

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Organizace cytoskeletu u vojtěšky (*Medicago sativa* L.) při interakci s prospěšnými mikroorganismy**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Natálie Svobodová**

Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství

Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Olga Šamajová, Dr.**

Rok: 2023

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

V Olomouci dne 9.5.2023

.....  
Podpis studenta

Děkuji vedoucí své bakalářské práce Mgr. Olze Šamajové, Dr., za vstřícnost, trpělivost a odborné konzultace. Děkuji také Bc. Emě Heffnerové za spolupráci a rady v laboratoři. Stejně tak můj dík patří všem zaměstnancům KBT, zejména vedoucímu katedry prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. za umožnění práce v laboratoři.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Natálie Svobodová
Název práce	Organizace cytoskeletu u vojtěšky ( <i>Medicago sativa</i> ) při interakci s prospěšnými mikroorganismy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je autotetraploidní rostlina patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Je jednou z nejvíce pěstovaných píceňin na světě a hraje důležitou úlohu v ekosystému a udržitelném zemědělství. V *in vitro* podmínkách lze vojtěšku získat pomocí somatické embryogeneze. Vojtěška se vyznačuje silným křovitým kořenem vytvářejícím vhodné podmínky pro výskyt a růst mikroorganismů. Jedním z mikroorganismů vyskytujících se v tomto prostředí je *Pseudomonas fluorescens*. Je to saprofytická nepatogenní gramnegativní tyčinkovitá rhizobakterie podporující růst rostlin. Rostlinám pomáhá produkcí sideroforů a sekundárních metabolitů, včetně antibiotik a kyanovodíku. Mikroorganismy mohou ovlivnit organizaci cytoskeletu rostlin, který se podílí na základních buněčných procesech v buňce. Skládá se z aktinových mikrofilament, mikrotubul a asociovaných proteinů.

Cílem této bakalářské práce bylo v *in vitro* podmínkách reprodukovat rostliny tolíce vojtěšky pomocí přímé i nepřímé somatické embryogeneze, následně navodit interakci s prospěšnými mikroorganismy *P. fluorescens* a poté sledovat fenotyp kořenového systému a organizaci mikrotubulárního cytoskeletu.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , cytoskelet, mikroorganismy podporující růst rostlin, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , imunolokalizace, fenotyp rostlin, kořenový fenotyp
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Natálie Svobodová
Title	Cytoskeleton organization in alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) during interaction with beneficial microorganisms
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2023

### Abstract

*Medicago sativa* L., commonly known as alfalfa, is an autotetraploid plant belonging to the Fabaceae family. It is one of the most widely cultivated forage crops in the world and plays an important role in ecosystem and sustainable agriculture. In vitro, alfalfa can be obtained through somatic embryogenesis. Alfalfa is characterized by a strong taproot that creates suitable conditions for the occurrence and growth of microorganisms. One of the microorganisms present in this environment is *Pseudomonas fluorescens*. It is a saprophytic, non-pathogenic gram-negative rod-shaped rhizobacterium that supports plant growth. It helps plants by producing siderophores and secondary metabolites, including antibiotics and cyanide. Microorganisms can affect the organization of the plant cytoskeleton, which is involved in fundamental cellular processes. It is composed of actin microfilaments, microtubules, and associated proteins.

The aim of this bachelor's thesis was to reproduce alfalfa plants in vitro using direct and indirect somatic embryogenesis, then induce interaction with beneficial microorganisms *P. fluorescens* and observe the phenotype of the root system and organization of the microtubular cytoskeleton.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , cytoskeleton, plant growth promoting microorganisms, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , immunolocalization, plant phenotype, root phenotype
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>3</b>
2.1.	Tolice vojtěška.....	3
2.2.	Somatická embryogeneze.....	5
2.3.	Mikroorganismy podporující růst rostlin.....	8
2.3.1.	Využití PGPM a PGPR .....	9
2.3.2.	<i>Pseudomonas</i> .....	10
2.3.3.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	13
2.4.	Cytoskelet rostlin.....	14
2.4.1.	Mikrotubuly.....	15
2.4.2.	Aktinový cytoskelet .....	17
2.4.3.	Buněčné dělení.....	18
2.4.4.	Zobrazení mikrotubul a mikrovláken.....	19
2.5.	Imunohistochemické a histochemické metody.....	19
2.5.1.	„Whole mount“ metoda.....	20
2.5.2.	„ClearSee“ metoda .....	20
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>22</b>
3.1	<b>Materiál</b> .....	<b>22</b>
3.1.1	Biologický materiál .....	22
3.1.2	Chemikálie .....	22
3.1.3	Roztoky a média .....	23
3.1.4	Přístroje .....	28
3.1.5	Software .....	29
3.2	<b>Metody</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Příprava kultivačních médií .....	29
3.2.2	Somatická embryogeneze .....	29
3.2.3	Příprava bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	30
3.2.4	Fixace kořenů <i>M. sativa</i> .....	31
3.2.5	Imunoznačení „Whole mount“.....	31
3.2.6	Příprava zalévacího média.....	32
3.2.7	Mikroskopické pozorování vzorek.....	32
3.2.8	Fenotypová analýza kořenových špiček <i>M. sativa</i> pomocí ClearSee metody .....	33
3.2.9	Fenotypová analýza <i>M. sativa</i> po inokulaci <i>P. fluorescens</i> .....	33
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>35</b>
4.1	<b>Somatická embryogeneze</b> .....	<b>35</b>
4.1.1	Přímá SE.....	35
4.1.2	Nepřímá SE .....	39
4.2	<b>Imunohistochemické značení mikrotubul u <i>M. sativa</i></b> .....	<b>41</b>
4.2.1	Whole mount metoda.....	41
4.2.2	Orientace kortikálních mikrotubulů u <i>M. sativa</i> .....	42
4.3	<b>Fenotypová analýza</b> .....	<b>49</b>
4.3.1	Porovnání fenotypu kořenových špiček .....	49
4.3.2	Porovnání kořenového systému po desetidenní inkubaci s bakteriemi <i>P. fluorescens</i> .....	50
<b>5</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>54</b>

<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>67</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

1. Vypracování literární rešerše na téma cytoskelet rostlin, mechanismy vlivu prospěšných mikroorganismů na růst rostlin, imunohistochemické metody.

### **Praktická část**

1. Fenotypová analýza transgenních linií vojtěšky (*Medicago sativa* L.) při interakci s prospěšnými mikroorganismy rodu *Pseudomonas* v *in vitro* podmínkách.
2. Imunohistochemické studium lokalizace cytoskeletu u vojtěšky při interakci s *Pseudomonas*.



## 1 ÚVOD

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je autotetraploidní kvetoucí rostlina patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Je to jedna z nejproduktivnějších a nejpěstovanějších luštěnin s vysokým obsahem bílkovin. Zralá rostlina se vyznačuje silným křovinatým kořenem, který vytváří vhodné prostředí pro růst mikroorganismů díky produkci chemických exsudátů. Vojtěška má přirozeně vysoký obsah vitamínů, proteinů a enzymů. Proto se pěstuje jako krmivo pro zvířata, jako léčivo, surovina pro výrobu biopaliva a ethanolu a za účelem zlepšování vlastností půdy.

Somatická embryogeneze je morfogenetický děj, ve kterém jakákoli somatická buňka má schopnost produkovat celou rostlinu bez splynutí gamet. Rostliny vzniklé somatickou embryogenezí (SE) se pěstují na kultivačních médiích obohacených o růstové hormony, aminokyseliny, vitamíny, makro- a mikro-elementy. Rozlišují se dva druhy SE, přímá a nepřímá. Rostlinné explantáty u nepřímé SE procházejí dediferenčním stádiem a následnou tvorbou kalusu, na nichž se následně začínají tvořit embrya. U přímé SE se embrya indukují ze somatických buněk v organizovaném pletivu, které má embryonální schopnost, nevzniká stádium kalusu.

Mikroorganismy podporující růst rostlin mají vliv na klíčení semen, výživu, choroby a produktivitu rostlin. Rostliny jsou neustále vystaveny působení abiotického a biotického stresu, a proto jejich přežití závisí na jejich schopnosti rychle upravit svou fyziologii, vývoj a růst. V tom jim pomáhají prospěšné mikroorganismy, které prostřednictvím biochemických procesů zlepšují dostupnost některých živin z půdy, které nejsou pro rostlinu volně a snadno přístupné. Bakterie žijící v rhizosféře se vyznačují tvorbou biofilmu okolo kořenových systémů v místě produkce kořenových exsudátů rostlinou. Pomáhají tolerovat stres pomocí různých přímých či nepřímých mechanismů a zároveň brání rostlinu před patogeny a nemocemi.

*Pseudomonas* jsou aerobní, gramnegativní všudypřítomné bakterie patřící do třídy proteobakterií. Produkují fytohormony (kyselinu indol-3-oxalovou, cytokininy, gibbereliny, ethylen), které jsou považovány za jeden z hlavních mechanismů podpory růstu rostlin. Působí jako biokontrolní činidlo a navozují systémovou rezistenci vůči rostlinným onemocněním.

*Pseudomonas fluorescens* je saprofytická nepatogenní rhizobakterie podporující růst rostlin, potlačující choroby rostlin produkcí sideroforů a sekundárních metabolitů, včetně antibiotik a kyanovodíku. Vyskytují se v půdě, ve vodě i na povrchu rostlin. Detekovat je

lze díky fluorescenční sloučenině pyoverdinu, který bakterie vylučují a slouží jako siderofor.

Cytoskelet rostlinných buněk je organizován do trojrozměrné dynamické sítě složené z aktinových mikrofilament, mikrotubul a asociovanými proteiny. Podílí se na základních buněčných procesech. Mikrotubuly jsou hlavní dutou složkou cytoskeletu. Hrají klíčovou roli v buněčném cyklu, při buněčném dělení a přenosu informace. V dělicích se buňkách mikrotubuly přímo přispívají k tvorbě mitotického vřeténka, preprofázního svazku a fragmoplastu. Podílejí se také na růstu rostlinných buněk, od toho se pak odvíjí jejich uspořádání.

Imunohistochemické metody jsou metody, pomocí kterých lze lokalizovat různé proteiny během vývoje rostlin. Imunofluorescenční značení je jednou z používaných metod fluorescenčního zobrazení buněčných struktur. Principem je afinitní vazba sekundárních protilátek značených fluoroforem na primární protilátku na určitém epitopu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1. Tolice vojtěška

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.), známá také pod názvem „alfalfa“, je autotetraploidní víceletá kvetoucí modelová rostlina pocházející z Asie a patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*) (Blondon *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2012). Je to jedna z nejproduktivnějších a nejpěstovanějších luštěnin s vysokým obsahem bílkovin (Telekalo *et al.*, 2020). Pěstuje se celosvětově ve více než 80 zemích o celkové rozloze ~32 milionů hektarů (Bouton 2012; Havananda *et al.*, 2011). Roste na různých typech půd, nejčastěji však na dobře odvodněné hlinité půdě. V některých částech světa jsou některé její druhy zařazeny mezi ohrožené rostliny díky tomu, že se nevyskytuje na kyselých a přemokřených půdách (Rhodes, L. 2016).

Zralá rostlina se vyznačuje silným křovitým kořenem, který sahá do půdy mnohem hlouběji než u jiných plodin, a to většinou 3–5 metrů, což je výhodné mimo jiné i pro zpevňování půdy. V půdě se díky kořenovému systému tvoří mnoho kanálů, které podporují vstřebávání vody, zlepšení koloběhu živin, a to následně ovlivňuje růst plodin. Kořeny vojtěšky vytvářejí také vhodné prostředí pro růst mikroorganismů díky chemickým exsudátům vylučovaným kořeny. Vylučovaný exsudát na bázi polysacharidů působí také jako lubrikant pro lepší klouzání kořenů mezi částicemi v půdě a díky svému složení poskytuje výživu pro rhizobakterie (Synek *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2014).

Tolice vojtěška kvete v období od června do září a barva květů se liší od druhu. Květy mohou být fialové, žluté, krémové či bílé (Bora & Sharma, 2011). Výška rostliny dosahuje od 30 cm až do 1 metru. Listy nejsou přeměněny, na stonku jsou uspořádány střídavě a jejich tvar je složený trojčetný. Květy, s jednou rovinou souměrnosti, mají volně srostlé květní obaly tvořené kalichem a korunou. Typem květenství u vojtěšky je hrozen čítající 12-15 květů. Plody jsou suché lusky s hnědou nebo šedou barvou, které se šíří autochorií (Chytrý *et al.*, 2021; Pladias – databáze české flóry a vegetace, [www.pladias.cz](http://www.pladias.cz)).

Vojtěška je významná i fixováním vzdušného dusíku. Dusík je jedním ze základních stavebních prvků pro stavbu rostlinných bílkovin i pro stavbu lidských proteinů. Fixace dusíku může být uskutečněna například symbiózou mezi vojtěškou a bakterií *Sinorhizobium meliloti*, která se nachází v hlízkách kořenů. Díky vlastní fixaci dusíku vojtěška nevyžaduje žádné dusíkaté hnojivo pro svůj optimální růst (Baldacci-Cresp *et al.*, 2012; Triboi & Triboi-Blondel, 2014).

Vojtěška je cenná pro přirozeně vysoký obsah vitamínů. Z vitamínů to jsou B, A, D, E, K a z minerálů vápník, kyselina listová, železo, hořčík, draslík. Vyznačuje se i vysokým obsahem proteinů, enzymů (amyláza, koaguláza, peroxidáza, lipáza) antioxidantů a fytofarmaceutických látek (Bora & Sharma, 2010).

Pěstuje se za účelem zlepšování půdy, díky mohutným kořenům nedochází k častým erozím, jak již bylo zmíněno. Široce se také používá jako surovina pro výrobu biopaliv a ethanolu (Fu *et al.*, 2015; Bora & Sharma, 2011). Dále se používá jako krmivo pro zvířata a má i léčebné použití. Jak vyplývá ze studie Jomezai *a et al.* (2019), vojtěška by mohla mít přímou souvislost se snižováním cholesterolu. V léčbě se podává ve formě extraktů z klíčků, listů a kořenů. Klíčky vojtěšky se často konzumují se zeleninou jako zeleninový salát. Její listy a semena se zpracují a prodávají se jako kapsle, tablety nebo čaje v obchodech se zdravou výživou (Hong *et al.*, 2009). Vojtěška se řadí i mezi homeopatika podávané při poruchách centrálního nervového a trávicího systému. Je protizánětlivá a její další využití má i na zlepšení paměti, kašle, bolesti ledvin a svalů (Bora & Sharma, 2011; Jomezai *et al.*, 2019).

Genom vojtěšky má velikost 800-1000 Mb a není zatím kompletně osekvenovaný. Vojtěška je autotetraploid, který má 32 (2n) chromozomů (Blondon *et al.*, 1994). V posledních letech bylo vyvinuto začlenění transgenních znaků do genomu vojtěšky, ve snaze zlepšit produktivitu a kvalitu plodin. Například transgenní linie vojtěšky se sníženým obsahem ligninu při využití pro krmné účely zvířat zlepšují stravitelnost této cenné biomasy (Barros *et al.*, 2019). Nejčastěji používané transgenní linie pro vědecké účely jsou SIMKKi (solným stresem indukovaná mitogenem aktivovaná kináza kináza) a SIMKi (solným stresem indukovaná mitogenem aktivovaná kináza). Vznikají potlačením exprese *SIMK* nebo *SIMKK* metodou *RNAi*. Pro porovnání s *RNAi* liniemi se využívá také linie GFP-SIMK nadexprimující *SIMK*, u které je také možné pozorovat lokalizaci a distribuci *SIMK* pomocí mikroskopie živých buněk (Hrbáčková *et al.*, 2021).

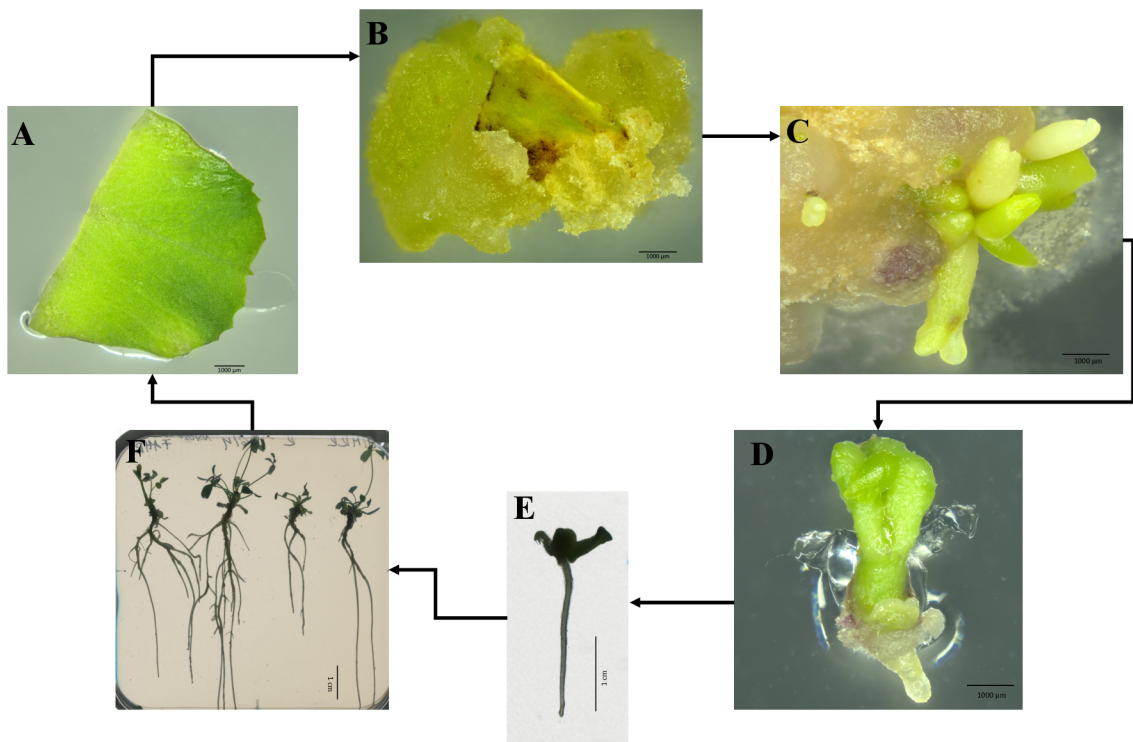
V roce 1989 byl představen hybrid *M. sativa* Regen-SY, který vznikl křížením rostlin první generace kultivarů Regen-S (*M. sativa*) a Regen-Y (*Medicago falcata*). Tento hybrid se vyznačuje zlepšenými regeneračními vlastnostmi (Seiler, 1991).

*Medicago truncatula* je součástí rodu *Medicago*. Používá se jako modelový organismus, díky svému malému (550 kb,) diploidnímu (2n=16) a kompletně osekvenovanému genomu. Rostlina pochází ze Středozeří a v zimě představuje rostoucí autogamní jednoletý druh plevelných druhů *Medicago*. Její květy jsou žluté barvy, lusky jsou malé, stočené a ostnaté. Zoubkování okrajů listů je charakteristické a zoubky jsou

střídavě velké. V Austrálii a oblasti Středomoří slouží jako důležitá krmná luštěnina (Küster, 2013).

## 2.2. Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze (SE) je morfogenetický děj, ve kterém jakákoli somatická buňka má schopnost produkovat celou rostlinu bez splynutí gamet (Fehér et al. 2003). Schopnost rostlinné buňky produkovat embrya závisí na její totipotenci, přičemž rostlinné buňky mají schopnost vytvářet nové kompletní rostliny (Germana a Lambardi 2016). SE zahrnuje vývoj somatického embrya, jako bipolární struktury, ze somatických buněk bez fáze gamet a oplodnění v *in vitro* podmínkách (Kim *et al.*, 2012). SE tedy umožňuje pohled na model raného vývoje rostlin experimentální cestou (Obr. 1) (Zimmerman, 1993).



Obrázek 1: Schematické znázornění postupu nepřímé somatické embryogeneze v *in vitro* podmínkách u Tolice vojtěšky (*M. sativa*).

Proces začíná výběrem a rozřezáním mladých listů umístěných na vhodné médium indukující tvorbu kalusu (A), masivní dělení buněk a tvorba kalusu na listovém explantátu na médiu obsahující hormony (B), tvorba somatických embryí na kalusu na médiu bez hormonů (C). V dalších krocích je pak vyžadováno médium bohaté na vitamíny a aminokyseliny podporující klíčení a vývin somatických embryí (D), která mohou být dále regenerována na kompletní rostliny na Murashige a Skoog médiu (MS) (E) a následně jsou rostliny přeneseny do půdy, nebo zachovány v *in vitro* podmínkách pro další cyklus nebo další experiment (F).

Somatická embrya jsou tedy geneticky totožná s rodičovskou rostlinou (Ausubel, 2005), připomínají zygotická embrya a procházejí podobnými stádii (Fras *et al.*, 2008; Winkelmann, 2016). Mezi tyto stádia se řadí: globulární, srdčité, torpédovité, v případě dvouděložných rostlin i kotyledonární. Jakmile se embrya dostanou do kotyledonární fáze, zahajuje se tvorba výhonků z meristému a začíná růst semenáčků (Yang & Zhang, 2010).

Při dalším porovnání somatického a zygotického vývojového stádia embrya, rozlišujeme dvě hlavní fáze. První probíhá na morfogenetické úrovni, kdy se spouští aktivita meristémů, je zahájen proces růstu a zrání. Druhá fáze je na úrovni metabolické, což je charakterizováno biochemickými aktivitami a přípravou tvorby semen. Somatické buňky obsahují celý soubor informací, důležitých a podstatných pro vytvoření a dokončení celé funkční rostliny. Dalším rozdílem mezi zygotickými a somatickými embryi, je přítomnost endospermu, který zygotickým embryím poskytuje živiny a růstové regulátory. Somatická embrya však endosperm neobsahují. Proto je u SE nutné do kultivačních médií přidávat růstové hormony a aminokyseliny pro podporu růstu a správného vývoje rostlin (Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Amini *et al.*, 2016; Merkle *et al.*, 1995; Sangra, Shahin & Dhir, 2019).

Do kultivačních médií se mohou přidat aminokyseliny, vitamíny, růstové regulátory, makro– a mikro-elementy a také zpevňující složky. Jejich přítomnost v médiu zvyšuje účinnost SE (Amini *et al.*, 2016).

Auxin je fytohormon indukující SE. Jeho vysoké koncentrace vedou k rozvoji kořenového primordia, což vede k vývoji kořenů. Syntetickým auxinem používaným pro SE je pak 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D). Cytokininy indukují tvorbu embryogenního kalusu a podporují tvorbu sekundárních embryí na bočních stranách primárního embrya. Mezi přírodní cytokininy patří zeatin, mezi syntetické analogy patří kinetin (KIN) a benzyladenin (BA). Kyselina abscisová (ABA) je hormon regulující syntézu a ukládání zásobních proteinů u SE. Mechanismus regulace genové exprese pomocí ABA zahrnuje translační kontrolu, zpracování transkriptu a stabilitu mRNA. Bylo zjištěno, že kyselina giberelová (GA) indukuje prodlužování buněk buněčného dělení, syntézu fotosyntetických pigmentů ve vyvíjejících se embryích. Tím se zlepšuje fotosyntetická schopnost rostliny, pomáhá skladovat sacharidy a podporuje klíčení *in vitro* (Joshi & Kumar, 2013).

