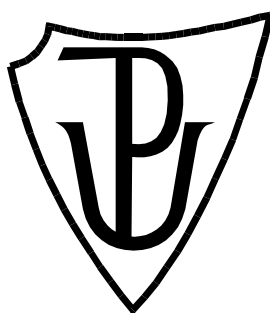


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fenotypická charakterizace kontrolních a
transgenních rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) se
sníženou expresí mitogenem-aktivovaných protein
kináz**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Valerie Kotulanová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorů. 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 mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne:

.....

Poděkování

„Ráda bych poděkovala především vedoucímu své bakalářské práce prof. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za věnovaný čas, cenné rady, konzultace a celkovou pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat také celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za pomoc a rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i vedoucímu oddělení prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnění práce a využívání vybavení v laboratoři.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Valerie Kotulanová
Název práce	Fenotypická charakterizace kontrolních a transgenních rostlin vojtěšky (<i>Medicago sativa</i> L.) se sníženou expresí mitogenem-aktivovaných protein kináz
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Medicago sativa patří mezi luštěniny, které dokážou interagovat a vytvářet symbiotický vztah s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium*. Tento vztah spočívá ve vytváření specializovaných orgánů (tzv. hlízek) na kořenech rostlin, v nichž bakterie redukuje atmosférický dusík na amoniak. Pro zahájení interakce mezi rostlinou a bakterií jsou klíčové mitogenem-aktivované proteinkinasy (MAPK), podílející se na přenosu signálu z vnějšího prostředí. U *M. sativa* byla v rámci popsáných MAPK identifikována SIMK (stresem indukovaná MAPK), která dokáže ovlivňovat stav a dynamiku aktinového cytoskeletu a je aktivní zejména během vytváření a vývoje kořenových vlásků, což může ovlivnit také efektivitu procesu tvorby hlízek. Cílem této bakalářské práce byla regenerace kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* v *in vitro* podmínkách procesem somatické embryogeneze. Dále fenotypická charakterizace a srovnání kontrolních a transgenních rostlin *M. sativa* prostřednictvím měření délky kořenové soustavy a počítání laterálních kořenů. Po aplikaci půdních bakterií *Sinorhizobium meliloti* na kořeny rostlin byla vyhodnocována efektivita tvorby hlízek.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, SIMK, somatická embryogeneze, <i>Sinorhizobium meliloti</i> , transgeneze
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Valerie Kotulanová
Title	Phenotypical characterization of control and transgenic plants of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) with downregulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	Prof. Mgr. M. Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Medicago sativa is one of the legumes that can interact and form a symbiotic relationship with soil bacteria of the genus *Rhizobium*. This relationship includes the formation of specialized organs (so-called nodules) on the roots of plants, in which bacteria reduce atmospheric nitrogen to ammonia. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), involved in signal transduction from the environment, are key components of plant-bacterial interactions. In *M. sativa*, SIMK (stress-induced MAPK) has been identified within the described alfalfa MAPKs, which can influence the state and dynamics of the actin cytoskeleton. SIMK is active especially during the formation and development of root hairs, which may also affect the efficiency of the nodule formation process. The aim of this bachelor thesis was the regeneration of control Regen-SY and transgenic *SIMK RNAi* alfalfa plants *in vitro* by the process of somatic embryogenesis. Furthermore, phenotypic characterization and comparison of control and transgenic *M. sativa* plants was performed by measuring the length of the root system and counting the lateral roots. After application of soil bacteria *Sinorhizobium meliloti* to plant roots, the effectiveness of nodulation was evaluated.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, SIMK, somatic embryogenesis, <i>Sinorhizobium meliloti</i> , transgenesis
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Tolice vojtěška (<i>Medicago sativa</i> L.)	2
2.1.1 Charakteristika	2
2.1.2 Kořen.....	2
2.1.3 Stonek a listy.....	2
2.1.4 Květ.....	3
2.1.5 Plody a semena	3
2.1.6 Zemědělské a ekonomické využití	3
2.2 Indukce a regenerace rostlin v <i>in vitro</i> podmínkách	4
2.2.1 Somatická embryogeneze	4
2.2.2 Nepřímá somatická embryogeneze	5
2.2.3 Přímá somatická embryogeneze.....	5
2.3 Transgenozie a stabilní transformace rostlin.....	6
2.3.1 Transformace zprostředkovaná bakterií <i>Agrobacterium</i>	7
2.3.2 Transformace metodou elektroporace.....	8
2.3.3 Biolistická metoda transformace.....	9
2.3.4 Mikroinjekce	10
2.3.5 „Gene-targeting“ technologie	10
2.4 Signalizace u rostlin	13
2.4.1 Mitogenem – aktivované protein kinázy (MAPK).....	13
2.4.2 Podíl signálních drah MAPK na regulaci vývojových procesů, hormonální regulace a při biotických a abiotických interakcích rostlin s prostředím	15
2.4.3 MAPK u <i>M. sativa</i>	19
2.4.4 Interakce rostlin <i>M. sativa</i> s bakteriemi rodu <i>Rhizobium</i>	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1 Materiál	22
3.1.1 Použité chemikálie	22
3.1.2 Roztoky a média.....	23
3.1.3 Použité přístroje	26
3.1.4 Software pro zpracování výsledků.....	27
3.1.5 Rostlinný materiál	27
3.1.6 Bakteriální materiál.....	27
3.2 Metody	27
3.2.1 Příprava B5H média.....	27
3.2.2 Příprava B50 média.....	28
3.2.3 Příprava MMS média.....	28
3.2.4 Příprava MS média.....	29

3.2.5 Příprava tekutého Fáhreova média bez dusíku.....	29
3.2.6 Povrchová sterilizace listů	29
3.2.7 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze	30
3.2.8 Příprava kultury <i>Sinorhizobium meliloti</i>	30
3.2.9 Aplikace <i>Sinorhizobium meliloti</i>	30
3.2.10 Měření délky kořenové soustavy a počítání bočních kořenů kontrolních a transgenních rostlin <i>Medicago sativa</i>	31
3.2.11 Vyhodnocování efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních a transgenních rostlin <i>Medicago sativa</i>	31
3.2.12 Analýza a zpracování dat	31
4. VÝSLEDKY	32
4.1 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze	32
4.2 Měření délky kořenové soustavy a počítání bočních kořenů kontrolních a transgenních rostlin <i>Medicago sativa</i>	35
4.3 Vyhodnocování efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních a transgenních rostlin <i>Medicago sativa</i>	38
5. DISKUSE.....	40
6. ZÁVĚR	42
7. SEZNAM LITERATURY	43
8. SEZNAM ZKRATEK	52

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování rešerše zaměřené na:

- význam druhu *Medicago sativa* L. a shrnutí jeho zemědělského a biologického potenciálu
- zemědělský a ekologický význam půdních bakterií rodu *Rhizobium*
- podíl signálních proteinů ze skupiny MAP kinas na regulaci vývojových procesů rostlin a jejich reakcí na vnější stresové podmínky
- signální, vývojové a strukturní aspekty interakcí rostlin vojtěšky se *Sinorhizobium meliloti* v procesu tvorby hlízek
- metody stabilní transformace *Medicago sativa* za účelem vnášení nebo umlčování genů a selekce pozitivních transgenů pomocí genotypování transformovaných rostlin

Praktická část

Realizovat experimenty zaměřené na studium vývojových procesů kontrolních a transgenních rostlin vojtěšky *in vitro* v kontrolních podmínkách, vyhodnocovat kvalitativní a kvantitativní znaky fenotypu a indukovat interakci rostlin vojtěšky s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Konkrétní cíle jsou:

- kultivace a množení rostlin vojtěšky v podmínkách *in vitro*
- charakterizace transgenních linií vojtěšky pomocí analýzy fenotypu kořenového systému
- aplikace bakteriální kultury *Sinorhizobium meliloti* k indukci tvorby hlízek
- vyhodnocení efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních rostlin a u rostlin se sníženou expresí mitogenem-aktivovaných protein kináz

1. ÚVOD

Medicago sativa je vytrvalá, modrofialově kvetoucí luskovina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*; Randuška, 1983). Díky vysokému obsahu bílkovin, vitamínů, enzymů a minerálů patří mezi nejdůležitější a nejvíce pěstované luštěniny světa (Bouton, 2001; Bora a Sharma, 2011). Její významnou vlastností je také schopnost vytvářet symbiotický vztah s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium* fixujícími atmosférický dusík. Do této skupiny řadíme mimo jiné také kmen gram-negativních, aerobních bakterií *Sinorhizobium meliloti* (Galibert, 2001; Gibson *et al.*, 2008). Díky této mimořádné schopnosti nevyžaduje *M. sativa* pro svůj růst téměř žádné množství dusíkatého hnojiva a sama příznivě ovlivňuje úrodnost půdy. Samotná interakce se projevuje vytvořením specializovaných orgánů, tzv. hlízek, na kořenech rostlin, v nichž probíhá postupná redukce atmosférického dusíku na amoniak (Randuška, 1983; Ebert, 2007; Triboui a Triboui-Blondel, 2014; Roy *et al.*, 2019).

Pro zahájení interakce a vytvoření symbiotického vztahu mezi rostlinou a bakterií je klíčová signalizace prostřednictvím mitogenem-aktivovaných proteinkinasových (MAPK) kaskád. Ty se u rostlin podílí na přenosu signálů z vnějšího prostředí, na obranných reakcích, vývojových procesech, či hormonální regulaci (Kiegerl *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2013; Xu a Zhang, 2015). Mezi nejvýznamnější MAPK u *M. sativa* řadíme SIMK neboli stresem indukovanou MAPK. Její role se projevuje zejména při ovlivňování stavu a dynamiky aktinového cytoskeletu a bylo zjištěno, že nadměrná exprese proteinu SIMK vede u rostlin ke zvýšené tvorbě kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014), což může mít dále vliv na tvorbu hlízek u *M. sativa* během interakce s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium* (Hrbáčková *et al.*, 2020b).

Předkládaná bakalářská práce se věnuje regeneraci kontrolních rostlin *M. sativa*, kultivar Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* procesem somatické embryogeneze. V další části se práce věnuje fenotypické charakterizaci a srovnání kontrolních a transgenních rostlin prostřednictvím měření délky kořenové soustavy a počítáním vytvořených bočních (laterálních) kořenů. Poslední část práce se věnuje sledování a vyhodnocování efektivity procesu tvorby hlízek po aplikaci bakteriální kultury *Sinorhizobium meliloti* na kořenový systém rostlin.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Charakteristika

Medicago sativa L. (česky Tolice vojtěška, mezinárodně *alfalfa*) je víceletá luskovina řazena do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Je vysoká 30–80 cm a kvete od května do října (Randuška, 1983). Její prvně kultivovaná forma pochází s největší pravděpodobností ze západní Persie, poté se rozšířila do mnoha oblastí Asie, Ameriky a Evropy (Hrbáčková *et al.*, 2020a). Její biologický a ekologický význam spočívá zejména ve schopnosti přizpůsobit se různým typům půdy a klimatickým podmínkám (Desgagnés *et al.*, 1995).

2.1.2 Kořen

Pro *M. sativa* je typický silný hlavní kůlový kořen, který se větví a dosahuje hloubky 1,5–5 m, což ji umožňuje efektivně vyhledávat a získávat živiny (Hrabě *et al.*, 2004; Šantrůček *et al.*, 2007). Boční kořeny dále vytváří hustou síť tenkých kořínků nacházejících se zejména ve vrchních vrstvách půdy. Na tenkých koříncích se vytváří hlízky, speciální orgány, ve kterých s rostlinou koexistují endosymbiotické bakterie schopné fixovat vzdušný dusík. Kořenový krček neboli odnožovací uzel, je spodní část lodyhy, která bezprostředně přiléhá ke kořeni. Na tomto místě se zakládají pupeny, z nichž se následně utváří boční lodyhy, díky kterým se nadzemní část rostliny rozvětvuje. Kořenový krček je s postupným stárnutím *M. sativa* vtahován do půdy o zhruba 30–50 mm. Hlubší zatažení kořenového krčku do půdy souvisí s vyšší odolností vůči vyzimování, zasychání pupenů a odolnosti vůči škůdcům (Hrabě *et al.*, 2004).

2.1.3 Stonek a listy

První lodyha vyrůstá ze semene a postupně mohutní, zatímco další již vyrůstají z pupenů na kořenovém krčku či v paždí listů (při pokosení). Počet lodyh na jedné rostlině se pohybuje od 2–3 do několika desítek a je závislý na podmínkách růstu a také na celkovém vzrůstu rostliny. Lodyhy jsou vzpřímené či polovzpřímené, nejčastěji lysé, na průřezu kruhového nebo čtyřhranného tvaru a zelené barvy, ve spodní části může být barva nafialovělá. Tato skutečnost je zapříčiněna výskytem antokyanů (Randuška, 1983; Hrabě *et al.*, 2004). Listy jsou střídavé, trojčetné, složené z obvejčitých, v horní třetině nepravidelně zubatých lístků. Prostřední lístek je dlouze řapíkatý, postranní jsou přisedlé. Palisty jsou kopinaté a srostlé s řapíkem (Randuška, 1983). V „nižším patře“ rostliny

bývají lístky okrouhlé, naopak v horní části rostlin bývá tvar listů užší. Barva lístků je světle až tmavě zelená (Hrabě *et al.*, 2004).

2.1.4 Květ

Květy vyrůstají na dlouhých stopkách v úžlabí podpůrných nitkových listenů a vytvářejí mnohokvítkové hrozny dlouhé 10–30 mm. Kalich je pětizubý a na žilkách chlupatý, koruna je modrofialová a je složena z pěti plátků. Dva srostlé plátky vytvářejí člunek a dva volné se nazývají vesla či křídla, pavéza (největší okvětní list) je tmavě fialově zbarvená (Randuška, 1983; Hrabě *et al.*, 2004). Květ *M. sativa* je oboupohlavní – obsahuje pestík a deset tyčinek, devět je srostlých v sloupeček a desátá je volná. Jedná se o cizosprašnou rostlinu, což zajišťuje vysokou biologickou hodnotu semen (Hrabě *et al.*, 2004).

2.1.5 Plody a semena

Plodem je lusk s 1–3 řídkými závity, síťnatě žilkovaný a přitiskle chlupatý (Randuška, 1983). V lusku se tvoří semena, obvykle ve tvaru ledvin, složená z embrya, endospermu a osemení (testa, plášť semene). Celá testa je pokryta kutikulou, ta se skládá z kutinu, komplexní směsi mastných kyselin a vosků. Zralá semena jsou dlouhá přibližně 2 mm a široká přibližně 1 mm (Teuber a Brick, 1988). Barva semen bývá žlutohnědá až hnědá, postupným stárnutím semen barva tmavne a stává se matnou. Obal semene je velmi tvrdý, semena proto nejsou schopna dlouhou dobu nabobtnat a klíčí nestejně. Tato vlastnost se nazývá tvrdosemennost. Příčinou nabobtnání je velké množství vysoce hydrofilních bílkovin, semena přijímají přibližně tolik vody, kolik činí hmotnost jejich sušiny. Po nabobtnání semen dochází ke klíčení, růstu a prodlužování kořínku a na povrch postupně prorůstají děložní lístky (Hrabě *et al.*, 2004).

2.1.6 Zemědělské a ekonomické využití

Vojtěška se řadí mezi výživné a nejvíce pěstované pícniny, jelikož slouží jako hlavní a nejlevnější zdroj rostlinných bílkovin, přirozený zdroj vápníku, železa a vitamínů. Vykazuje vysoký obsah enzymů (amylázy, koagulázy, peroxidázy, erepsinu, lipázy, invertázy a pektinázy), antioxidantů, minerálů a také cenných fytofarmaceutických složek (Bora a Sharma, 2011). *M. sativa* je dále využitelná také ve fytofarmaceutice (López *et al.*, 2005; Nirola *et al.*, 2016) a při výrobě rekombinantních farmaceutických proteinů (Fu *et al.*, 2015).

Její biologický a agronomický potenciál je mimořádný také proto, že díky schopnosti vytvářet symbiotický vztah s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium*, které dokážou fixovat vzdušný dusík, vyžaduje pro svůj optimální růst malé nebo žádné množství dusíkatého hnojiva a zároveň sama obohacuje půdu o dusík, který je tak dostupný i jiným plodinám. Je tedy velmi významná pro udržitelné hospodářství na celém světě (Ebert, 2007; Triboi a Triboi-Blondel, 2014; Roy *et al.*, 2020, Tichá *et al.*, 2020).

Vzhledem k autotetraploidnímu genomu a cizosprašnému způsobu rozmnožování je výzkum vojtěšky velmi náročný (Tichá *et al.*, 2020).

2.2 Indukce a regenerace rostlin v *in vitro* podmínkách

Schopnost regenerace rostlin v *in vitro* podmínkách, a především morfogenní kompetence jednotlivých typů buněk a rostlinných pletiv, je obecně řízena složitými genetickými, ale i epigenetickými faktory, jako je methylace DNA, posttranslační modifikace histonů, dráhy mikro RNA (miRNA) či úroveň kondenzace chromatinu. Některé z těchto faktorů (např. methylace DNA) jsou dědičné a lze je během mitózy konzervovat (Henderson *et al.*, 2007; Tichá *et al.*, 2020). Rostliny *M. sativa* lze regenerovat v *in vitro* podmínkách z tkáně kalusu (Saunders a Bingham, 1972), z buněčných suspenzních kultur (McCoy a Bingham, 1977) i z protoplastů (Mezentsev, 1979; Kao a Michayluk, 1980; Dos Santos *et al.*, 1980).

2.2.1 Somatická embryogeneze

Propagace a regenerace rostlin pomocí somatické embryogeneze není vhodná pro všechny druhy rostlin, může se lišit jak mezi jednotlivými kultivary, tak i mezi genotypy kultivaru (Kao a Michayluk, 1981). Každé somatické embryo se vyvíjí z jedné buňky, zároveň se však mohou indukovat a formovat také sekundární embrya (nová somatická embrya iniciována z buněk somatických embryí), je tedy důležité nahlížet na genetický původ a vývoj somatických embryí jako na nezávislé regenerační události (Saunders a Bingham, 1972; Tichá *et al.*, 2020).

