

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Měření abundance a aktivity MAP kinas v transgenních rostlinách *Medicago sativa***

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Jiří Sojka</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Petra Vyplelová</b>
Termín odevzdání práce:	11. 5. 2018

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

V Olomouci dne

.....

Jiří Sojka

#### Poděkování:

„Rád bych poděkoval v první řadě své vedoucí bakalářské práce Mgr. Petře Vypelové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Chtěl bych poděkovat také prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., Ing. Pavlu Křenkovi, Ph.D. za přípravu primerů, Mgr. Ivanu Luptovčiakovi, Ph.D. a Mgr. Mirce Hrbáčkové za odborné rady v průběhu mé práce. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za přátelské prostředí a ochotu pomoci a poradit.“

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jiří Sojka
Název práce	Měření abundance a aktivity MAP kinas v transgenních rostlinách <i>Medicago sativa</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Petra Vyplelová
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Rostliny jsou neustále vystavovány nepříznivým stimulům z vnějšího prostředí, které negativně ovlivňují jejich růst a vývoj. Jako určitá obrana proti těmto stresovým faktorům jim slouží kaskáda mitogen aktivovaných protein kinas (MAPKs). Poslední členové této dráhy, MAPKs, se podílejí prostřednictvím fosforylace/defosforylace na regulaci těchto rostlinných odpovědí. V této bakalářské práci byla měřena aktivita a abundance dvou vybraných MAPKs v kořenech vojtěšky seté (*Medicago sativa*) – MMK3 a SIMK pomocí metody Western blot. Po propagaci kontrolního i transgenního rostlinného materiálu pomocí somatické embryogeneze, byla skutečnost sníženého množství nadřazené mitogen aktivované protein kinasy (MAPKK) u transgenní linie ověřena metodou kvantitativní PCR. Kořeny *M. sativa* byly vystaveny oxidativnímu stresu a porovnávány s kontrolními podmínkami. Z výsledků je patrné, že dochází ke snížené abundanci SIMK v transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linii oproti kontrolním, což bylo potvrzeno i qPCR. U proteinu MMK3 je třeba dalšího výzkumu. Aktivita těchto MAPKs je kolísavá a dochází k výrazné fosforylaci v mokré kontrole a defosforylaci při oxidativním stresu působícím po dobu 30 minut. V případě MMK3 zřejmě dochází ke vzájemnému ovlivnění množství transkriptu a proteinu v buňkách kořene *M. sativa*.

Klíčová slova	mitogen aktivované protein kinasy, <i>Medicago sativa</i> , somatická embryogeneze, oxidativní stres, Western Blot, qPCR
Počet stran	101
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jiří Sojka
Title	Measurement of an abundance and activity of the MAP kinases in the transgenic plants of <i>Medicago sativa</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Petra Vypelová
The year of presentation	2018

### Abstract

Plants are constantly exposed to adverse environmental stimuli that negatively affect their growth and development. As a defense against these stress factors they use cascade of mitogen-activated protein kinases. The last members of this pathway, MAPKs, which are involved in the regulation of these plant responses by phosphorylation / dephosphorylation. In this bachelor thesis the activity and abundance of two chosen MAPKs from the roots of alfalfa (*Medicago sativa*) – MMK3 and SIMK were measured by Western blot method. After propagation control and transgenic plant material by somatic embryogenesis method, was the fact of reduced quantity of upstream mitogen-activated protein kinases (MAPKK) of the transgenic line was verified by the quantitative PCR method. Roots of the *M. sativa* were exposed to oxidative stress and compared with control conditions. The results show that there is a reduced abundance of SIMK in the transgenic *SIMKK RNAi 2A/2* line over the control, which was confirmed by qPCR. For MMK3, further research is needed. The activity of these MAPKs is fluctuating and there is a markedly large phosphorylation in wet control and dephosphorylation under oxidative stress over a period of 30 minutes. In the case of MMK3, the amount of transcript and protein appears to interact, in the root cells.