Schopnost tvorby embryí přímé nebo nepřímé SE závisí na faktorech jako jsou například výše zmíněné fytohormony, dále proteiny a transkripční faktory (Joshi & Kumar, 2013).

Rostliny dokáží díky diferenciaci somatických buněk optimalizovat svůj růst a vývoj v závislosti na vnitřních a vnějších podmínkách. Zejména různé způsoby regenerace, jako je například reparace tkání, de novo organogeneze a SE, které zahrnují tvorbu proliferující pluripotentní buněčné hmoty, tzv. kalusu (Sugimoto *et al.*, 2011). Mezi epigenetické faktory ovlivňující regeneraci rostlin se řadí kondenzace chromatinu, methylace DNA a post-translační modifikace histonů. Každé somatické embryo je vytvořeno z jedné buňky (totipotentní buňky), ale mohou se odvozovat a tvořit i sekundární embrya na již vytvořených primárních embryích (Henderson & Jacobsen, 2007).

V *in vitro* podmínkách existují dva typy SE, přímá a nepřímá. U nepřímé SE se explantáty kultivují na pevném médiu v Petriho miskách. Buňky explantátu procházejí dediferenciačním stádiem a následnou tvorbou kalusu, než jsou schopné produkovat samostatná somatická embrya. Indukce embryogenních kalusů a tvorba somatických embryí se navodí kultivací na mediích bez hormonů. Přímá SE se indukuje ze somatických buněk v organizovaném pletivě, které mají embryonální schopnost. Explantáty, z kterých se odvodí suspenzní kultura se nechávají kultivovat v tekutém médiu v Erlenmeyrových baňkách a embrya se indukují z organizovaného pletiva bez fáze kalusu (Fowler *et al.*, 1998; Tichá *et al.*, 2020; Ausubel, 2005). Proces indukce přímé SE z listů vojtěšky se dá zkrátit přidáním polyetylen glykolu (PEG) do kultivačního média a tím se vynechá stadium kalusu (Denchev *et al.*, 1991).

U vojtěšky, na rozdíl od jiných rostlin, může být SE indukována ze všech částí rostliny, protože embryogenní potenciál regenerovatelných genotypů není závislý na typech explantátů. SE vojtěšky začíná výběrem a izolací explantátu, například povrchově sterilizovaným listem nebo stonkem z rostlin pěstovaných *in vivo*, nebo také stonkem a listem z *in vitro* pěstovaných rostlin, které jsou rozřezány na malé části a následně umístěny na/do vhodného média (Kao & Michayluk, 1980; Lu *et al.*, 1982; Dijak & Brown, 1987).

Obecně platí, že pomalejší růst a regenerace rostlin odvozených pomocí SE souvisí s nižším množstvím uvolněných zásobních proteinů a AMK u vyvinutých embryí (Lai, Lecouteux & McKersie, 1995; Lai & McKersie, 1994).

V roce 1984 Antassov a Brown popsali indukci kalusu z kotyledonů, hypokotylů a explantátů listů z vojtěšky na B5 médiu doplněného regulátory růstu. Je zjištěno, že kalus

vojtěšky po dvou až třech subkultivacích dále již netvoří embrya. K prodloužení SE vojtěšky se používá sekundární SE (Sangra, Shahin & Dhir, 2019). Během sekundární SE jsou nová somatická embrya tvořena z původních primárních somatických embryí. Ve srovnání s primární SE je účinnost explantátů v sekundární embryogenezi vyšší (Raemakers *et al.*, 1995).

Nevýhodou nepřímé SE vojtěšky je vznik somaklonální variability a také nutnost pokaždé odvozovat kalus z nového explantátu (Garcia *et al.*, 2019). Tento proces je časově velmi náročný, pracný, ale i nákladný. Navíc během kultivace v *in vitro* podmínkách může u explantátů vojtěšky dojít ke kontaminaci mikroorganismy, a to dále snižuje účinnost indukce SE nových kultur (Tian, Brown & Watson, 2002; Pereira & Erickson, 1995).

### **2.3. Mikroorganismy podporující růst rostlin**

Mikrobiální společenstva mají klíčový vliv na fungování rostlin, ovlivňují jejich fyziologii a vývoj. Mají vliv na klíčení semen, výživu, choroby a produktivitu rostlin (Mendes *et al.*, 2013). Na rostliny působí abiotický (sucho, horko, salinita) a biotický stres (býložravci, patogeny), a proto přežití rostlin závisí na jejich schopnosti rychle upravit svou fyziologii, vývoj a růst (Saad *et al.*, 2020).

Mikroorganismy podporující růst rostlin (PGPM), podporují jejich růst tím, že zlepšují dostupnost určitých živin z půdy, které nejsou pro rostlinu volně a snadno přístupné. Dostupnost zlepšují prostřednictvím biochemických procesů, jako jsou rozpustnost, mineralizace, oxidační a redukční reakce. Tyto procesy, které se odehrávají v rhizosféře, kde je vyšší dostupnost fosforu, draslíku, zinku, selenu a železa rostlinám (Koskey *et al.*, 2021).

Pouze 1-2 % bakterií jsou schopny podporovat růst rostlin v rhizosféře a nazývají se rhizobakterie podporující růst rostlin (PGPR) (Patten & Glick, 2002). V rhizosféře dochází k výživě a zároveň obraně rostliny. PGPR podporují růst rostlin a pomáhají tolerovat stres pomocí různých přímých či nepřímých mechanismů (Glick, 2012; Kaushal & Wani, 2016; Timmus *et al.*, 2017). Rhizobakterie se nejčastěji vyskytují u rostlin vylučujících kořenové exsudáty, které ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti okolní půdy. Exsudáty jsou složeny převážně z organických kyselin, vitamínů, jednoduchých cukrů, polysacharidů a také minerálních látek, jako je dusík a uhlík z mrtvých nebo



odumírajících kořenových vlásků (Bora & Sharma, 2011; Baldacci-Cresp *et al.*, 2012; Synek *et al.*, 2021).

Kořenové exsudáty rostlin neslouží pouze jako zdroj uhlíku pro půdní mikroorganismy, ale působí také jako signál k přitahování nebo odpuzování mikrobů. Složení kořenových exsudátů je druhově specifické a závisí na půdě, ve které se rostlina vyskytuje a také od výskytu a růstu hub a mikroorganismů v jejím okolí. Kořenová soustava rostlin nevylučuje exsudát všude stejně koncentrovaný, což vede k odlišnosti kolonizace bakterií podél kořene (Synek *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2014; Rudrappa *et al.*, 2008).

Poté, co se PGPR dostanou ke kořenovému systému mohou kompetentní kmeny bakterií vytvořit biofilm na povrchu kořenů rostlin a následně začít kolonizovat kořeny (Wheatley & Poole, 2018). Biofilmy umožňují bakteriím odolávat drsným podmínkám včetně vysychání a vysokým koncentracím toxických sloučenin (Danhorn & Fugua, 2007). Buňky bakterií se nejprve nespecificky a reverzibilně přichytí na povrch kořene nejčastěji pomocí bičíku nebo pílí. V pozdější fázi se začnou vázat specificky, a díky produkci kořenových polysacharidů nebo adhezivních proteinů, také irreverzibilně (Wheatley & Poole, 2018). Po přichycení se bakteriální buňky začnou množit a vytvářet kolonie. Bakterie se do rostliny dostávají pomocí přirozených „otvorů“ na rostlinném těle (například v místech přerůstání bočních kořenů, průduchy, anebo hydatodami) i přes kořenové vlásky, trichomy nebo rány způsobené patogeny, býložravci či hmyzem. Mnoho druhů PGPR produkují enzymy rozvolňující buněčnou stěnu rostlin tak, aby se do kořenových pletiv dostali aktivní cestou přes epidermis. Z enzymů PGPR využívají například celulózy, xylanázy, pektinázy a endo/exo-glukanázy. Některé druhy PGPR pak dokáží procházet endodermis a kolonizovat celé rostlinné tělo prostřednictvím rostlinných vodivých pletiv (Synek *et al.*, 2021).

Mezi převládající rody PGPR patří *Pseudomonas* spp. a *Bacillus* spp (Podile & Kishore, 2006).

### **2.3.1. Využití PGPM a PGPR**

Bakterie produkují metabolity, které mohou přímo zlepšit růst rostlin, nebo nepřímo minimalizují účinky půdních rostlinných patogenů, tzn. že slouží jako biokontrola (Patten & Glick, 2002). Mimo to snižují negativní dopady různého působení metabolických a fyziologických procesů, jako je bioremediace těžkých kovů (Oves *et al.*, 2017),

degradace/tolerance pesticidů a tolerance sucha a zasolení (Dubey & Fulekar, 2013; Daffonchio *et al.*, 2015). Interakce rostlinných mikrobů s rostlinou může být variabilní vůči změnám v ekosystému, fyzikálně-chemickým vlastnostem půdy, odpovědi hostitele, adaptaci a fyziologickému stavu bakterií (Eida *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2016; You *et al.*, 2016). Rozmanitost a vysoká koncentrace bakterií hraje důležitou roli pro podporu zdraví a vývoje rostliny při abiotickém stresu (Soussi *et al.*, 2016).

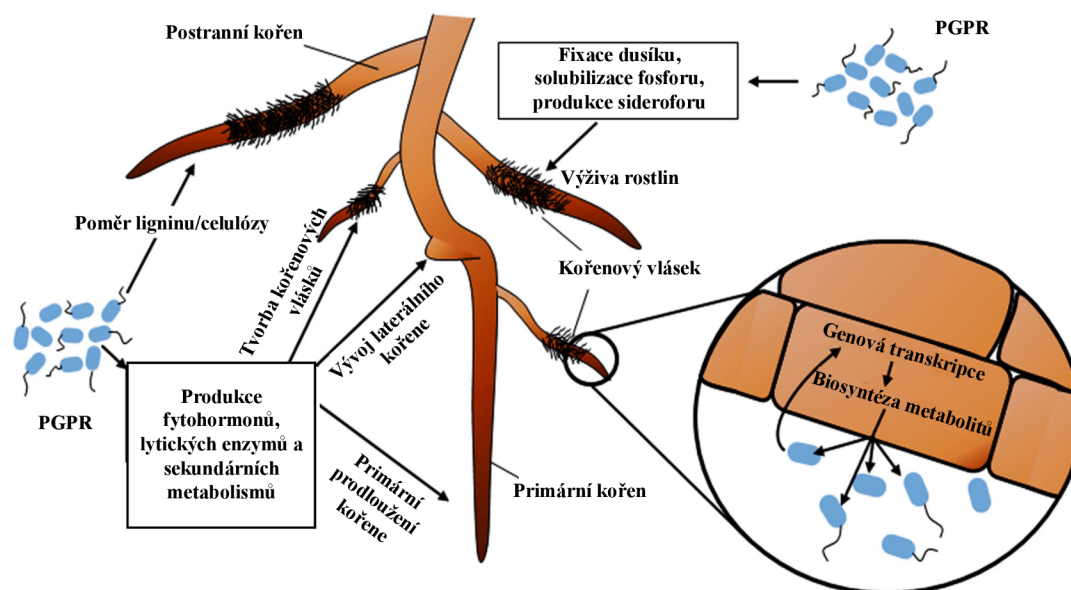
Nárůst lidské populace může mít negativní dopad v zemědělství a může být důvodem globálních problémů. Jako je například skleníkový efekt, nadměrné používání fosilních paliv, neustálé odlesňování, zvyšování globálních teplot, nedostatek sladkovodních zdrojů. (Mgbemene *et al.*, 2016). Všechny tyto problémy svým způsobem ovlivňují atmosféru i půdu a tím i pěstování a růst rostlin. Prospěšné mikroby mohou sloužit k podpoře růstu rostlin v dnešních podmínkách klimatických změn (Saad *et al.*, 2020).

Bakteriální a exogenní aplikace prospěšných chemických látek se používá ke zlepšení odolnosti, výnosu a tolerance rostlin vůči toxicitě a stresových podmínek. Například aplikace kyseliny jasmínové, chitosanu, kyseliny huminové, kyseliny gibberelové a dalších hormonů (Khan *et al.*, 2017; Bistgani *et al.*, 2017; Kasmani *et al.*, 2013; Shaddad *et al.*, 2013). I tyto chemikálie napomáhají dobrému fyziologickému stavu a adaptaci rostlin ve stresových podmínkách (Enebe & Babalola, 2018).

### **2.3.2. Pseudomonas**

*Pseudomonas* jsou aerobní, gramnegativní všudypřítomné bakterie. Patří k proteobakteriím do podtřídy gama (Selvakumar *et al.*, 2015). Hojně se vyskytují v půdách a vodním prostředí, kolonizují kořeny rostlin. Mnoho kmenů podporuje růst rostlin a slouží jako biologická kontrola proti různým rostlinným patogenům. Díky jejich schopnosti metabolizovat živiny, jejich rychlost a snadnost růstu v různém prostředí rostlin a půdy, z nich činí slibné organismy pro vývoj komerčních produktů biologické kontroly a biohnojiv (Roquigny *et al.*, 2017). Ty kmeny *Pseudomonas*, které se vyskytují v hojném množství v rhizosféře, podporují růst rostliny, například lepší kolonizací kořenů, produkcí enzymů a metabolitů, solubilizací živin, kyseliny indolactové (IAA) (Obr. 2). Působí jako biokontrolní činidlo a navozují systémovou rezistenci vůči nemocem (Podile & Kishore, 2006).

Bakterie *Pseudomonas* produkují fytohormony, které jsou považovány za jeden z hlavních mechanismů podpory růstu rostlin (Egamberdieva, 2005).



**Obrázek 2: Vliv PGPR na kořenový systém, získávání živin a fungování kořenů**  
 PGPR může modulovat vývoj a růst kořenů produkcí fytohormonů, sekundárních metabolitů a enzymů. Nejčastěji pozorovanými účinky PGPR je snížení rychlosti růstu primárního kořene a zvýšení počtu a délky postranních kořenů a kořenových vlásků. Rhizobakterie také ovlivňují výživu rostlin prostřednictvím fixace dusíku, solubilizace fosforu nebo produkce sideroforu a modifikují fyziologii kořenů změnou genové transkripce a biosyntézy metabolitů v rostlinných buňkách (Upraveno podle Vacheron *et al.*, 2013).

### 2.3.2.1. Produkce hormonů

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou chemickými posly, kteří ovlivňují schopnost rostliny reagovat na ně ve svém životním prostředí. Jsou to přírodní organické sloučeniny účinné při velmi nízké koncentraci, stimulující nebo inhibující růst rostlin. Syntetizují se většinou v určitých částech rostliny a transportují se do jiných míst v rostlině. Ovlivňují fyziologické procesy v nízkých koncentracích jako je růst, diferenciace a vývoj nebo i stomatální pohyb (Davies, 2013). Označují se také jako regulátory růstu rostlin, které se vytváří z PGPR (Obr 2). Mezi nejvíce projevované rostlinné hormony se řadí auxiny, ethylen, gibbereliny, kyselina abscisová (ABA) a cytokininy mohou dobře regulovat růst a vývoj rostlin (Kende *et al.*, 1997; Taiz & Zeiger, 2002). Rostlinné fytohormony mohou být produkovány i rhizobakteriemi, které tím podporují růst a vývoj rostlin.

#### 2.3.2.1.1. Kyselina indol-3-octová

Fytohormon auxin hraje roli v regulaci růstu rostlin a je produkován samotnými rostlinami. Bylo zjištěno, že většina bakterií žijící v rhizosféře, je schopna produkovat auxin indol-3-octovou kyselinu (IAA). Auxiny mohou mít jak prospěšné, tak škodlivé účinky na růst rostlin (Patten & Glick, 1996). Účinnost závisí na hladině IAA, kterou vyprodukuje rostlina samotná. Jestliže je hladina IAA nízká, může být přidání bakteriální

IAA pro kořeny rostlin prospěšné. Bakteriální IAA totiž podporuje tvorbu kořenových vlásků a zvyšuje počet a délku postranních a primárních kořenů. Pokud však rostlina produkuje sama osobě vysoké množství IAA, přidání bakteriální IAA může mít škodlivé účinky na délku kořene a inhibici růstu primárního kořene (Davies 1995; Persello-Cartiaux *et al.*, 2003).

#### **2.3.2.1.2. Cytokininy**

Cytokininy jsou N6-substituované aminopuriny sloužící jako regulátory růstu rostlin a ovlivňující mnoho fyziologických a vývojových procesů, jako například dělení buněk, klíčení semen, vývoj kořenového systému, akumulaci chlorofylu, expanzi listů a zpomalení stárnutí listů a chloroplastů. Tyto fytohormony jsou syntetizovány v kořenech rostlin a jsou transportovány přes xylém do výhonků, kde plní své funkce (Chernyad'ev II, 2009). Cytokininy mohou být produkovány i rhizosférickými mikroorganismy žijící v těsné blízkosti kořene rostlin a ovlivňují tak jejich růst a vývoj (De Salamone *et al.*, 2001). Po naočkování rostlin bakteriemi produkující cytokininy, se stimuluje růst výhonků a snižuje se poměr kořen/výhon u rostlin vystavených suchu (Arkipova *et al.*, 2007).

#### **2.3.2.1.3. Gibereliny**

Gibereliny (GA) jsou tetracycké diterpenoidní kyseliny produkované rostlinami. Ovlivňují vývojové procesy v rostlinách včetně prodlužování stonku, klíčení semen, růst květů a plodů (King & Evans, 2003). Produkce GA byla pozorována také u různých kmenů *Pseudomonas* spp. Například u *P. putida*, který díky produkci GA zvyšuje růst rýže a deficitem GA, pomáhá také rostlině tolerovat sucho a u sóji inhibuje stres ze soli (Kang *et al.*, 2014).

#### **2.3.2.1.4. Ethylen**

Ethylen je plynný fytohormon (identifikován také jako stresový hormon), který v nízké koncentraci reguluje růst, vývoj a stárnutí rostliny (Saleem *et al.*, 2007). Vysoké koncentrace mohou být pro rostliny škodlivé, mohou způsobit defoliaci, předčasné stárnutí a inhibovat růst stonků a kořenů tím, že ovlivňují buněčné procesy (Li *et al.*, 2005).

#### **2.3.2.1.5. Siderofor**

Železo patří mezi minerály volně přítomné na povrchu Země, avšak v půdě je nedostupné pro rostliny. V přírodě se běžně vyskytuje ve formě  $Fe^{3+}$ , která je vysoce nerozpustná pro rostliny. Problém s nerozpustností železa řeší PGPR vylučující siderofor. Siderofory jsou

nízkomolekulární proteiny vázající železo, zapojují se do procesu chelatace železitého železa z prostředí (Obr. 2) (Vejan *et al.*, 2016). Mezi nejvíce studované kmeny bakterií produkující siderofory patří *Pseudomonas* spp. Nejhojnější siderofor u *Pseudomonas* sp. je pyoverdin. Roquiny *et al.*, (2017) uvádí, že po inokulaci vojtěšky (*M. sativa* L.) *Pseudomonas* sp. v podmínkách omezeného přístupu železa zvýšila klíčivost a větší hmotnost sušiny kořene a stonku u naočkovaných semen.

### 2.3.2.2. Fluorescenční *pseudomonady*

Fluorescenční *pseudomonady* jsou funkční skupinou, která zahrnuje druhy *Pseudomonas*, které se vyznačují produkcí zelené fluorescenční sloučeniny známé pod názvem pyoverdin, což je siderofor (Cézard *et al.*, 2015). Pyoverdiny zachycují a dodávají železo do buněk rostliny. Mikrobiální siderofory tedy mohou zvýšit příjem železa rostlinami (Masalha *et al.*, 2000). Mezi fluorescenční *pseudomonady* patří fytopatogenní druhy pozitivní na cytochrom c oxidázu (*Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonad marginalis* a *Pseudomonas tolaasii*), nefytopatogenní kmeny, které nezpůsobují nekrózu rostlin (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* a *Pseudomonas aeruginosa*) a fytopatogenní kmeny způsobující nekrózu, neobsahují cytochrom c oxidázu (*Pseudomonas syringae* a *Pseudomonas viridiflava*) (Choudhary *et al.*, 2009).

Fluorescenční *pseudomonady* soutěží s rostlinnými patogeny o prostor a živiny, což snižuje onemocnění rostlin (Haas & Défago, 2005). Jednou z hlavních živin, která vede ke konkurenci je železo, kvůli jeho omezené dostupnosti v půdě. *Pseudomonady* soutěží o železo produkcí sideroforu, pyoverdinu, což by mohlo vést ke snížení železa pro patogenní organismy. Studie ukázaly, že siderofory mají schopnost biologické kontroly patogenních hub a podobných organismů včetně *Pythium* spp. a *Fusarium* spp. v *in vitro* a *in vivo* podmínkách (León *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2009).

### 2.3.3. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* je saprofytická nepatogenní rhizobakterie podporující růst rostlin a potlačující choroby rostlin. Vyskytuje se v půdě, ve vodě i na povrchu rostlin. Je to gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která vylučuje již zmíněnou fluorescenční sloučeninu pyoverdin (Cézard *et al.*, 2015). Většina jsou obligátními aeroby, některé kmeny přijímají NO<sub>3</sub> místo O<sub>2</sub>. *P. fluorescens* produkuje siderofor a sekundární metabolity, včetně antibiotik a kyanovodíku (Roquiny *et al.*, 2017). Hlavním

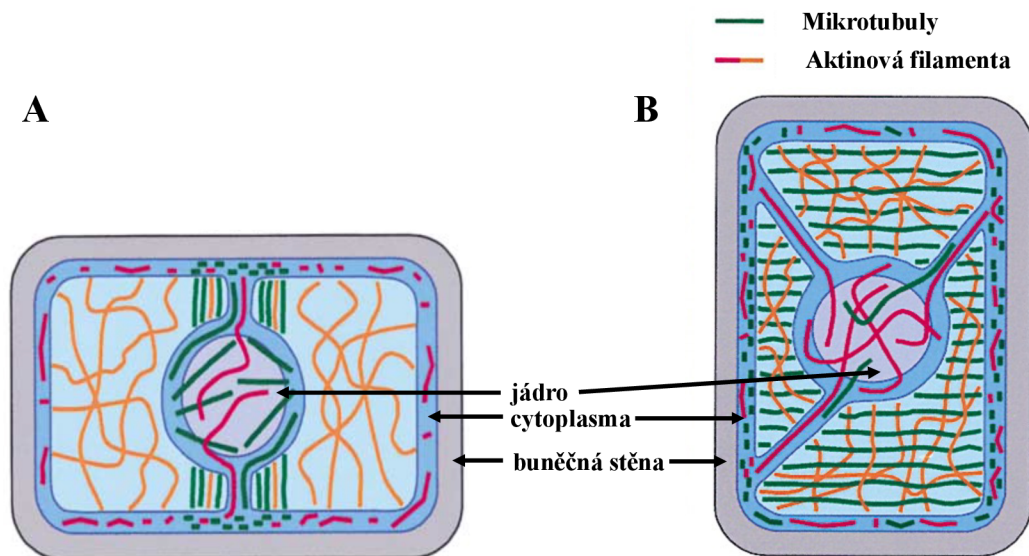
mechanismem účinku *P. fluorescens* je rychlá kolonizace prostřednictvím kompetitivního vyloučení patogenů, tím inhibuje patogeny v rhizosféře (Haas & Défago, 2005). Bakterie také působí jako prostředek biologické kontroly (Mohan *et al.*, 2023).