Somatická embryogeneze u *M. sativa* může být, na rozdíl od jiných druhů rostlin, indukována ze všech částí rostliny, jelikož její embryogenní potenciál není závislý na typu explantátu (Tichá *et al.*, 2020). Bylo ale zjištěno, že vhodný výběr primárního explantátu ovlivňuje rychlost růstu buněk a je tak důležitý pro účinnou indukci somatické embryogeneze a následnou regeneraci rostlin *in vitro*. Nejvyšší efektivita indukce somatické embryogeneze byla zaznamenána z explantátů různých částí rostlin, které

můžeme seřadit v následujícím pořadí: dělohy > řapík > hypokotyl > stonek > list (Novák a Konečná, 1982; Tichá *et al.*, 2020). Somatická embryogeneze může probíhat cestou přímou či nepřímou.

2.2.2 Nepřímá somatická embryogeneze

Experimentální postup při indukci nepřímé somatické embryogeneze u vojtěšky začíná odebráním a povrchovou sterilizací explantátu (např. list) rozřezaného na menší části. Následně se tyto části umístí na kultivační médium s obsahem přidaných rostlinných hormonů (označováno jako B5H médium), které slouží k vyvolání tvorby kalusu (ke kalogenezi; Tichá *et al.*, 2020). Nejčastěji se jedná o kombinaci syntetického auxinu 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová) a cytokininu KIN (kinetin). Tato kombinace zvyšuje proliferaci buněk kalusu během počátečního růstového období kultury, ovšem manipulací koncentrace a poměru těchto hormonů lze účinně řídit následný vývoj somatických embryí (Novák a Konečná, 1982). Po přeložení na kultivační médium bez hormonů (označováno jako B50 médium) již probíhá indukce embryogenního kalusu a následně tvorba somatických embryí. Plně vyvinutá somatická embrya se dále vyvíjí po přeložení na médium bohatém na vitamíny a aminokyseliny (označováno jako MMS médium). Zde se u somatických embryí formují a vyvíjí výhonky a kořeny (Tichá *et al.*, 2020). Plně vyvinuté rostliny ze somatických embryí lze udržovat *in vitro* po přeložení na MS médium, ze kterého je možné dobře vyvinuté rostliny přenést do *in vivo* podmínek. Rostliny získané procesem somatické embryogeneze a následně pěstované v *in vivo* podmínkách jsou plodné, schopné kvést a produkovat semena k propagaci další generace rostlin (Tichá *et al.*, 2020).

Vhodné množství vitaminů, aminokyselin a růstových regulátorů v kultivačních médiích je klíčové pro správný vývoj somatických embryí a následnou regeneraci rostlin (Amini *et al.*, 2016). Jednotlivé růstové regulátory se od sebe liší svým účinkem. Kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) a kyselina 2,4,5-trichlorfenoxycetová (2,4,5-T) stimulují u rostlin *M. sativa* tvorbu jak kalusu, tak i somatických embryí, naopak kyselina indol-3-ylacetic (IAA) je pro tvorbu kalusu i embryí neúčinná. Jiné růstové regulátory pak stimulují pouze tvorbu kalusu, mezi takové patří kyselina 4-chlorfenoxycetová (CPA) a kyselina alfa-naftalenacetátová (NAA; Tichá *et al.*, 2020).

2.2.3 Přímá somatická embryogeneze

K přímé somatické embryogenezi dochází z různých tkání, a indukována je nejčastěji z protoplastů, jejichž zdrojem jsou především kotyledony, kořeny a mladé listy.

K získání protoplastů ze starších listů je obvykle nutné delší enzymatické ošetření k odbourání buněčné stěny (Kao a Michayluk, 1980; Lu *et al.*, 1983). Schopnost izolovat protoplasty z co nejširší škály rostlinných tkání a následně z těchto protoplastů regenerovat rostliny je zásadní pro efektivní využití této techniky při somatické hybridizaci a genetické transformaci (Lu *et al.*, 1983).

Během přímé somatické embryogeneze je vynecháno stádium kalusu a je tak umožněno zkrátit proces somatické embryogeneze u vojtěšky o 35–40 dní. Tato cesta také umožňuje vyhnout se sekundárním změnám (somaklonální variabilita), ke kterým dochází během procesu dediferenciace (Denchev *et al.*, 1991).

2.3 Transgenozé a stabilní transformace rostlin

Transformaci objevil F. Griffith koncem 20. let 20. století. Klíčovou roli pro transformaci rostlin hraje schopnost zavádět do jejich genomu cizí geny (transgeny) z jiných druhů rostlin, ale i hub, virů, bakterií či zvířat (Ow *et al.*, 1986; Luciano *et al.*, 1987; Onouchi *et al.*, 1991; Spörlein *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009). Do této skupiny technik zahrnujeme i možnost delece či umlčení („vypnutí“) specifického genu. Z transformovaných rostlinných buněk se následně regenerují celé rostliny pomocí pletivových kultur *in vitro* a u regenerovaných rostlin se transgeny následně stabilně přenáší (dědí) na další generace (Rivera *et al.*, 2012). Přejídná exprese transgenu nebo jeho stabilní integrace do buněčného jádra má za cíl zvýšit produktivitu rostlin (Bhat, 2010; Dhar *et al.*, 2011), zlepšit výživné vlastnosti rostlin (Vasil, 1994; Collins a Shepherd, 1996; Vain, 2007), biosyntetické procesy (Comai *et al.*, 1985; Davey *et al.*, 1989), dále také zlepšit mechanismy rezistence vůči biotickým stresovým faktorům, jako je napadení hmyzem či viry (Vaecck *et al.*, 1987; Palukaitis a Zaitlin, 1997) a abiotickým stresovým faktorům, mezi které řadíme herbicidy, antibiotika, sucho, zasolení, změny teploty a také UV záření (Bevan *et al.*, 1983, Koes *et al.*, 1989; Meer, 1993; Zaragozá *et al.*, 2004; Bartels a Sunkar, 2005; Wahid *et al.*, 2007; Ashraf, 2010).

Metody genetické transformace, tedy dopravy cizorodého genetického materiálu do hostitelských buněk, se dělí na nepřímé, využívající biologické metody přenosu pomocí bakterií, a přímé (často fyzikální), založené na mechanické penetraci buněčné stěny a plazmatické membrány při přenosu (Rivera *et al.*, 2012). Metody nepřímé transformace fungují na principu zavedení plazmidu (tj. nezávislá cirkulární molekula DNA oddělená od bakteriálního chromozomu, schopná autonomní replikace v hostiteli)

do cílové buňky prostřednictvím bakterií schopných přenášet geny do vyšších rostlin. Nejčastěji využívané jsou půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*. Velikost plazmidu použitého pro transformaci se pohybuje nejčastěji mezi 5–12 kbp („kilobase pairs“; Zambryski *et al.*, 1983; Zupan a Zambryski, 1997; Broothaerts *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2012).

2.3.1 Transformace zprostředkovaná bakterií *Agrobacterium*

Transformace zprostředkovaná *A. tumefaciens* patří mezi nejběžnější a nejúčinnější metody transformace (Tichá *et al.*, 2020). *A. tumefaciens* je gramnegativní půdní fytopatogenní bakterie schopná přenášet části rezidentního Ti-plazmidu, T-DNA, do rostliny. Integrace přenesené (transferované) DNA (T-DNA) do jaderného genomu rostliny vyvolává tvorbu nádorů. Této schopnosti bylo využito k uplatnění plazmidu jakožto biologického vektoru pro genetickou transformaci rostlin, geny indukující tvorbu nádorů však byly z vektorů odstraněny (Gelvin, 2000; Mayers *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2012). Interakce bakterií *A. tumefaciens* (a příbuzných druhů *A. rhizogenes*, *A. rubi* a *A. vitis*) s rostlinami je zajištěna komplexní sérií chemických signálů sloužících ke komunikaci mezi patogenem a hostitelem. Jedná se zejména o fenolické sloučeniny z poškozených rostlinných buněk sloužící jako induktory či ko-induktory bakteriálních *Vir* (virulence) genů. K aktivaci transkripce *Vir* genu vede autofosforylace proteinu VirA a následná transfosforylace proteinu VirG. Většina indukovaných Vir proteinů se přímo účastní zpracování T-DNA z Ti-plazmidu i následného přenosu T-DNA z bakterie do rostliny (Jin *et al.*, 1990a,b; Gelvin, 2000).

U *M. sativa* byla tato metoda transformace s využitím kmene *A. tumefaciens* LBA4404 poprvé prokázána v publikaci Shahin *et al.* (1989) a významně tak doplnila snahy o klasické šlechtění vojtěšky. Tato nová metoda nabídla novou příležitost studia a využití rostlinných genů podílejících se na symbióze, kvalitě produkčních parametrů rostlin, jako i při obranných faktorech vůči nepříznivým biotickým a abiotickým vlivům.

Úspěch transformace je podmíněn zejména použitím správné kombinace bakteriálního kmene, genotypu rostlin a délkou ko-kultivace (Tichá *et al.*, 2020). Během popsaného experimentu (Desgagnés *et al.*, 1995) bylo dokázáno, že kombinace bakteriálního kmene LBA4404 *A. tumefaciens* obsahující vektor pGA482 a genotypu vojtěšky 11.9 vykazuje nejvyšší účinnost transformace (60 %). Jako společný selekční marker se při transformaci vojtěšky používá gen *Bialaphos resistance* (gen *BARr*), který vykazuje rezistenci na fosfinitricin, nebo rezistenci na antibiotikum hygromycin

(D'Halluin *et al.*, 1990; Tabe *et al.*, 1995). Častěji se pak používá gen *Neomycin fosfotranferasa II (NPTII)*, který vykazuje rezistenci na kanamycin. Kanamycin slouží pro selekci transgenních linií a jeho koncentrace hraje při transformaci vojtěšky klíčovou roli, protože koncentrace vyšší než $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ způsobuje inhibici kritických stádií transformace, mezi které se řadí vývoj kalusu, indukce somatických embryí a následná rhizogeneze (Chabaud *et al.*, 1988; Tichá *et al.*, 2020). Transgenní rostliny vojtěšky lze vyprodukovat během 9–14 týdnů po ko-kultivaci s bakteriemi (Samac a Austin-Phillips, 2006; Tichá *et al.*, 2020).

2.3.2 Transformace metodou elektroporace

Elektroporace je jednoduchá, rychlá a vysoce účinná technika genetické transformace pro širokou škálu rostlinných pletiv, nejčastěji se však používá k transformaci rostlinných protoplastů (tj. buňka zbavená buněčné stěny). Běžně je využívána k přenosu biochemických látek, jako jsou proteiny, lipidy, RNA či DNA do vnitřku hostitelské buňky. Metoda je založena na principu zvýšené tvorby pórů na povrchu buněk, tedy plazmatické membrány (zvýšená permeabilizace buněk) v důsledku změny polarizace na membráně způsobené elektrickým polem (Bates *et al.*, 1983; Saulis *et al.*, 1991; Rivera *et al.*, 2012). Genetická transformace metodou elektroporace se provádí v elektroporátoru, jenž se skládá ze zásobníku o objemu 80 až 800 μl a štěrbin, ve které se nachází dvě rovnoběžně umístěné elektrody z hliníku. Elektrody jsou v kontaktu s vodným elektrolytem, ten obsahuje intaktní buňky v suspenzi a DNA, která má být začleněna do buňky (Okada *et al.*, 1986; Spayer, 1990; Rivera *et al.*, 2012). Rozhodující vliv na účinnost transformace má zejména typ, počet, délka a trvání pulzu, ale také míra permeace membrány či forma a koncentrace DNA (Kubinić *et al.*, 1990; Kosturkova, 1993; Hui, 1995).

Podmínky elektroporace pro absorpci a expresi chimérických genů v protoplastech *M. sativa* zkoumali Choundary *et al.* (1990). Během tohoto experimentu byly metodou elektroporace v prostředí polyethylenglykolu zavedeny do izolovaných protoplastů konstrukty obsahující bakteriální reportérový gen kódující chloramfenikol acetyltransferázu (*CAT*) pod kontrolou konstitutivního promotoru *35S* z viru kvěťákové mozaiky, nebo promotoru chalkon-syntázy z fazole (*CHS*; Choundary *et al.*, 1990). Další experimenty k identifikaci vhodných parametrů elektroporace u vojtěšky byly provedeny transformací mezofylových protoplastů izolovaných z mladých listů a protoplastů z děloh 7–8 dní starých semenáčků. Po elektroporaci jedním pulzem (1,5 ms při 750 V/cm) bylo

úspěšně transformováno 34 % regenerovaných rostlin a transformované rostliny zůstaly i po selekci na kanamycině zelené a zdravé. Zachovaly si tak odolnost vůči selekčnímu antibiotiku (Kosturkova, 1993).

2.3.3 Biolistická metoda transformace

V rostlinném výzkumu slouží biolistická metoda zejména ke studiu přechodné genové exprese, produkci transgenních rostlin a inokulaci rostlin virovými patogeny (Bridson *et al.*, 1998; Taylor a Fauquet, 2002). Biolistická metoda transformace, známá také jako technika „gene gun“, mikroprojektilový přenos DNA či metoda bombardování částicemi, je založena na zrychlení (vystřelení) nosných částic (mikronosičů) platiny, zlata či wolframu o vysoké hustotě a s průměrem 0,5–2 μm pokrytých DNA, která má být přenesena, jejich průchodu skrz buňky rostlinného explantátu a ponechání nesené DNA uvnitř buněk (Sanford *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 2012). Tyto částice mohou pronikat buněčnými stěnami a membránami a vstupovat do buněk způsobem, který buňky výrazně nepoškozuje a ponechává je živé. Výhodou této metody je, že lze současně transformovat velké množství buněk v cílových tkáních (Sanford *et al.*, 1987).

Touto metodou lze transformovat části listů, buněčné suspenze, nezralá i zralá embrya, kalus, meristémy, ale i mikrospory a pyl. Využívá se zejména u rostlinných druhů, u nichž je transformace jinou metodou velmi obtížná či nemožná (Sanford *et al.*, 1993). Mezi hlavní výhody biolistické metody transformace se řadí její rychlost, jednoduchost a schopnost zavedení více genů či chimérické DNA do explantátu, a dále i možnost jejího využití u velmi malých typů buněk. Lze ji tedy použít i pro transformaci různých mikrobiálních druhů, jako jsou např. vláknité houby, kvasinky (Armaleo *et al.*, 1990), řasy (Zumbrunn *et al.*, 1989) ale i prokaryotní organismy jako jsou bakterie (Smith *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993). Negativním faktorem omezujícím využití této metody je možná přítomnost více kopií zavedených genů, která může vést až k umlčení genu či změněné genové exprese, nízká účinnost transformace a také vysoké náklady na jednotlivá příslušenství (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Rivera *et al.*, 2012).

Zařízení pro transformaci (gene gun) se skládá z vysokotlaké a nízkotlaké komory s trhacím diskem uprostřed. Zdrojem hélia je tlaková nádoba s regulátorem připojená k vysokotlaké vakuové komoře. Při postupném zvyšování tlaku, dochází k protržení trhacího disku v důsledku přetlaku hélia a uvolnění silné rázové vlny plynu. Ta pohání makronosič, pokrytý mikroskopickými kovovými částicemi (nazývanými mikronosiče) s DNA směrem ke stopovacímu sítu. Po nárazu jsou mikročástice uvolněny směrem k

cílové tkáni umístěné na Petriho misce, mikročástice zasáhnou buňky a transgeny se uvolní z cytoplazmy. Následně dochází k jejich začlenění do chromozomální DNA. (Kikkert, 1993; Sanford *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1994; Rivera *et al.*, 2012). Hélium je upřednostňováno před jinými konvenčními lahvovými plyny, hlavně proto, že se velmi rychle rozpíná a dodává tak mikronosičům vyšší rychlost (Kikkert, 1993). Mikronosiče fungující jako transportéry DNA se využívají zejména kvůli jejich snadné dostupnosti a minimální buněčné toxicitě, jedná se nejčastěji o částice zlata, které jsou biologicky inertní (Sanford *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 2012).

U *M. sativa* byla tato metoda použita například pro transformaci pylu (Ramaiah a Skinner, 1997), kalusu (Pereira a Erickson, 1995) či chloroplastů (Wei *et al.*, 2011). Obvykle ale není tato metoda transformace upřednostňována, nepoměrně častěji se využívá metoda transformace pomocí *A. tumefaciens* (Tichá *et al.*, 2020).

2.3.4 Mikroinjekce

Metoda mikroinjekce se řadí mezi velmi účinné metody genetické transformace živočišných i rostlinných buněk. Je založena na přímém a přesném transportu DNA do vnitřku buňky bez jejího poškození, prostřednictvím skleněné mikrokapilární injekční pipety pod mikroskopickou kontrolou (Morikawa a Yamada, 1985; Crossway *et al.*, 1986; Neuhaus a Spangenberg, 1990). U rostlin se využívá zejména k transformaci protoplastů, kdy jsou molekuly DNA mikroinjektovány do jejich intracytoplazmatického či intranukleárního kompartmentu, ale vzhledem k přítomnosti velkých centrálních vakuol, které fungují jako lysozomální kompartmenty, je provádění této metody velice obtížné. Ke zvýšení přesnosti mikroinjekce lze využít tzv. přidržovací („holding“) pipety, s jejíž pomocí lze cytoplazmu či jádro protoplastů naorientovat ke špičce injekční pipety (Morikawa a Yamada, 1985; Crossway *et al.*, 1986). Tato technika je velmi pomalá a časově náročná, na druhou stranu je ale velice přesná a efektivní. Mezi její hlavní výhody patří také možnost zavedení nejen plazmidů, ale také celých chromozomů do rostlinné buňky (Griesbach, 1987; Rivera *et al.*, 2012).