Keywords	mitogen-activated protein kinases, <i>Medicago sativa</i> , somatic embryogenesis, oxidative stress, Western Blot, qPCR
Number of pages	101
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Čeleď <i>Fabaceae</i></b> .....	<b>10</b>
2.1.1 Obecná charakteristika čeledi bobovité .....	10
2.1.1 Výskyt a význam bobovitých rostlin.....	11
<b>2.2 Vojtěška setá (<i>Medicago sativa</i> Linnaeus subsp. <i>sativa</i>)</b> .....	<b>12</b>
2.2.1 Obecná charakteristika druhu <i>Medicago sativa</i> .....	12
2.2.2 Parazité a rezistence .....	13
<b>2.3 Mitogen aktivované protein kinasy</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 Rozdělení dle motivů do fylogenetických skupin a tříd .....	14
2.3.1.1 Fylogenetické členění MAPK.....	15
2.3.1.2 Fylogenetické členění MAPKKs .....	15
2.3.1.3 Fylogenetické členění MAPKKKs .....	16
2.3.2 MAPK kaskáda.....	17
2.3.3 MAPKs u <i>Medicago sativa</i> .....	18
<b>2.4 Abiotický stres u rostlin</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5 Somatická embryogeneze</b> .....	<b>22</b>
2.5.1 Pět fází somatické embryogeneze .....	23
2.5.1.1 Iniclace .....	23
2.5.1.2 Proliferace .....	24
2.5.1.3 Fáze před dozráním.....	24
2.5.1.4 Dozrávání .....	24
2.5.1.5 Regenerace v celistvou rostlinu .....	25
2.5.2 Genová regulace somatické embryogeneze .....	25
2.5.2.1 Pozitivní regulátory .....	25
2.5.2.2 Geny negativní regulace.....	26
<b>2.6 Složení médií a funkce sloučenin při somatické embryogenezi</b> .....	<b>28</b>
2.6.1 Makronutrienty .....	29
2.6.1.1 Uhlík .....	29
2.6.1.2 Dusík.....	29
2.6.1.3 Fosfát.....	30
2.6.1.4 Draslík.....	30
2.6.1.5 Sodík.....	31
2.6.1.6 Hořčík .....	31
2.6.1.7 Síra .....	31

2.6.1.8 Vápník .....	32
2.6.1.9 Chlór .....	32
2.6.2 Mikronutrienty.....	33
2.6.2.1 Mangan .....	33
2.6.2.2 Zinek.....	33
2.6.2.3 Bor.....	34
2.6.2.4 Měď.....	34
2.6.2.5 Molybden .....	34
2.6.2.6 Kobalt .....	34
2.6.2.7 Nikl .....	35
2.6.2.8 Křemík .....	35
2.6.3 Chelatační činidla .....	35
2.6.4 Vitamíny .....	35
2.6.5 Ztužující komponenty média.....	36
2.6.5.1 Agar .....	37
2.6.5.2 Agarosa .....	37
2.6.5.3 Gellan gum .....	37
2.6.6 Růstové regulátory a rostlinné hormony .....	37
<b>2.7 Western blot.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8 Kvantitativní PCR.....</b>	<b>41</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Materiál .....</b>	<b>42</b>
3.1.1 Chemikálie.....	42
3.1.2 Přístroje a zařízení.....	44
3.1.3 Roztoky a média.....	45
3.1.4 Rostlinný materiál .....	52
<b>3.2 Metody.....</b>	<b>52</b>
3.2.1 Průběh somatické embryogeneze .....	52
3.2.1.1 Sterilizace rostlinného materiálu <i>Medicago sativa</i> z <i>in vitro</i> podmínek kultivace .....	53
3.2.1.2 Sterilizace rostlinného materiálu <i>Medicago sativa</i> z <i>in vivo</i> podmínek kultivace .....	53
3.2.1.3 Kultivace <i>M. sativa</i> na B5H médiu .....	53
3.2.1.4 Kultivace <i>M. sativa</i> na B50 médiu.....	54
3.2.1.5 Kultivace <i>M. sativa</i> na MMS médiu .....	54
3.2.1.6 Kultivace <i>M. sativa</i> na MS médiu.....	54
3.2.2 Western blot analýza .....	54