#### **2.4. Cytoskelet rostlin**

Cytoskelet rostlinných buněk je organizován do trojrozměrné dynamické sítě. Podílí se na základních buněčných procesech, jako je buněčné dělení, expanze a diferenciaci, buněčný transport, cytoplazmatické proudění, mezibuněčný transport, komunikace, přenos signálů a také odpovědi na podněty přicházející z vnějšího prostředí (Staiger, 2000; Petrášek a Schwarzerová, 2009; Komis *et al.*, 2015). Rostlinný cytoskelet se nachází ve vnitřním prostoru celé buňky a může být ve spojení s cytoplazmatickou membránou, jadernou membránou a organelami.

Cytoskelet slouží jako vnitřní podpůrná struktura buněk, udržuje buněčnou architekturu, vnitřní uspořádání organel a omezuje difúzi membránových proteinů. (Obr. 3) (Shaw, 2013). Cytoskelet sehraává důležitou roli ve vezikulárním transportu, napomáhá přenosu vezikul a organel a podílí se na tvorbě mitotického a cytokinetického aparátu (Obr. 4) (Takeuchi *et al.*, 2017; Petrášek a Schwarzerová, 2009).

Cytoskelet rostlinných buněk je reprezentovaný aktinovými mikrofilamenty, mikrotubuly a asociovanými proteiny. Mikrotubuly a aktinová mikrofilamenta tvoří bohatě rozšířené, nekovalentní, filamentózní polymery, které se vyznačují výrazně odlišnými velikostmi a zřetelnou intracelulární dynamikou (Komis *et al.*, 2015). Spojením jednotlivých vláken mikrotubulů nebo aktinových mikrofilamentů vznikají struktury vyššího řádu, jako například svazky a ortogonální sítě. Svazky a sítě mikrovláken a mikrotubul se v buňce neustále dynamicky mění, tvoří se nebo rozpadají, v závislosti na reakci na vnitřní a vnější podněty (Nick, 2013; Li *et al.*, 2015; Wang & Mao, 2019). Vytváří se mechanismem, kdy se z pomalu rostoucího konce (- konec) odstraňují monomery a k rychle rostoucímu konci (+ konec) se nové monomery přidávají (Fletcher & Mullins, 2010; Li *et al.*, 2015).

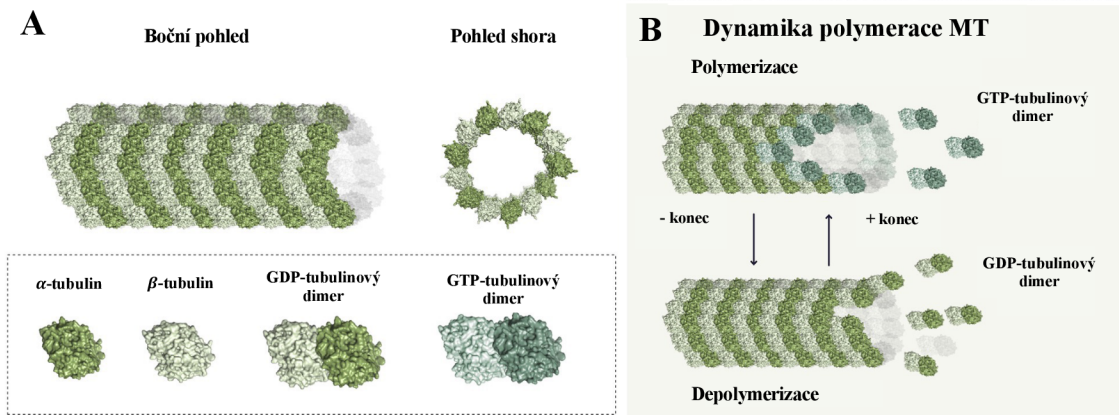


Obrázek 3: Schéma rostlinného cytoskeletu během profáze a interfáze  
Rostlinná buňka obsahující mikrotubuly a aktinová vlákna jak v cytoplasmatických oblastech, tak v jádře. A – cytoskelet v profázi; B – cytoskelet v interfázi (Upraveno podle Kost & Chua, 2002).

#### 2.4.1. Mikrotubuly

Mikrotubuly (MT) jsou hlavní dutou složkou cytoskeletu (Defeu Soufo & Graumann, 2004). Mají ústřední roli v mnoha biologických procesech, například jsou součástí buněčné signalizace, morfologie, pohybu a dělení buněk (Dustin, 1978). MT organizují síť, poskytující oporu pro vezikulární transport a umístění organel (Bonifacino & Neefjes, 2017). Klíčovou roli hrají v buněčném cyklu, při buněčném dělení, přenosu informace a intracelulárním transportu (Yue *et al.*, 2014). V dělicích se buňkách MT přímo přispívají k tvorbě mitotického vřetenka zajišťující stejné rozdělení chromozomů, také k tvorbě preprofázního svazku (PPB) a fragmoplastu (Rieder & Salmon, 1998). MT jsou složeny z 13 polarizovaných protofilamentů ( $\alpha/\beta$ -tubulinových dimerů) (Obr. 4A). Polymerace MT spočívá v přidávání  $\alpha/\beta$ -tubulinových dimerů na MT koncích (Obr. 4B) (Waterman-Storer & Salmon, 1997). Důležitou roli pro prostorovou a časovou regulaci dynamiky MT je množství MT-vazebných proteinů (Zhou & Giannakakou, 2005).

MT se podílejí na růstu rostlinných buněk. Uspořádání kortikálních MT v rychle rostoucích buňkách je horizontální, v pomalu rostoucích je šikmé nebo náhodné a v buňkách, které ukončili růst je vertikální. Orientaci MT ovlivňuje mnoho faktorů jako jsou např. světlo, působení depolymerizačních činidel (př. oryzalin, propyzamid) a stabilizátorů (taxol) (Porter & Day, 2016).



Obrázek 4: Schématické znázornění funkční role mikrotubulů (MT)

A – Struktura MT protofilamentu,  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinové podjednotky se skládají do heterodimeru.  
 B – Při polymeraci protofilament se přidávají tubulinové dimery na rostoucí + konec MT, kde je rychlejší dynamika ve srovnání s – koncem (Upraveno podle Eli *et al.*, 2022).

Na růstu rostlin se zároveň s MT podílejí růstové hormony, jako jsou auxiny a gibbereliny. MT a gibberelin regulují růst hypokotylů a MT s ABA regulují otevírání a zavírání průduchů (Porter & Day, 2016).



#### **2.4.1.1. Proteiny asociované s miktotubuly**

Rostlinné miktotubuly interagují s různými proteiny asociovanými s MT (MAPs). Lze je rozdělit na MT-síťovadla, MT + koncové vazebné proteiny (EB), regulátory dynamiky MT, motorické proteiny (Gardiner, 2013) a regulátory skládání tubulinu (Rodríguez-Milla & Salinas, 2009). Jejich funkcí je například síťování interfázních a cytokinetických MT v buněčném cyklu (MAP65-1 a 2) (Smertenko *et al.*, 2008), regulují organizaci paralelních kortikálních MT v rostoucích a diferencujících se rostlinných buňkách (MAP65-1) (Lucas & Shaw, 2012), dále regulují anizotropní buněčný růst (MAP70) (Korolev *et al.*, 2007). Mezi nejdůležitější funkce EB patří regulace spirálního růstu a reorganizace MT (Wang *et al.*, 2011).

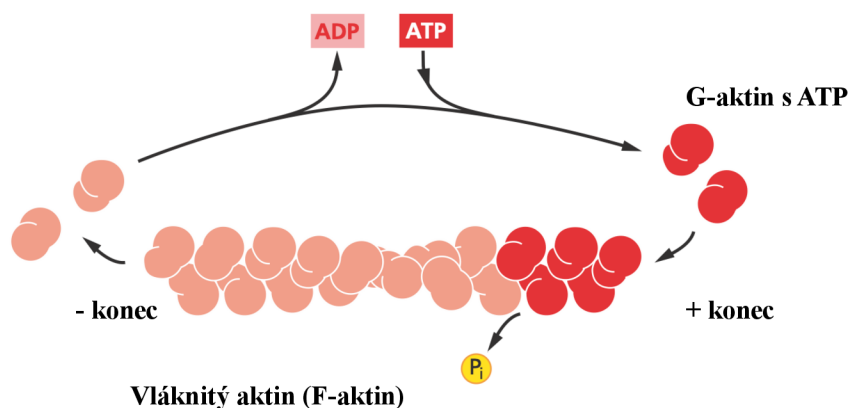
#### **2.4.2. Aktinový cytoskelet**

Eukaryotický aktinový cytoskelet je dynamická síť, jehož aktivita je řízena přísně regulovanými prostorovými a organizačními změnami v monomerním globulárním (G)- a vláknitým (F)-aktinu (Obr. 5) (Porter & Day, 2016). Aktinový cytoskelet je nezbytný pro funkci řady buněčných procesů, jako je například buněčné dělení, prodlužování buňky, stanovení buněčné polarity a pohybu, endocytóza, přenos vezikul a imunity, dále pak udržují morfologii buněk, transportují materiál, zajišťují apikální růst a přenos signálu (Porter & Day, 2016; He, Chen & Han, 2020).

##### **2.4.2.1. Aktin vázající proteiny**

Proteiny vázající aktin (ABP) mohou být klasifikovány jako aktin monomer vázající a/nebo uzavírající proteiny (globulární G-aktin vázající proteiny), regulátory F-aktin polymerace nebo depolymerace, aktinové mikrofilamentní síťovadla (F-aktin svazující proteiny) a myozinové motorické proteiny (McCurdy *et al.*, 2001). Nejznámějším proteinem vázajícím aktinový monomer je profilin. Indukuje depolymerizaci F-aktinu (Xue & Robinson, 2013). Bylo zjištěno, že jednou z jejich funkcí je prodlužování buněk (Fan *et al.*, 2013).

Některé proteiny mají duální funkce pro obě skupiny proteinů. Například v jednom případě jeden protein vykazuje afinitu jak pro MT, tak pro mikrovlákna a vykonává duální regulační funkce pro oba typy cytoskeletálních polymerů. V druhém případě jeden protein remodeluje stejný typ polymeru cytoskeletu, ale vykazuje různé aktivity ovlivňující cytoskelet. Rozmanitost proteinových aktivit odráží komplexní, různorodé



Obrázek 5: Schéma aktinového filamentu

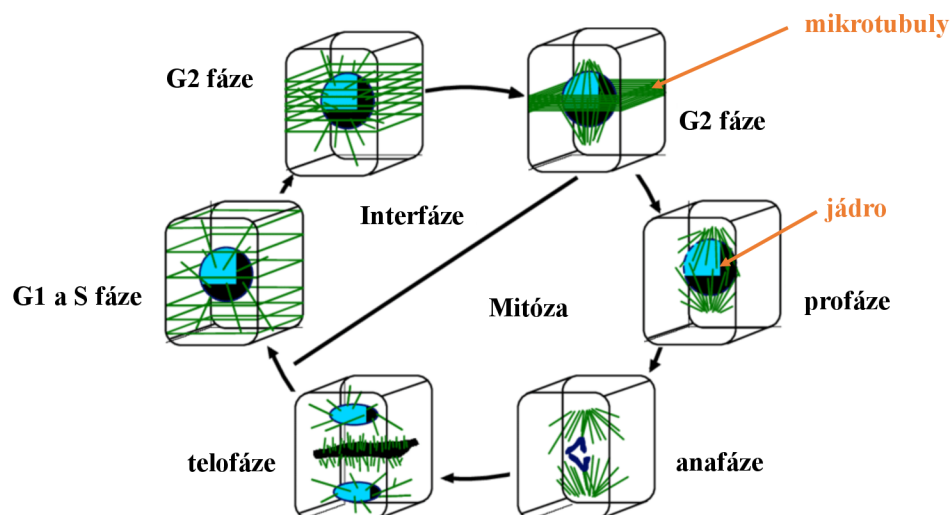
Aktinová vlákna se začnou tvořit, jestliže se tři G-aktinové proteiny samy spojí a vytvoří trimer, který se váže na + konec F-aktinu. Zdrojem energie pro proces skládání je adenosintrifosfát (ATP), který se hydrolýzou mění na adenosinmonofosfát (ADP). Molekuly ADP zůstávají zachyceny v aktinovém vláknu a nemohou se vyměňovat s ATP, dokud se monomer aktinu, který je nese, z vlákna neodstraní (Upraveno podle Alberts *et al.*, 2004).

mechanismy, které regulují cytoskelet v reakci na intracelulární a extracelulární signály (Lian *et al.*, 2021).

Mezi společné funkce MAP a ABP patří kontrola organizace, dynamiky a funkce cytoskeletu. MAP a ABP mění své aktivity v reakci na signální molekuly nebo prostřednictvím post-translační modifikace k zajištění správné prostorové a časové regulace dynamiky cytoskeletu (Lian *et al.*, 2021).

### 2.4.3. Buněčné dělení

Buňky rostlinných pletiv se dělí antiklinálně (kolmo k povrchu orgánu) v mediální rovině (Obr. 6). Kontrolu polohy rovin buněčného dělení zprostředkovává cytoskelet (Kost & Chua, 2002). Kortikální MT se na začátku mitózy shlukují do úzkého prstence kolem jádra a vytváří se PPB, který určuje rovinu buněčného dělení. Aktinový cytoskelet řídí polohu jádra, kolem kterého se vytváří PPB. PPB zcela mizí během karyokineze, která je zprostředkována mitotickým vřeténkem, tvořeném MT. Vřeténko se rozpadá po anafázi a vzniká fragmoplast, tvořený paralelními MT, který je zapojen do tvorby buněčné stěny (buněčné destičky) mezi nově vznikajícími dceřinými jádry během cytokineze (Nebenfuehr *et al.*, 2000). Buněčná destička dozrává a od středu k rodičovské buněčné stěně se rozpadá, a nakonec s ní splývá. Později v cytokinezi získává fragmoplast tvar



Obrázek 6: Schéma mitózy a interfáze rostlinných buněk

Mikrotubulová pole během buněčného cyklu u vyšších rostlin. Během interfáze jsou mikrotubuly sestaveny v kortikální oblasti a jaderném obalu. V G2 fázi se tvoří preprofázní pás, zatímco počet jaderných mikrotubulů se zvyšuje. Během mitózy se sestaví vřetenka a separují se chromozomy a následuje tvorba fragmoplastových mikrotubulů v telofáze (Upraveno podle Canaday *et al.*, 2004).

kruhového prstence, který je spojen s okrajem expandující buněčné destičky (Kost & Chua, 2002).

#### 2.4.4. Zobrazení mikrotubul a mikrovláken

Snadné zobrazení mikrotubul a filamentózního aktinu (F-aktin) v živých rostlinných buňkách lze nyní docílit pomocí řady konstruktů zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) s využitím laserového konfokálního mikroskopu. Často se zobrazování živých buněk provádí na vzorcích, které jsou upevněny na podložním sklíčku překryty krycím sklíčkem. Tato metoda mikroskopování může vést k poškození buněk, protože se mohou během přípravy mikroskopického preparátu buňky v důsledku tlaku rozbít nebo během dlouhodobého zobrazování mohou vzorky vyschnout (Chai, Chin & Blancaflor, 2022).

#### 2.5. Imunohistochemické a histochemické metody

Imunohistochemické a histochemické metody jsou metody, pomocí kterých lze lokalizovat různé proteiny nebo jiné chemické látky během vývoje rostlin. Analýza na histologické, buněčné a subcelulární úrovni by mohla pomoci objasnit proteinovou funkci, interakci a aktivitu v metabolismu a dějích v různých tkáních v rostlinných strukturách (Molero *et al.*, 2019).

Imunofluorescenční značení je metoda fluorescenčního zobrazení buněčných struktur pomocí afinitní vazby sekundárních protilátek značených fluoroforem na primární protilátku na určitém epitopu (Šamajová *et al.*, 2014). Tato metoda umožňuje lepší prostorové rozlišení, je relativně rychlá a umožňuje vysoké rozlišení při mikroskopování vzorků bez nutnosti nativních preparátů (Komis *et al.*, 2018).

### 2.5.1. „Whole mount“ metoda

Technika imunofluorescenčního značení whole mount byla vytvořena především pro lokalizaci epitopů komplexních rostlinných tkání a orgánů (Pasternak *et al.*, 2015; Šamajová *et al.*, 2014). Pracuje se s fixovanými vzorky, které jsou dalšími kroky upraveny. Mezi zásadní kroky patří chemická fixace, trávení buněčné stěny, membránová permeabilizace, blokování a inkubace s primárními a sekundárními protilátkami (Tichá *et al.*, 2020).

Správná fixace se vyznačuje vhodným složením fixačního roztoku a rychlou penetrací vakuovou infiltrací vzorku. K fixaci se používá roztok paraformaldehydu nebo glutaraldehydu. Glutaraldehyd však může způsobovat nežádoucí autofluorescenci (Collins & Goldsmith, 1981). K natrávení buněčných stěn se používají enzymy, které umožňují degradaci buněčné stěny a proniknutí protilátek do pletiv a buněk. Membránovou permeabilizaci zajišťují neiontové detergenty, vytvářející póry v membráně. Nespecifická vazba protilátek je zamezena zablokováním vzorku před inkubací primární protilátkou, například roztokem hovězího sérového albuminu (BSA). Vzorky jsou následně přeneseny na sklíčko a jsou z nich připraveny trvalé preparáty použitím zalévacího média (Pasternak *et al.*, 2015; Šamajová *et al.*, 2014).

### 2.5.2. „ClearSee“ metoda

Jednou z používaných metod pro histochemické značení rostlinných orgánů je metoda "clearing". Tato metoda se používá ke zprůhlednění pletiv pro zkoumání buněk *in situ*. Mezi clearing metody patří metoda ClearSee, která odstraňuje barvy, včetně chlorofylů (Hasegawa *et al.*, 2016). Metoda dokáže zviditelnit fluorescenční proteiny v listech, kořenech, pestících a květech. Po inkubaci při 37 °C po dobu 10 dnů až 3 týdnů jsou preparáty dostatečně "čisté" pro aplikaci barviv a analýzu rostlinných struktur a organel (Nagaki, Yamaji & Murata, 2017). Pro vizualizaci buněčných struktur uvnitř rostlinných orgánů lze použít fluorescenční barviva rozpustná v clearsee roztoku (Ursache, 2018). Barvivo calcofluor white se selektivně váže na buněčné stěny složené z celulózy nebo

jiných  $\beta$ -1,4-vázaných sacharidů a vizualizuje primární buněčné stěny nelignifikovaných a nesuberizovaných buněk (Snow, 2016; Mitra & Loque, 2014; Sexauer *et al.*, 2021). Excitační a emisní maxima vyžadují dvou fotonovou excitaci nebo 405 nm laser (Ursache, 2018). Další vhodná barviva rozpustná v clearsee roztoku pro značení buněčných stěn jsou Direct Yellow 96, Direct Red 23 a bazický fuchsin. Direct Red 23 vyzařuje fluorescenční signál v přítomnosti celulózy (Mravec *et al.*, 2017), Direct Yellow 96 v přítomnosti xyloglukanu (Wallace & Anderson, 2012), bazický fuchsin vizualizuje lignin (Kalmbach *et al.*, 2017). Bylo zjištěno, že barviva použita s clearsee roztokem zachovávají subcelulární struktury a dají se navzájem kombinovat pro lepší a komplexnější vizualizaci (Ursache, 2018).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

*Medicago sativa* L. – divoký typ kultivar RSY

*Medicagi sativa* L. – transgenní linie:

- SIMKi – RNAi linie s potlačenou expresí SIMK
- SIMKKi – RNAi linie s potlačenou expresí SIMKK
- GFP-SIMK – linie nadexprimující SIMK

*Pseudomonas fluorescens*

#### 3.1.2 Chemikálie

Alfa Aesar:

- Phytigel

Duchefa Biochemie:

- 2,4-dichlorfenyloctová kyselina (2,4-D)
- Nitsch & Nitsch směs vitamínů (1000x)
- Gamborg B5 médium základní směs solí
- Gamborg B5 směs vitamínů (1000x)
- Murashige & Skoog (MS) základní směs solí
- Kinetin

Penta:

- 70% a 96% ethanol

Sigma-Aldrich:

- Sacharóza
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)
- Dusičnan draselný (KNO<sub>3</sub>)
- Heptahydrát síranu horečnatého (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)
- Tween 20
- Chlorid sodný (NaCl)
- Hydroxid draselný (KOH)
- Chlorid vápenatý (CaCl<sub>2</sub>)
- Síran hořečnatý (MgSO<sub>4</sub>)

- DAPI

### 3.1.3 Roztoky a média

#### Kalus indukující B5H médium

Gamborg B5 základní směs solí	3,1 g·l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	0,5 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g·l <sup>-1</sup>
sacharóza	34,30 g·l <sup>-1</sup>
phytagel	4,5 g·l <sup>-1</sup>
milliQ H <sub>2</sub> O	
pH 5,7 (úprava 1 mol·l <sup>-1</sup> a 0,1 mol·l <sup>-1</sup> KOH)	

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno:

kinetin	0,1 mg·l <sup>-1</sup>
2,4-D	1,0 mg·l <sup>-1</sup>
zásobní roztok aminokyselin	30 ml·l <sup>-1</sup>
1000x Gamborg B5 směs vitamínů	1,0 ml·l <sup>-1</sup>
prolin	0,5 g·l <sup>-1</sup>

#### Zásobní roztok kinetinu (0,1 mg/ml)

kinetin	4 mg
1 mol·l <sup>-1</sup> NaOH	80 µl
milliQ H <sub>2</sub> O	39,92 ml

#### Zásobní roztok 2,4-D (1 mg/ml)

2,4-D	40 mg
1 mol·l <sup>-1</sup> NaOH	300 µl
milliQ H <sub>2</sub> O	39,7 ml

#### Zásobní roztok aminokyselin (250 ml)

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

milliQ H <sub>2</sub> O	250 ml
-------------------------	--------

### **B50 médium**

Gamborg B5 základní směs solí	3,1 g·l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	0,5 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g·l <sup>-1</sup>
Sacharóza	30 g·l <sup>-1</sup>
phytagel	4,5 g·l <sup>-1</sup>
milliQ H <sub>2</sub> O	
pH 5,7 (úprava 1 mol·l <sup>-1</sup> a 0,1 mol·l <sup>-1</sup> KOH)	