2.3.5 „Gene-targeting“ technologie

Jedná se o metody editace genomu. První „gene-targeting“ experiment provedli Paszkowski *et al.* v roce 1988 na protoplastech tabáku (*Nicotiana tabacum*). Později se zjistilo, že účinnost této metody může být vylepšena pomocí indukce DSBs (zlomy dvouřetězcové DNA) na specifických, předem zvolených místech (lokusech) rostlinného genomu. Tato místa pak slouží k zacílení genů, jejich adici, deleci či inaktivaci (Puchta

et al., 1993; Mahfouz *et al.*, 2011). DSBs jsou pro buňku vážnou hrozbou a pokud nejsou opraveny, vedou k mutacím a buněčné smrti. Jsou známy dva hlavní systémy na opravu DNA. Prvním je homologně řízená oprava (HDR; použití homologního templátu), druhým je pak účinnější, avšak méně přesné nehomologní spojování konců (NHEJ), které může v některých případech vést k inzerci či delecii nukleotidů, což vyvolává mutaci posunu čtecího rámce. Důsledkem může být předčasné vytvoření stop kodonu, gen se stává nefunkčním a vzniká genetický „knock-out“, tedy vyřazení genu (Kanaar *et al.*, 1998; Pastwa a Blasiak, 2003; Li *et al.*, 2011; Hrbáčková *et al.*, 2020a).

Mezi hlavní technologie sloužící k zacílení genu patří např. nukleázy zinkového prstu (ZFNs), meganukleázy, efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům (TALENs) a CRISPR/Cas9 („clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9“). Tyto metody jsou využívány pro genetické zlepšení výnosu, kvality a odolnosti rostlin vůči biotickým a abiotickým stresům, ale také k eliminaci nežádoucích nebo naopak nadexpresi žádoucích genů a k cílené úpravě požadovaných vlastností u elitních odrůd (Chen *et al.*, 2019; Hrbáčková *et al.*, 2020a).

2.3.5.1 Technologie TALENs

TAL efektorové nukleázy (TALENs) jsou vytvořeny fúzí TAL efektorů na nukleázovou doménu FokI (Li *et al.*, 2011; Hrbáčková *et al.*, 2020a). Protein Fok I se řadí mezi restriční endonukleázy typu II a je produkován bakterií *Flavobacterium okeanoikoites* (Li a Chandrasegaran, 1993). Ve struktuře TALE se nachází centrální opakující se doména rozpoznávající DNA a specifické cílové báze (Miller *et al.*, 2011). Technologie je tedy založena na schopnosti generované hybridní TALE nukleázy vázat se *in vitro* na svou cílovou sekvenci DNA, plnit funkci tzv. „molekulárních nůžek“ a vytvářet zlomy (DSBs), ty jsou následně opraveny systémem NHEJ (Mahfouz *et al.*, 2011). Lze ji tedy efektivně aplikovat pro cílenou regulaci a modifikaci endogenních genů (Miller *et al.*, 2011). Mezi hlavní výhody TALENs lze zařadit jejich nižší toxicitu a jednodušší přípravu oproti ZFNs. Na druhou stranu, mají i řadu nevýhod jako např. finanční a časovou náročnost, vysokou variabilitu účinnosti (u každého konstruktů), či neschopnost zacílit na methylovanou DNA (Malzahn *et al.*, 2017; Hrbáčková *et al.*, 2020a). Experimenty zaměřené na cílenou mutagenézi prostřednictvím TALENs byly provedeny na luštěnině sóji (Haun *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016), avšak úspěšná aplikace této technologie na *M. sativa* doposud zveřejněna nebyla.

2.3.5.2 Technologie CRISPR/Cas9

Mezi další alternativy k ZFNs a TALENs řadíme systém CRISPR/Cas9. CRISPR a Cas9 jsou základní komponenty adaptivního imunitního systému bakterií z archea, tedy rozsáhlé skupiny prokaryotických jednobuněčných organismů, a společně se podílí na degradaci fágové DNA či virů, založené na systému navádějící RNA (sgRNA). SgRNA dokáže rozpoznat cílové lokusy na základě párování nukleobází a vytváří spolu s proteinem Cas9 komplex Cas9/sgRNA. Kombinace proteinu Cas9 a sgRNA v jednom vektoru zlepšuje účinnost transformace rostlin. Endonukleáza Cas9 je velký charakteristický protein CRISPR/Cas systému typu II a je složen z endonukleázové domény podobné RuvC a HNH, z nichž každá štěpí jedno vlákno DNA (Wiedenheft *et al.*, 2012; Graham a Root, 2015; Du *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019; Meng *et al.*, 2019; Hrbáčková *et al.*, 2020a). Inaktivace obou domén vytváří deaktivovaný protein Cas9 (dCas9), ten lze fúzovat s jinými proteiny jako jsou např. fluorescenční proteiny, transkripční aktivátory a epigenetické efektrory, které slouží k zobrazování DNA, regulaci genů, genomovému značení či editaci genomu. Složky CRISPR/Cas9 lze transformovat do rostlinných buněk prostřednictvím bakterií *Agrobacterium* (T-DNA) či metodou „gene gun“ (Chen *et al.*, 2019). Mezi hlavní nevýhody této metody patří vysoký potenciál mimo-cílových (off-target) zásahů v genomu. CRISPR-Cas9, ve srovnání s TALENs (rozpoznávají sekvence DNA o velikosti 30 či více párů bází (bp)), rozpoznává sekvence DNA o velikosti ~ 20 bp a má tak pravděpodobně nižší specifitu zacílení (tzv. targeting specificity; Malzahn *et al.*, 2017). Na druhou stranu, mezi výhody této metody, oproti TALENs, řadíme schopnost zacílit methylovanou DNA a zejména pak schopnost vytvářet multiplexy, které umožňují upravovat (mutovat) současně velké množství cílových míst v jedné rostlinné buňce (např. cílená delece velkých chromozomálních segmentů obsahujících velký počet genů, tzv. multigenní knockout). Celkově je tedy technologie CRISPR/Cas9 přímější a dostupnější metodou úpravy genomu (Du *et al.*, 2016; Malzahn *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019) a její úspěšná aplikace u rostlin s komplexním genomem, jako je např. *M. sativa*, může vést k významnému pokroku ve zdokonalování jejich vlastností (Gao *et al.*, 2018).

Při porovnání celkové efektivity editace genomu s příslušnými údaji u jiných méně komplexních genomů rostlin, byla u vojtěšky po použití této metody prokázána nižší účinnost. To pravděpodobně souvisí s jejím poměrně složitým autotetraploidním genomem, který obsahuje vysoký podíl často se opakujících klastrů (highly repeated clusters; Meng *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018). Složitý autotetraploidní genom *M. sativa* a

s ním spojené omezení genomové analýzy výrazně brzdí objev genů zodpovědných za kontrolu důležitých zemědělských vlastností, a tím také možnost genetických vylepšení této plodiny (Gao *et al.*, 2019). K úpravě genomu rostlin *M. sativa* byla technika CRISPR/Cas 9 úspěšně použita poměrně nedávno, kdy se jednalo o cílenou mutaci genu *SPL9* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE-9*). Následná sekvenční analýza genomu vojtěšky neukázala žádné „off-target“ účinky a prokázala tak u sgRNA vysokou specificitu rozpoznání cílového místa (Gao *et al.*, 2018). Nedávno byla vyvinuta optimalizovaná metoda systému CRISPR/Cas9 s použitím transformace zprostředkované *A. tumefaciens*, která byla úspěšně použita na editaci genu *FYTOEN DESATURÁZY* (*MtPDS*) u *Medicago truncatula*. Tato strategie umožňuje editaci genomu ve výrazně širším rozsahu a mohla by usnadnit studium genových funkcí (Meng *et al.*, 2019). *M. truncatula* je blízce příbuzná *M. sativa*, má krátký životní cyklus a diploidní, plně sekvenovaný genom. Slouží tedy jako ideální druh pro studium genetiky a genomiky luštěnin (Young *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2019).

2.4 Signalizace u rostlin

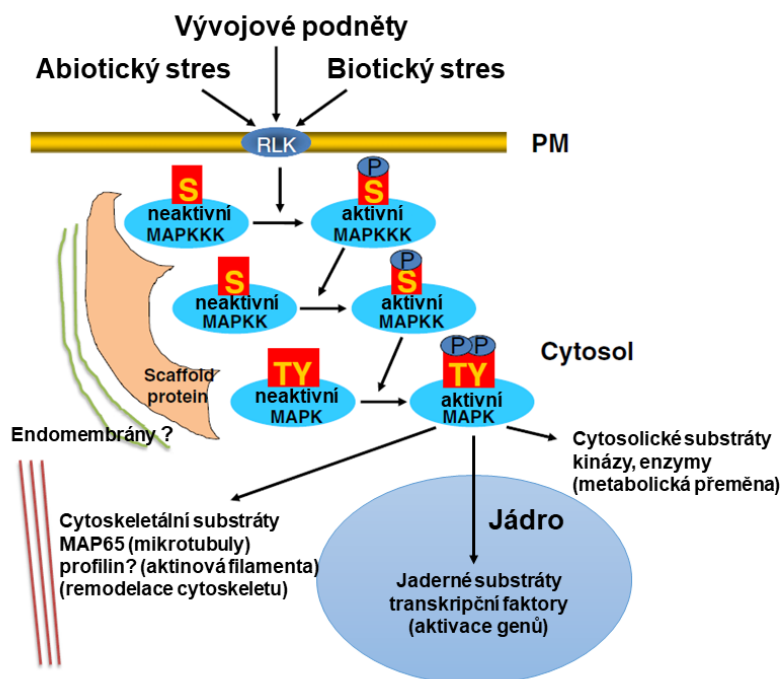
2.4.1 Mitogenem – aktivované protein kinázy (MAPK)

Mitogenem aktivované protein kinázy jsou fosfotransferázy schopné aktivovat substrát pomocí fosforylace. Jsou součástí signálních drah při aktivaci vývojových a obranných reakcí, které si rostliny vyvinuly vůči neustálému působení biotických a abiotických faktorů vnějšího prostředí. Podílejí se na regulaci růstu, diferenciaci, proliferaci a smrti buněk, jako i na obranných reakcích rostlin vůči různým typům stresů. Mimořádná komplexita těchto signálních drah byla odhalena po dokončení sekvenace genomu *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Nově získané informace poskytly rámec pro jednotnou nomenklaturu a stanovení funkcí MAPK v signálních dráhách rostlin (Jonak *et al.*, 2002; Šamajová *et al.*, 2013).

Obrovský význam pro správnou funkci MAPK má jejich subcelulární lokalizace. Každý specifický funkční modul MAPK by se měl nacházet v blízkosti místa zaznamenávání signálu, tedy v blízkosti receptorů. Tato místa jsou však odlišná od míst jejich působení, a proto moduly disponují určitými mechanismy relokace (přemístění), které slouží k navedení MAPK k cílovým substrátům (Komis *et al.*, 2018). Extracelulární signály jsou nejčastěji zachyceny receptory na plazmatické membráně a následně přeneseny buď přímo, prostřednictvím interakcí, nebo nepřímo prostřednictvím

např. heterotrimerních GTPas či jiných sekundárních posílů na specifické moduly MAPK (Müller *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2015; Komis *et al.*, 2018). MAPK jsou v signálních drahách uspořádány do třístupňových modulů složených z MAPK kinázy kinázy (MAPKKK, MAP3K či MEKK), MAPK kinázy (MAPKK, MAP2K či MEK) a MAPK a jsou drženy pohromadě pomocí tzv. „scaffold“ proteinů (Jonak *et al.*, 2002; Šamajová *et al.*, 2013; Ovečka *et al.*, 2014).

Transdukce signálu začíná aktivací MAP3K, které dále aktivují MAP2K fosforylací dvou serinových/threoninových zbytků v konzervovaném motivu S/T-X₃₋₅-S/T (SP motivy). To následně vede k duální fosforylaci a aktivaci MAPK na threoninových a tyrosinových zbytcích v motivu T-X-Y. Takto aktivované MAPK fosforylují a regulují různé substráty, včetně transkripčních faktorů, jiných proteinových kináz, enzymů a proteinů lokalizovaných v jádře, cytosolu či cytoskeletu (Obr. 1; Jonak *et al.*, 2002; Šamajová *et al.*, 2013; Ovečka *et al.*, 2014). Díky své schopnosti cílit přednostně na SP motivy, řadíme MAPK spolu s cyklin-dependentními kinázami (CDKs), kinázami glykogen syntázy 3 (GSK3s) a kinázami podobnými CDK (CLKs) do skupiny CGMC (Komis *et al.*, 2018).



Obrázek 1: Schéma zobrazující subcelulární organizaci modulů mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK) a jejich cílů. Upraveno podle Šamajová *et al.*, 2013.

2.4.2 Podíl signálních drah MAPK na regulaci vývojových procesů, hormonální regulace a při biotických a abiotických interakcích rostlin s prostředím

2.4.2.1 Regulace vývojových procesů prostřednictvím MAPK

Aby se rostliny přizpůsobily podmínkám vnějšího prostředí, může být jejich morfologie během vývoje a v reakci na vnější podněty do jisté míry modifikována. MAPK jsou zapojeny do vývoje gametofytů a následné produkce gamet, specifikace vývojového vzoru během embryogeneze, dále v regulaci růstu vegetativních orgánů, a hrají klíčovou roli i během buněčné proliferace a diferenciaci. Lze tedy říct, že MAPK svým zapojením do signálních drah do jisté míry kontrolují celkový vývoj rostlin (Xu a Zhang, 2015; Komis *et al.*, 2018).

Komplexním studiem s využitím technik jako je fluorescenční mikroskopie a transmisní elektronová mikroskopie (TEM), a následných proteomických a fosfoproteomických studií bylo zjištěno, že aktivované MAPK lokalizují v jádře vyvíjejícího se a klíčícího pylu, jsou zapojeny do vývoje samčích a samičích gamet, účastní se i jejich fúze během oplodnění, a důležité role zastávají také při vývoji embrya a semene. Jejich lokalizace v jádře je charakteristická během signalizace spojené s transaktivací transkripce. MAPK rovněž řídí ontogenezi průduchů a jejich správnou funkci. Jejich signální dráhy jsou aktivní také během vývoje květů a zapojují se do řízení jejich velikosti a opadávání (Coronado *et al.*, 2002; Lukowitz *et al.*, 2004; Coronado *et al.*, 2007; Hord *et al.*, 2008; Lampard *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Komis *et al.*, 2018). Na správném vývoji, velikosti a tvaru vegetativních orgánů rostlin, mezi které řadíme listy, kotyledony, hypokotyl, primární, laterální a adventivní kořeny, se MAPK podílí ovlivňováním orientace roviny buněčného dělení v proliferaci buněk při tvorbě primordií různých orgánů prostřednictvím fosforylace příslušných cytoskeletálních substrátů (Lukowitz *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018). Signalizační dráhy MAPK dále fosforylují auxinový transportér PINFORMED1 (PIN1), mají vliv na směr a průběh transmembránového transportu auxinů na krátké vzdálenosti, a společně jsou tak zapojeny do vývoje a větvení výhonků, morfologie listů, ale i jejich senescence (Zhou *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2016). Dále je dokázáno, že MAPK jsou zapojeny do signalizace během vývoje a růstu kořenových vlásků a hrají významnou roli během procesu tvorby hlízek (nodulace), a to prostřednictvím jak pozitivní, tak i negativní regulace (Beck *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2017; Komis *et al.*, 2018).

2.4.2.2 Abiotické stresové faktory spouštějící aktivitu MAPK

Signální dráhy MAPK přenáší signály z povrchu buněk do jádra, jsou aktivovány celou řadou abiotických faktorů, mezi které řadíme sucho, nízké či vysoké teploty, zasolení, osmotický šok, UV záření, intoxikaci ozonem a těžkými kovy. Přenos signálů prostřednictvím MAPK následně reguluje biochemické, fyziologické a morfologické změny rostlin při obranné reakci (Koes *et al.*, 1989; Ichimura *et al.*, 2000; Bartels a Sunkar, 2005; Wahid *et al.*, 2007; Ashraf, 2010). Odezvy na stres způsobené abiotickými faktory lze rozdělit do dvou skupin: odezvy regulující signální transdukcí vedoucí k aktivaci genové exprese, a odezvy chránící před stresem prostřednictvím přeprogramování metabolismu (Teige *et al.*, 2004). Mezi hlavní MAPK v rostlinách *A. thaliana* řadíme MPK3, MPK4 a MPK6, které jsou aktivovány během odezvy na zasolení, sníženou teplotou, sucho či poranění (Ichimura *et al.*, 2000).

Při působení nízkých teplot a solného stresu byla v rostlinách *A. thaliana* identifikována kompletní signální kaskáda složená z MEKK1 (MAP3K1) aktivující MKK2, která následně fosforyluje a aktivuje MPK4 a MPK6 v *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Nadprodukce MKK2 u rostlin zvyšuje aktivitu MPK4 a MPK6 a ovlivňuje expresi mnoha dalších genů (152), zapojených do signální transdukcce a buněčné obrany. Tato signalizace zvyšuje toleranci rostlin a jejich rezistenci k mrazu a zasolení (Zhu, 2001; Fowler a Thomashow, 2002; Xiong *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004). Do signalizace během abiotického stresu v *A. thaliana* je zapojena také MEK1 (MAP2K1), a to prostřednictvím fosforylace a aktivace MPK4 při zasolení, poranění, suchu a chladu (Matsuoka *et al.*, 2002). Vede to k regulaci exprese *CAT1* genů (kódujících enzymy antioxidačního systému) při odezvě na zasolení a sucho (Xing *et al.*, 2007).