3.2.2.1 Oxidativní stres .....	54
3.2.2.2 Extrakce proteinů z kontrolních i transgenních kořenů <i>M. sativa</i> .....	55
3.2.2.3 Stanovení koncentrace vyizolovaných proteinů .....	55
3.2.2.4 SDS elektroforéza .....	56
3.2.2.5 Western blot .....	56
3.2.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce .....	58
3.2.3.1 Rostlinný materiál a příprava vzorku .....	58
3.2.3.2 Měření koncentrace .....	59
3.2.3.3 Izolace nukleových kyselin .....	59
3.2.3.4 Přepis vzorku mRNA do cDNA .....	61
3.2.3.5 Semikvantitativní PCR .....	61
3.2.3.5 Kvantitativní PCR .....	63
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>65</b>
4.1 Somatická embryogeneze .....	65
4.2 Western blot analýza .....	68
4.2.1 Abundance SIMK v kořenech <i>M. sativa</i> .....	68
4.2.2 Abundance MMK3 v kořenech <i>M. sativa</i> .....	72
4.2.3 Aktivita MMK3 a SIMK v kořenech <i>M. sativa</i> .....	75
4.2.3.1 Aktivita SIMK v kořenech <i>M. sativa</i> .....	76
4.2.3.2 Aktivita MMK3 v kořenech <i>M. sativa</i> .....	79
4.3 Kvantitativní PCR reakce .....	81
<b>5 ZÁVĚR .....</b>	<b>85</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>87</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>99</b>



# CÍLE PRÁCE

## Teoretická část:

1. Souhrn poznatků o základní charakteristice čeledi *Fabaceae* a druhu *Medicago sativa*
2. Zpracování kapitoly pojednávající o kaskádě mitogen aktivovaných protein kinas (MAPKs) u rostlin se zaměřením na doposud popsané MAPKs u *Medicago sativa*
3. Vypracování literární rešerše na téma získání geneticky identického materiálu pomocí somatické embryogeneze u rostliny *Medicago sativa*.

## Praktická část:

1. Příprava kontrolního i transgenního rostlinného materiálu *Medicago sativa* pomocí somatické embryogeneze.
2. Měření abundance a aktivity vybraných MAPKs v kořeni *M. sativa* v kontrolních a stresových podmínkách pomocí metody Western blot a jejich porovnání mezi kontrolními a transgenními liniemi
3. Stanovení relativní exprese genů *SIMKK* a *SIMK* u *M. sativa* v kontrolních i stresových podmínkách pomocí metody qPCR a její srovnání mezi kontrolními a transgenními liniemi

## 1 ÚVOD

V souvislosti s měnícími se enviromentálními podmínkami si rostliny vyvinuly řadu signálních a obranných mechanismů. Pro rostliny, jakožto přisedlé organismy neschopné pohybu, jsou tyto mechanismy nesmírně důležité pro přežití. K takovýmto mechanismům patří i mitogen aktivované protein kinasové (MAPKs) signální dráhy. Jsou hierarchicky seřazeny do kaskády a fungují na základě po sobě jdoucích fosforylacích. Receptory lokalizované na plazmatické membráně přijímají a přenášejí vjemy z extracelulárního do intracelulárního prostředí buňky. Výsledkem je duální fosforylace specifických residuí threonin/tyrosinových T-X-Y motivů a aktivace v kaskádě nejnižše umístěných MAPKs, které ovlivňují široké spektrum buněčných pochodů (Pearson *et al.*, 2001). Podílejí se zejména na regulaci exprese genů, mitóze, buněčné diferenciaci a proliferaci a programované buněčné smrti. Neméně důležitá je jejich úloha v odpovědích rostlin na hormony nebo stresové faktory z vnějšího prostředí (např. oxidativní stres, zasolení, sucho, infekce patogenem).

K propagaci rostlinného materiálu je vhodná metoda somatické embryogeneze. Některé dospělé somatické buňky mohou dediferencovat vlivem různých faktorů např. působením stresu nebo koncentrací rostlinných růstových hormonů (Féher, 2014). Tělní buňky, které se normálně neúčastní rozmnožování, se stanou základem pro celou novou rostlinu. Této vlastnosti se říká totipotence a definoval ji již v roce 1902 rakouský vědec Gottlieb Haberlandt. Metoda somatické embryogeneze se díky své jednoduchosti a finanční nenáročnosti stala nezbytnou pro laboratoře a firmy zabývající se rostlinnou výrobou, či výzkumem.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Čeleď *Fabaceae*

#### 2.1.1 Obecná charakteristika čeledi bobovité

Bobovité rostliny jsou z pravidla dvouděložné. Čeleď *Fabaceae* je třetí největší, co se počtu druhů a rodů týče. Čítá celkově 480-500 rodů a více jak 12 000 druhů. Patří do ní jedny z nejvýznamnějších hospodářských plodin jako např. sója luštinatá (*Glycine max*), hrách setý (*Pisum sativum*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), či vojtěška setá (*Medicago sativa*) (Slavík, 2000).