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno:

zásobní roztok aminokyselin	30 ml·l <sup>-1</sup>
1000x Gamborg B5 směs vitamínů	1,0 ml·l <sup>-1</sup>

### **Tekuté B5M médium**

Gamborg B5 základní směs solí	3,1 g·l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	0,5 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g·l <sup>-1</sup>
maltóza	30 g·l <sup>-1</sup>
milliQ H <sub>2</sub> O	
pH 5,7 (úprava 1 mol·l <sup>-1</sup> a 0,1 mol·l <sup>-1</sup> KOH)	

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno (na 500 ml):

zásobní roztok aminokyselin	1,5 ml
2,5% PEG přefiltrovat přes bakteriologický filtr	1,25 ml

### **MS médium s ABA**

MS základní směs solí	4,3 g·l <sup>-1</sup>
sacharóza	30 g·l <sup>-1</sup>
phytagel	4,5 g·l <sup>-1</sup>
milliQ H <sub>2</sub> O	
pH 5,7 (úprava 1 mol·l <sup>-1</sup> a 0,1 mol·l <sup>-1</sup> KOH)	

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno (na 500 ml):

ABA	3,4 µl
-----	--------



### MMS médium

MS základní směs solí	4,3 g·l <sup>-1</sup>
myoinositol	0,1 g·l <sup>-1</sup>
sacharóza	30 g·l <sup>-1</sup>
Phytigel	30 g·l <sup>-1</sup>
milliQ H <sub>2</sub> O	
pH 5,7 (úprava 1 mol·l <sup>-1</sup> a 0,1 mol·l <sup>-1</sup> KOH)	

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno (na 500 ml):

1000x Nitsch & Nitsch směs vitamínů	1 ml·l <sup>-1</sup>
-------------------------------------	----------------------

### Tekuté Föhreovo médium bez dusíku

#### Makronutrienty:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 mg·l <sup>-1</sup>	(0,0953 g·ml <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,0 mg·l <sup>-1</sup>	(0,1232 g·ml <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2 ml·l <sup>-1</sup>	(0,0712 g·ml <sup>-1</sup> )
Fe-EDTA	2,5 ml·l <sup>-1</sup>	

#### Mikronutrienty:

CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,1 ml·l <sup>-1</sup>	(0,0015 g·ml <sup>-1</sup> )
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,1 ml·l <sup>-1</sup>	(0,001 g·ml <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 ml·l <sup>-1</sup>	(0,001 g·ml <sup>-1</sup> )
ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,1 ml·l <sup>-1</sup>	(0,0017 g·ml <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,1 ml·l <sup>-1</sup>	(0,0011 g·ml <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	30 ml·l <sup>-1</sup>	(0,0712 g·ml <sup>-1</sup> )
pH 6,5		

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno:

CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml·l <sup>-1</sup>	(0,11098 g·ml <sup>-1</sup> )
-------------------	------------------------	-------------------------------

### **Pevné Föhreus médium bez dusíku**

Zásobní roztoky:

Makro- a mikronutrienty byly použity stejné jako u přípravy tekutého Föhreus média bez dusíku

mikroagar 13 g·ml<sup>-1</sup>

pH 6,5 (upraveno pomocí HCl)

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno:

CaCl<sub>2</sub> 0,11 g·ml<sup>-1</sup>

### **LB médium pro kultivaci *P. fluorescens***

LB Broth (Miller) s agarem 40 g·ml<sup>-1</sup>

pH 7,2 (upraveno pomocí HCl)

sterilizováno autoklávováním, po vychladnutí přidáno:

tetracyklín 50 g·ml<sup>-1</sup>

nebo

streptomycin 400 g·ml<sup>-1</sup>

### **ClearSee roztok**

xylitol 10% (w/v)

deoxycholát sodný 15% (w/v)

Urea 25% (w/v)

doplněno H<sub>2</sub>O na 1000 ml

Rozmícháno 45 minut na magnetické míchačce.

### **Chemikálie na fixaci, natrávení buňkové stěny a permeabilizaci kořenů *M. sativa***

Fixační roztok: (na 1 ml)

16% paraformaldehyd (PFA) 125 µl

25% glutaraldehyd (GA) 8 µl

10% DMSO

0,3% Tween-20

0,3% Triton X-100

v ½ MTSB 500 µl

### MTSB

5 mmol·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,23 g
50 mmol·l <sup>-1</sup>	PIPES	15,1 g
5 mmol·l <sup>-1</sup>	EGTA	10 ml (0,5 mol·l <sup>-1</sup> zásobního média)

pH 6,9 (upravené pomocí KOH)

sterilizováno přes bakteriologický filtr a je skladován při pokojové teplotě

### EGTA

EGTA	3,8 g
H <sub>2</sub> O	10 ml

Přidává se tuhý KOH, dokud není roztok čirý, poté se doplní na objem 20 ml

pH 8

### Enzymová směs pro natrávení buněčných stěn

2%	meiceláza	0,2 g
2%	macerozym R10	0,2 g
2%	celuláza R10	0,2 g
0,5%	celuláza RS	0,05 g
0,5%	pektolyáza Y23	0,05 g
0,1%	hemiceluláza HP	0,01 g

v PBS

Centrifugováno 2 minuty při 13 000 g, použitý supernatant

### PBS

2,7 mmol·l <sup>-1</sup>	KCl	0,2 g
140 mmol·l <sup>-1</sup>	NaCl	8 g
1,5 mmol·l <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
6,5 mmol·l <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,15 g

pH 7,3, doplněno MilliQ H<sub>2</sub>O na 1000 ml

sterilizováno autoklávováním a je skladován při pokojové teplotě

### Permeabilizační pufr

10%	DMSO	100 µl
-----	------	--------

2%	Nonidet	20 $\mu$ l na 1 ml PBS
Kapka	Tween-20	

## **Protilátky**

### Primární protilátky

#### **Kryší anti $\alpha$ -tubulinu**

- Roztok primární protilátky byl připravený těsně před použitím, rozředěním v PBS obsahující 2,5 % (w/v) BSA
- Ředění  $\alpha$ -tubulinu je 1:350

### Sekundární protilátky

#### **Kozí anti-kryší protilátka značená AlexaFluor 488**

#### **Kozí anti-králičí protilátka značení AlexaFluor 647 pro GFP-SIMK a suché rostliny**

- Roztok sekundární protilátky byl připravený těsně před použitím, rozředěním v PBS obsahující 2,5% (w/v) BSA.
- Ředění protilátek 1:500
- Vzorke byly inkubovány ve tmě.

### **3.1.4 Přístroje**

- Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)
- Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group) 31
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga
- Elektromagnetická míchačka MSH-420 (Boeco)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 (operační program Zen Black 2012, Zeiss)
- Laboratorní lednička LIE LCV 4010 (Schoeller)
- Laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering)
- Mikroskop Axio Zomm.V16 (Zeiss)
- Stolní pH metr PC 2700 (Eutech instruments)
- Skener Image Scanner III (Epson)
- Sterilní laminární box (Merci)
- Výrobek deionizované vody Simplicity water purification systém (Millipore)

### 3.1.5 Software

- PowerPoint 365 (Microsoft Office)
- Microsoft Excel
- Zen Blue version 2.3 (Zeiss)
- ImageJ bundles with Java 8
- Cytospectre version 1.2
- Oriana version 4.02

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava kultivačních médií

- Na elektromagnetickou míchačku byla umístěna kádinka s magnetickým míchadlem a s přibližně  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ H<sub>2</sub>O.
- Na předvážkách byly naváženy příslušné chemikálie, které byly následně postupně rozpuštěny v kádince s milliQ H<sub>2</sub>O za stálého míchání.
- Poté bylo pomocí příslušných roztoků upraveno pH připraveného roztoku na hodnotu asi o 2 desetiny nižší, než byla požadovaná hodnota. pH roztoku bylo upraveno na konečnou hodnotu po přidání milliQ H<sub>2</sub>O na požadovaný objem.
- Médium bylo nalito do skleněných lahví a následně bylo sterilizováno v autoklávu.
- Po autoklávování a vychladnutí na 55 °C, aby nedošlo k jejich degradaci, byla přidána antibiotika, fytohormony, vitamíny a aminokyseliny.

### 3.2.2 Somatická embryogeneze

#### 3.2.2.1 Přímá

- Nejprve byly odstříhány mladé listy z *M. sativa* vypěstované ve sterilních *in vitro* podmínkách.
- Listy byly rozstříhány na menší části. Nejprve byly kultivovány v kalus-indukujícím tekutém B5H nebo B5M (maltóza místo sacharózy) médiu obsahujícím fytohormony kinetin (cytokinin) a kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2,4-D; syntetický auxin) ve sterilních Erlenmeyerových baňkách.

- Po 20. dnech kultivace byla suspenze centrifugována a k peletu bylo přidáno čerstvé B5M médium s 2,5 % PEG, který indukuje tvorbu somatických embryí.
- Vytvořená embrya byla přenesena na pevné MS médium s ABA.

### 3.2.2.2 Nepřímá

- Nejprve byly odštíhnuty mladé listy z *M. sativa* vypěstované ve sterilních *in vitro* podmínkách.
- Listy byly rozstříhány na menší části a byly kultivovány na pevném B5H médiu obsahujícím fytohormony kinetin a 2,4-D v Petriho miskách.
- Explantáty byly kultivovány 3 týdny ve fytotronu.
- Poté byly vytvořené kalusy přeneseny na B50 médium bez hormonů, které indukovalo tvorbu somatických embryí.
- Izolovaná embrya byla přenesena na MMS médium.
- Po 2 týdnech byla embrya už s viditelnými primárními kořeny přenesena na MS médium a následně na pevné Fährus médium bez dusíku.
- Všechny Petriho misky byly kultivovány ve fytotronu při teplotě 21 °C, 71 % vlhkosti a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma.

### 3.2.3 Příprava bakterií *Pseudomonas fluorescens*

- Bakteriální konzervy byly vytaženy z mrazáku a nechaly se rozmraznout na ledu.
- Do 19 ml LB média bylo aplikováno 500 µl bakterií *P. fluorescens* za sterilních podmínek ve flowboxu.
- Falkonová zkumavka s připravenými bakteriemi byla dána na třepačku do tmy při 28 °C, 180 RP.
- Kultura byla kultivována 48 hod.
- V den aplikace bakterií na kořeny *M. sativa* bylo změřeno OD<sub>600</sub>, bakteriální kultura byla 2x centrifugována (8 min, 18 °C, 6500 RP) a promyta ve Fährus médiu, znovu změřeno OD<sub>600</sub>.
- Naměřené OD<sub>600</sub> bylo zředěno pomocí Fährus média na OD<sub>600</sub>=0,9.

### 3.2.4 Fixace kořenů *M. sativa*

- Rostliny byly inokulovány bakteriální kulturou *P. fluorescens* ve Fåhrens médiu nebo samotným Fåhrens médiem jako *mock* kontrola.
- Kořenové špičky byly odebrány před ošetřením, po 20 a 120 min inkubace s bakteriemi nebo médiem.
- Přibližně 1 cm dlouhé špičky primárních i laterárních kořenů byly odřezány a přeneseny do fixačního roztoku v destičce s jamkami v digestoři.
- Na vzorky bylo třikrát po dobu 30 sekund aplikováno vákuum pomocí vakuové pumpy a exikátoru.
- Po vakuové infiltraci byly explantáty ponechány po dobu 1 hod v digestoři při pokojové teplotě.
- Následně byla destička uzavřena parafilmem, zabalena do alobalu a uchována při 4°C.

### 3.2.5 Imunozaření „Whole mount“

- První 3 kroky probíhaly v digestoři.
- Destička se vzorky byla vytažena z ledničky a vzorky byly přemístěny do plastových košíčků a byly dvakrát promyty v MTSB po dobu 10 min a poté dvakrát v PBS po dobu 10 min.
- Následně byly redukováné nezreagované aldehydové skupiny třikrát po dobu 5 minut v NaBH<sub>4</sub> v PBS.
- Po redukci byly vzorky třikrát po dobu 5 min promyty v PBS.
- K natrávení buněčné stěny byl použit roztok enzymů a vzorky se nechaly inkubovat při 37 °C, 30 min.
- Po inkubaci byly vzorky čtyřikrát po 5 min promyty v PBS.
- Následovala permeabilizace buněčných stěn, provedena byla příslušným permeabilizačním roztokem při 37 °C, 30 min a dalších 10 min při pokojové teplotě.
- Vzorky byly čtyřikrát promyty v PBS po dobu 10 min.
- Poté byly vzorky dvakrát inkubovány v 5% BSA (0,05 g/1 ml) v PBS, 30 min při pokojové teplotě.
- Následně byly vzorky přeneseny do roztoku primárních protilátek. Pro lepší proniknutí protilátek do buňky byla použita vakuová pumpa (třikrát, 5 min).

- Destička byla uzavřena parafilmem, zabalena do alobalu a uchována při 4 °C přes noc.
- Ráno byly vzorky inkubovány 45 min při 37 °C.
- Primární látky byly vymyty 5x po 10 min v PBS a následovala blokáce 2x po 20 minutách v 5% BSA (0,05g/ 1 ml) v PBS.
- Poté byla aplikována sekundární protilátka, inkubace ve tmě při 37 °C po dobu 2 hod.
- Po inkubaci byla sekundární látka vymyta v PBS (3x10 min).
- Promyté vzorky byly inkubovány s DAPI při pokojové teplotě 10 min a poté promyty 3x10 min v PBS.
- Poté byly připraveny mikroskopické preparáty:
  - (3-8) kořenových špiček bylo přeneseno do kapky zalévacího média na podložním sklíčku.
  - Špičky byly pod lupou upraveny a vzorek byl přikryt krycím sklíčkem.
  - Okraje krycího skla byly zalakovány tenkou vrstvou laku na nehty.

### 3.2.6 Příprava zalévacího média

- Pracovalo se v digestoři, kde bylo nejprve do kádinky nasypáno 100 mg parafenylendiaminu.
- Poté se přidalo 100 µl DMSO, ve kterém byl parafenylendiamin rozpuštěn jemným kroužením kádinky.
- Do kádinky se postupně přidalo 10 ml 1 M Tris pufu (pH 8,8), roztok se kroužením promíchal a po částech za rychlého míchání skleněnou tyčinkou bylo přidáno 90 ml 100% glycerolu.

### 3.2.7 Mikroskopické pozorování vzorek

- Vzorky byly mikroskopovány na konfokálním laserovým skenovacím mikroskopu LSM 710 s použitím laserů s vhodnou vlnovou délkou.
- Z filtrů a laserů byly použity vlnové délky:
  - na excitaci **AlexaFluor 488** laser s vlnovou délkou 488 nm a filtr 493-551 nm
  - pro **AlexaFluor 647** laser s vlnovou délkou 647 a filtr 638-755 nm
  - pro **DAPI** laser s vlnovou délkou 405 nm a filtr 410-495 nm.



- Mikroskopování vzorků značených Calcofluor white:
  - excitace 405 nm, detekce při 425-475 nm.

### **3.2.8 Fenotypová analýza kořenových špiček *M. sativa* pomocí ClearSee metody**

- Pomocí nepřímé somatické embryogeneze (viz 3.2.2.2.) byly získány rostliny *M. sativa*.
- Zhruba měsíc staré rostliny s vyvinutým kořenovým systémem a nadzemní částí byly přeneseny z MS média na Fåhrens médium bez dusíku.
- Po 5 dnech kultivace byly pomocí skalpelu odřezané kořenové špičky hlavních kořenů a byly přeneseny do fixačního roztoku obsahujícího 16% paraformaldehyd v PBS, bylo aplikováno vakuum 3x3 min a poté vakuum na 1 h.
- Následně byly vzorky promyty 3x5 min v PBS roztoku.
- Byl připraven roztok ClearSee.
- Zafixované a promyté kořenové špičky byly přeneseny do PBS roztoku a poté do clearsee roztoku.
- Vzorky v roztoku byly inkubovány 12 dní, každé 2-3 dny se roztok měnil za čerstvé.
- V den mikroskopování byly vzorky přeneseny do barviva calcofluor white barvicí primární buněčné stěny po dobu 4 h.
- Poté byly 2x promyty v roztoku clearsee, přeneseny na podložní sklíčko s kapkou clearsee roztoku, přikryty krycím sklíčkem a mikroskopovány na konfokálním mikroskopu.

### **3.2.9 Fenotypová analýza *M. sativa* po inokulaci *P. fluorescens***

- Pomocí nepřímé somatické embryogeneze (viz 3.2.2.2.) byly získány rostliny *M. sativa*.
- Zhruba měsíc staré rostliny s vyvinutým kořenovým systémem a nadzemní částí byly přeneseny z MS média na Fåhrens médium bez dusíku.
- Byla připravena bakteriální kultura *P. fluorescens* (viz 3.2.3.).
- Kontrolní misky byly ošetřeny tekutým Fåhrens médiem bez dusíku.
- K jednotlivým kořenovým špičkám bylo aplikováno 10 µl na 3 kořenové špičky připravených bakterií nebo čistého média.

- 3. den po inokulaci byly rostliny přeneseny na čisté Föhreus médium bez dusíku.
- Misky byly skenovány 1.,3.,4.,6.,8., a 10. den po inokulaci (DAI).
- Délky kořenového systému se měřily pomocí programu ImageJ.
- Zpracování dat a vypočítání přírůstku délky kořenového systému bylo provedeno v programu Microsoft excel, tak že se 1., 3., 4., 6., 8. a 10. DAI odečetl od 0 DAI.
- Zároveň byl pozorován vznik bakteriálního biofilmu na ZOOM mikroskopu.

## 4 VÝSLEDKY

Tato kapitola výsledků je rozdělena do tří částí. První část se zabývá výsledky somatické embryogeneze. Detailně je zaměřena na přípravu rostlin *M. sativa* L. divokého typu RSY a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK pomocí přímé SE. Jedna podkapitola je věnována i klasické přípravě somatických embryí nepřímou cestou. Druhá část kapitoly je tvořena výsledky imunohistochemické metody Whole mount, konkrétně byly značené mikrotubuly a DNA zmíněných linií *M. sativa* po interakci s bakterií *Pseudomonas fluorescens*. Tato část zahrnuje také analýzu orientace kortikálních mikrotubulů po interakci s bakteriemi. Poslední, třetí část výsledků je věnována fenotypové analýze kořenového systému v odpovědi na inkubaci s bakteriemi *P. fluorescens*. V rámci této podkapitoly jsou uvedeny i výsledky histochemického značení pomocí fluorescenční barvičky calcofluor white, která značí celulózu v primárních buněčných stěnách, což se využilo pro porovnání fenotypu kořenových špiček použitých linií vojtěšky.

### 4.1 Somatická embryogeneze

#### 4.1.1 Přímá SE

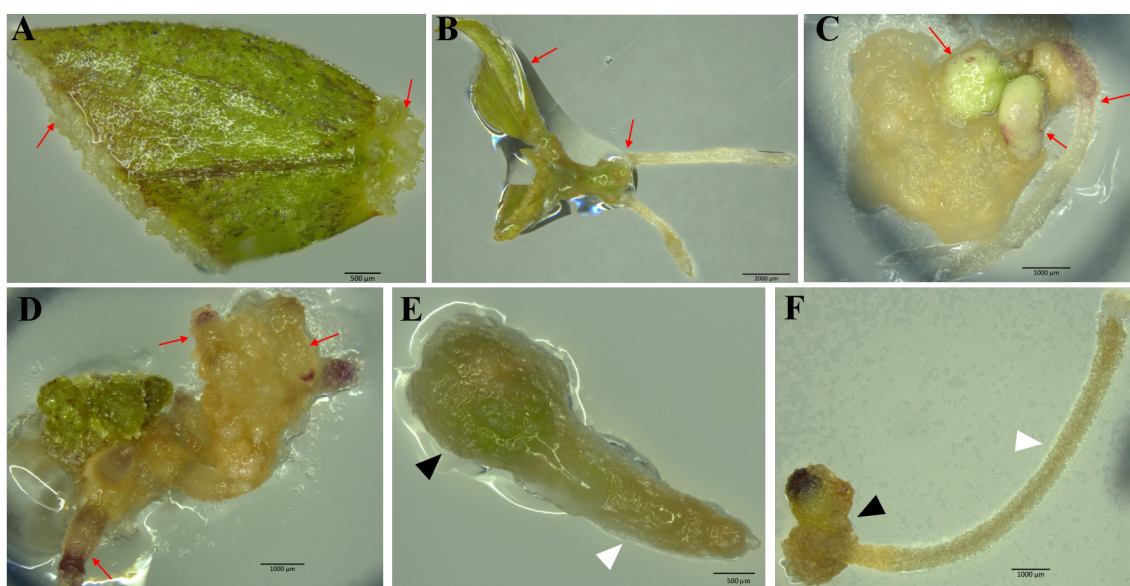
Explantáty listových čepelí a řapíků odebraných z rostlin vojtěšky divokého typu RSY a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK pěstovaných *in vitro* se použily na indukci přímé SE v tekutém B5 médiu s maltózou místo sacharózy (B5M). Toto médium obsahuje cytokinin kinetin a syntetický auxin 2,4-D. Po 20 dnech kultivace se na řezných plochách listových explantátů začaly tvořit globulární útvary, připomínající pro-embrya (Obr. 7A). Následně byly explantáty přeneseny do čerstvého bezhormonálního B5M média obsahujícího 2,5% PEG, který indukuje tvorbu somatických embryí.

Po 20 dnech kultivace v médiu s 2,5% PEG se začaly u linie SIMKKi tvořit kořeny z řezných ploch listových řapíků (Obr. 7B). Polovina explantátů byla přenesena do čerstvého B5M média obsahujícího PEG. Druhá polovina explantátů byla přenesena na pevné MS médium s ABA indukující tvorbu somatických embryí.

Po týdnu kultivace explantátů na pevném MS mediu s ABA byly na povrchu listových explantátů pozorovány somatická embrya (Obr. 7C a D). Embrya byla následně separována a přenesena na čerstvé pevné MS médium s ABA. Po 2 týdnech kultivace byly pozorovány embrya v kotyledonárním stadiu (Obr. 7E a F). Embrya se přestala dál vyvíjet, a tak byl experiment po 49 dnech od přenosu somatických embryí na MS médium ukončen (Obr. 8).