Při vystavení rostlin ozonu, který vyvolává zvýšenou tvorbu ROS (reaktivní formy kyslíku), dochází k rychlé, ale přechodné aktivaci MPK3 a MPK6 (Ahlfors *et al.*, 2004). Později bylo zjištěno že na MPK3 a MPK6 negativně působí MKP2 (MAPK fosfatáza 2), která ovlivňuje jejich aktivační stav a slouží tak jako pozitivní regulátor buněčné odezvy na intoxikaci ozonem. Umlčení této fosfatázy vede u rostlin k prodloužené (neregulované) aktivaci MPK3 a MPK6 a k přecitlivělosti na oxidativní stres (Lee a Elis, 2007). Dalším významným zástupcem ROS je také peroxid vodíku (H_2O_2), při jehož působení dochází v rostlinách opět k aktivaci MPK3 a MPK6, ale také MPK1 a MPK2, MPK4 či MPK7. Lze tedy říct, že ROS obecně indikují u *A. thaliana* odezvy různých MAPK kaskád (Kovtun *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2006; Doczi *et al.*, 2007; Ortiz-Masia *et al.*, 2007).

Růst rostlin je silně ovlivněn také toxickými koncentracemi těžkých kovů, které u vyšších rostlin rovněž aktivují několik typů MAPK. Při charakterizaci těchto signálních drah v rostlinách *Oryza sativa* bylo zjištěno, že vystavení rostlin vlivu kadmia (CdCl_2) a mědi (CuCl_2) vede k aktivaci MPK3 a MPK6 (Yeh *et al.*, 2007). V rostlinách *M. sativa* došlo vlivem zvýšených koncentrací mědi a kadmia k aktivaci čtyř různých MAPK a to SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK, jejich signální dráhy se však navzájem liší (Jonak *et al.*, 2004). Kadmium je toxický kov inhibující klíčení semen a růst kořenů, může způsobit také chromozomální aberace, šedo zelenou barvu a opadávání listů (Chakravarty a Srivastava, 1992; Liu *et al.*, 1992; Czuba a Kraszewski, 1994; Zhang a Xiao, 1998). Měď jako biogenní prvek je sice pro správný růst a vývoj rostlin nezbytná, ale její vyšší koncentrace mohou rovněž vést k inhibici růstu a příznakům toxicity (Hall, 2002).

2.4.2.3 Biotické stresové faktory spouštějící aktivitu MAPK

Rostliny mají vůči biotickým faktorům, jako jsou patogeny, vyvinutý vrozený imunitní systém sestávající ze dvou úrovní. První z nich je tzv. PTI imunita („PAMP-triggered immunity“), která je založena na specifické detekci molekulárních vzorů asociovaných s patogeny (PAMP), rozpoznávaných transmembránovými PRR („pattern recognition receptors“) receptory, a která spouští příslušné obranné reakce jako je přeprogramování genové exprese, změna enzymatické aktivity a produkce antimikrobiálních sloučenin, vedoucí k přerušení kolonizace rostliny patogenem. Patogeny si však vyvinuly schopnost produkovat efektorové proteiny schopné tuto PTI překonat a účinně zastavit. Druhou úrovní obrany rostlin je proto tzv. ETI (efektorem vyvolaná) imunita, založená na rozpoznání patogenních efektorů prostřednictvím proteinů rezistence (PR, pathogenesis-related proteins). Ty fungují jako imunitní receptory spouštějící hypersenzitivní odpověď (HR) v podobě usmrcení buněk lokalizovaných v místě infekce, čímž dojde k zamezení šíření patogenu. Jedná se o zrychlenou a zesílenou reakci vedoucí k rezistenci vůči biotickým faktorům (Dangl a Jones, 2001; Jones a Dangl, 2006).

Do této vrozené imunity rostlin je zapojena rozsáhlá síť MAPK kaskád, které sehrávají během odpovědi na molekulární mechanismy patogenů a jejich efektorů v celkové odolnosti vůči nim klíčovou roli. U rostlin *A. thaliana* patří mezi nejlépe charakterizované MAPK aktivované během interakce s patogeny MPK3, MPK4 a MPK6 (Desikan *et al.*, 2001; Nuhse *et al.*, 2000; Šamajová *et al.*, 2013). Rychlou a silnou aktivaci těchto MAPK spouští např. flg22 (peptid odvozený od bakteriálního elicitoru flagellinu). Zachycení signálu flagellinu je zprostředkováno komplexem receptoru FLS2

a BAK1 (BRI1 asociovaná kináza), lokalizovaným na plazmatické membráně, který následně spouští dvě souběžné signální MAPK kaskády (Asai *et al.*, 2002; Chinchilla *et al.*, 2007). První kaskáda je složena z MEKK1 (MAP3K), dvou MAP2K (MKK4, MKK5) a dvou MAPK (MPK3 a MPK6), které fosforylují a tím aktivují transkripční faktory WRKY22, WRKY29 a FRK1 („flg22-induced receptor kinase 1“) a indukují expresi genů *WRKY29*, *FRK1* a *GST1*. Rostliny exprimující tyto geny pak vykazují zvýšenou rezistenci vůči patogenům (Asai *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2006). Druhou kaskádu tvoří MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4, přičemž MPK4 negativně reguluje expresi obranných genů a ovlivňuje systémově získanou rezistenci (Peterson *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2006). Ačkoliv tyto kaskády působí antagonisticky, jsou vzájemně propojeny a obě hrají klíčové role během imunitní odpovědi a při získávání rezistence rostlin vůči patogenům (Mészáros *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2013).

Mezi PAMP řadíme nejen flg22, ale i např. harpin, chitin, NLP („Nep1-like protein“) nebo EF-Tu („elongation factor thermo-unstable“), které mohou obdobně aktivovat MPK3, MPK6 či MPK4 a regulovat expresi obranných genů (Desikan *et al.*, 1999; Desikan *et al.*, 2001; Kunze *et al.*, 2004; Qutob *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007).

2.4.2.4 Hormonální regulace zprostředkované MAPK

Rostlinné hormony jsou endogenní nízkomolekulární látky podílející se na regulaci velkého množství dějů v rostlinách. Mimo jiné zprostředkovávají komunikaci mezi signalizací při abiotickém a při biotickém stresu a jsou nezbytné pro regulaci a určení správného mechanismu obrany rostlin. Mezi hlavní tzv. stresové hormony řadíme ethylen (ET), kyselinu abscisovou (ABA), kyselinu salicylovou (SA) a kyselinu jasmonovou (JA), jejichž biosyntéza je indukována prostřednictvím aktivovaných MAPK kaskád (Fujita *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2013). Kyselina jasmonová je důležitá zejména při regulaci odpovědi na stresové faktory pocházející z prostředí, jako je dehydratace, vliv ozonu, UV záření či poranění, a její vyšší hladiny vedou u rostlin k rezistenci vůči napadení patogeny a škůdci (Creelman a Mullet, 1997; Berger, 2002; Devoto a Turner, 2003). Ethylen je plynný hormon, který má u rostlin významný vliv zejména při klíčení semen, zrání plodů, stárnutí, opadávání (abscise) plodů, listů či jiných orgánů a vyvolání určitých obranných reakcí při stresu z poranění a napadení patogeny (Abeles, 1992; Schweighofer *et al.*, 2007).

Zapojení MAPK kaskád do hormonální signalizace bylo prokázáno izolací CTR1 kinázy (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1; patřící do rodiny Raf-like MAP3K),

kteřá ve spojení s ethylenovým receptorem ETR1 působí jako negativní regulátor signalizace ethylenu (Kieber *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1998; Hua a Meyerowitz, 1998; Jonak *et al.*, 2002). Dále se ukázalo, že při působení přímého prekurzoru syntézy ethylenu (ACC; 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny) dochází k inaktivaci dráhy CTR1, ale zároveň k aktivaci signální kaskády MKK9-MPK3/6. Princip této kaskády spočívá v přemístění aktivované MKK9 z cytoplazmy do jádra, kde aktivuje jaderné MPK3 a MPK6. Ty pak fosforylují a stabilizují transkripční faktor EIN3 (ethylene-insensitive 3), nacházející se rovněž v jádře, čímž aktivují primární transkripci (Chao *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 2008). Mezi další aktivátory MPK6 patří také flg22. Takto aktivovaná MPK6 se dále podílí na regulaci syntézy ethylenu, která je indukovaná PAMP, a to prostřednictvím fosforylace a stabilizace biosyntetických enzymů ethylenu, jako jsou např. ACS2 a ACS6 (Liu a Zhang, 2004). MAPK ovšem v signálních soustavách, které jsou spojeny s funkcí ethylenu vykazují jak pozitivní, tak i negativní roli (Kieber *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 2008).

Při studiu kyseliny jasmonové bylo dokázáno, že v rostlinách *A. thaliana* aktivuje kaskádu MKK3-MPK6 v reakci na stresové faktory. Tato kaskáda negativně reguluje transkripční faktor AtMYC2, čímž ovlivňuje expresi genů, které jsou JA regulovány. Transkripční faktor AtMYC2 je zahrnut do inhibice růstu kořenů, a je tedy důležitou součástí signální dráhy JA (Takahashi *et al.*, 2007). U *A. thaliana* byla identifikována také AP2C1 fosfatáza, která reguluje přenos signálů během poranění rostliny, a to prostřednictvím defosforylace a inaktivace na stres reagujících MPK4 a MPK6. Fosfatáza AP2C1 reguluje množství JA, ethylenu a aktivitu MAPK, a její zvýšená hladina narušuje u rostlin vrozenou imunitní odpověď (Schweighofer *et al.*, 2007).

2.4.3 MAPK u *M. sativa*

U *M. sativa* byla v rámci popsaných MAPK identifikována SIMK (stresem indukovaná MAPK), která je indukována solným stresem, poraněním, vysokou koncentrací těžkých kovů a různými houbovými elicitory (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2004). V další studii metodou „Yeast twohybrid screening“ byla identifikována SIMK kináza (SIMKK) jakožto specifický aktivátor SIMK, prostřednictvím duální fosforylace threoninových a tyrosinových residuí TEY motivu, v reakci na solný stres (Kiegerl *et al.*, 2000; Ovečka *et al.*, 2014).

SIMKK má velikost 42 kDa a lze ji označit jako homolog k MKK4 a MKK5 z *A. thaliana* (Kiegerl *et al.*, 2000; Komis *et al.*, 2018). Za normálních podmínek je lokalizována v jádře a cytoplazmě buněk, při působení solného stresu se však spolu se

SIMK přesouvá a lokalizuje do cytoplazmatických vezikulárních kompartmentů. Rostliny nadměrně exprimující SIMKK vykazují zvýšenou senzitivitu vůči soli a SIMKK se tak jeví jako možný negativní regulátor tolerance rostlin k zasolení (Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018). SIMK je protein o velikosti 46 kDa vykazující vysokou homologii k MPK6 z *A. thaliana* (Šamaj *et al.*, 2002; Komis *et al.*, 2018). V epidermálních buňkách kořene je SIMK lokalizována zejména v jádrech, avšak během vytváření a vývoje kořenových vlásků dochází k jejímu přemístění z jádra do cytoplazmy rostoucích špiček kořenových vlásků tvořených hustou sítí F-aktinových vláken. Bylo dokázáno, že její nadměrná exprese vede ke zvýšenému prodlužování těchto vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014). Specifické přemístění SIMK je pravděpodobně zajišťováno prostřednictvím aktinových mikrofilament, protože při jejich depolymerizaci působením latrunkulinu B dochází k přesunu SIMK zpět do jádra (Šamaj *et al.*, 2002; Komis *et al.*, 2018). SIMK dokáže fosforylovat a regulovat některé z proteinů vázících se na aktin (actin-binding proteins) a tím ovlivňovat stav a dynamiku aktinového cytoskeletu. Hraje tedy klíčovou roli v růstu a vývoji kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002), což může ovlivnit také tvorbu hlízek u *M. sativa* při interakci s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium* (Hrbáčková *et al.*, 2020b).

Dále byly u *M. sativa* identifikovány také dvě MAPK aktivované změnou teploty neboli tzv. teplotním šokem – HAMK a SAMK (Sangwan a Dhindsa, 2002). K aktivaci SAMK dochází společně se SIMK, MMK2 a MMK3 také během vystavení rostlin zvýšené koncentraci těžkých kovů, konkrétně Cd a Cu (Jonak *et al.*, 2004). Při působení oxidativního stresu prostřednictvím zvýšené koncentrace ROS byla u *M. sativa* identifikována OMTK1 (MAP3K1) následně aktivující MMK3 (Nakagami *et al.*, 2004).

2.4.4 Interakce rostlin *M. sativa* s bakteriemi rodu *Rhizobium*

Mnoho luštěnin, včetně *M. sativa*, dokáže interagovat a vytvářet symbiotický vztah s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium*, které jako endosymbionty ve specializovaných kořenových orgánech, hlízkách, redukuje atmosférický dusík na amoniak. Celý proces však doprovází velká spotřeba ATP, a rostlina jej proto zahajuje jen v případě silného nedostatku dusíku (tzv. hladovění; Roy *et al.*, 2019; Tichá *et al.*, 2020). Tyto podmínky lze v *in vitro* prostředí vyvolat při kultivaci rostlin na Fährerově médiu bez dusíku (Fährer, 1957).

Invaze bakterií do hostitelské rostliny začíná na špičce kořenových vlásků. Kořenové vlásky produkují řadu fenolických sloučenin jako jsou flavonoidy a

isoflavonoidy. Tyto sloučeniny indukují u bakterií expresi *Nod* genů pro následnou syntézu nodulačních (Nod) faktorů. Nod faktory mohou vyvolat prodloužení a deformaci buněk kořenového vlásku, který se obtočí kolem shluku bakterií. Tímto způsobem je tedy zajištěna komunikace a prvotní interakce mezi bakteriemi a hostitelskou rostlinou. (Fournier *et al.*, 2008; Suzaki *et al.*, 2015; Tichá *et al.*, 2020). Po deformaci kořenových vlásků dojde k internalizaci bakterií a k vytvoření specializované tubulární struktury zvané infekční vlákno (infection thread, IT) a k deformaci buněčné stěny kořenových vlásků. IT se prodlužuje a větví, čímž je umožněn pohyb bakterií několika buněčnými vrstvami kořene až do aktivovaných kortikálních buněk, kde se formují primordia kořenových hlízek. Bakterie opouští IT a vytváří intracelulární specializované organely zvané „symbiosomy“, z nichž každá obsahuje jeden nebo více bakteroidů, které jsou metabolicky aktivní a účastní se fixace dusíku (Tian *et al.*, 2012; Suzaki *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2019; Tichá *et al.*, 2020). Postupný růst IT lze označit jako diskontinuální, jelikož dochází ke střídání fází rychlého a pozastaveného prodlužování. Průměrná rychlost růstu IT byla odhadnuta na 2–12 $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Fournier *et al.*, 2008). Samotný proces fixace se skládá ze tří kroků: nejprve dochází k redukci N_2 na N_2H_2 (didimin), následně na N_2H_4 (hydrazin) a ten je nakonec převeden na dvě molekuly amoniaku (NH_3) či amonných iontů (NH_4^+). Aby se zabránilo akumulaci amoniaku, který je při vyšších koncentracích pro rostlinu toxický, dochází k jeho zabudování do aminokyselin, nejčastěji do glutaminu prostřednictvím glutaminsyntetázy (GS; Udvardi a Poole, 2013; Vega-Mas *et al.*, 2017, Tichá *et al.*, 2020).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

kádinky, odměrné válce, pinzety, nůžky, skalpel, Pasteurovy pipety, filtrační papír, centrifugační kyvety, mikrozkušavky, zkumavky typu Falcon, magnetická míchadla, sterilní špičky, sterilní Petriho misky, plastové boxy, černé igelitové obaly, Parafilm, chirurgická páska, bakteriologický filtr s póry o velikosti 0,22 μm .