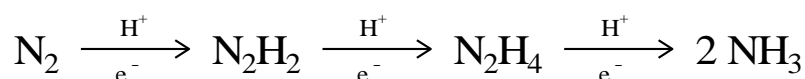
Významnou vlastností bobovitých rostlin (*Fabaceae*) je nepřímá schopnost fixovat vzdušný dusík. Jsou tak velkou mírou zapojeny do koloběhu dusíku v přírodě. Fixovat vzdušný dusík jsou schopné díky symbiotickým půdním bakteriím. Ty žijí uvnitř kořenového systému těchto rostlin, v orgánech zvaných hlízkky (Ogden *et al.* 2017). Bakterie se nazývají z tohoto důvodu hlízkovité. Nejčastěji patří do rodu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (Trujillo *et al.*, 2017). Bakterie z těchto rodů jsou schopny vázat dusík pouze za pomoci kořenového systému rostliny (Vincent, 1974). Jedná se o vztah mutualistický, kdy mají prospěch obě strany. Rostlina dodává bakteriím vysokoenergetické dikarboxylové kyseliny, např. kyselinu jablečnou, sukcinát (Prell a Poole, 2006), fosfát a vodu. S využitím těchto látek jsou bakterie schopny fixovat vzdušný dusík do formy amonného kationtu (NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, který pak druhotně využívá rostlina.

Rostlinná buňka je schopna rozeznat symbiotickou bakterii od bakterie patogenní. Symbiotická bakterie vylučuje tzv. nodulační faktor (Nod faktor), který je z chemického hlediska lipochitooligosacharid. Indukuje zatočení buňky kořenového vlásku, a tak usnadňuje průnik i výměnu živin (Gough a Cullimore, 2011). Faktor je rozpoznán rostlinným Nod faktor receptorem (NF receptor), který je složen ze dvou až tří lysinových motivů. Receptor se nachází na vnější straně plasmatické membrány rostlinné buňky (Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003).

Do procesu vniku bakterií, ale i vláknitých hub do rostlin je zapojena i SYMRK (SYMBiosis Receptor-like Kinase), poprvé objevená u vojtěšky seté (*M. sativa*) (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002).

Po internalizaci bakterií se vytvoří v rostlině infekční vlákno (Napoli a Hubbell, 1975). Rostlina následně přizpůsobí cytoskelet a rozmístění buněčných organel pro nejvýhodnější výměnu látek (Timmers *et al.*, 1998). Rostlina též v hlízkách vytváří organele podobnou strukturu nazývanou symbiosom. Jedná se o seskupení bakteroidu, peribakteroidního prostoru a rostlinné membrány (Kereszt *et al.*, 2011).

Fixace dusíku probíhá ve třech krocích za spotřeby velkého množství ATP. Nejdůležitějším enzymem těchto reakcí je nitrogenasa. Ta se skládá ze dvou částí, tj. Mo-Fe protein neboli nitrogenasa a Fe protein neboli nitrogenasa reduktasa (Hageman a Bums, 1978). Vzdušný dusík je hlízkovitými bakteriemi vázán ve formě N<sub>2</sub>. V prvním kroku je N<sub>2</sub> redukován na diimin (N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), následně další redukcí je přeměněn na hydrazin (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) a nakonec na dvě molekuly amoniaku (2 NH<sub>3</sub>) popřípadě na amonné ionty (2 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Udvardi a Poole, 2013) dle rovnice:



Amoniak je ve vyšších koncentracích pro rostlinu toxický, proto je zabudován u bobovitých rostlin do nově vznikajících aminokyselin, nejčastěji do glutaminu (González-Moro *et al.*, 2017).