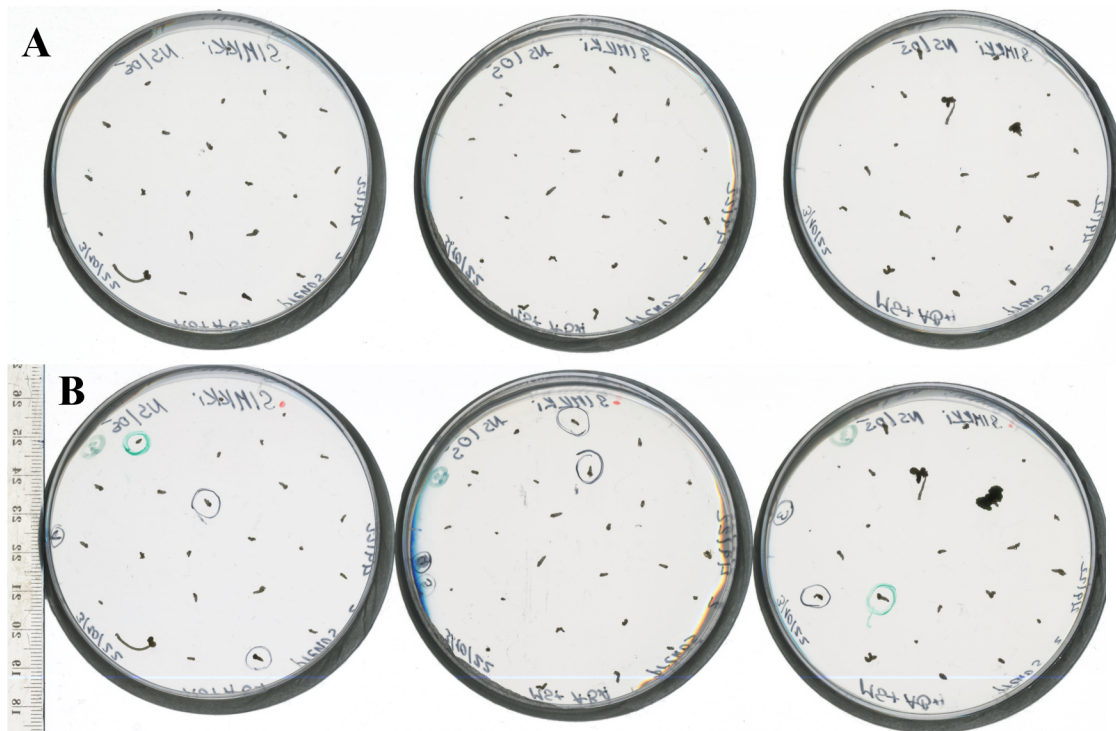
Na listových explantátech, které byly dlouhodobě (3 měsíce) kultivovány v tekutém B5M médiu s 2,5% PEG, se začaly tvořit somatická embrya, která se samovolně uvolňovala do média. Separovaná somatická embrya byla přenesena na pevné MS médium s ABA. U všech přenesených somatických embryí na MS médiu byla pozorována houbová infekce, tudíž vývoj somatických embryí nepokračoval.

Indukce přímé somatické embryogeneze u ostatních transgenních linií (GFP-SIMK a SIMKi) a divokého typu RSY byla provedena stejným způsobem jako u linie SIMKKi, avšak tyto linie zastavily vývoj somatických embryí v globulárním stadiu po 6 týdnech kultivace v B5M obsahujícím 2,5% PEG. Na Obr. 9A – D lze vidět listové explantáty jednotlivých linií, u kterých se na povrchu a na řezných plochách vytvořily globulární somatická embrya, která se dál nevyvíjela.



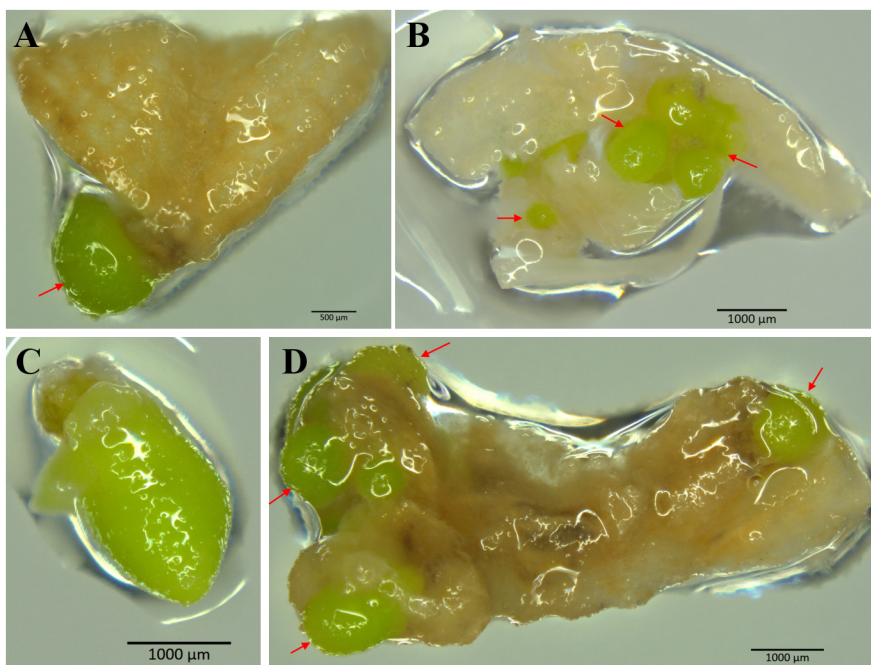
**Obrázek 7: Přímá somatická embryogeneze *M. sativa* u transgenní linie SIMKKi**

**A** – listový explantát 20. den kultivace v B5H médiu, červenými šípkami jsou naznačená místa výskytu globulárních útvarů, připomínající pro-embrya; **B** – explantát listového řápiku s kořeny (červené šípky) indukovanými z řezné plochy na 20. den kultivace v B5M médiu s 2,5 % PEG; **C, D** – listové explantáty s vytvořenými embryi (červené šípky); **E, F** – separovaná kotyledonární embrya kultivována 2 týdny na MS médiu s ABA s kořenem (bílý hrot šípky) a kotyledony (černý hrot šípky). Měrka: A, E=500  $\mu$ m, B=2000  $\mu$ m, C, D, F=1000  $\mu$ m. Snímky pořízeny na ZOOM mikroskopu.



Obrázek 8: Izolovaná somatická embrya *M. sativa* transgenní linie SIMKKi kultivované na pevném MS mediu obsahujícím ABA

A – embrya kultivované 14 dnů na MS mediu s ABA; B – embrya kultivovaná 49 dnů na MS mediu s ABA.



Obrázek 9: Přímá somatická embryogeneze *M. sativa* u RSY a transgenní linie SIMKi a GFP-SIMK

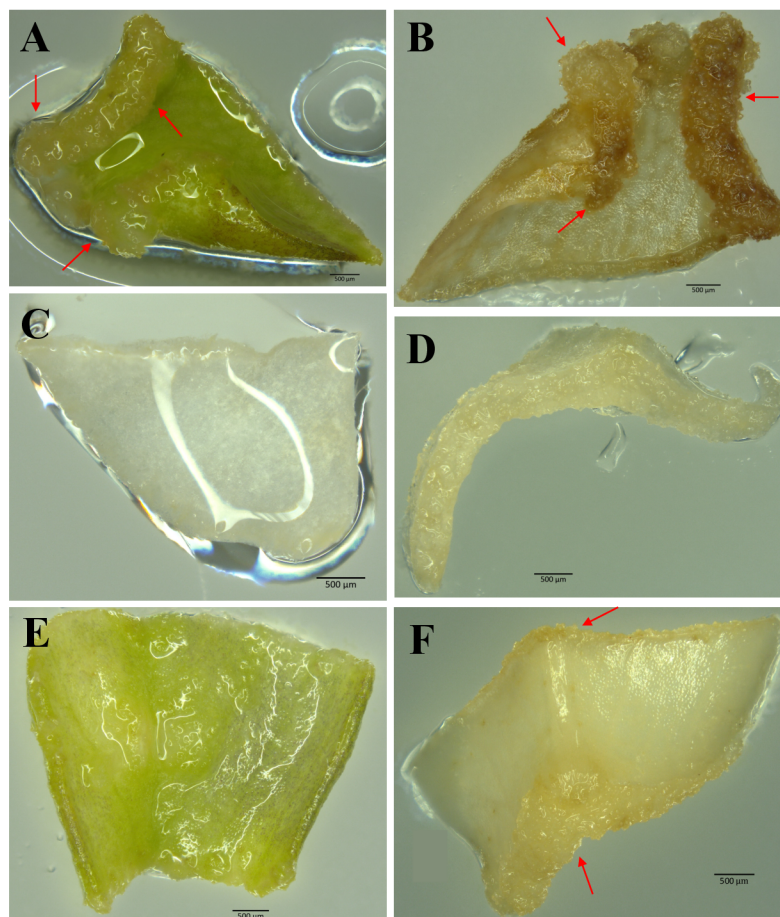
Listové explantáty kultivované 38 dnů v B5M médiu s 2,5% PEG. A – RSY; B – SIMKi; C – SIMKi; D – GFP-SIMK; šípky značí globulární embrya indukovaná na povrchu a na řezných plochách explantátů. Měrka: B=500  $\mu\text{m}$ , A,C,D=1000  $\mu\text{m}$ . Snímky pořízeny na ZOOM mikroskopu.

Navození indukce přímé somatické embryogenezi jsme znovu zopakovali ve druhém experimentu. Listy ze sterilních rostlin byly rozstříhány na menší části a byly umístěny do tekutého B5H média s kinetinem a 2,4-D. U linie GFP-SIMK byla pozorována infekce při kultivaci v B5H indukčním mediu, proto se tato linie v této části výsledků nevyskytuje.

Explantáty byly přeloženy do B5M média s 2,5% PEG. Po 2 týdnech kultivace v médiu u RSY bylo možné na řezných plochách pozorovat změnu struktury okrajů explantátu (Obr. 10A), následně byly explantáty přeneseny na pevné MS medium obsahující ABA. Po 7 dnech kultivace bylo možné sledovat změnu barvy listového explantátu a zvýšenou tvorbu globulárních útvarů, především na řezných plochách (Obr. 10B).

Rostlinné explantáty linií SIMKi (Obr. 10C) a SIMKKi (Obr. 10E) byly z média B5H přeloženy do B5M média s 2,5% PEG. Explantáty SIMKi v B5M médiu s 2,5% PEG změnily barvu degradací chlorofylu na žluto-bílou (Obr. 10C). Po 65 dnech kultivace byly explantáty přeloženy na pevné MS médium s ABA (Obr. 10 D, F). Na explantátů SIMKKi je patrná chloróza (Obr. 10F).

Tento experiment nebyl dán udržován, po 120. dnech kultivace byly explantáty stále ve stejném stavu, bez žádného znaku dalšího vývoje.



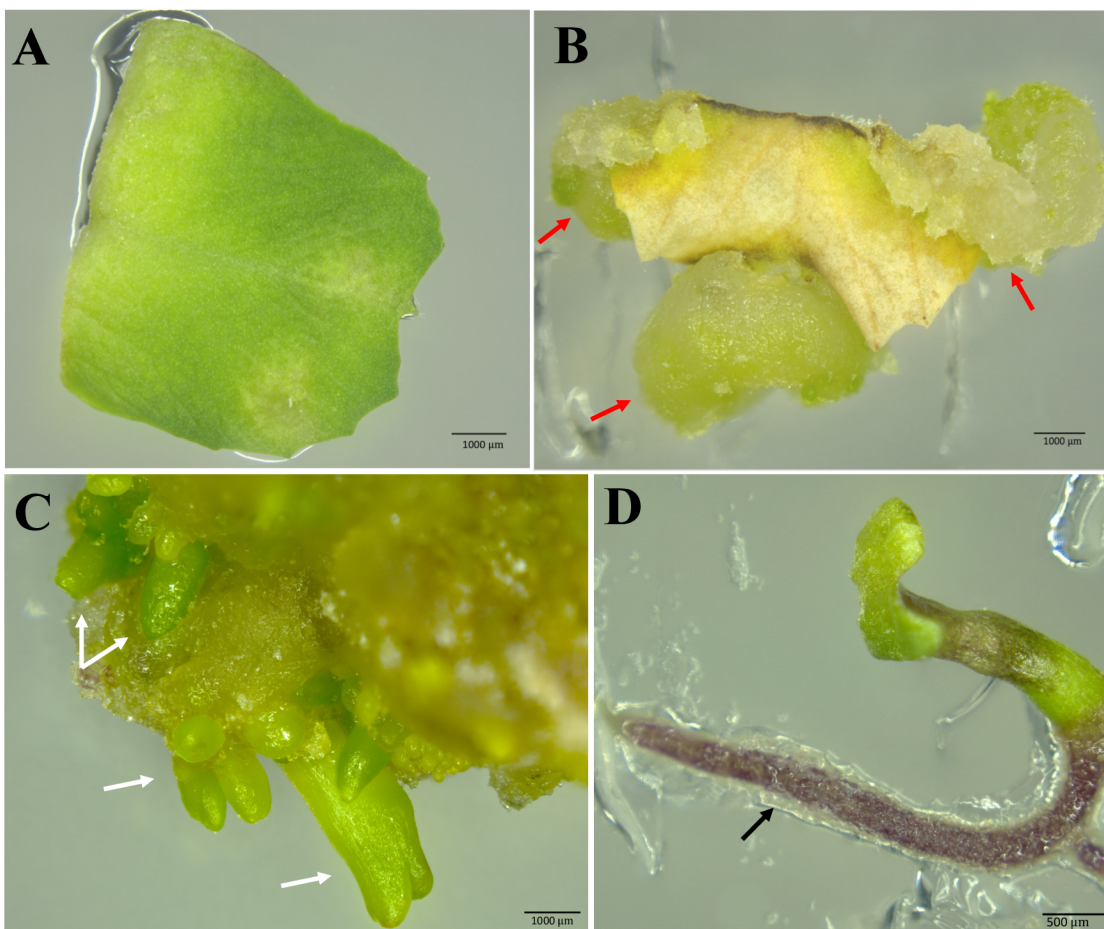
Obrázek 10: **Přímá somatická embryogeneze *M. sativa* u RSY a transgenních linií SIMKKi a SIMKi**

**A** – explantát listu RSY v B5M médiu s 2,5% PEG; **B** – explantát RSY 42. den na pevném MS médiu s ABA; **C** – explantát SIMKi přeložený z B5H média do B5M média s přidáním 2,5% PEG; **D** – explantát SIMKi na MS médiu s ABA; **E** – listový explantát SIMKKi přeložený do B5M média s 2,5% PEG; **F** – explantát SIMKKi na pevném MS médiu s ABA. Místa označená šipkami znázorňují změnu řezných ploch explantátu. Měrka: 500 µm. Snímky

#### 4.1.2 Nepřímá SE

Zdrojem explantátů pro indukci nepřímé SE byly listy vojtěšky pěstované v *in vitro* podmínkách. Obdobně jako u přímé SE, byl použit divoký typ RSY a transgenní linie SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK. Povrchově vysterilizované listové explantáty byly rozřezány na polovinu a následně umístěny na pevné B5H médium obsahující kinetin a 2,4 D, indukující tvorbu kalusu (Obr. 11A). Po 3 týdnech kultivace byly explantáty s vytvořenými kompaktními kalusy přeneseny na B50 médium, které neobsahuje růstové látky (Obr. 11B). Po přibližně třech týdnech se na explantátech začaly tvořit somatická embrya (Obr. 11C), která byla následně separována a přenesena na MMS kultivační médium podporující klíčení a vývin rostlin (Obr. 11D). Po 2 týdnech kultivace byly

embrya přenesena na MS médium, kde se vyvinul kořenový systém rostlin. Poté byly rostlin s vyvinutým kořenových systémem přeneseny na Fährus médium.



Obrázek 11: **Nepřímá somatická embryogeneze *M. sativa* linie SIMKKi**

**A** – listový explantát na B5H médium; **B** – listový explantát s vytvořeným kalusem přenesen na B50 médium; **C** – tvorba embryí na kalusu na B50 médium 3 týdny po kultivaci; **D** – klíčící embryo se začínajícím vývinem kořene na MMS médium. Červená šipka směřuje na tvorbu kalusu na listovém explantátu; bílá na vytvořená embrya globulárního a srdčitého stádia; černá šipka na začínající tvorbu kořene. Měrka: A,B,C=1000 µm, D=500 µm. Snímky pořízeny na ZOOM mikroskopu.



## 4.2 Imunohistochemické značení mikrotubul u *M. sativa*

### 4.2.1 Whole mount metoda

Pro imunochemické značení mikrotubul byly použity kořenové špičky rostlin *M. sativa* divokého typu RSY a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK kultivovaných 5 dní na Färeus médiu. Kořeny byly inokulovány bakteriemi *P. fluorescens* a jako *mock* kontrola bylo použito čisté Färeus médium. Kořenové špičky byly odebrány před inokulací (suchá kontrola) a po 20 a 120 min inkubace s bakteriemi. Odebrané kořenové špičky byly zafixovány a následně byly mikrotubuly lokalizovány pomocí imunohistochemické metody whole mount. Zde jsou uvedeny ilustrační fotografie pořízeny konfokálním mikroskopem.

Mikrotubuly jsou zeleně značené pomocí primární protilátky anti  $\alpha$ -tubulin a sekundární protilátky značené AlexaFluor 488. Modře značená DNA v jádrech buněk byla vizualizována pomocí DAPI. V případě linie GFP-SIMK a suchých kontrol (Obr. 18-21) byla pro vizualizaci mikrotubul (červeně) použita sekundární protilátka značená AlexaFluor 647. Na obrázcích níže je možné pozorovat mikrotubuly u jednotlivých linií.

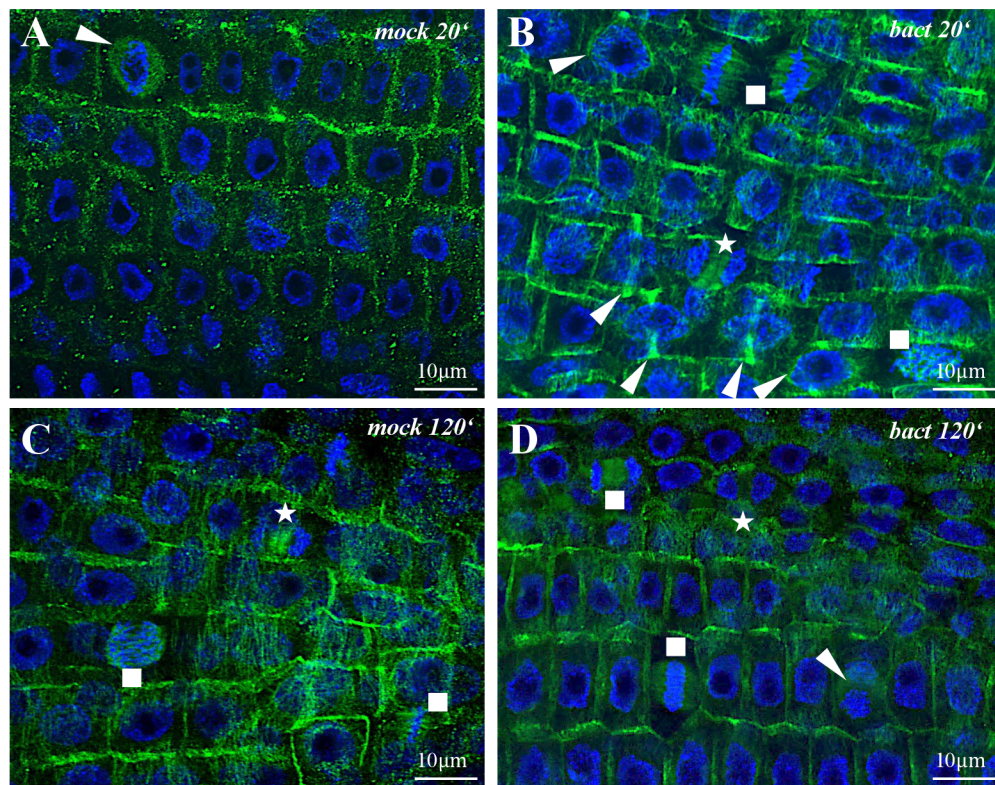
Pozorování ukázalo, že divoký typ RSY má před (Obr. 20A) i po aplikaci bakterií nebo čistého média (Obr. 12) pravidelně velké buňky bez žádných modifikací. U transgenní linie SIMKi (Obr. 14) jsou buňky v porovnání s aplikací bakterií a *mock* kontrolou větší a mají pravidelnější tvar. Suchá kontrola SIMKi (Obr. 20B) má oproti ošetřeným buňkám nepravidelné uspořádání, buňky jsou menší a jádra mají nepravidelné tvary. Buňky SIMKKi (Obr. 16) se po aplikaci bakterií oproti *mock* kontrole výrazně zmenšili a mají nepravidelný prodloužený tvar, tak je to i u suché kontroly (Obr. 20C). Poslední zkoumanou transgenní linií je GFP-SIMK (Obr. 18), zde jsou použity pouze snímky po 120 min po aplikaci bakterií a *mock* kontroly, kvůli nedostatku rostlinného materiálu. Buňky této linie mají po ošetření bakteriemi pravidelnější tvar a více se dělí. Suchá kontrola má deformované nepravidelně velké buňky s jádry nepravidelného tvaru (Obr. 20D).

Zaměřily jsme se také na výskyt PPB (označeny pomocí bílých hrotů šipek), fragmoplastu (značen bílou hvězdičkou) a mitotických fází (nejčastěji vyskytující se profáze, metafáze a anafáze) (značeny bílým čtvercem). U všech linií byla zaznamenána tvorba PPB i po 120 min inkubace s bakteriemi.

#### 4.2.2 Orientace kortikálních mikrotubulů u *M. sativa*

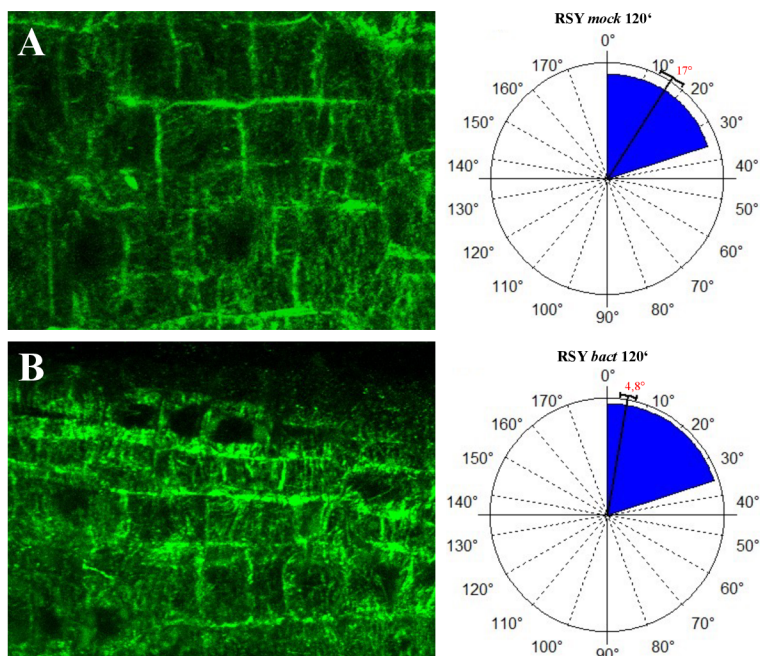
Pro analýzu orientace mikrotubul (MT) u všech zmíněných linií, byly nasnímány kortikální MT kořenových špiček před ošetřením a 120 min po ošetření bakteriemi a kontrolou. Průměrná orientace MT byla změřena pomocí programu CytoSpectre, následně byly hodnoty zpracovány do růžicových grafů v programu Oriana. Průměrná hodnota orientace MT u RSY *mock* kontroly (Obr. 13) je 17°, oproti rostlinám ošetřených bakteriemi, kdy průměrná hodnota je 4,8°. *Mock* kontrola u linie SIMKi (Obr. 15) má nižší průměrnou hodnotu orientace – 12°, vyšší hodnota je po ošetření bakteriemi – 40°. Taktéž rozdílnou hodnotu vykazuje linie SIMKKi (Obr. 17), průměrná hodnota *mock* kontroly je 31°, po ošetření bakteriemi 4,9°. Nižší průměrná hodnota orientace MT u *mock* kontroly byla zaznamenána i u linie GFP-SIMK (Obr. 19), jejich hodnota jsou 3° a hodnota po ošetření bakterií je 4,5°. Rovněž byly vyhodnoceny suché (*DRY*) kontroly (Obr. 21), které byly odebrány před naočkováním. Průměrná hodnota orientace MT divokého typu RSY je 11°, transgenních linií SIMKi – 3°, SIMKKi – 4°, GFP-SIMK – 15°.