3.1.1 Použité chemikálie

1000x Gamborg's vitamin (Duchefa Biochemie)

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa Biochemie)

2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diylidinitrilo)tetraoctová kyselina pH 8 (EDTA, PanReac AppliChem)

2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (Duchefa Biochemie)

Adenin (Sigma-Aldrich)

Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)

Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)

Ethanol denaturovaný (96%, PENTA)

Gamborg's B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Gellan gum powder (Alfa Aesar)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich)

Heptahydrát síranu železnatého (Sigma-Aldrich)

Hydroxid draselný (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)

Chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich)

Chlornan sodný (Sigma-Aldrich)

Kinetin (Duchefa Biochemie)

Kyselina boritá (Duchefa Biochemie)

LB broth (MO BIO laboratories)

L-Glutamin (Duchefa Biochemie)

L-glutathion (Sigma-Aldrich)

L-Prolin (Sigma-Aldrich)
L-Serin (Sigma-Aldrich)
Monohydrát síranu manganatého (Sigma-Aldrich)
Monohydrát síranu zinečnatého (Sigma-Aldrich)
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Myoinositol (Duchefa Biochemie)
MilliQ voda
Phyto agar (Duchefa Biochemie)
Pentahydrát síranu měďnatého (Duchefa Biochemie)
Sacharosa (Sigma-Aldrich)
Tikarcilin (Duchefa Biochemie)
Tween ® 20 (Sigma-Aldrich)
Voda (Sigma-Aldrich)
Vodovodní voda

3.1.2 Roztoky a média

Sterilizační roztok na sterilizaci listů *M. sativa* (100 ml):

- 70% ethanol
- 1 ml chlornan sodný
- 50 µl Tween
- MilliQ H₂O

B5H médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 0,5 g·l⁻¹ prolin
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1,0 mg·l⁻¹ 2,4-D

- 0,1 mg·l⁻¹ kinetin
- 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

Směs aminokyselin:

- 6,65 g glutamin
- 0,83 g serin
- 0,004 g adenin
- 0,083 g L-glutathion
- Doplnění MilliQ H₂O do 250 ml
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm
- Uchovávání při 4 °C

Roztok 2,4-D (1,0 mg·ml⁻¹):

- Rozpuštění 50 mg 2,4-D v 5 ml 1M NaOH
- Doplnění do 50 ml MilliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm
- Uchovávání při -20 °C

Roztok kinetinu (0,1 mg·ml⁻¹):

- Rozpuštění 10 mg kinetin v 0,1 ml 0,1M NaOH
- Doplnění do 10 ml MilliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm
- Uchovávání při -20 °C

B50 médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 0,5 g·l⁻¹ prolin
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

MMS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 0,1 g·l⁻¹ myoinositol
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 1 ml·l⁻¹ 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution

Pevné MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

Pevné Föhreovo médium bez dusíku

- 1 ml·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O (0,1232 g·ml⁻¹)
- 1 ml·l⁻¹ KH₂PO₄ (0,0953 g·ml⁻¹)
- 2 ml·l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O (0,0712 g·ml⁻¹)
- 2,5 ml·l⁻¹ Fe-EDTA
- 0,1 ml·l⁻¹ MnSO₄·H₂O (0,001g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O (0,0015g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ ZnSO₄·H₂O (0,0017g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ H₃BO₃ (0,001 g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O (0,0011g·ml⁻¹)
- 13 g·l⁻¹ Microagar
- Úprava pH na 6,5 (1M a 0,1M HCl)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 0,1 ml·l⁻¹ CaCl₂ (0,11098g·ml⁻¹)

Roztok Fe-EDTA (10 ml):

- 0,056g FeSO₄·7H₂O

- 0,074 g Na₂EDTA
- Doplnění MilliQ H₂O do 10 ml
- Rozpustit za stálého míchání při 50 °C

Tekuté Föhreovo médium bez dusíku

- 1 ml·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O (0,1232 g·ml⁻¹)
- 1 ml·l⁻¹ KH₂PO₄ (0,0953 g·ml⁻¹)
- 2 ml·l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O (0,0712 g·ml⁻¹)
- 2,5 ml·l⁻¹ Fe–EDTA
- 0,1 ml·l⁻¹ MnSO₄·H₂O (0,001g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O (0,0015g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ ZnSO₄·H₂O (0,0017g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ H₃BO₃ (0,001 g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O (0,0011g·ml⁻¹)
- Úprava pH na 6,5 (1M a 0,1M HCl)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklárování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 0,1 ml·l⁻¹ CaCl₂ (0,11098g·ml⁻¹)

LB médium

- 25 g·l⁻¹ LB broth
- Úprava pH na 7,2
- Sterilizace autoklávem

3.1.3 Použité přístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Automatické pipety (Eppendorf)

Autokláv – parní sterilizátor (Stervap, MMM Group)

Box laminární Biohazard (Merci)

Centrifuga stolní chlazená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)

Elektromagnetická míchačka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)

Fotoaparát Nikon 7000 (Nikon)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Inkubátor s nastavitelnou teplotou (Mettler)

Laboratorní chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)

Mikrovlnná trouba MHE21 (HITACHI)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)

Skener (Image Scanner III)

Spektrofotometer (Smart Spec™ plus, Bio-Rad)

Třepačka s inkubací ES-20 (Biosan)

Výrobník deionizované vody Simplicity water purification system (Millipore)

Fluorescenční stereomikroskop (Axio Zoom.V16 Carl Zeiss)

3.1.4 Software pro zpracování výsledků

Excel 365 (Microsoft Office)

ImageJ (NIH)

PowerPoint 365 (Microsoft Office)

Statistica 14.0.0

Zen Blue 2014 ver. 3.2 (Carl Zeiss)

3.1.5 Rostlinný materiál

- *Medicago sativa* L. divoký typ, kultivar Regen SY
- *Medicago sativa* L. transgenní linie *SIMK RNAi* s relativním snížením úrovně exprese *SIMK* (mRNA transkriptu) o 60 % v porovnání s divokým typem

3.1.6 Bakteriální materiál

- kmen *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 obsahující plazmid pHc60 (tetR), kódující mRFP

3.2 Metody

3.2.1 Příprava B5H média

B5H médium je kultivační médium s obsahem přidaných rostlinných hormonů sloužících k vyvolání kalogeneze. Jednotlivé explantáty se na tomto médiu kultivují po dobu zhruba tří týdnů.

V jedné laboratorní kádince byla smíchána směs Gamborg's B5 basal salt mixture spolu s KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, poté byl přidán prolin, sacharosa a nakonec Gellan gum, pro ztuhnutí média. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce byl MilliQ vodou doplněn objem na 1 l a pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Médium bylo po 250 ml rozlito do čtyř uzavíratelných skleněných lahví o objemu 500 ml a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55 °C byla v sterilním laminárním

boxu a přes sterilní membránové filtry přidána do objemu 250 ml směs aminokyselin, hormony (kinetin a 2,4-D) vitamíny (1000X Gamborg's vitamin) a antibiotikum ticarcilin ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) k potlačení růstu bakterií. Médium bylo následně rovnoměrně rozlito do 10 Petriho misek a volně ochlazen na laboratorní teplotu.

3.2.2 Příprava B50 média

B50 médium je kultivační médium bez přidaných rostlinných hormonů. Slouží k indukci embryogenního kalusu a následné tvorbě somatických embryí, která nastává po asi 2–3 týdnech kultivace.

Do jedné laboratorní kádinky byla přidána směs Gamborg's B5 basal salt mixture spolu s KNO_3 a $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, následně byl přidán prolin, sacharosa a nakonec Gellan gum, pro ztuhnutí média. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce byl MilliQ vodou doplněn objem na 1 l a pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Médium bylo po 250 ml rozlito do čtyř uzavíratelných skleněných lahví o objemu 500 ml a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55°C byla v sterilním laminárním boxu a přes sterilní membránové filtry přidána do objemu 250 ml směs aminokyselin, vitamíny (1000X Gamborg's vitamin) a antibiotikum ticarcilin ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Médium bylo rovnoměrně rozlito do 10 Petriho misek a volně ochlazen na laboratorní teplotu.

3.2.3 Příprava MMS média

MMS médium je kultivační médium sloužící k správnému vývoji somatických embryí, jejich výhonků a kořenů. Somatická embrya se na MMS médiu kultivují opět po dobu asi 3 týdnů.

V jedné laboratorní kádince byla smíchána směs MS basal salt mixture spolu s myoinositolem a sacharosou a poté byly přidán Gellan gum, jakožto ztužovací složka. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce byl objem doplněn MilliQ vodou na 1 l a pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Médium bylo po 250 ml rozlito do čtyř uzavíratelných skleněných lahví o objemu 500 ml a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55°C byla v sterilním laminárním boxu a přes sterilní membránové filtry přidána do objemu 250 ml směs vitamínů (1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution) a antibiotikum ticarcilin ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Médium bylo následně rovnoměrně rozlito do 10 Petriho misek a volně ochlazen na laboratorní teplotu.

3.2.4 Příprava MS média

MS médium je kultivační médium sloužící k dokončení správného vývoje mladých rostlin a k jejich udržování v *in vitro* podmínkách.

Do jedné kádinky byla postupně přidána směs MS basal salt mixture, sacharosa a Gellan gum. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce byl objem doplněn MilliQ vodou na 1 l a pH bylo upraveno pomocí 1M KOH na hodnotu 5,7. Médium bylo po 250 ml rozlito do čtyř uzavíratelných skleněných lahví o objemu 500 ml a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55 °C bylo ve sterilním laminárním boxu a přes sterilní membránové filtry přidáno do objemu 250 ml antibiotikum ticarcilin ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Takto připravené médium bylo rovnoměrně rozlito do 10 Petriho misek a volně ochlazen na laboratorní teplotu.

3.2.5 Příprava tekutého Fähreova média bez dusíku

Do jedné laboratorní kádinky byly postupně napipetovány jednotlivé makroelementy ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Fe-EDTA) a mikroelementy ($\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$; H_3BO_3 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce byl MilliQ vodou doplněn objem do 1 l a pH bylo upraveno pomocí 1M a 0,5M HCl na hodnotu 6,5. Médium bylo po 250 ml rozlito do čtyř uzavíratelných skleněných lahví o objemu 500 ml a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55 °C byl ve sterilním laminárním boxu a přes sterilní membránový filtr přidán do objemu 250 ml CaCl_2 (Fähraeus, 1957). Následně bylo médium rovnoměrně rozlito do Petriho misek. K přípravě ztuženého Fähreova média bez dusíku byl do tekutého roztoku před autoklávováním přidán Microagar.

3.2.6 Povrchová sterilizace listů

Zdravé zelené a nepoškozené listy byly odebrány přibližně ze střední části rostliny *M. sativa*, kultivaru Regen-SY rostoucí v půdě ve fytotronu (v *in vivo* podmínkách). Jednotlivé listy byly po odebrání vloženy do zkumavky typu Falcon naplněné vodou z vodovodního řádu a přeneseny do laminárního boxu. Zde následovala sterilizace listů 70% ethanolem po dobu 10 vteřin, následně se listy přenesly do 50 ml zkumavky typu Falcon obsahující sterilní MilliQ vodu, 1% chlornan sodný a 0,05% Tween a byly protřepávány po dobu 5 minut. Poté byly listy promyty sterilní destilovanou vodou a přeneseny na sterilní filtrační papír, kde byly sterilním skalpelem v půlce přeříznuty. Jednotlivé části listů byly přenášeny na B5H médium s přidavkem antibiotika (ticarcilin $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v kulatých Petriho miskách. Podobně jako i u ostatních médií pro kultivaci

rostlinného materiálu, antibiotikum ticarcilin bylo přidáno jako prevence sekundární bakteriální kontaminace.

Rostliny transgenní linie *SIMK RNAi* rostoucí na MS médiu v plastových boxech (v *in vitro* podmínkách) byly přeneseny do sterilních podmínek laminárního boxu a po odstřížení byly listové explantáty opět přeneseny na sterilní filtrační papír a rozříznuty napůl pomocí skalpelu. Jednotlivé části listů byly přeneseny na B5H médium s přídavkem selekčního antibiotika (ticarcilin $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v kulatých Petriho miskách.

3.2.7 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze

Jednotlivé Petriho misky s listovými explantáty byly označeny a kultivovány ve fytotronu při teplotě $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, intenzitě světla $60\text{--}80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma po dobu tří týdnů pro indukci kalusu (kalogeneze). Jednotlivé správně vyvinuté kalusy pak byly přeneseny na B50 médium s přídavkem ticarcilinu a kultivovány po dobu tří týdnů pro indukci embryogenního kalusu a tvorbu somatických embryí. Plně vyvinutá somatická embrya byla přenesena na MMS médium s ticarcilinem, po dobu asi tří týdnů k správnému formování a vývoji výhonků a kořenů. Mladé rostlinky vyvinuté ze somatických embryí byly nakonec přeneseny a udržovány na MS médiu v podmínkách *in vitro*.

3.2.8 Příprava kultury *Sinorhizobium meliloti*

Za pomoci pipety se sterilní špičkou bylo odebráno přibližně $30 \mu\text{l}$ kultury ze zmrzlého glycerolového roztoku s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, kmen Sm2011, a přeneseno do 50 ml kyvety s 10 ml LB média. Suspenze byla inkubována ve tmě, na třepačce při 180 otáčkách za minutu a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin, do dosažení OD_{600} (optická hustota při 600 nm) mezi 0,8–1,5. Jako kontrola (blank) bylo použito sterilní LB médium a kontrola optické hustoty byla prováděna na spektrofotometru.

Buňky byly následně od LB média odděleny centrifugací po dobu 5 minut, při 3000 g a laboratorní teplotě. Supernatant byl odlit do odpadu a pelet bakteriálních buněk byl resuspendován v tekutém Färeově médiu bez dusíku pro dosažení $\text{OD}_{600} = 0,5$.

3.2.9 Aplikace *Sinorhizobium meliloti*

Jednotlivé plně vyvinuté rostliny *M. sativa* kultivar Regen-SY a *M. sativa SIMK RNAi* kultivované na MS médiu byly přeloženy na pevné Färeovo médium bez dusíku – jednalo se vždy o tři rostliny na jednu Petriho misku. Dolní část Petriho misek, kde se nacházel jejich kořenový systém, byla následně zakryta černou plastovou fólií, aby

nedocházelo k vystavení kořenů přímému světlu. Po 7 dnech bylo na jejich kořenový systém pipetou aplikováno 5 ml připravené kultury *Sinorhizobium meliloti* s hodnotou $OD_{600} = 0,5$ a takto připravené Petriho misky byly kultivovány v kultivační komoře po dobu 30 dní.

3.2.10 Měření délky kořenové soustavy a počítání bočních kořenů kontrolních a transgenních rostlin *Medicago sativa*

Pro měření délky kořenové soustavy a počítání bočních kořenů bylo vybráno 10 reprezentativních kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY a 10 reprezentativních transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* rozmnožených *in vitro* procesem somatické embryogeneze. Kořeny rostlin byly snímány 14 dní po překlada a kultivaci na MS médiu, pomocí skeneru a jejich délka byla měřena přímo z pořízených fotografií v programu ImageJ.

3.2.11 Vyhodnocování efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních a transgenních rostlin *Medicago sativa*

Pro vyhodnocení efektivity procesu tvorby hlízek (nodulace) bylo vybráno 5 kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY a 5 transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*. Vyhodnocení proběhlo prostřednictvím počítání všech vytvořených hlízek po 30 dnech od aplikace bakteriální kultury *Sinorhizobium meliloti* na kořenový systém kontrolních a transgenních rostlin. U jednotlivých hlízek bylo dále rozlišeno, zda se jedná o zdravé (funkční) či senescentní noduly.

3.2.12 Analýza a zpracování dat

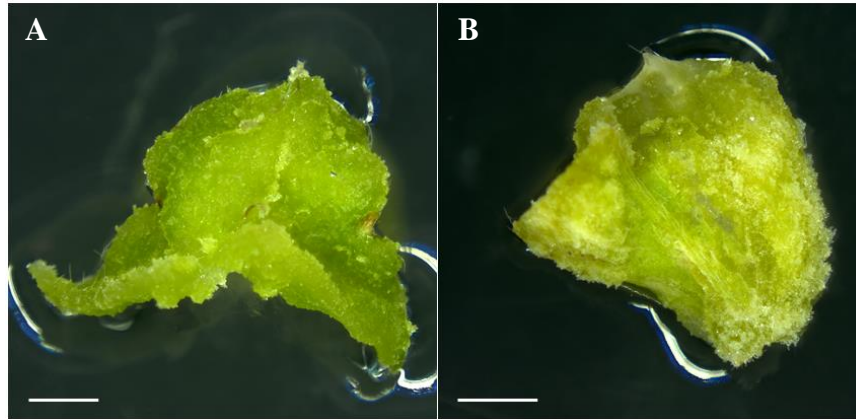
Jednotlivá stádia procesu somatické embryogeneze byla postupně snímána na Petriho miskách pomocí Zoom stereomikroskopu a takto získané snímky byly dále zpracovány v programu Zen Blue 3.2 a Microsoft Power Point 365. Rostliny na hranatých Petriho miskách byly snímány pomocí skeneru Image Scanner III, po 14 dnech kultivace na MS médiu a jednotlivé snímky byly následně použity pro měření délky kořenové soustavy a počítání bočních kořenů kontrolních a transgenních rostlin v programu ImageJ. Po 30 dnech od aplikace bakteriální kultury byly kořeny rostlin s vytvořenými hlízkami snímány Zoom stereomikroskopem a snímky následně zpracovány v programu Zen Blue 3.2 a Microsoft Power Point 365. Veškerá data a z nich vytvořené grafy byla zpracována a vyhodnocena v programu Microsoft Excel 365 a Statistica 14.0.0.

4. VÝSLEDKY

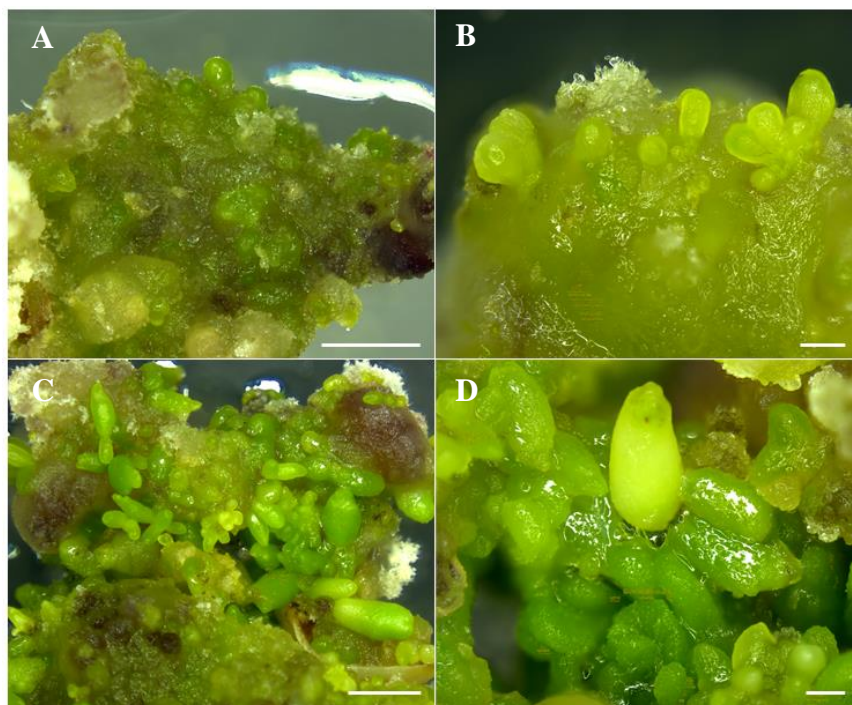
První část této kapitoly prezentuje výsledky regenerace rostlin *Medicago sativa* procesem somatické embryogeneze. Jedná se o kontrolní linii kultivaru Regen-SY a transgenní linii *SIMK RNAi*, se sníženou expresí a produkcí proteinu SIMK. Druhá část je zaměřena na částečnou fenotypickou charakterizaci a srovnání kontrolní a transgenní linie *M. sativa* měřením délky kořenové soustavy a počítáním bočních kořenů. Poslední část zahrnuje vyhodnocování a srovnání efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních a transgenních rostlin *M. sativa* prostřednictvím počítání vytvořených nodulů, po aplikaci symbiotických půdních bakterií *Sinorhizobium meliloti* na kořenový systém rostlin.

