Colocalization with Microtubules in Arabidopsis Seedling Whole-Mount Probes. *Methods in Molecular Biology* **1171**, 107- 115.
- Takemoto D., Hardham A.R. (2004): The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. *Plant Physiology* **136**, 3864- 3876.
- Timmers A.C.J., Auriac M.C., de Billy F., Truchet G. (1998): Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* **125**, 339- 349.
- Timmers A.C.J., Auriac M.C., Truchet G. (1999): Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617- 3628.
- Timmers A.C.J. (2008): The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy* **231**, 247- 256.
- Truchet G. (1978): Monosomatic state of meristematic cells of leguminous root modules. *Annales Des Sciences Naturelles Botanique Et Biologie* **19**, 3- 38.
- Van Noorden G.E., Ross J.J., Reid J.B., Rolfe B.G., Mathesius U. (2006): Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules mutant. *The Plant Physiology*. **140**, 1494- 1506.
- Vantard M., Levilliers N., Hill A.M., Adoutte A., Lambert A.M. (1990): Incorporation of *Paramecium* axonemal tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8825-8829.
- Vasse J., De Billy F., Camut S., Truchet G. (1990): Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology* **172**, 4295- 4306.
- Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A., Kevei Z., Horvath G. (2003): Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *The Plant Cell* **15**, 2093- 3105.
- Vissenberg K., Fry S.C., Verbelen J.P. (2001): Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **127**, 1125- 35.
- Vitha S., Baluška F., Mews M., Volkmann D. (1997): Immunofluorescence detection of F-actin on low melting point wax sections from plant tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**, 89- 95.
- Wang C., Zhang L.J., Huang R.D. (2011): Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 29- 31.
- Wang Q., Liu J., Zhu H. (2018): Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-*Rhizobium* Interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**:313.
- Wasteneys G.O., Galway M.E. (2003): Remodelling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 691- 722.
- Weerasinghe R.R., Collings D.A., Johannes E., Allen N.S. (2003): The distributional changes and role of microtubules in Nod factor-challenged *Medicago sativa* root hairs. *Planta* **218**, 276- 287.
- Wick S.M. (1991): The preprophase band. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form* (CW Lloyd, ed.) Academic Press, London, 231-244.
- Williamson R.E. (1991): Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. *International Review of Cytology* **29**, 135-206.

- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**, 56- 64.
- Yokota K., Fukai E., Madsen L.H., Jurkiewicz A., Rueda P., Radutoiu S., Held M., Hossain M.S., Szczyglowski K., Morieri G. (2009): Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* **21**, 267- 284.
- Zepeda I., Sanchez-Lopez R., Kunkel J.G., Banuelos L.A., Hernandez-Barrera A., Sanchez F., Quinto C., Cardenas L. (2014): Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing *Phaseolus vulgaris* root hair cells and their responses to *Rhizobium etli* Nod factors. *Plant and Cell Physiology* **55**, 580- 592.
- Zhang J., Guo W.H., Wang Y.L. (2014): Microtubules stabilize cell polarity by localizing rear signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16383- 816388.
- Zhang R., Alushin G.M., Brown A., Nogales E. (2015): Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *The Cell* **162**, 849- 859.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AF	aktinová filamenta
CCaMK	vápníkem aktivovaná kináza
CE	kortikální endodermis
CRE1	Cytokinin Response 1
DMI2	DOES NOT MAKE INFECTIONS 2
ENOD	EARLY NODULATION
ERN1	ERF Required for Nodulation 1
ERN2	ERF Required for Nodulation 2
F- aktin	filamentární aktin
G- aktin	globulární aktin
IC	vnitřní kortex
ITs	infekční vlákna
KASH	Klarsicht/ANC-1/Syne Homology
<i>L. japonicus</i>	<i>Lotus japonicus</i>
LINC	komplex jaderného skeletu a cytoskeletu
LjSIP2	MAPKK z <i>L. japonicus</i>
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
MAPK, MPK	mitogen- aktivovaná protein kináza
MAPKK, MKK, MEK	mitogen- aktivovaná protein kináza kináza
MAPKKK, MEKK	mitogen- aktivovaná protein kináza kináza kináza
MAPs	s mikrotubuly asociované proteiny
MMK3	mitogen- aktivovaná protein kináza 3 z <i>M. sativa</i>
MPK3	mitogen- aktivovaná protein kináza 3
MPK4	mitogen- aktivovaná protein kináza 4
MPK6	mitogen- aktivovaná protein kináza 6
MT	mikrotubuly
MTOCs	mikrotubuly organizující centra
NF	nod faktor
NIN	NODULE INCEPTION
NLPs	NIN podobné proteiny
NSP1	Nod Factor Signaling Pathway 1
NVB	vaskulární svazky vnitřního kortexu
NVT	vaskulární pletivo

OC	vnější kortex
<i>P. sativum</i>	<i>Pisum sativum</i>
PAMPs	s patogeny asociované molekulární vzory
PB1	Phox and Bem1
PITs	preinfekční vlákna
PPB	preprofázní svazek
PRR	receptory rozpoznávající vzory
RLKs	receptorům podobné kinázy
RSY	kultivar Regen SY
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SIMK	stresem indukovaná MAPK
<i>SIMKK RNAi</i>	transgenní linie stresem indukované MAPKK s potlačenou expresí proteinu SIMKK metodou RNA interference
SIMKK	stresem indukovaná MAPKK
SUN	Sad1/UNC-84
SUNDN	dominantně negativní SUN proteiny
SymRK	symbiotická receptorová kináza
VE	vaskulární endodermis