Ze získaných výsledků vidíme, že největší rozdíl v orientaci MT mezi suchou kontrolou, *mock* kontrolou a po inokulaci s bakteriemi *P. fluorescens* je u transgenní linie SIMKi. Nejmenší rozdíl je u linie GFP-SIMK. Všechny průměrné hodnoty orientace MT jsou v horizontální nebo šikmé rovině k ose buněk, což znamená že růst kořene nebyl bakteriemi zastaven.

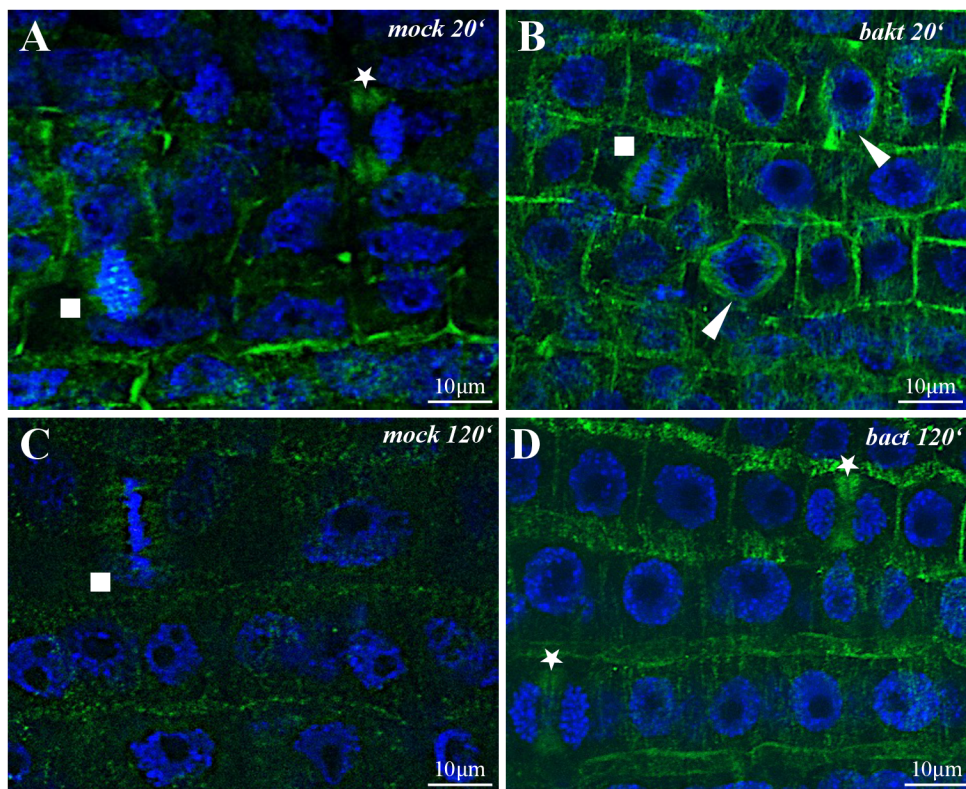


Obrázek 12: Imunohistochemická lokalizace mikrotubul a jader divokého typu RSY u *M. sativa*

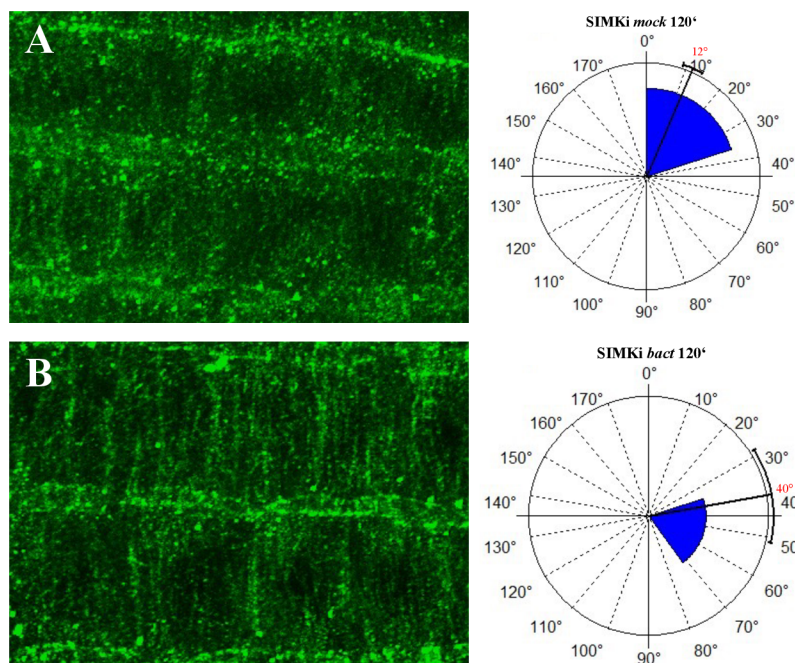
Rostliny ošetřeny Fährus médiem a bakteriemi *P. fluorescens*, odebrány 20 a 120 min od aplikace. Hrot šipky ukazuje na PPB, hvězdička na fragmoplast, čtverec na mitotické fáze. Měrka 10  $\mu\text{m}$ . Snímky pořízeny na konfokálním mikroskopu.



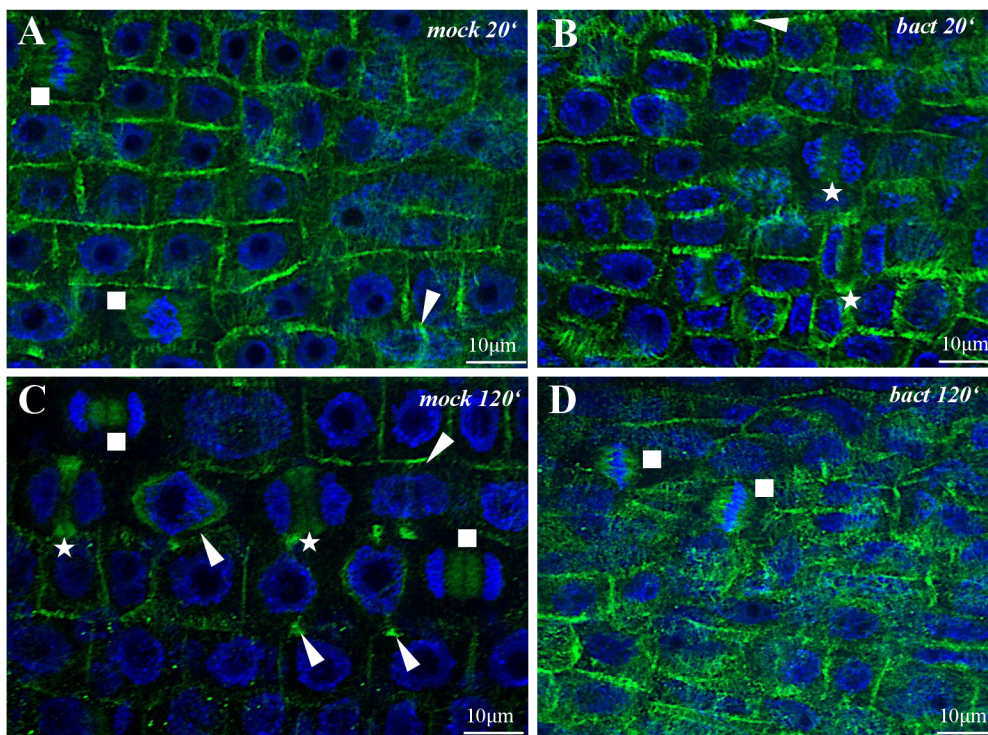
Obrázek 13: Analýza orientace kortikálních mikrotubulů divokého typu RSY u *M. sativa*. Příklad uspořádání kortikálních MT a růžicový graf znázorňující rozložení a orientaci uhlů kortikálních mikrotubulů. **A** – RSY *mock* kontroly; **B** – RSY po 120 min ošetření s bakteriemi *P. fluorescens*. Modré pole na grafu znázorňuje rozložení a hodnotu průměrné orientaci (červeně) MT u *mock* kontroly. Průměrný úhel orientace MT *mock* kontroly je  $17^\circ$ , po ošetření bakteriemi je  $4,8^\circ$ .



Obrázek 14: **Imunohistochemická lokalizace mikrotubul a jader linie SIMKi u *M. sativa***  
 Rostliny ošetřeny Fåhrens médiem a bakteriemi *P. fluorescens*, odebrány 20 a 120 min od aplikace. Hrot šipky ukazuje na PPB, hvězdička na fragmoplast, čtverec na mitotické fáze. Měrka 10  $\mu\text{m}$ . Snímky pořízeny na konfokálním mikroskopu.

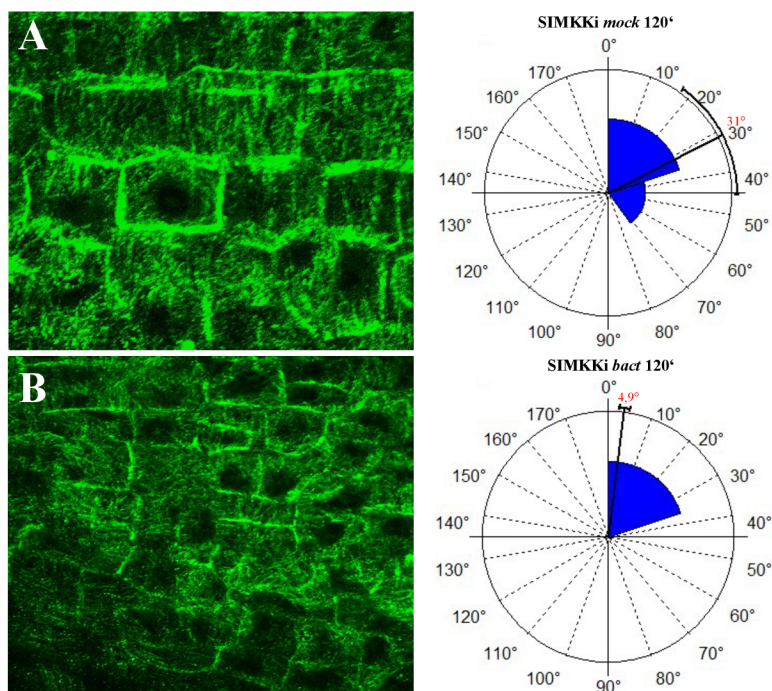


Obrázek 15: **Analýza orientace kortikálních mikrotubulů linie SIMKi u *M. sativa*.**  
 Příklad uspořádání kortikálních MT a růžicový graf znázorňující rozložení a orientaci úhlů kortikálních mikrotubulů. **A** – SIMKi *mock* kontroly; **B** – SIMKi po 120 min ošetření s bakteriemi *P. fluorescens*. Modré pole na grafu znázorňuje rozložení a hodnotu průměrné orientaci (červeně) MT u *mock* kontroly. Průměrný úhel orientace MT *mock* kontroly je  $12^\circ$ , po ošetření bakteriemi je  $40^\circ$ .



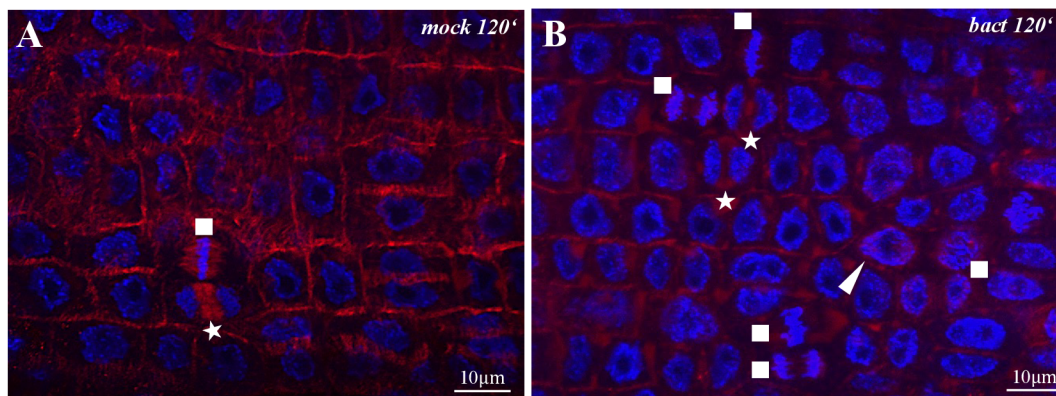
Obrázek 16: Imunohistochemická lokalizace mikrotubul a jader linie SIMKKi u *M. sativa*

Rostliny ošetřeny Fährus médiem a bakteriemi *P. fluorescens*, odebrány 20 a 120 min od aplikace. Hrot šipky ukazuje na PPB, hvězdička na fragmoplast, čtverec na mitotické fáze. Měrka 10  $\mu\text{m}$ . Snímky pořízeny na konfokálním mikroskopu.



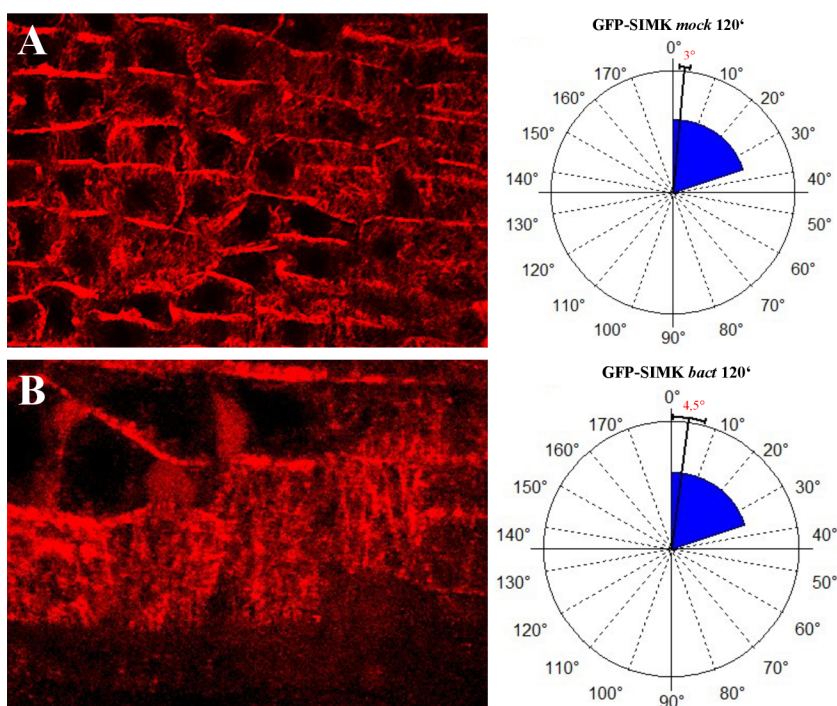
Obrázek 17: Analýza orientace kortikálních mikrotubulů linie SIMKKi u *M. sativa*.

Příklad uspořádání kortikálních MT a růžový graf znázorňující rozložení a orientaci uhlů kortikálních mikrotubulů. **A** – SIMKKi *mock* kontroly; **B** – SIMKKi po 120 min ošetření s bakteriemi *P. fluorescens*. Modré pole na grafu znázorňuje rozložení a hodnotu průměrné orientaci (červeně) MT u *mock* kontroly. Průměrný úhel orientace MT *mock* kontroly je  $31^\circ$ , po ošetření bakteriemi je  $4,9^\circ$ .



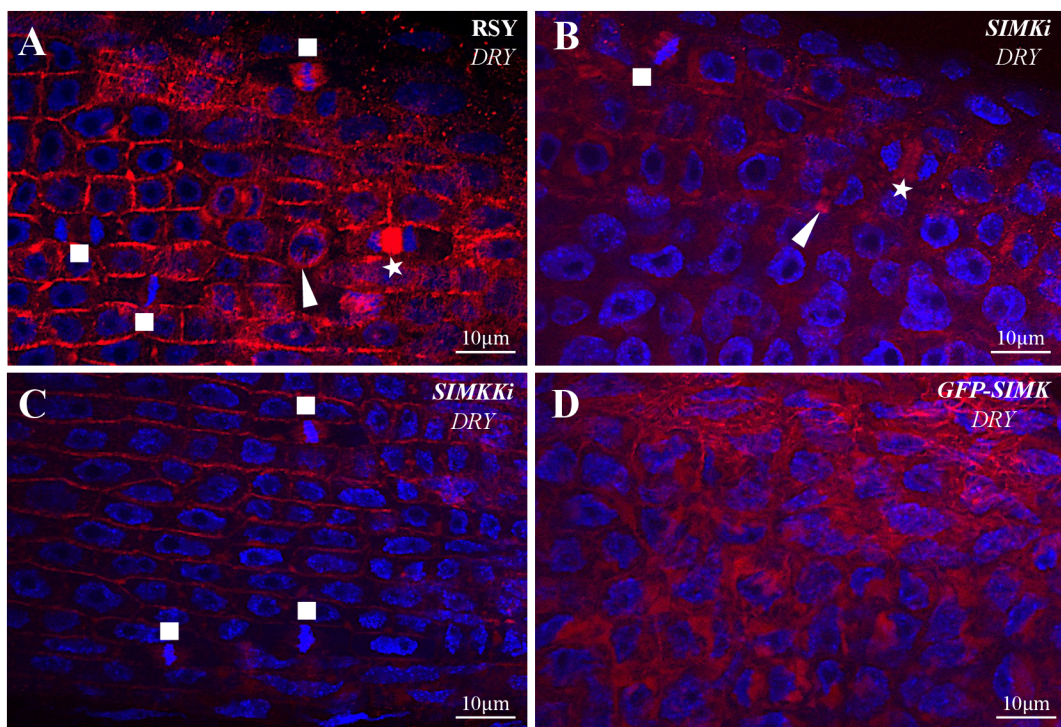
Obrázek 18: Imunohistochemická lokalizace mikrotubul a jader linie GFP-SIMK u *M. sativa*

Rostliny ošetřeny Fährus médiem a bakteriemi *P. fluorescens*, odebrány 20 a 120 min od aplikace. Hrot šipky ukazuje na PPB, hvězdička na fragmoplast, čtverec na mitotické fáze. Měrka 10  $\mu\text{m}$ . Snímky pořízeny na konfokálním mikroskopu.



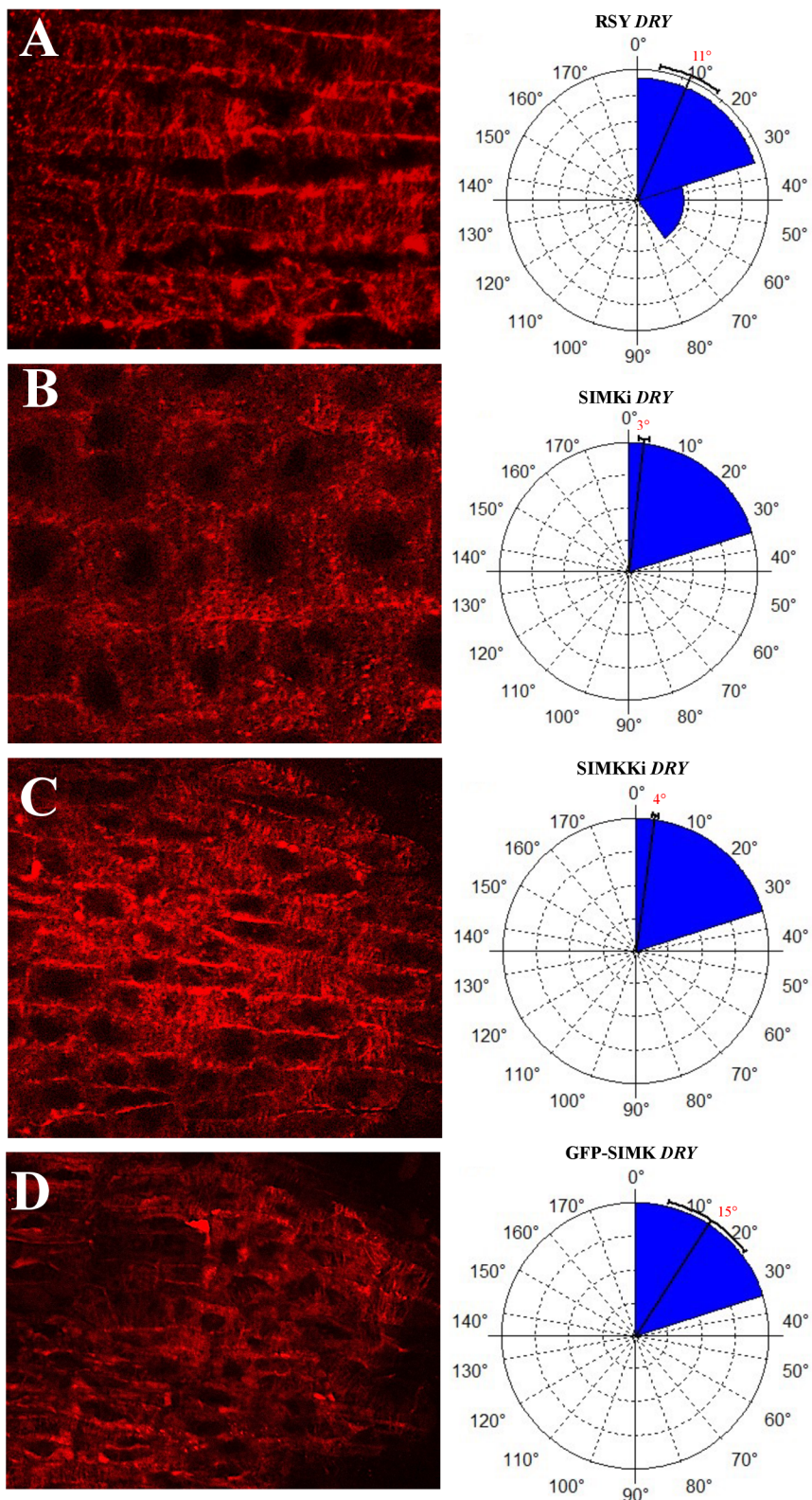
Obrázek 19: Analýza orientace kortikálních mikrotubulů linie GFP-SIMK u *M. sativa*.