4.1 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze

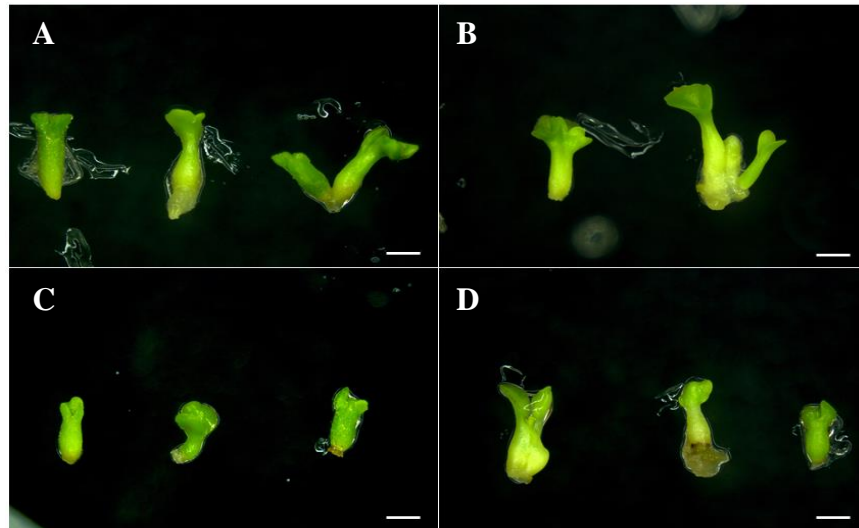
Regenerace rostlin *M. sativa* procesem somatické embryogeneze byla indukována z listových explantátů kontrolní linie Regen-SY a transgenní linie *SIMK RNAi* přenesených na sterilní B5H médium s přidavkem antibiotika (ticarcilin - 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Kultivace explantátů na B5H médiu obsahujícím rostlinné hormony probíhala po dobu tří týdnů a vedla u somatických buněk ke kalogenezi (Obr. 2). Jednotlivé kalusy byly následně přeneseny na médium s obsahem antibiotika, avšak bez obsahu hormonů (označováno jako B50 médium). Během tří týdnů kultivace docházelo na kalusech k indukci (Obr. 3 A, B) a postupnému vývoji somatických embryí (Obr. 3 C, D). Vyvinutá somatická embrya byla poté jednotlivě přenesena na MMS médium s ticarcilinem, které je bohaté na vitamíny a aminokyseliny (Obr. 4). Na MMS médiu docházelo u somatických embryí k postupnému vývoji kořenů a výhonků (Obr. 5). Nakonec byla embrya přenesena na MS médium, kde došlo k dokončení vývoje celé rostliny. Takto vyvinuté rostliny byly na MS médiu dále kultivovány a udržovány v *in vitro* podmínkách (Obr. 6). Celý proces regenerace rostlin *M. sativa* somatickou embryogenezí byl snímán pomocí mikrosnímků ze Zoom stereomikroskopu, nebo makrosnímků z fotoaparátu. Při srovnání kontrolní a transgenní linie nebyl pozorován žádný významný rozdíl.



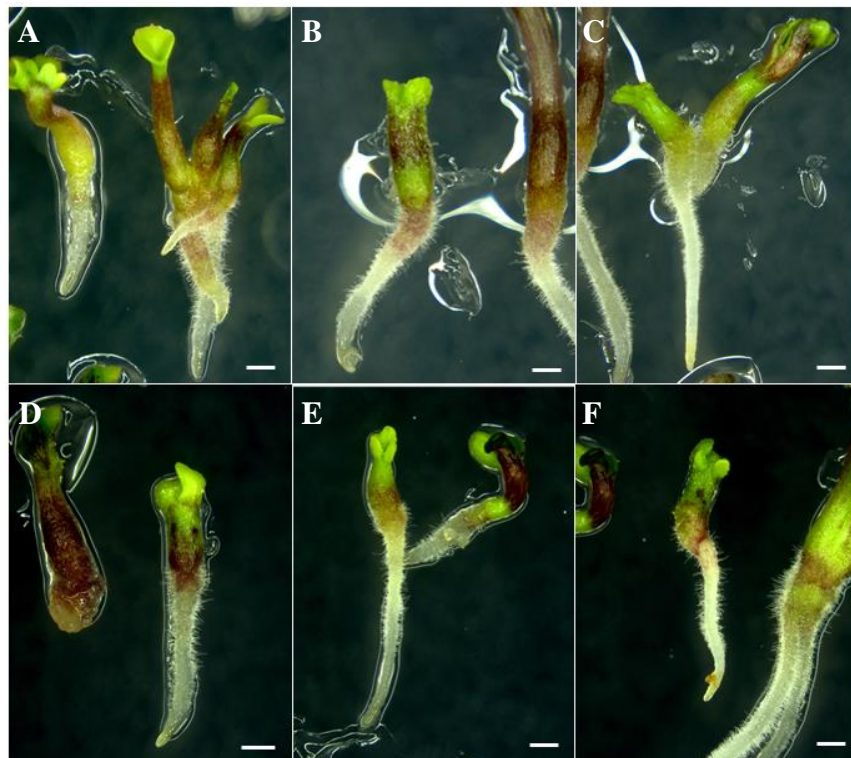
Obrázek 2: Indukce kalusu u listových explantátů *M. sativa* po 12 dnech kultivace na B5H médiu. (A) Kultivar Regen-SY, (B) transgenní linie *SIMK RNAi*. Měřítko – 2 mm.



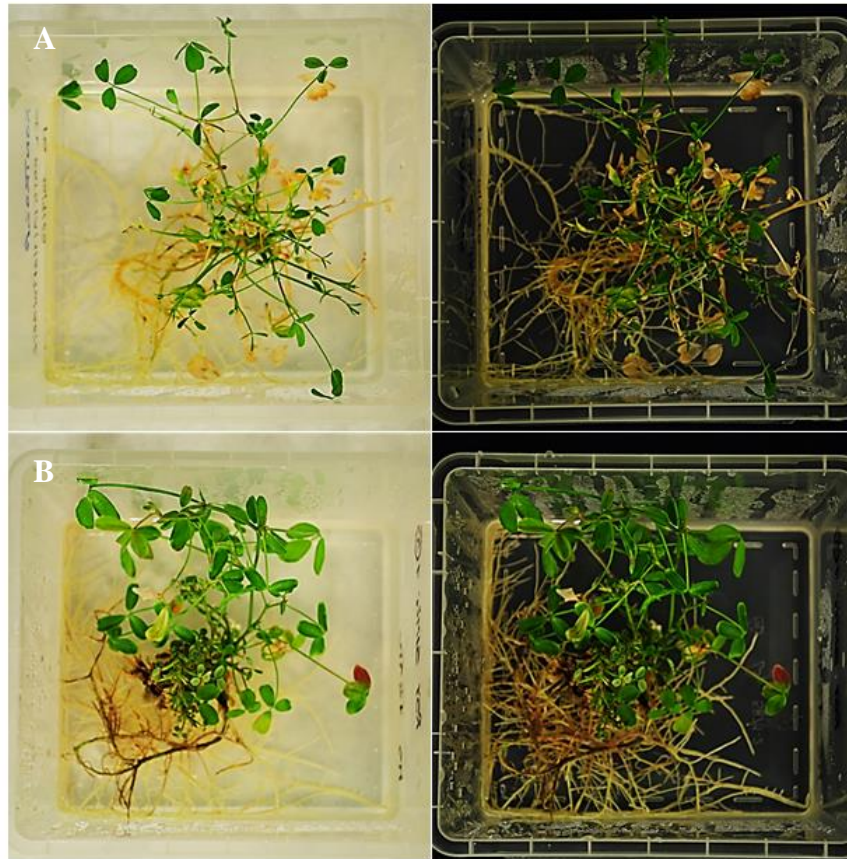
Obrázek 3: Indukce embryogenního kalusu a somatických embryí *M. sativa* z kalusu 5 dní po přeložení na B50 médiu. (A) Kultivar Regen-SY, měřítko – 2 mm, (B) transgenní linie *SIMK RNAi*, měřítko – 0,5 mm. Vývoj somatických embryí na kalusech *M. sativa* po 15 dnech kultivace na B50 médiu. (C) Kultivar Regen-SY, měřítko – 2 mm, (D) transgenní linie *SIMK RNAi*, měřítko – 0,5 mm.



Obrázek 4: Jednotlivá vyvinutá somatická embrya *M. sativa* přeložená na MMS médium. (A, B) Kultivar Regen-SY, (C, D) transgenní linie *SIMK RNAi*. Měřítko – 1 mm.



Obrázek 5: Vývoj kořenů ze somatických embryí *M. sativa* 5 dní po přeložení na MMS médium. (A, B, C) Kultivar Regen-SY, (D, E, F) transgenní linie *SIMK RNAi*. Měřítko – 1 mm.



Obrázek 6: Kultivace kompletně vyvinutých rostlin *M. sativa* na MS médiu. (A) Kultivar Regen-SY na světlém pozadí (vlevo), na tmavém pozadí (vpravo), (B) transgenní linie *SIMK RNAi* na světlém pozadí (vlevo), na tmavém pozadí (vpravo).

4.2 Měření délky kořenové soustavy a počítání bočních kořenů kontrolních a transgenních rostlin *Medicago sativa*

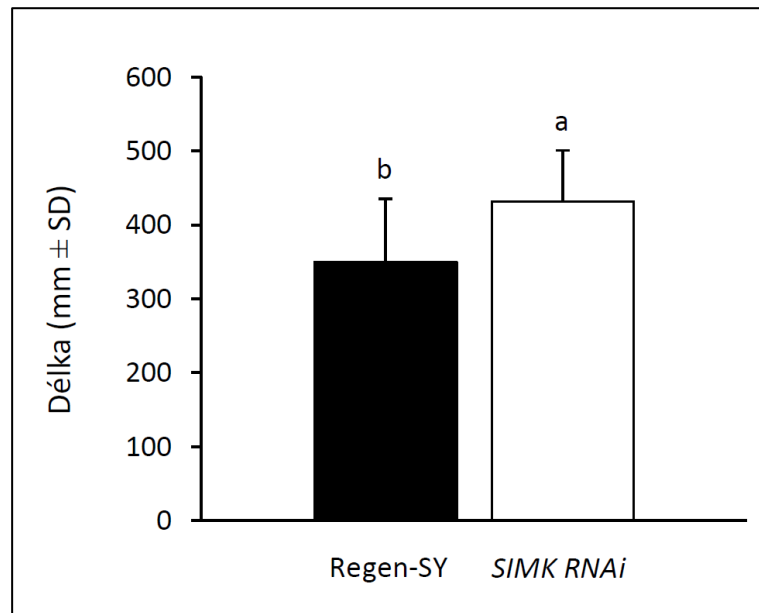
Pro vyhodnocení a srovnání fenotypu kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* bylo provedeno měření kořenové soustavy a následné počítání bočních kořenů. Pro tento experiment bylo u obou linií vybráno 10 zdravých rostlin, vyhodnocených 14 dní po přenosu na MS médiu v hranatých Petriho miskách (Obr. 7). Kořeny byly snímány pomocí skeneru vždy v procházejícím světle (Obr. 7 vpravo) a odraženém světle (Obr. 7 vlevo) a jejich délka byla měřena v programu ImageJ.

U kontrolních rostlin *M. sativa* byla naměřena průměrná délka kořenové soustavy 349,793 mm (Obr. 8) a rostliny měly vytvořeny průměrně 14,8 bočních kořenů (Obr. 9). Průměrná délka kořenové soustavy transgenních rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* činila 431,708 mm (Obr. 8) a z hlavního kořene vyrůstalo průměrně 16,1 bočních kořenů (Obr. 9). Z výsledků je patrné, že transgenní rostliny *M. sativa* *SIMK RNAi* mají

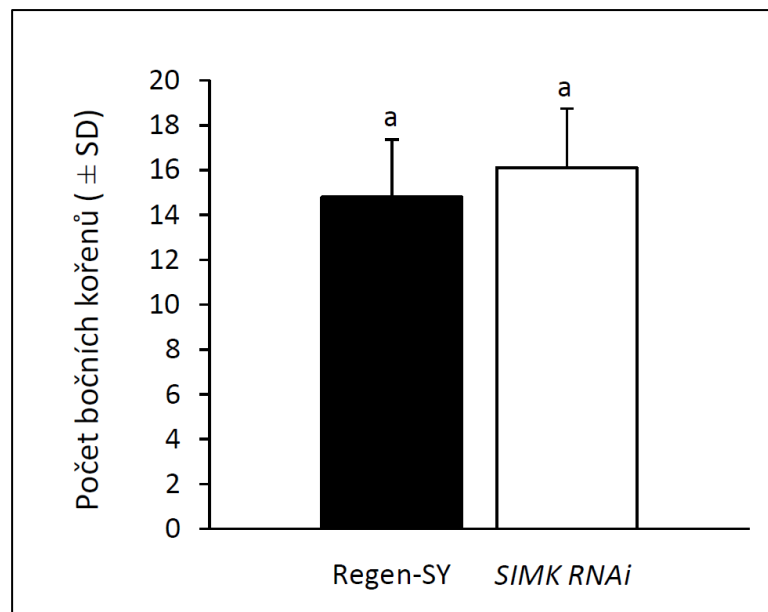
vytvořenou kořenovou soustavu delší v průměru přibližně o 82 mm než kontrolní rostliny *M. sativa* (Obr. 8). V počtu vytvořených laterálních kořenů se však kontrolní a transgenní rostliny od sebe téměř neliší (Obr. 9).



Obrázek 7: Fenotyp kořenové soustavy rostlin *M. sativa* rostoucích na MS médiu 14 dní po přenosu. (A) Kontrolní linie Regen-SY v procházejícím světle (vpravo), v odraženém světle (vlevo). (B) Transgenní linie *SIMK RNAi* v procházejícím světle (vpravo), v odraženém světle (vlevo).



Obrázek 8: Délka kořenné soustavy kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa* SIMK RNAi kultivovaných na MS médiu 14 dní po přenosu. N=10; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při $p < 0,05$ stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.

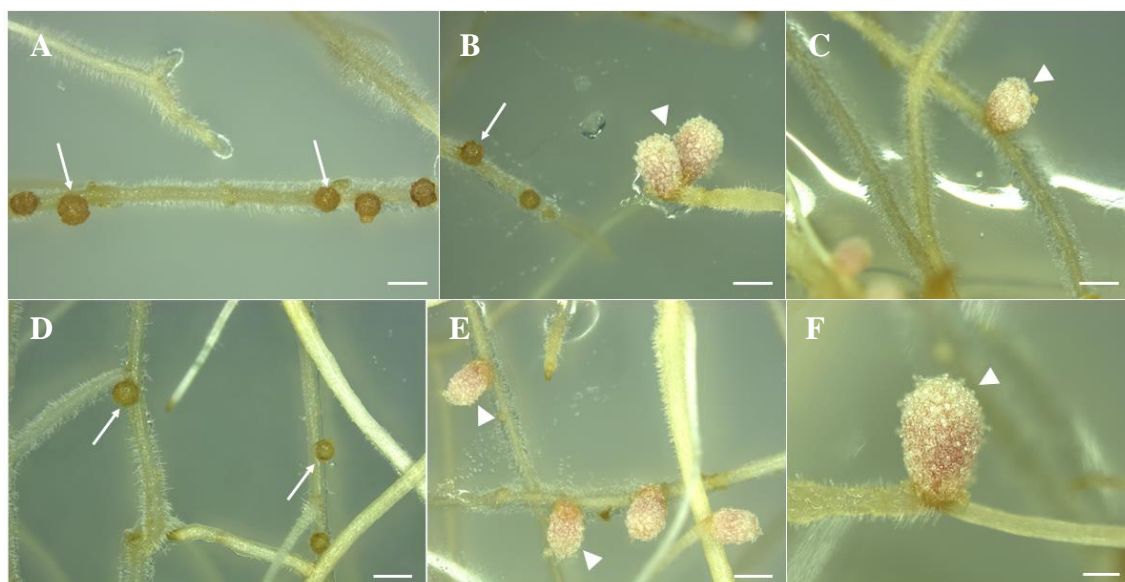


Obrázek 9: Počet bočních kořenů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa* SIMK RNAi kultivovaných 14 dní po přenosu. N=10; písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při $p < 0,05$ stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.

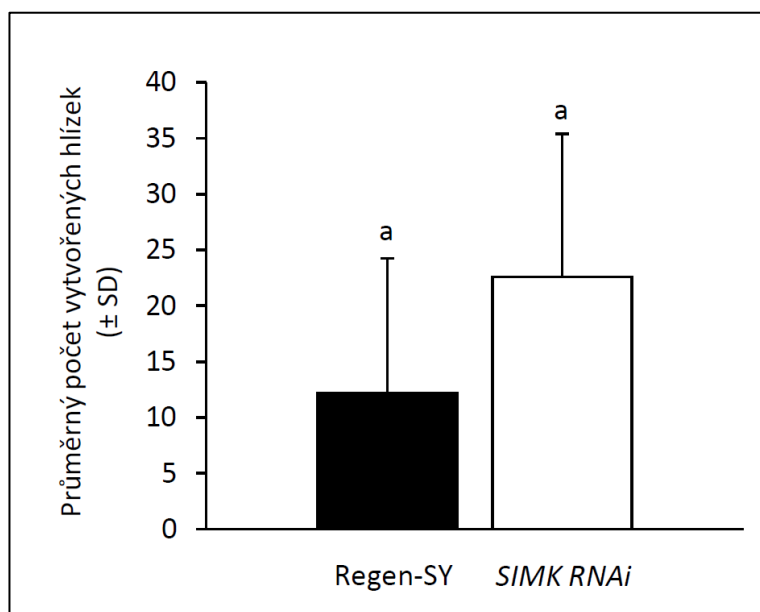
4.3 Vyhodnocování efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních a transgenních rostlin *Medicago sativa*

Srovnání efektivity procesu tvorby hlízek u kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* bylo vyhodnoceno z fotografií pořízených zoom stereomikroskopem (Obr. 10). Rostliny byly 7 dní kultivovány na Fähreově médiu bez dusíku k navození stavu „hladovění“ a následně byla na jejich kořenový systém aplikována kultura *Sinorhizobium meliloti* v koncentraci s hodnotou $OD_{600} = 0,5$. Po 30 dnech od ko-kultivace rostlin s bakteriemi, bylo u obou linií vybráno 5 zdravých rostlin, vytvořené hlízky byly spočítány a rozlišeny na zdravé, vzhledem k obsahu leghemoglobinu pravděpodobně plně funkční, a na senescentní, vzhledem k zastavení růstu tedy nefunkční. Senescentní hlízky lze poznat na základě tmavé hnědé barvy a menší velikosti (Obr. 10 A, D). Zdravé a funkční hlízky jsou naopak větší a světle růžově zbarvené (Obr. 10 B, C, E, F).