### 2.1.1 Výskyt a význam bobovitých rostlin

Čeď bobovité (*Facaceae*) patří mezi endemickou skupinu rostlin a je rozšířena téměř po celém světě, vyjma polárních oblastí. V teplých podnebných pásech se můžeme setkat i s dřevinami této čeledi. V mírném a subtropickém pásu se setkáváme s častým polním pěstováním. V ČR rostou většinou bylinné druhy (Slavík, 2000).

Rostliny z čeledi *Fabaceae* nacházejí rozmanité pole aplikací a využití. Zahrnuje spoustu významných plodin jako je sója luštinatá (*Glycine max*), hrách setý (*Pisum sativum*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*) a vojtěška setá (*M. sativa*). Nejdůležitější využití je právě v potravinářství. Sója je součástí mnoha potravin a používá se pro svůj vysoký obsah bílkovin jako náhražka živočišného masa.

Jako výživný zdroj dusíkatých látek slouží i hrách a fazol. Pokud nejsou některé bobovité rostliny konzumovány přímo, využívají se jako součást krmných směsí pro jatečný dobytek. Příkladem této plodiny je vojtěška setá (*M. sativa*), která se z tohoto důvodu stala cílem výzkumu. Za zmínku stojí různé druhy orchidejí (*Orchidaceae*), které jsou častou domácí dekorací. Bobovité rostliny nalézají využití v okrasných parcích a to např. čimlíček (*Chamaecytisus elongatus*), štědřenec odvislý (*Laburnum amagyroides*) známý spíše pod lidovým označením „zlatý déšť“. Některé látky získané z bobovitých rostlin se často využívají ve farmacii. Dále se také využívají ke zúrodnování písčítých polí pro pastvu dobytka. K tomuto účelu slouží mimo jiné i janovec metlatý (*Sarothamnus scoparius*), což je malý, žlutě kvetoucí jedovatý keř (Slavík, 2000).

## **2.2 Vojtěška setá (*Medicago sativa* Linnaeus subsp. *sativa*)**

### **2.2.1 Obecná charakteristika druhu *Medicago sativa***

Jedná se o vytrvalou bylinu patřící do čeledi *Fabaceae*, rodu *Medicago*. Vyznačuje se svým velmi rozvinutým, mohutně se větvícím kořenovým systémem. Jeden kořen hlavní, který může být dlouhý až několik metrů, se rozvětňuje v kořeny boční a kořenové vlášení. Lodyha má tupé hrany a výšku od 30 cm do 100 cm. V závislosti na místě růstu můžeme na lodyze výjimečně pozorovat i řídké ochlupení. Listy jsou řapíkaté, trojčetné a obvejčitého tvaru, na délku 1-3 cm a na šířku 0,5-1 cm (Valíček, 2002). V horní části jsou pilovité. Někdy se mohou vyskytovat i malé vejčité kopinaté, v horní části drobně zubaté palisty. Květenství u vojtěšky seté je 3 cm dlouhé. Na jedné rostlině se může nacházet až 30 květů eliptického tvaru, složených z kalichu a koruny. Kališní lístky jsou povětšinou lysé s úzkými cípy. Lístky koruny jsou zbarvené od bílé barvy, přes bleděmodrou až k modrofialové. Pavéza má obvejčitý tvar. Plodenství luskovitěho tvaru, které neopadá, je spirálovitě stočené a nepuká. Semena žlutohnědé barvy jsou srdcovitého tvaru a elipsoidně nesouměrná (Slavík, 2000).

Vojtěška setá se v ČR vyskytuje na výhřevných, sušších stanovištích kolem s provzdušněnou na živiny bohatou půdou. Roste v nižších polohách, ale byla nalezena i v nadmořské výšce 810 metrů v Peci pod Sněžkou. Můžeme ji nalézt i okolo silničních komunikací a v blízkosti železničních drah (Slavík, 2000).

Vojtěška setá (*M. sativa*) pochází z oblasti Malé Asie a Zakavkazí. Odtud se rozšířila do Evropy, Střední Asie a Severní a Jižní Ameriky.

Díky jejím vlastnostem se stala jednou z nejvýznamnější pěstovaných píce s celkovou pěstební plochou přes 30 milionů hektarů. Více než 30 % celkové pěstební plochy je v Severní Americe. V subtropickém pásu může být sklizeno až dvanáct úrod, což je zhruba 80-120 tun zelené hmoty na hektar. Má velký význam v krmení dobytka, jelikož patří mezi výborné zdroje bílkovin, a to i díky symbiotickému vztahu s hlízkovými bakteriemi. Může vázat až 300 kg dusíku/ha. Další z výhod je, že poskytuje více sklizní do roka. Je odolná vůči stresu z nedostatku vody a nízkých teplot a dá se tak pěstovat skoro po celém světě vyjma arktických a subarktických oblastí (Valíček, 2002).