Příklad uspořádání kortikálních MT a růžicový graf znázorňující rozložení a orientaci uhlů kortikálních mikrotubulů. **A** – GFP-SIMK *mock* kontroly; **B** – GFP-SIMK po 120 min ošetření s bakteriemi *P. fluorescens*. Modré pole na grafu znázorňuje rozložení a hodnotu průměrné orientaci (červeně) MT u *mock* kontroly. Průměrný úhel orientace MT *mock* kontroly je  $3^\circ$ , po ošetření bakteriemi je  $4,5^\circ$ .



Obrázek 20: **Imunohistochemická lokalizace mikrotubul a jader suchých kontrol *M. sativa***

Rostliny odebrány před aplikací bakterií a čistého Fáhreus média. Hrot šipky ukazuje na PPB, hvězdička na fragmoplast, čtverec na mitotické fáze. Měrka 10  $\mu\text{m}$ . Snímky pořizeny na konfokálním mikroskopu.



Obrázek 21: Analýza orientace kortikálních mikrotubulů suchých (*DRY*) kontrol u *M. sativa*.

Příklad uspořádání kortikálních MT a růžicový graf znázorňující rozložení a orientaci uhlů kortikálních mikrotubulů u suchých kontrol. **A** – RSY; **B** – SIMKi; **C** – SIMKKi; **D** – GFP-SIMK. Modré pole na grafu znázorňuje rozložení a hodnotu průměrné orientaci (červeně) MT u *DRY* kontrol. RSY - 11°, SIMKi - 3°, SIMKKi - 4°, GFP-simk - 15°.

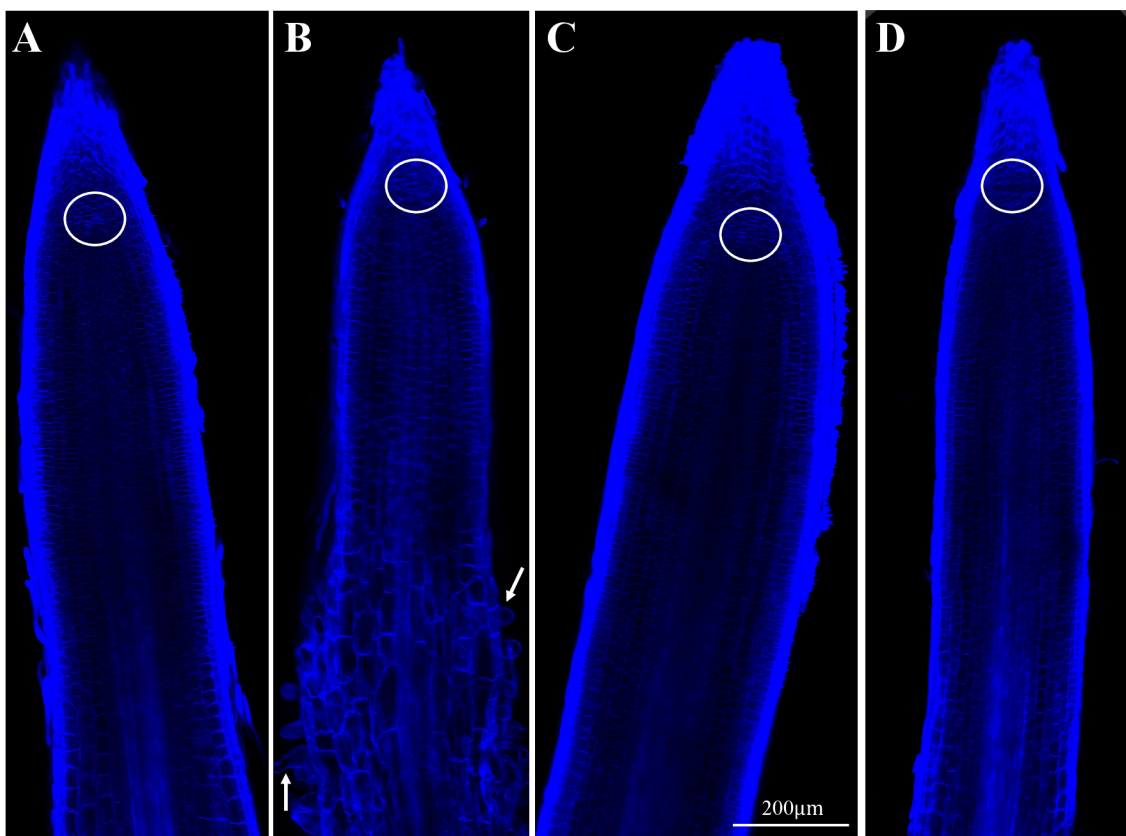


### 4.3 Fenotypová analýza

#### 4.3.1 Porovnání fenotypu kořenových špiček

Kořenové špičky *M. sativa* divokého typu a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK byly po zafixování ve fixačním roztoku inkubovány 12 dní v ClearSee roztoku. Následně bylo aplikováno fluorescenční barvivo calcofluor white a vzorky byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu.

Z obrázku 22 nejsou patrné žádné odchylky v anatomii kořenových špiček divokého typu RSY a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK. Pouze u transgenní linie SIMKi (Obr. 22B) jsou vidět kořenové vlásky na začátku diferenciální zóny a kratší meristematická a přechodná zóna oproti ostatním transgenním liniím a divokému typu RSY. U všech zkoumaných linií a divokého typu byly pozorovány kořenové apikální meristémy včetně Q-centra (značen bílým kruhem). Nejdál postavené Q-centrum je u linie SIMKKi (Obr. 22C).



Obrázek 22: Značení buněčných stěn Calcofluor white

**A** – RSY; **B** – SIMKi (bílé šipky značí kořenové vlásky); **C** – SIMKKi; **D** – GFP-SIMK. Místa označená bílými kruhy znázorňují klidové centrum kořene. Měrka 200  $\mu$ m. Snímky pořízeny na konfokálním mikroskopu.

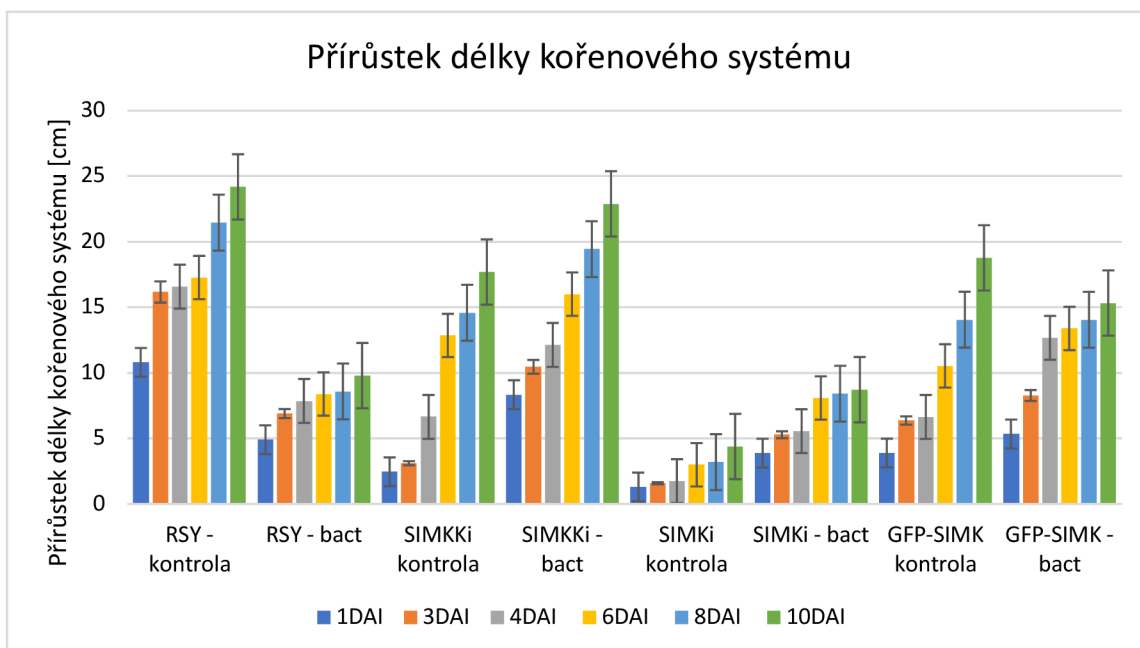
#### 4.3.2 Porovnání kořenového systému po desetidenní inkubaci s bakteriemi *P. fluorescens*

Rostliny *M. sativa* divokého typu RSY a transgenní linie SIMKKi, SIMKi a GFP-SIMK na Petriho miskách na Fåhreas médiu byly skenovány před naočkováním a poté 1., 3., 4., 6., 8. a 10. den po naočkování (DAI). Na měření délky kořenového systému byl použit program ImageJ. Zpracování dat a vypočítání přírůstku délky kořenového systému bylo provedeno v programu Microsoft excel. Na základě získaných dat byl pak vytvořen graf (Obr. 23).

Jak vyplývá z grafu, všechny použité linie včetně divokého typu RSY *M. sativa* měly kontinuální přírůstek délky kořenového systému v průběhu kultivace (Obr. 23). Kořenové systémy divokého typu RSY ošetřeny bakteriemi *P. fluorescens* rostly pomaleji (průměrný přírůstek = 7,73) než kontrolní rostliny ošetřeny čistým Fåhreas médiem (průměrný přírůstek = 17,74). Transgenní linie SIMKKi a SIMKi naočkované bakteriemi pak rostly rychleji než jejich kontroly. Průměrný přírůstek v celém průběhu kultivace SIMKKi po naočkování bakteriemi je 14,87, u kontrolních rostlin je průměrný přírůstek 9,55. Bakteriemi ošetřená SIMKi měla průměrný přírůstek 6,65 a kontrolní rostliny SIMKi 2,52. Kořenový systém linie GFP-SIMK rostl stabilně a průměrné hodnoty přírůstku se mezi naočkovanými a kontrolními moc nelišily, průměrný přírůstek u naočkovaných rostlin byl 11,51 a u kontrolních 10,04.

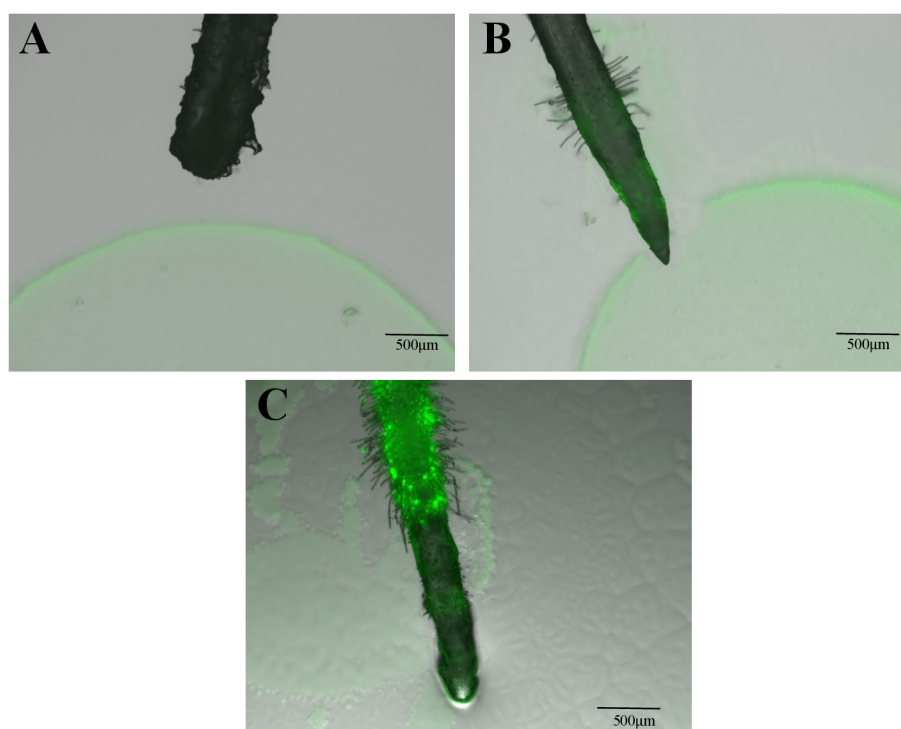
Z pozorovaných linií *M. sativa* vyplývá, že jen transgenní linie SIMKKi vykazovala rozdílné hodnoty přírůstků délky kořenového systému naočkovaných a kontrolních rostlin.

Zároveň byla na ZOOM mikroskopu pozorovaná tvorba biofilmu bakteriemi v průběhu kultivace na kořenových špičkách divokého typu RSY a transgenních linií *M. sativa*. Na obrázku 24 je zobrazená transgenní linie SIMKi. Bakterie byly aplikovány těsně ke kořenovým špičkám a následně byly dokumentovány: 1. den po aplikaci bakterií (Obr. 24A), 3. den po aplikaci (Obr. 24B) kdy se rostoucí kořenové špičky dostaly do kontaktu s bakteriemi a lze pozorovat zelený signál i na části kořenové špičky, a potom 7. den po aplikaci (Obr. 24C), kdy se bakterie rozrostly dál po kořeni a vytvářejí biofilm s charakteristickým silným zeleným signálem v oblasti kořenových vlásků.



Obrázek 23: Sloupcový graf přírůstku délky kořenového systému rostlin *M. sativa* po desetidenní inkubaci s bakteriemi *P. fluorescens*

Rostliny *M. sativa* divokého typu RSY a transgenní linie SIMKKi, SIMKi a GFP-SIMK byly naočkovány bakteriální kulturou *P. fluorescens* a ošetřeny čistým Fåhrens médiem jako kontrola v jednotlivých dnech.



Obrázek 24: Tvorba biofilmu bakterie *P. fluorescens* na kořenových špičkách *M. sativa* transgenní linie SIMKi

A – 1DAI; B – 3DAI; C – 7DAI. Zelený signál je vytvořen fluorescenční sloučeninou pyoverdinem, který produkují bakterie. Měrka: 500 μm. Snímky pořízeny na ZOOM mikroskopu.

## 5 DISKUSE

Cílem této bakalářské práce bylo vyprodukovat v *in vitro* podmínkách rostliny tolíce vojtěšky pomocí přímé i nepřímé SE. Dále navodit podmínky interakce rostlin vojtěšky s prospěšnými mikroorganismy *P. fluorescens* a následně sledovat změny fenotypu, relativního přírůstku délky kořenového systému a organizace mikrotubul oproti kontrolním podmínkám. Mikrotubuly byly značeny pomocí whole mount metody a mikroskopovány na konfokálním mikroskopu. Dále byla pozorována odlišnost uspořádání buněk divokého typu RSY a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK pomocí histochemického značení fluorescenčním barvivem calcofluor white.

K přípravě indukce přímé SE transgenních linií a divokého typu *M. sativa*, byl použit protokol publikovaný Denchev et. al. (1991). Přímou cestou se však nepodařilo získat rostliny pro pokračování experimentu. Denchev et al. (1991) uvádí, že tvorba embryí byla indukována již po dvou týdnech kultivace a největší počet embryí byl po 25 dnech indukce. V naší experimentální práci k indukci embryí došlo pouze v jednom opakování, a to u transgenní linie SIMMKi, jenomže po přeložení na pevné MS médium s ABA, embrya se přestala vyvíjet. Proces SE vyžaduje kultivaci explantátu na vhodném médiu s přidavkem hormonů, který vyvolá stresovou reakci a následné spuštění SE (Rose et al., 2010; Ikeda-Iwai et al., 2003). Úspěch regenerace pomocí SE závisí na genotypu rostliny, protože genetická variabilita může zabránit samotné regeneraci (Vasil, 1987). Kromě podmínek pěstování dárcovské rostliny, zdroje použitého explantátu a složení média, je genotyp kultivaru klíčovým faktorem ovlivňujícím úspěšnost SE (Popelka et al., 2003). Přímou SE jsme tedy založily z toho důvodu, neboť u nepřímé SE je zvýšená možnost vyskytu somaklonální variability (Joshi & Kumar, 2013).

Rhizobakterie z rodu *Pseudomonas* jsou schopny podporovat růst rostlin tím, že potlačují nemoci rostlin schopností produkovat železo, vyvolají systémovou rezistenci rostlin anebo antibiόzu, pomocí které inhibují růst jiných mikroorganismů (Berg, 2009; Bakker et al., 2007; Raaijmakers et al., 2002). Tyto bakterie se přichycují na místa produkce kořenových exsudátů díky adhezním proteinům rostlin a vytvářejí biofilm (Hinsa et al., 2003). Přímá podpora růstu rostlin spočívá v produkci fytohormonů (např. auxiny, gibbereliny, ethylen) a také spuštěním mechanismů zabezpečujících zvýšení dostupnosti živin pro rostliny (např. zvýšení příjmu fosfátu, produkce sideroforů a fixace dusíku) (Roquigny et al., 2017). Naše experimenty jasně nepotvrdily pozitivní vliv *Pseudomonas* na růst kořenového systému a na tvorbu biofilmu. K lepší verifikaci by

bylo potřeba zopakovat experiment s větším počtem rostlin v každé linii, které nebylo možné z časových důvodů provést v rámci této práce. Získání rostlinného materiálu se připravuje časově náročnou cestou nepřímé SE a zároveň je problematické získat dostatečný počet rostlin ze všech 4 použitých linií ve stejný čas.

Nárůst délky kořenového systému byl pozorován po dobu 10 dnů od aplikace bakterií oproti kontrolním rostlinám ošetřených čistým Fåhrens médiem. Pozitivní vliv bakterií se projevil i v buňkách kořenových spiček debraných po 20 a 120 minutách od aplikace bakterií, značené metodou whole mount. Byla pozorována zvýšená tvorba PPB u vzorků po 120 minutách inkubace s bakteriemi. To naznačuje zvýšenou cytoticketickou aktivitu a rostliny tedy nebyly stresované působením bakterií. Pozorována byla také změna orientace mikrotubul po 120 minutách od aplikace bakterií nebo čistého Fåhrens média, zejména u transgenní linie SIMKi byla pozorována největší změna v orientaci.

V této práci byla doplňkově zkoumána odlišnost tvaru a hustoty buněk mezi jednotlivými transgenními liniemi a divokým typem *M. sativa*. Pro mikroskopickou analýzu buněčných struktur bylo použito fluorescenční barvivo calcofluor white ve spojení s clearsee odbarvovací metodou, jelikož prostupnost běžně používaného vitálního fluorescenčního barviva FM 4-64 byla u kořenů vojtěšky nedostatečná. Calcofluor white se selektivně váže na primární buněčné stěny složené z celulózy nebo jiných  $\beta$ -1,4-vázaných sacharidů a tím umožňuje jejich vizualizaci (Snow, 2016; Mitra & Loque, 2014).

## 6 ZÁVĚR

Teoretická část této práce se zabývá charakteristikou rostliny *M. sativa*, jejím využitím a regenerací v *in vitro* podmínkách pomocí somatické embryogeneze. Dále byl popsán mechanismus vlivu PGPM na růst rostlin. Konkrétně pak byla charakterizována rhizobakterie *P. fluorescens* a její produkce hormonů ovlivňující růst rostlin. Především kyselina indol-3-octová, cytokininy, gibereliny, produkce ethylenu a sideroforu. Mikroorganismy ovlivňují organizaci cytoskeletu rostlin, kterému byla věnována jedna z podkapitol. Podrobně byly popsány mikrotubuly, aktinový cytoskelet a proteiny s nimi asociované a jejich vizualizace pomocí imunohistochemické metody whole mount.

Praktická část se věnuje výsledkům indukce přímé i nepřímé somatické embryogeneze rostlin divokého typu RSY a transgenních linií SIMKi, SIMKKi a GFP-SIMK *M. sativa*. Získané rostliny z nepřímé somatické embryogeneze byly naočkovány prospěšnou bakterií *P. fluorescens* a byl pozorován jejich vliv na růst kořenového systému.

Rostlinné kořenové špičky byly naočkovány bakteriemi *P. fluorescens* nebo čistým Föhreus médiem jako kontrolou a poté byly po 20 a 120 min inkubace odebrány. K imunolokalizaci mikrotubul byla použita primární protilátka anti  $\alpha$ -tubulin a sekundární protilátky značené AlexaFluor 488 a 647. Vzorky byly z mikroskopovány pomocí konfokálního mikroskopu. Dále se vyhodnotily délky a přírůstek délky kořenových systémů po interakci s bakteriemi po dobu deseti dnů, kdy nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u transgenní linie SIMKKi.

Závěrem můžeme konstatovat, že aplikace rhizobakterie *P. fluorescens* měla pozitivní vliv na růst zejména transgenní linie SIMKKi a SIMKi *M. sativa* získané nepřímou somatickou embryogenezí.