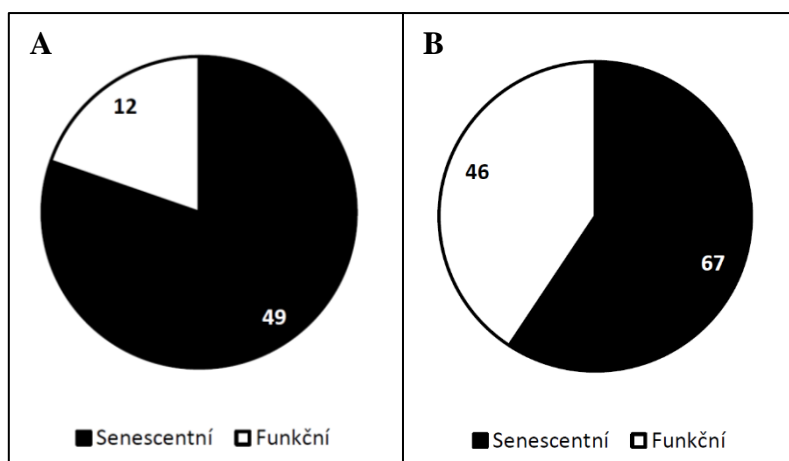
U kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY se během 30 dní průměrně tvořilo 12,2 hlízek na rostlinu, kdežto u transgenních rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* se za stejnou dobu vytvořilo průměrně 22,6 hlízek na rostlinu (Obr. 11). Celkový počet vytvořených hlízek u pěti kontrolních rostlin byl 61, z toho pouze 12 bylo plně funkčních (Obr 12 A). U pěti transgenních rostlin byl celkový počet vytvořených hlízek 113, z nichž 46 bylo funkčních (Obr. 12 B). Z výsledků je patrné, že na kořenech transgenních rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* se vytvořilo skoro 2x více hlízek než u kontrolních rostlin *M. sativa*.



Obrázek 10: Hlízky vytvořené na kořenech rostlin *M. sativa* po 30 dnech od ko-kultivace s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. (A, B, C) Kontrolní linie Regen-SY, (D, E, F) transgenní linie *SIMK RNAi*. Šipky ukazují na senescentní hlízky, hroty šipek značí zdravé hlízky. (A-E) Měřítko – 1 mm. (F) Měřítko – 0,5 mm.



Obrázek 11: Průměrný počet vytvořených hlízek na kořenech kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY a transgenních rostlin *M. sativa* SIMK RNAi po 30 dnech od ko-kultivace s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. N=5; písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při $p < 0,05$ stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.



Obrázek 12: Podíl funkčních a senescentních hlízek vytvořených na kořenech rostlin *M. sativa* po 30 dnech od ko-kultivace s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. (A) Kontrolní rostliny *M. sativa* Regen-SY (B) transgenní rostliny *M. sativa* SIMK RNAi.

5. DISKUSE

Je dobře známo, že základním mechanismem signalizace u rostlin je kaskádovitý přenos signálů, na čem se podílí i MAPK kaskády. Ty jsou zapojeny v hormonální regulaci, vývojových procesech a obranných reakcích vůči biotickému i abiotickému stresu (Kiegerl *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2013; Xu a Zhang, 2015). U *Medicago sativa* v rámci popsáných MAPK, hraje klíčovou roli stresem indukovaná MAPK (SIMK). SIMK vykazuje vysokou homologii k MPK6 z *Arabidopsis thaliana* (AtMPK6) a je indukována solným stresem, poraněním, vysokou koncentrací těžkých kovů a různými houbovými elicitory (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2004). Bylo dokázáno, že během růstu kořenových vlásků dochází k její aktivaci a přemístění z jádra do cytoplazmy rostoucích špiček kořenových vlásků. Nadměrná exprese této kinázy vede u rostlin ke zvýšené míře prodlužování těchto kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014; Hrbáčková *et al.*, 2020b). Při vzájemném porovnání transgenních rostlin *M. sativa SIMKK RNAi* se sníženou expresí proteinu SIMKK (a zároveň se sníženou expresí i s ním spojeného proteinu SIMK) metodou RNA interference, a transgenních rostlin *M. sativa* s nadexpresí proteinu SIMK značeného GFP (GFP-tagged SIMK) bylo dokázáno, že transgenní linie *SIMKK RNAi* vykazují snížený růst kořenových vlásků a poskytují tedy menší kapacitu pro vytvoření kořenových hlízek při infekci bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. U rostlin se sníženou expresí proteinů SIMKK a SIMK dochází také ke zpomalení růstu a tvorbě nižšího podílu biomasy u nadzemní části (Hrbáčková *et al.*, 2020b).

Je zajímavé, že po změření a porovnání celkové kořenové soustavy kontrolních a transgenních rostlin bylo zjištěno, že transgenní rostliny se sníženou expresí proteinu SIMK procesem RNA interference, mají vytvořenou kořenovou soustavu delší v průměru asi o 82 mm. To může být způsobeno určitou snahou rostliny vykompenzovat snížený obsah důležitého signálního proteinu a zvětšit si tak povrch pro efektivnější příjem živin a vody z půdy. V počtu vytvořených bočních kořenů u kontrolních a transgenních rostlin však nejsou žádné signifikantní rozdíly. Zajímavý je také fakt, že po aplikaci půdní bakterie *Sinorhizobium meliloti*, docházelo u transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* k tvorbě většího množství hlízek, a to skoro dvojnásobně ve srovnání s kontrolními liniemi. Z důvodu relativně vysoké míry variability, a také vzhledem k větší celkové délce kořenového systému *SIMK RNAi* linií, nebyl ovšem tento rozdíl statisticky signifikantně rozdílný. Důležitým faktem ovšem je, že z celkového počtu 113 vytvořených hlízek u transgenních rostlin, bylo 46 zcela funkčních. U kontrolních rostlin

bylo ale funkčních pouze 12 z celkového počtu 61. Je možné, že u rostlin se sníženou expresí proteinu SIMK dochází ke kompenzaci prostřednictvím zvýšení aktivity proteinu SIMK, a tedy i k udržení jeho funkce.

Získaná data z těchto experimentů naznačují, že cílená manipulace prostřednictvím snížení exprese SIMK může u rostlin ovlivnit růst kořenů, interakci s půdními bakteriemi a také následný proces nodulace. Pro potvrzení či vyvrácení těchto výsledků však bude nutné experimenty opakovat.

6. ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla popsána základní charakteristika rostliny *Medicago sativa*, její zemědělské a ekonomické využití a možnost indukce a regenerace rostlin procesem přímé a nepřímé somatické embryogeneze. V další části byla popsána transgenozé a přímé a nepřímé metody transformace rostlin. Protože se v praktické části pracovalo s transgenní linií *M. sativa SIMK RNAi*, byla v poslední části teoretického úvodu popsána signalizace prostřednictvím MAPK a jejich zapojení do vývojových procesů, hormonální regulace a obranných reakcí rostlin, se zaměřením na *M. sativa*, včetně mechanismu interakce rostlin s půdními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*.

V praktické části je popsána práce s kontrolními rostlinami *M. sativa* Regen-SY a transgenními rostlinami *M. sativa SIMK RNAi*, množenými procesem somatické embryogeneze. Nejprve byla provedena fotodokumentace celkového průběhu regenerace kontrolních a transgenních rostlin. Dále byla provedena částečná fenotypická charakterizace kontrolních i transgenních rostlin prostřednictvím měření celkové délky kořenové soustavy a počítáním vytvořených laterálních kořenů. Naměřená data sloužila k porovnání výsledků u obou linií. Ukázalo se, že transgenní rostliny *M. sativa SIMK RNAi* mají vytvořenou kořenovou soustavu v průměru o 82 mm delší než kontrolní rostliny *M. sativa* Regen-SY, ovšem v počtu laterálních kořenů se od sebe kontrolní a transgenní rostliny téměř neliší. Nakonec byla připravena bakteriální kultura *Sinorhizobium meliloti* a byla aplikována na kořenový systém kontrolních i transgenních rostlin pro následné vyhodnocování interakce a efektivity procesu tvorby hlízek (nodulace). Získaná data sloužila opět k porovnání výsledků u obou linií. Ukázalo se, že na kořenech transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* se vytvořilo průměrně 2x více hlízek než u kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY. Výsledky práce přispěly k charakterizaci originální transgenní linie *M. sativa*, vytvořené v naší laboratoři, a budou využity při dalších experimentech s touto linií.

7. SEZNAM LITERATURY

- Abeles F. B., Morgan P. W., Saltveit M. E., Jr. (1992): *Ethylene in Plant Biology*. 2nd Ed, Academic Press, New York, 414 stran.
- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosché M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjärvi J. (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **40**, 512–22.
- 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**, 321–330.
- Armaleo D., Ye G.N., Klein T.M., Shark K. B., Sanford J. C., Johnston S. A. (1990): Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics* **17**, 97–103.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- Ashraf M. (2010): Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances* **28**, 169–183.
- Bartels D., Sunkar R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 23–58.
- Bates G., Gaynor J., Shekhawat N. (1983): Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiology* **72**, 1110–1113.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell* **22**, 755–71.
- Bevan M. W., Flavell R. B., Chilton M. D. (1983): A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Biotechnology (Reading, Mass.)* **24**, 367–370.
- Bhat S. R. (2010): Transgenics for increasing productivity of crops. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **19**, 1–7.
- Bora K. S., Sharma A. (2011): Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical Biology* **49**, 211–220.
- Bouton JH (2001) Alfalfa. In: 'Proceedings XIX International Grassland Congress'. (Gomide J. A., Mattos W. R. S., d'Silva S. C. eds.) FEALQ, Piracicaba, SP, Brazil: Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil, 545–547.
- Briddon R., Liu S., Pinner M., Markham P. (1998): Infectivity of African cassava mosaic virus clones to cassava by biolistic inoculation. *Archives of Virology* **143**, 2487–2492.
- Broothaerts W., Mitchell H. J., Weir B., Kaines S., Smith L. M. A., Yang W., Mayer J., Roa-Rodríguez C., Jefferson R. A. (2005): Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* **433**, 629–633.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36734–36740.
- Clark K. L., Larsen P. B., Wang X., Chang C. (1998): Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **95**, 5401–5606.
- Collins G. B., Shepherd R. J. (1996): Engineering plants for commercial products and applications. *New York Academy of Sciences* **792**, 1–176.
- Comai L., Facciotti D., Hiatt W. R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D. M. (1985): Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**, 741–744.
- Coronado M. J., González-Melendi P., Seguí J. M., Ramírez C., Bárány I., Testillano P. S., Risueno M. C. (2002): MAPKs entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes. *Journal of Structural Biology* **140**, 200–213.

- Coronado M. J., Testillano P. S., Wilson C., Vicente O., Heberle-Bors E., Risueno M. C. (2007): *In situ* molecular identification of the Ntf4 MAPK expression sites in maturing and germinating pollen. *Biology of Cell* **99**, 209–221.
- Creelman R. A., Mullet J. E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **48**, 355–381.
- Crossway A., Oakes J. W., Irvine J. M., Ward B., Knauf V. C., Shewmaker C. K. (1986): Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics* **202**, 179–185.
- Czuba M., Kraszewski A. (1994): Long-term cadmium exposure accelerates oxidant injury: significance of bound/free water states during long-term metal stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **29**, 330–348.
- Dangl J. L., Jones J. D. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.
- Davey M. R., Rech E. L., Mulligan B. J. (1989): Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Molecular Biology* **13**, 273–285.
- Denchev P., Velcheva M., Atanassov A. (1991): A new approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Reports* **10**, 338–341.
- Desgagnés R., Laberge S., Allard G., Khoudi H., Castonguay Y., Lapointe J., Michaud R., Vézina L. P. (1995): Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* **42**, 129–140.
- Desikan R., Clarke A., Atherfold P., Hancock J. T., Neill S. J. (1999): Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta* **210**, 97–103.
- Desikan R., Hancock J. T., Ichimura K., Shinozaki K., Neill S. J. (2001): Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology* **126**, 1579–1587.
- D'Halluin K., Botterman J., De Greef W. (1990): Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Science* **30**, 866–871.
- Dhar M.K., Kaul S., Kour J. (2011): Towards the development of better crops by genetic transformation using engineered plant chromosomes. *Plant Cell Reports* **30**, 799–806.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* **19**, 3266–3279.
- Du H., Zeng X., Zhao M., Cui X., Wang Q., Yang H., Cheng H., Yu D. (2016): Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *Journal of Biotechnology* **217**, 90–97.
- Ebert J. (2007): Alfalfa's bioenergy appeal. *Ethanol Producer Magazine (BBI International)* 88–94.
- Fähraeus G. M. (1957): The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* **16**, 374–381.
- Fournier J., Timmers A. C., Sieberer B. J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D. G. (2008): Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology* **148**, 1985–1995.
- Fowler S., Thomashow M. F. (2002): *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell* **14**, 1675–1690.
- Fu G., Grbic V., Ma S., Tian L. (2015): Evaluation of somatic embryos of alfalfa for recombinant protein expression. *Plant Cell Report* **34**, 211–221.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006): Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436–442.
- Gao R., Feyissa B. A., Croft M., Hannoufa A. (2018): Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing *Medicago sativa*. *Planta* **247**, 1043–1050.

- Gelvin S. B. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 223–256.
- Gibson K. E., Kobayashi H., Walker G. C. (2008): Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics* **42**, 413–441.
- Graham D. B., Root D. E. (2015): Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome Biology* **16**, 260.
- Griesbach R. J. (1987): Chromosome-mediated transformation via microinjection. *Plant Science* **50**, 69–77.
- Griffith F. (1928): The Significance of *Pneumococcal* Types. *The Journal of hygiene* **27**, 113–159.
- Hall J. L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1–11.
- Henderson I. R., Jacobsen S. E. (2007): Epigenetic inheritance in plants. *Nature* **447**, 418–424.
- Haun W., Coffman A., Clasen B. M., Demorest Z. L., Lowy A., Ray E., Retterath A., Stoddard T., Juillerat A., Cedrone F., Mathis L., Voytas D. F., Zhang F. (2014): Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*. **12**, 934–940.
- Hord C. L., Sun Y. J., Pillitteri L. J., Torii K. U., Wang H., Zhang S., Ma H. (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant* **1**, 645–658.
- Hua J., Meyerowitz E. M. (1998): Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**, 261–271.
- Huang J., Wu L., Yalda D., Adkins Y., Kelleher S. L., Crane M., Lonnerdal B., Rodriguez R. L., Huang N. (2002): Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. *Transgenic Research* **11**, 229–239.
- Hui S. W. (1995): Effects of pulse length and strength on electroporation efficiency. *Methods in molecular biology* **55**, 29–40.
- Hrabě F. a kol. (2004): *Trávy a jeteloviny v zemědělské praxi*. Nakladatelství Ing. Petr Baštan, Olomouc, ISBN 80-903275-1-6, 121stran.
- Hrbáčková M., Dvořák P., Takáč T., Tichá M., Luptovčíak I., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2020a): Biotechnological Perspectives of Omics and Genetic Engineering Methods in Alfalfa. *Frontiers in Plant Science* **11**, 592.
- Hrbáčková M., Luptovčíak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Novák D., Bednarz H., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020b). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal* **19**, 767–784.
- Chabaud M., Passiatore J. E., Cannon F., Buchanan-Wollaston V. (1988): Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Reports* **7**, 512–516.
- Chakravarty B., Srivastava S. (1992): Toxicity of some heavy metals *in vivo* and *in vitro* in *Helianthus annuus*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **283**, 287–294.
- Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W., Ecker J. R. (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133–1144.
- Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. (2019): CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology* **70**, 667–697
- Cheng Z., Li J. F., Niu Y., Zhang X. C., Woody O. Z., Xiong Y., Djonovič S., Millet Y., Bush J., Mcconkey B. J., Sheen J., Ausubel F. (2015): Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature* **521**, 213–216.
- Choudhary A.D., Kessmann H., Lamb C.J., Dixon R. (1990): Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) IV. Expression of defense gene constructs in electroporated suspension cell protoplasts. *Plant Cell Reports* **9**, 42–46.