### 2.2.2 Parazité a rezistence

Ke hmyzím parazitům škodícím v porostech vojtěšky seté (*M. sativa*) patří zejména plodomorka vojtěšková (*Contarinia medicaginis*). Tento parazit poškozují květní pupeny rostliny a ty následně nejsou schopny produkce semen. Plodomorka vojtěšková tak dokáže znehodnotit místy až 85 % úrody (Kolomoets a Turaev, 1977). Dalším z hmyzích škůdců je klopuška (*Adelphocoris lineolatus*), jejíž larvy se živí listy vojtěšky (Loan, 1980). Vůči těmto hmyzím škůdcům prozatím není rezistentní druh vojtěšky vypěstován. Mezi houbové patogeny je řazeno verticiliové cévní vadnutí (*Verticillium albo-atrum*) patřící do kmene *Deuteromycota*. Hlavními hostiteli je vojtěška, bavlník a chmel. Příznaky napadení tímto škůdcem jsou žloutnutí a opad listů. Nákaza se šíří přes vodivá pletiva a může vést až k zahubení hostitele (Kreitlow, 1962). Z virových onemocnění je znám AMV (Alfalfa Mosaic Virus), což je bacilliformní virus přenášený mšicí zelenou (*Myzus persicae*). Příznaky napadení rostliny tímto virem jsou jasně žluté velké skvrny na listech, ztráta pigmentace listu a nekróza. Pokud je napadeno pár mladých listů, lze stříhem zamezit šíření viru (Xu a Nie, 2006).

Některé patogeny mohou způsobit vysokou ztrátu na výnosech, a proto probíhá šlechtění na získání rezistence vůči nim.

## 2.3 Mitogen aktivované protein kinasy

Mitogen-Aktivované Protein Kinasy (MAPKs) jsou třída enzymů, uplatňující se především v přenosu externího signálu v eukaryotické buňce. To je důležité zejména pro správnou reakci organismů na signály z vnějšího prostředí. MAPKs kaskády jsou stimulovány především hormony, mitogeny a rozličnými látkami způsobující různé typy stresu (Kiegerl *et al.*, 2000). Biotický stres je způsoben např. napadením rostliny hmyzem, bakterií, houbou, či jiným živým organismem. Abiotický stres je způsoben fyzikálními faktory, jako je sucho, nedostatek světla, nebo vyšší obsah soli v půdě (Jonak *et al.*, 1996). Tyto signální dráhy jsou důležité jak v živočišné, tak i v rostlinné říši. Typy MAPKs se liší, ale princip zůstává zachován. V rostlinné říši byly MAPKs nejvíce prozkoumány u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Doposud bylo popsáno 20 MAPKs, 10 MAPKKs (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase) a 60 MAPKKKs (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase) (MAPK Group, 2002).

### 2.3.1 Rozdělení dle motivů do fylogenetických skupin a tříd

V říši rostlin se vyskytují nejčastěji dva typy fosforylačních motivů. Dle toho, jaký se vyskytuje motiv, jsou MAPKs rozděleny do jednotlivých skupin a podskupin. Existují čtyři základní fylogenetické skupiny, A, B, C, D a mnoho podskupin označených čísly. První tři skupiny A, B, C společně sdílí T-E-Y motiv. To znamená, že daná MAPK může být fosforylována na threoninu (T), glutamátu (E) a tyrosinu (Y). Ve čtvrté skupině D se u MAPKs opakuje T-D-Y motiv. T-D-Y motiv znamená, že je MAPKs fosforylována na threoninu (T), kyselině aspartátové (D) a tyrosinu (Y). Ve fylogenetickém členění jsou uvedeny MAPKs z různých druhů rostlin, které jsou si podobné v sekvenci aminokyselin a umístění již zmíněného motivu fosforylace (Ichamura *et al.*, 2002). Přesný popis motivu a krystalická struktura místa fosforylace byla popsána i na atomární úrovni (Zhang *et al.*, 1994).