## 7 LITERATURA

- Amini, M., Deljou, A., & Nabiabad, H. S. (2016). Improvement of in vitro embryo maturation, plantlet regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 22(3), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0374-y>
- Arkipova, T. N., Prinsen, E., Veselov, S. U., Martinenko, E. V., Melentiev, A. I., & Kudoyarova, G. R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, 292, 305–315.
- Ausubel F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature immunology*, 6(10), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>
- Ausubel F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature immunology*, 6(10), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>
- Bakker, P. A., Pieterse, C. M., & Van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239–243.
- Baldacci-Cresp, F., Chang, C., Maucourt, M., Deborde, C., Hopkins, J., Lecomte, P., Bernillon, S., Brouquisse, R., Moing, A., Abad, P., Hérouart, D., Puppo, A., Favery, B., & Frendo, P. (2012). (Homo)glutathione deficiency impairs root-knot nematode development in *Medicago truncatula*. *PLoS pathogens*, 8(1), e1002471. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002471>
- Barros, J., Temple, S., and Dixon, R. A. (2019). Development and commercialization of reduced lignin alfalfa. *Current Opinion in Biotechnology* 56, 48–54. doi: 10.1016/j.copbio.2018.09.003
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84, 11–18.
- Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G., & Hashemi, M. (2017). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5), 407–415.
- Blondon, F., Marie, D., Brown, S., & Kondorosi, A. (1994). Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37(2), 264–270. <https://doi.org/10.1139/g94-037>
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), 742–744. <https://doi.org/10.1126/science.1171647>
- Bonifacino, J. S., & Neefjes, J. (2017). Moving and positioning the endolysosomal system. *Current opinion in cell biology*, 47, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2017.01.008>
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
- Bouton J. H. (2012) Breeding lucerne for persistence. *Crop and Pasture Science* 63, 95–106. <https://doi.org/10.1071/CP12009>

- Canaday J. & Brochot, & Seltzer, & Herzog, & Evrard, & Schmit, Anne-Catherine. (2004). Microtubule assembly in higher plants. *Recent Res. Devel. Mol. Biol.* 2. 103-119.
- Cézard C, Farvacques N, Sonnet P (2015) Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr Med Chem* 22:165–186
- Collins, J. S., & Goldsmith, T. H. (1981). Spectral properties of fluorescence induced by glutaraldehyde fixation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 29(3), 411–414. <https://doi.org/10.1177/29.3.6787116>
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11), 811-825.
- Daffonchio, D., Hirt, H., and Berg, G. (2015). “Plant-microbe interactions and water management in arid and saline soils,” in *Principles of Plant-Microbe Interactions*, ed B. Lugtenberg (Cham: Springer), 265–276. doi: 10.1007/978-3-319-08575-3\_28
- Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401–422
- Davies PJ (1995) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer, Dordrecht, pp 1–12
- Davies, P. (Ed.) (2013). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA.
- De Salamone IEG, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47:404–411
- Defeu Soufo, H. J., & Graumann, P. L. (2004). Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO reports*, 5(8), 789–794. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400209>
- Denchev, P., Velcheva, M., & Atanassov, A. (1991). A new approach to direct somatic embryogenesis in Medicago. *Plant cell reports*, 10(6-7), 338–341. <https://doi.org/10.1007/BF00193154>
- Dijak, M., & Brown, D. C. (1987). Patterns of direct and indirect embryogenesis from mesophyll protoplasts of Medicago sativa. *Plant cell, tissue and organ culture*, 9, 121–130.
- Dubey, K. K., & Fulekar, M. H. (2013). Investigation of potential rhizospheric isolate for cypermethrin degradation. *3 Biotech*, 3(1), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0067-3>
- Dustin P. (1980). Microtubules. *Scientific American*, 243(2), 66–76. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0880-66>
- Egamberdieva D (2005) Characterization of *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of plants grown in serozem soil, semiarid region of Uzbekistan. *Sci World J* 5:501–509
- Eida, A. A., Hirt, H., and Saad, M. M. (2017). “Challenges faced in field application of phosphate-solubilizing bacteria,” in *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. Microorganisms for Sustainability*, Vol. 2, ed S. Mehnaz (Singapore: Springer), 125–143. doi: 10.1007/978-981-10-4862-3\_6



- Eli, S., Castagna, R., Mapelli, M., & Parisini, E. (2022). Recent Approaches to the Identification of Novel Microtubule-Targeting Agents. *Frontiers in molecular biosciences*, *9*, 841777. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.841777>
- Enebe, M. C., & Babalola, O. O. (2018). The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*(18), 7821–7835. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9214-z>
- Fan, T., Zhai, H., Shi, W., Wang, J., Jia, H., Xiang, Y., & An, L. (2013). Overexpression of profilin 3 affects cell elongation and F-actin organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*, *32*(1), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1349-2>
- Fehér, A., Pasternak, T.P. & Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* *74*, 201–228. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, *463*(7280), 485–492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Fowler, M. R., Ong, L. M., Russinova, E., Atanassov, A. I., Scott, N. W., Slater, A., & Elliott, M. C. (1998). Early changes in gene expression during direct somatic embryogenesis in alfalfa revealed by RAP-PCR. *Journal of Experimental Botany*, *49*(319), 249–253. <https://doi.org/10.1093/JXB/49.319.249>
- Fras, A., Smolen, B., & Maluszynska, J. (2008). Vascularization of zygotic and somatic embryos. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *50*, 43-48.
- Fu, G., Grbic, V., Ma, S., & Tian, L. (2015). Evaluation of somatic embryos of alfalfa for recombinant protein expression. *Plant cell reports*, *34*(2), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1700-x>
- Garcia, C., Furtado de Almeida, AA., Costa, M. *et al.* Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **137**, 193–212 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- Gardiner J. (2013). The evolution and diversification of plant microtubule-associated proteins. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *75*(2), 219–229. <https://doi.org/10.1111/tpj.12189>
- Germana, M. A., & Lambardi, M. (Eds.) (2016) *In vitro* embryogenesis in higher plants. New York/Heidelberg: Humana Press.
- Glick B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, *2012*, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews. Microbiology*, *3*(4), 307–319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S., & Matsunaga, S. (2016). Three-Dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique. *Plant & cell physiology*, *57*(3), 462–472. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw027>

- Havananda, T., Brummer, E. C., & Doyle, J. J. (2011). Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa and allies (*Medicago sativa*; Leguminosae). *American journal of botany*, 98(10), 1633–1646. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000318>
- He, F., Chen, H., & Han, R. (2020). The Plant Cytoskeleton and Crosslinking Factors. *CellBio*, 09(02). <https://doi.org/10.4236/cellbio.2020.92004>
- Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447(7143), 418–424. <https://doi.org/10.1038/nature05917>
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., & O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology*, 49(4), 905-918.
- Hrbáčková, M., Luptovciak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., Novák, D., Bednarz, H., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant biotechnology journal*, 19(4), 767–784. <https://doi.org/10.1111/pbi.13503>
- Chai, C., Chin, S., & Blancaflor, E. B. (2022). Imaging the Cytoskeleton in Living Plant Roots. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2364, 139–148. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1661-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1661-1_6)
- Chernyad'ev II (2009) The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress. *Appl Biochem Microbiol* 45:351–362
- Choudhary DK, Prakash A, Wray V et al (2009) Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. *Curr Sci* 97:170–179
- Chytrý M., Danihelka J., Kaplan Z., Wild J., Holubová D., Novotný P., Řezníčková M., Rohn M., Dřevojan P., Grulich V., Klimešová J., Lepš J., Lososová Z., Pergl J., Sádlo J., Šmarda P., Štěpánková P., Tichý L., Axmanová I., Bartušková A., Blažek P., Chrtěk J. Jr., Fischer F. M., Guo W.-Y., Herben T., Janovský Z., Konečná M., Kühn I., Moravcová L., Petřík P., Pierce S., Prach K., Prokešová H., Štech M., Těšitel J., Těšitelová T., Večeřa M., Zelený D. & Pyšek P. (2021) Pladias Database of the Czech Flora and Vegetation. – *Preslia* 93: 1–87. <https://doi.org/10.23855/preslia.2021.001>.
- Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., & Kamada, H. (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 34(1), 107–114. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01702.x>
- Jogezai, Taj, M.K., Shahzad, F., Khan, A.W., Taj, I., Yasmeen, S., Ullah, N., Azam, S., Lalbib, Sazain, B., Ali, S.A., Hussain, A., Samreen, Z. (2019): Role of alfalfa in natural environment. *J. Bio. Env. Sci.* 15 (4), 25-31
- Jones, D. A., & Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current opinion in immunology*, 16(1), 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.016>
- Joshi, R., & Kumar, P. (2013). Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. *Agricultural Reviews*, 34(1), 1-20.

- Kalmbach, L., Hématy, K., De Bellis, D., Barberon, M., Fujita, S., Ursache, R., Daraspe, J., & Geldner, N. (2017). Transient cell-specific EXO70A1 activity in the CASP domain and Casparian strip localization. *Nature plants*, 3, 17058. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.58>
- Kang S-M, Radhakrishnan R, Khan AL et al (2014) Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol Biochem* 84:115–124
- Kao, K. N., & Michayluk, M. R. (1980). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 96(2), 135-141.
- Kasmani, M. B., Samavat, S., Mostafavi, M., & Khalighi, A. (2013). The effect of application of humic acid foliar on biochemical parameters of pistachio under drought stress. *New York Sci J*, 6(12), 26-31.
- Kaushal, M., and Wani, S. P. (2016). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Ann. Microbiol.* 66, 35–42. doi: 10.1007/s13213-015-1112-3
- Kende, H., & Zeevaart, J. (1997). The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant cell*, 9(7), 1197–1210. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1197>
- Khan, A. L., Waqas, M., Asaf, S., Kamran, M., Shahzad, R., Bilal, S., ... & Lee, I. J. (2017). Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. *Environmental and Experimental Botany*, 133, 58- 69
- Kim, Y. J., Lee, O. R., Kim, K. T., & Yang, D. C. (2012). High Frequency of Plant Regeneration through Cyclic Secondary Somatic Embryogenesis in *Panax ginseng*. *Journal of ginseng research*, 36(4), 442–448. <https://doi.org/10.5142/jgr.2012.36.4.442>
- Kim, Y. J., Lee, O. R., Kim, K. T., & Yang, D. C. (2012). High Frequency of Plant Regeneration through Cyclic Secondary Somatic Embryogenesis in *Panax ginseng*. *Journal of ginseng research*, 36(4), 442–448. <https://doi.org/10.5142/jgr.2012.36.4.442>
- King RW, Evans LT (2003) Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prising open the lid of the “Florigen” black box. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 54:307–328
- Komis, G., Luptovciak, I., Duskocilova, A., & Samaj, J. (2015). Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1043-1062.
- Komis, G., Novák, D., Ovečka, M., Šamajová, O., & Šamaj, J. (2018). Advances in Imaging Plant Cell Dynamics. *Plant physiology*, 176(1), 80–93. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00962>
- Korolev, A. V., Buschmann, H., Doonan, J. H., & Lloyd, C. W. (2007). AtMAP70-5, a divergent member of the MAP70 family of microtubule-associated proteins, is required for anisotropic cell growth in *Arabidopsis*. *Journal of cell science*, 120(Pt 13), 2241–2247. <https://doi.org/10.1242/jcs.007393>
- Koskey, G., Mburu, S. W., Awino, R., Njeru, E. M., & Maingi, J. M. (2021). Potential Use of Beneficial Microorganisms for Soil Amelioration, Phytopathogen Biocontrol, and Sustainable Crop Production in Smallholder Agroecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 130. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.606308>

- Kost, B., & Chua, N. H. (2002). The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell*, 108(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00634-1)
- Küster, H. (2013). *Medicago truncatula*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 335–337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00915-3>
- Lai, F. M., & McKersie, B. D. (1994). Regulation of starch and protein accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science*, 100(2), 211–219.
- Lai, F. M., Lecouteux, C. G., & McKersie, B. D. (1995). Germination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds and desiccated somatic embryos: I. Mobilization of storage reserves. *Journal of plant physiology*, 145(4), 507–513.
- León M, Yaryura P, Montecchia M et al (2009) Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. *Int J Microbiol*. doi:10.1155/2009/572049
- Lewis, J. D., Guttman, D. S., & Desveaux, D. (2009). The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Seminars in cell & developmental biology*, 20(9), 1055–1063. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.06.003>
- Li Q, Saleh-Lakha S, Glick BR (2005) The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd 1843 on the rooting of carnation cuttings. *Can J Microbiol* 51:511–514
- Li, J., Blanchoin, L., & Staiger, C. J. (2015). Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual review of plant biology*, 66, 415–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040327>
- Lian, N., Wang, X., Jing, Y., & Lin, J. (2021). Regulation of cytoskeleton – associated protein activities: Linking cellular signals to plant cytoskeletal function. *Journal of integrative plant biology*, 63(1), 241–250. <https://doi.org/10.1111/jipb.13046>
- Lu, D. Y., Davey, M. R., Pental, D., & Cocking, E. C. (1982). Forage legume protoplasts: somatic embryogenesis from protoplasts of seedling cotyledons and roots of *Medicago sativa*. In *Plant tissue culture 1982: proceedings, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokyo and Lake Yamanake, Japan, July 11-16, 1982/edited by Akio Fujiwara*. Tokyo: Japanese Association for Plant Tissue Culture, [1982].
- Lucas, J. R., & Shaw, S. L. (2012). MAP65-1 and MAP65-2 promote cell proliferation and axial growth in *Arabidopsis* roots. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 71(3), 454–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05002.x>
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Oh et al (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils* 30:433–439
- Mathur, J., & Hülskamp, M. (2002). Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. *Current biology: CB*, 12(19), R669–R676. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01164-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01164-8)
- McCurdy, D. W., Kovar, D. R., & Staiger, C. J. (2001). Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*, 215(1–4), 89–104. <https://doi.org/10.1007/BF01280306>

- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez- Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in plant science*, 10, 77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *In vitro embryogenesis in plants*, 155-203.
- Mgbemene, C. A., Nnaji, C. C., & Nwozor, C. (2016). Industrialization and its backlash: focus on climate change and its consequences. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9(4), 301-316.
- Mohan, V., Wibisono, R., Chalke, S., Fletcher, G., & Leroi, F. (2023). The Anti- Listeria Activity of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from the Horticultural Environment in New Zealand. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(2), 349. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020349>
- Molero de Ávila, M. E., Alarcón, M. V., Uriarte, D., Mancha, L. A., Moreno, D., & Francisco-Morcillo, J. (2019). Histochemical and immunohistochemical analysis of enzymes involved in phenolic metabolism during berry development in *Vitis vinifera* L. *Protoplasma*, 256(1), 25–38. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1278-1>
- Mravec, J., Guo, X., Hansen, A. R., Schückel, J., Kračun, S. K., Mikkelsen, M. D., Mouille, G., Johansen, I. E., Ulvskov, P., Domozych, D. S., & Willats, W. G. T. (2017). Pea Border Cell Maturation and Release Involve Complex Cell Wall Structural Dynamics. *Plant physiology*, 174(2), 1051–1066. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00097>
- Nagaki, K., Yamaji, N., & Murata, M. (2017). ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples. *Scientific reports*, 7, 42203. <https://doi.org/10.1038/srep42203>
- Nebenfür, A., Frohlick, J. A., & Staehelin, L. A. (2000). Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant physiology*, 124(1), 135–151. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.135>
- Nick P. (2013). Microtubules, signalling and abiotic stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 75(2), 309–323. <https://doi.org/10.1111/tpj.12102>
- O'Sullivan, D. J., & O'Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56(4), 662– 676. <https://doi.org/10.1128/mr.56.4.662-676.1992>
- Oves, M., Khan, M. S., and Qari, H. A. (2017). *Ensifer adhaerens* for heavy metal bioaccumulation, biosorption, and phosphate solubilization under metal stress condition. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 80, 540–552. doi: 10.1016/j.jtice.2017.08.026
- Pasternak, T., Tietz, O., Rapp, K., Begheldo, M., Nitschke, R., Ruperti, B., & Palme, K. (2015). Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant methods*, 11, 50. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2>

- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207–220
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795–3801
- Pereira, L. F., & Erickson, L. (1995). Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant cell reports*, 14(5), 290–293. <https://doi.org/10.1007/BF00232030>
- Petrásek, J., & Schwarzerová, K. (2009). Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current opinion in plant biology*, 12(6), 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.010>
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant – associated bacteria*, 195-230.
- Popelka, J. C., Xu, J., & Altpeter, F. (2003). Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgenic research*, 12(5), 587.
- Porter, K., & Day, B. (2016). From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *Journal of integrative plant biology*, 58(4), 299–311. <https://doi.org/10.1111/jipb.12445>
- Pradhan Mitra, P., & Loqué, D. (2014). Histochemical staining of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (87), 51381. <https://doi.org/10.3791/51381>
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & De Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van leeuwenhoek*, 81, 537-547.
- Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E. A., & Visser, R. G. F. (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*, 81, 93-107
- Ren, Z., Zhang, Y., Zhang, Y., He, Y., Du, P., Wang, Z., Sun, F., & Ren, H. (2019). Cryo-EM Structure of Actin Filaments from *Zea mays* Pollen. *The Plant cell*, 31(12), 2855–2867. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00973>
- Rhodes, L. (2016) *Medicago sativa*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T174725A19402449. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T174725A19402449.en>.
- Rieder, C. L., & Salmon, E. D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends in cell biology*, 8(8), 310–318. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01299-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01299-9)
- Rodríguez-Milla, M. A., & Salinas, J. (2009). Prefoldins 3 and 5 play an essential role in *Arabidopsis* tolerance to salt stress. *Molecular plant*, 2(3), 526–534. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp016>
- Roquigny, R., Novinscak, A., Biessy, A., & Fillion, M. (2017). Pseudomonadaceae: from biocontrol to plant growth promotion. *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*, 39-68. Rose, R.
- J., Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Chen, S. K., Wang, X. D., Nolan, K. E., & Sheahan, M. B. (2010). Developmental biology of somatic embryogenesis. *Plant Developmental Biology- Biotechnological Perspectives: Volume 2*, 3-26.

- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, *148*(3), 1547–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Saad, M. M., Eida, A. A., & Hirt, H. (2020). Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. *Journal of experimental botany*, *71*(13), 3878–3901. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa111>
- Saleem M, Arshad M, Hussain S et al (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:635–648
- Sangra, A., Shahin, L., & Dhir, S. K. (2019). Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. *Plants (Basel, Switzerland)*, *8*(8), 278. <https://doi.org/10.3390/plants8080278>
- Seiler, G. J. (1991). Registration of alfalfa hybrid Regen-SY germplasm for tissue culture and transformation research. *Crop Science*, *31*(4), 1098-1098.
- Selvakumar, G., Panneerselvam, P., Bindu, G. H., & Ganeshamurthy, A. N. (2015). Pseudomonads: plant growth promotion and beyond. *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*, 193-208.
- Sen S, Rai M, Acharya R et al (2009) Biological control of pathogens causing the Cymbidium pseudobulb rot complex using fluorescent *Pseudomonas* strain BRL-1. *J Plant Pathol* 91:751–755
- Sexauer, M., Shen, D., Schön, M., Andersen, T. G., & Markmann, K. (2021). Visualizing polymeric components that define distinct root barriers across plant lineages. *Development (Cambridge, England)*, *148*(23), dev199820. <https://doi.org/10.1242/dev.199820>
- Shaddad, M. A. K., Abd El-Samad, H. M., & Mostafa, D. (2013). Role of gibberellic acid (GA3) in improving salt stress tolerance of two wheat cultivars. *Int. J. Plant Physiol. Biochem*, *5*(4), 50-57.
- Shaw, S.L. (2013) Reorganization of the Plant Cortical Microtubule Array. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*, 693-697. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.09.006>
- Smertenko, A. P., Kaloriti, D., Chang, H. Y., Fiserova, J., Opatrny, Z., & Hussey, P. J. (2008). The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *The Plant cell*, *20*(12), 3346–3358. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063362>
- Snow J. W. (2016). A fluorescent method for visualization of Nosema infection in whole-mount honey bee tissues. *Journal of invertebrate pathology*, *135*, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.01.007>
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E., et al. (2016). Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant Soil* *405*, 357–370. doi: 10.1007/s11104-015-2650-y
- Staiger, C. J. (2000). Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual review of plant biology*, *51*(1), 257-288.

- Sugimoto, K., Gordon, S. P., & Meyerowitz, E. M. (2011). Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?. *Trends in cell biology*, 21(4), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.004>
- Synek, L., Rawat, A., L'Haridon, F., Weisskopf, L., Saad, M. M., & Hirt, H. (2021). Multiple strategies of plant colonization by beneficial endophytic *Enterobacter* sp. SA187. *Environmental microbiology*, 23(10), 6223–6240. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15747>
- 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 (Clifton, N.J.)*, 1171, 107–115. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0922-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0922-3_9)
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). Photosynthesis: physiological and ecological considerations. *Plant Physiol*, 9, 172-174.
- Takeuchi, M., Staehelin, L. A., & Mineyuki, Y. (2017). Actin-microtubule interaction in plants. *Cytoskeleton-structure, dynamics, function and disease*, 33-54.
- Telekalo, N., & Melnyk, M. (2020). Agroecological substantiation of medicago sativa cultivation technology. *Agronomy Research*, 18(4). <https://doi.org/10.15159/AR.20.181>
- Tian, L., Brown, D. C., & Watson, E. (2002). Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38, 279- 284.
- Tichá, M., Hlaváčková, K., Hrbáčková, M., Ovečka, M., Šamajová, O., & Šamaj, J. (2020). Super-resolution imaging of microtubules in *Medicago sativa*. *Methods in cell biology*, 160, 237–251. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.03.004>
- Tichá, M., Illésová, P., Hrbáčková, M., Basheer, J., Novák, D., Hlaváčková, K., Šamajová, O., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2020). Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical reviews in biotechnology*, 40(8), 1265–1280. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1814689>
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Frontiers in plant science*, 8, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Triboi, E., Triboi-Blondel, A. M. (2014). Towards sustainable, self-supporting agriculture: biological nitrogen factories as a key for future cropping systems. In *Soil as World Heritage*, ed. D. Dent /Dordrecht: Springer), 329–342. doi: 10.1007/978-94-007-6187-2\_32
- Ursache, R., Andersen, T. G., Marhavý, P., & Geldner, N. (2018). A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 93(2), 399–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.13784>
- Vasil, I. K. (1987). Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of plant physiology*, 128(3), 193-218.
- Vasil, I. K. (1988). Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/technology*, 6(4), 397-402.



- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrullah Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Wallace, I. S., & Anderson, C. T. (2012). Small molecule probes for plant cell wall polysaccharide imaging. *Frontiers in plant science*, 3, 89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00089>
- Wang, S., Kurepa, J., Hashimoto, T., & Smalle, J. A. (2011). Salt stress-induced disassembly of Arabidopsis cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. *The Plant cell*, 23(9), 3412–3427. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089920>
- Wang, X., & Mao, T. (2019). Understanding the functions and mechanisms of plant cytoskeleton in response to environmental signals. *Current opinion in plant biology*, 52, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.08.002>
- Wang, X., Zhu, L., Liu, B., Wang, C., Jin, L., Zhao, Q., & Yuan, M. (2007). Arabidopsis MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *The Plant cell*, 19(3), 877–889. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048579>
- Waterman-Storer, C. M., & Salmon, E. D. (1997). Microtubule dynamics: treadmilling comes around again. *Current biology: CB*, 7(6), R369–R372. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00177-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00177-1)
- Wheatley, R. M., & Poole, P. S. (2018). Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS microbiology reviews*, 42(4), 448–461. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy014>
- Winkelmann T. (2016). Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1359, 25–46. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2)
- Xue, B., & Robinson, R. C. (2013). Guardians of the actin monomer. *European journal of cell biology*, 92(10-11), 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.10.012>
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57.
- You, Y. H., Park, J. M., Park, J. H., & Kim, J. G. (2016). Specific rhizobacterial resources: characterization and comparative analysis from contrasting coastal environments of Korea. *Journal of basic microbiology*, 56(1), 92–101. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500195>
- Yue, J., Xie, M., Gou, X., Lee, P., Schneider, M. D., & Wu, X. (2014). Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4. *Developmental cell*, 31(5), 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.025>
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374(1–2), 689–700. <https://doi.org/10.1007/S11104-013-1915-6>
- Zhou, D., Huang, X.-F., Chaparro, J. M., Badri, D. V., Manter, D. K., Vivanco, J. M., et al. (2016). Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant Soil* 401, 259–272. doi: 10.1007/s11104-015-2743-7

Zhou, J., & Giannakakou, P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 5(1), 65–71.  
<https://doi.org/10.2174/1568011053352569>

Zimmerman J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant cell*, 5(10), 1411–1423. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1411>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
ABA	kyselina abcisová
ABP	proteiny vázající aktin
AMK	aminokyselina
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzyladenin
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide/hovězí sérový albumin
DAI	„day after inoculation“/den po inokulaci
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenylindol
DBI	„day before inoculation“/den před inokulací
EB	„ending binding proteins“/koncové vazebné proteiny
GA	gibereliny
GFP	zelený fluorescenční protein
IAA	kyselina indol-3-octová
KIN	kinetin
MAP	mitogenem-aktivovaný protein
MAPK	mitogenem-aktivované protein kinázy
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly
MS	Murashige a Skoog médium
MT	mikrotubuly
PBS	fosfátový pufr
PEG	polyethylenglykol
PGPM	mikroorganismy podporující růst rostlin
PGPR	rhizobakterie podporující růst rostlin
PPB	preprofázní svazek
RP	relativní přírůstek
RSY	kultivar Regen SY
SE	somatická embryogeneze
SIMK	stresem aktivovaná MAPK