- Chinchilla .D, Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J. D., Felix G., Boller T. (2007): A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal* **24**, 655–665.
- Ichimura K., Casais C., Peck S. C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006): MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 36969–36976.
- Jia W., Li B., Li S., Liang Y., Wu X., Ma M., Wang J., Gao J., Cai Y., Zhang Y., Wang Y., Li J., Wang Y. (2016): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLOS Biology* **14**.
- Jin S., Prusti R. K., Roitsch T., Ankenbauer R. G., Nester E. W. (1990a): Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *Journal of Bacteriology* **172**, 4945–50.
- Jin S., Roitsch T., Ankenbauer R. G., Gordon M. P., Nester E. W. (1990b): The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *Journal of Bacteriology* **172**, 525–30.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* **136**, 3276–3283.
- Jonak C., Okrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415–424.
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kanaar R., Hoeijmakers J. H., van Gent D. C. (1998): Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in Cell Biology* **8**, 483–489.
- Kao K. N., Michayluk M. R. (1980): Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Alfalfa. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **96**, 135–141.
- Kao K. N., Michayluk M. R. (1981): Embryoid Formation in Alfalfa Cell Suspension Cultures from Different Plants. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **17**, 645–648.
- Kieber J. J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K. A., Ecker J. R. (1993): CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427–441.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**, 2247–2258.
- Koes R. E. K., Spelt C. E., Mol J. N. M. (1989): The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*; V30GP differential K light 2 regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Molecular Biology* **12**, 213–225.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237–265.
- Kosturkova G. (1993): Expression of foreign genes following electroporation of *Medicago* protoplasts. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **7**, 43–46.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 2940–2945.
- Kubinić R. T., Liang H., Hui S. W. (1990): Effects of pulse length and pulse strength on transfection by electroporation. *BioTechniques* **8**, 16–20.
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. (2004): The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* **16**, 3496–3507.
- Lampard G. R., Wengier D. L., Bergmann D. C. (2014): Manipulation of mitogen-activated protein kinase signaling in the *Arabidopsis* stomatal lineage reveals motifs that contribute to protein localization and signaling specificity. *The Plant Cell* **26**, 3358–3371.

- Lee Y., Kim Y. J., Kim M. H., Kwak J. M. (2016): MAPK cascades in guard cell signal transduction. *Frontiers in Plant Science* **7**, 80.
- Lee J. S., Ellis B. E. (2007): *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25020–25029
- Li L., Chandrasegaran S. (1993): Alteration of the cleavage distance of Fok I restriction endonuclease by insertion mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2764–2768.
- Liu Y., Zhang S. (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ET biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 3386–3399.
- Liu D. H., Jiang W. S., Li M. X. (1992): Effects of Cd²⁺ on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Acta Scientiae Circumstantiae* **12**, 439–446.
- López M. L., Peralta-Videa J. R., Benitez T., Gardea-Torresdey J. L. (2005): Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere* **61**, 595–598.
- Lu D. Y., Davey M. R., Cocking E. C. (1983): A comparison of the cultural behaviour of protoplasts from leaves, cotyledons and roots of *Medicago sativa*. *Plant Science Letters* **31**, 87–99.
- Luciano C. S., Rhoads R. E., Shaw J. G. (1987): Synthesis of potyviral RNA and proteins in tobacco mesophyll protoplasts inoculated by electroporation. *Plant Science* **51**, 295–303.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. (2004): A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* **116**, 109–119.
- Mahfouz M. M., Li L., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fang X., Zhu J. K. (2011): De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **108**, 2623–2628.
- Malzahn A., Lowder L., Qil Y. (2017): Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell and Bioscience* **7**, 21.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002): Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal* **29**, 637–647.
- Meng Y. Y., Hou Y. L., Wang H., Ji R. H., Liu B., Wen J. Q., Niu L., Lin H. (2017): Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* **36**, 371–374.
- Meng Y., Wang C., Yin P., Zhu B., Zhang P., Niu L., et al. (2019): “Targeted mutagenesis by an optimized agrobacterium-delivered CRISPR/Cas 9 system in the model legume *Medicago truncatula*,” in *The Model Legume Medicago truncatula*, ed. F. D. Bruijn (Hoboken, NJ: Wiley), 1015–1018.
- Mészáros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy V., Teige M., Koncz C., Peck S., Bögre L. (2006): The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant Journal* **48**, 485–498.
- Meyers B., Zaltsman A., Lacroix B., Kozlovsky S. V., Krichevsky A. (2010): Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances* **28**, 747–756.
- Mccoy T. J., Bingham E.T. (1977): Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant Science Letters* **10**, 59–66.
- Meer M. I. (1993): Control of plant gene expression. London: CRC Press
- Mezentsev A. V. (1979): Plant regeneration from alfalfa protoplasts. In: *Proc. III. All Union Conference «Plant Cell Culture»*. Abovyan, U.S.S.R. pp. 100
- Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I., Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H.

- S., Holmes M. C., Zhang L., Gregory P., Rebar E. J., (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* **29**, 143–148.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. (2007): CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Science USA* **104**, 19613–19618.
- Morikawa H., Yamada Y. (1985): Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant and Cell Physiology* **26**, 229–236.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* **61**, 234–248.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I. I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *The Plant Journal* **20**, 381–388.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 26959–26966.
- Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt H. (2006): A Mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 38697–38704.
- Neuhaus G. Spangenberg G. (1990): Plant transformation by microinjection techniques. *Physiologia Plantarum* **79**, 213–217.
- Nirola R., Megharaj M., Beecham S., Aryal R., Thavamani P., Vankateswarlu K., Saint C. (2016): Remediation of metalliferous mines, revegetation challenges and emerging prospects in semi-arid and arid conditions. *Environmental Science and Pollution Research* **23**, 20131–20150.
- Novák F. J., Konečná D. (1982): Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **105**, 279–284.
- Nuhse T. S., Peck S. C., Hirt H., Boller T. (2000): Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7521–7526
- Onouchi H., Yokoi K., Machida C., Matsuzaki H., Oshima Y., Matsuoka K., Nakamura K., Machida Y. (1991): Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Research* **19**, 6373–6378.
- Ortiz-Masia D., Perez-Amador M. A., Carbonell J., Marcote M. J. (2007): Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**, 1834–1840.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Smékalová V., Luptovčiak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2335–2350.
- Ow D. W., Wood K. V., Deluca M., De Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H. (1986): Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856–859.
- Palukaitis P., Zaitlin M. (1997): Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Advances in Virus Research* **48**, 349–377
- Pastwa E., Blasiak, J. (2003): Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochimica Polonica* **50**, 891–908.
- Paszkowski J., Baur M., Bogucki A., Potrykus I. (1988): Gene targeting in plants. *The EMBO Journal* **7**, 4021–4026.
- Pereira L. F., Erickson L. (1995): Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports* **14**, 290–293.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O.,

- Jensen A. B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111–1120.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1993): Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research* **21**, 5034–5040.
- Qutob D., Kemmerling B., Brunner F., Kufner I., Engelhardt S., Gust A. A., Luberacki B., Seitz H. U., Stahl D., Rauhut T., Glawischign E., Schween G., Lacombe B., Watanabe N., Lam E., Schlichting R., Scheel D., Nau K., Dodt G., Hubert D., Gijzen M., Nürnberger T. (2006): Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *The Plant Cell* **18**, 3721–3744.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002): Alternative methods of plant transformation-a short review. *Cellular and Molecular Biology Letters* **7**, 849–858.
- Ramaiah S. M., Skinner D. Z. (1997): Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science* **73**, 674–682.
- Randuška D., Šomšák L., Háberová I. (1986): *Barevný atlas rostlin*. 3. Vydání (2. čes. opr. vyd.). Obzor: Bratislava. ISBN 65-010-86, 640 stran.
- Rivera A. L., Gomez-Lim M., Fernandez F., Loske A. M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* **9**, 308–345.
- Roy S., Liu W., Nandety R. S., Crook A., Mysore K. S., Pislariu C. I., Frugoli J., Dickstein R., Udvardi M. K. (2020): Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* **32**, 15–41.
- Ryu H., Laffont C., Frugier F., Hwang I. (2017): MAP kinase-mediated negative regulation of symbiotic nodule formation in *Medicago truncatula*. *Molecular Cells* **40**, 17–23.
- Samac D. A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In: Wang J, editor. *Methods in molecular biology. Agrobacterium protocols*. Springer, New York, 301–311.
- Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N. (1987): Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* **5**, 27–37.
- Sanford J. C., Smith F. D., Russel J. A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* **217**, 483–509.
- Sangwan V., Dhindsa R. S. (2002): *In vivo* and *in vitro* activation of temperature-responsive plant map kinases. *FEBS Letters* **531**, 561–564.
- Santos A. V. P. dos, Outka D. E., Cocking E. C., Davey M. R. (1980): Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **99**, 261–270.
- Saulis G., Venslauskas M. S., Naktinis J. (1991): Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **26**, 1–13.
- Saunders J. W., Bingham E. T. (1972): Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Science* **12**, 804–808.
- Shahin E. A., Spielmann A., Sukhapinda K., Simpson R. B. (1986): Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Science* **26**, 1235–1239.
- Schweighofer A., Kazanaviciute V., Scheikl E., Teige M., Doczi R., Hirt H., Schwanninger M., Kant M., Schuurink R., Mauch F., Buchala A., Cardinale F., Meskiene I. (2007): The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 2213–2224.
- Smékalová V., Luptovciak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**, 1175–1193.
- Smith F. D., Harpending P. R., Sanford J. C. (1992): Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *Journal of General Microbiology* **138**, 239–248.
- Spörlein B., Koop H-U. (1991): Lipofectin: direct gene transfer to higher plants using cationic liposomes. *Theoretical and Applied Genetics* **83**, 1–5.

- Suzaki T., Yoro E., Kawaguchi M. (2015): Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology* **316**, 111-158.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal* **21**, 3296–3306.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118–128.
- Šantrůček, J. a kol. (2007): *Encyklopedie pčinnářství*. Česká zemědělská univerzita, Praha, ISBN 978-80-213-1650-8, 157 stran.
- Tabe L. M., Wardley-Richardson T., Ceriotti A., Aryan A., McNabb W., Moore A., Higgins T. J. V. (1995): A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. *Journal of Animal Science* **73**, 2752–2759.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 805–818.
- Taylor N. J., Fauquet C. M. (2002): Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* **21**, 963–977.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**, 141–152.
- Teuber L. R., Brick M. A. (1988): Morphology and Anatomy. In: *Alfalfa and Alfalfa improvement*. Vol. 29, (Hanson A. A., Bernes D. K., Hill R. R., eds.), Madison, Wisconsin, USA, 125-162.
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2000, **408**, 796–815
- Tian C. F., Garnerone A. M., Mathieu-Demazière C., Masson-Boivin C., Batut J. (2012): Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti-Medicago* symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **109**, 6751–6756.
- 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**, 1265–1280.
- 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) Springer, Dordrecht, 329–342.
- Udvardi M., Poole P. S. (2013): Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 781–805.
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., de Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Montagu M. V., Leemans J. (1987): Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* **328**, 33–37
- Vain P. (2007): Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 221–229.
- Vasil I. K. (1994): Molecular improvement of cereals. *Plant Molecular Biology* **25** (6), 925–937
- Vega-Mas I., Pérez-Delgado C. M., Marino D., Fuertes-Mendizábal T., González-Murua C., Márquez A. J., Betti M., Estavillo J. M., González-Moro M. B. (2017): Elevated CO₂ Induces Root Defensive Mechanisms in Tomato Plants When Dealing with Ammonium Toxicity. *Plant and Cell Physiology* **58**, 2112–2125.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R. (2007): Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**, 199–223.
- Wang H-H, Yin W-B, Hu Z-M. (2009): Advances in chloroplast engineering. *Journal of Genetics and Genomics* **36**, 387–398.

- Wei Z., Liu Y., Lin C., Wang Y., Cai Q., Dong Y., Xing S. (2011): Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnology Letters* **33**, 2487–2494.
- Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**, 331–338.
- Xing Y., Jia W., Zhang J. (2007): AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2969–2981.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002): Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell* **14**, 165–183.
- Xu J., Zhang S. Q. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**, 56–64.
- Yeh C. M., Chien P. S., Huang H. J. (2007): Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany* **58**, 659–671.
- Yoo S. D., Cho Y. H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* **451**, 789–795.
- Young N. D., Debelle F., Oldroyd G. E., Geurts R., Cannon S., Udvardi M. K., Benedito V. A., Mayer K. F. X., Gouzy J., Schoof H., Peer Y. V., Proost S., Cook D. R., Meyers B. C., Spannagl M., Cheung F., De Mita S., Krishnakumar V., Gundlach H, Zhou S., Mudge J., Bharti A. K., Murray J. D. Naoumkina M., Rosen B., D., Silverstein K. A. T., Tang H., Rombauts S., Zhao P. X., Zhou P., Barbe V., Bardou P., Bechner M., Bellec A., Berger A., Bergés H., Bidwell S., Bisseling T., Choisne N., Couloux A., Denny R., Deshpande S., Dai X., Doyle J. J., Dubez A. M., Farmer A. D., Fouteau S., Franken C., Gibelin C., Gish J., Goldstein S., González A., Green P. J., Hallab A., Hartog M., Hua A., Humphray S. J., Jeong D-H., Jing Y., Jocker A., Kenton S. M., Kim D-J., Klee K., Lai H., Lang C., Lin S., Macmill S. L., Magdelenat G., Matthews L., McCorrison J., Monaghan E., Mun J-H., Najar F. Z., Nicholson C., Noirot C., O’Bleness M., Paule C. R., Poulain J., Prion F., Qin B., Qu C., Retzel E. F., Riddle C., Sallet E., Samain S., Samson N., Sanders I., Saurat O., Scarpelli C., Schiex T., Segurens B., Severin A. J., Sherrier D. J., Shi R., Sims S., Singer S., Sinharoy S., Sterck L., Viollet A., Wang B-B., Wang K., Wang M., Wang X., Warfsmann J., Weissenbach J., White D. D. White J. D., Wiley G., Wincker P., Xing Y., Yang L., Yao Z., Fu Y., Zhai J., Zhou L., Zuber A., Dénarié J., Dixon R., May G. D., Schwartz D., Rogers J., Quetier F., Town C., Roe B. A. (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**, 520–524.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Montagu M. V., Schell J. (1983): Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal* **2**, 2143–2150
- Zaragoza C., Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I. (2004): Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT. *Plant Cell Reports* **22**, 832–838.
- Zeng Q., Sritubtim S., Ellis B. E. (2011): AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signalling and Behavior* **6**, 1436–1439
- Zhang Y., Xiao H. (1998): Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **420**, 1–6.
- Zhou C., Cai Z., Guo Y., Gan S. (2009): An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9- MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology* **150**, 167–177.
- Zhu J.-K. (2001): Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 401–406.
- Zumbrunn G., Schneider M., Rochaix J-D. (1989): A simple particle gun for DNA-mediated cell transformation. *Technique* **1**, 204–216.
- Zupan J., Zambryski P. (1997): The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**, 279–295.

8. SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
2,4,5-T	2,4,5-trichlorfenoxyoctová
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová
ACS	z angl. aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
ANOVA	analýza rozptylu (z angl. Analysis of variance)
ATP	adenosintrifosfát
bp	pár bází (z angl. base pair)
CAT	chloramfenikol acetyltransferáza
CDKs	cyklin-dependentní kinázy
CdCl₂	chlorid kademnatý
CHS	chalkon-syntáza
CLKs	kinázy podobné CDK (z angl. CDK-like kinases)
CPA	kyselina 4-chlorfenoxyoctová
CRISPR/Cas9	z angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9
CTR 1	MAP3 kináza (z angl. Constitutive triple response)
CuCl₂	chlorid měďnatý
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DSBs	zlomy dvouřetězcové DNA (z angl. Double-strand breaks)
EDTA	kyselina 2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diyldinitrilo)tetraoctová
EF-Tu	z angl. elongation factor thermo-unstable
EIN	z angl. ethylene-insensitive
ET	ethylen
ETI	z angl. effector-triggered immunity
ETR1	z angl. ETHYLENE RESPONSE 1
FRK1	z angl. flg22-induced receptor kinase 1
GS	glutaminsyntetáza
GSKs	kinázy glykogen syntázy 3
GTP	guanosintrifosfát
H₂O₂	peroxid vodíku

HAMK	tepelným šokem aktivovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (z angl. heat shock-activated MAPK)
HDR	homologně řízená oprava (z angl. homology directed repair)
HR	hypersenzitivní odpověď
IAA	kyselina indol-3-octová
IT	infekční vlákno
JA	kyselina jasmonová
KIN	kinetin
LB	médium pro kultivaci bakterií (z angl. Lysogeny broth)
LSD	z angl. least significant difference
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L ssp.
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i> Gaether
MAP2K	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAP3K	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAPKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAPKKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MEK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MEKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MilliQ H₂O	purifikovaná voda technologií společnosti Millipore Corporation
MKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MKP	MAPK fosfatasa
MMK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa z <i>Medicago sativa</i>
MPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MS	Murashige and Skoog médium
<i>MtPDS</i>	gen <i>FYTOEN DESATURÁZY</i> u <i>Medicago truncatula</i>
N₂H₂	diimin
N₂H₄	hydrazin
NAA	kyselina alfa-naftalenacetátová
NH₃	amoniak
NH₄⁺	amonný ion

NHEJ	nehomologní spojování konců (z angl. Non-homologous end joining)
NLP	z angl. Nep1-like protein
Nod	faktor nodulace
<i>NPTII</i>	<i>Neomycin fosfotranferasa II</i>
Obr.	obrázek
OD₆₀₀	optická hustota při 600 nm
OMTK1	z angl. oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
PAMP	z angl. pathogen-associated molecular patterns
PIN1	z angl. PINFORMED1
PR	proteiny rezistence (z angl. pathogenesis-related proteins)
PRR	z angl. pattern recognition receptors
PTI	z angl. PAMP-triggered immunity
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SA	kyselina salicylová
SAMK	stresem aktivovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasa
sgRNA	z angl. single guide RNA
SIMK	solným stresem indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasa
SIMKK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasakinas
<i>SPL9</i>	z angl. <i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE-9</i>
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina (z angl. transfer deoxyribonucleic acid)
TALENs	z angl. Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEY	motiv threonin-kyselina glutamová-tyrozin
Ti	tumor indukující (z angl. tumor inducing)

UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
Vir	faktory virulence
WRKY	transkripční faktory (název odvozen od sekvence heptapeptidu WRKYGQK N-terminálního konce TF)
ZFNs	nukleázy zinkového prstu