### 2.3.1.1 Fylogenetické členění MAPK

Do skupiny MAPKs s T-E-Y motivem fosforylace patří ty z huseníčku, hrachu, vojtěšky i tabáku. Jako příklady těchto MAPKs lze uvést MsSAMK (M. sativa Stress-Activated MAPK) z vojtěšky seté (*M. sativa*), která spadá z fylogenetického hlediska do A1 podskupiny. MsSIMK (Stress-Induced MAP Kinase) patří do A2 podskupiny společně s PsD5 z hrachu setého (*Pisum sativum*). PsD5 je serin/threoninová protein MAPK uplatňující se v buněčném cyklu (Stafstrom *et al.*, 1993).

MsMMK2 a AtMPK5 z huseníčku rolního (*A. thaliana*) patří do skupiny B. AtMPK5 aktivuje WRKY62 regulující expresi genů při signalizaci kyseliny jasmonové (Mao *et al.*, 2007; Popescu *et al.*, 2009). Dále MsMMK3 z vojtěšky seté (*M. sativa*), AtMPK13 z huseníčku rolního (*A. thaliana*) a NtNTF6 z tabáku virginského (*N. tabacum*) patří do B2 skupiny (Ichimura *et al.*, 2002). Všechny tři byly lokalizovány v oblasti fragmoplastu při telofázi buněčného dělení (Calderini *et al.*, 1998; Bögre *et al.*, 1999).

Z D2 skupiny MAPKs je nutné zmínit MsTDY1 (Ichimura *et al.*, 2002). Jako další může být uvedena BWMK1 (Blast-and Wound-induced MAP Kinase 1) z rýže seté (*Oryza sativa*). Ta je aktivována vnikem patogenu (Cheong *et al.*, 2003; He *et al.*, 1999).

### 2.3.1.2 Fylogenetické členění MAPKKs

MAPKKs se stejně tak jako MAPKs dělí do čtyř základních skupin A, B, C a D. Do A skupiny patří MKK1, MKK2 a MKK6 z huseníčku rolního (*A. thaliana*). *In vitro* kinasové testy naznačují, že MKK1 a MKK2 aktivují MPK4 (Huang *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2002). MMK6 je poté homologní k NtMEK1 z tabáku virginského (*N. tabacum*) zapojené do buněčného dělení a aktivace NtNTF6 (Calderini *et al.*, 2001). Ve vojtěšce seté (*M. sativa*) je poté známá PRKK (Pathogen-Responsive MAPKK) aktivující v kaskádě podřazenou MAPK při stresu způsobeným patogenem (Cardinale *et al.*, 2002).

Do B skupiny MAPKKs jsou řazeny např. MKK3 z huseníčku (*A. thaliana*) a NPK2 z tabáku (*N. tabacum*). Ve své struktuře obsahují dvě specifické domény na C a N konci. Doména NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) na C konci zabezpečuje import RAN-GDP do jádra (Tanoue *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2002).



Na C konci se vyskytuje i katalytické místo. Vazebné místo pro kinasu se nachází na N konci (Dickinson a Keyse, 2006; Kondoh a Nishida, 2007).

SIMKK z vojtěšky seté (*M. sativa*) patří do C skupiny MAPKKs specificky aktivuje SIMK v kaskádě. K aktivaci dochází při zaznamenání elicitorů nebo solného stresu (Cardinale *et al.*, 2002). Z huseníčku rolního (*A. thaliana*) sem patří MKK4 a MKK5 a jejich ortolog z tabáku (*N. tabacum*) NtMEK2 (Ichimura *et al.*, 2002).

O MAPKKs ze skupiny D toho zatím moc zjištěno nebylo. Dle fylogenetického členění spadají do této kategorie MAPKKs z huseníčku rolního (*A. thaliana*) MKK7, MKK8, MKK9 a MKK10 (Ichimura *et al.*, 2002). Protein MKK7 je začleněn do polárního transportu auxinu v rostlině. Nadměrná exprese genu *MKK7* pod 35S promotorem vedla k abnormální stavbě těla rostliny (Dai *et al.*, 2006).

### 2.3.1.3 Fylogenetické členění MAPKKKs

MAPKKKs jsou z hlediska fylogenetického členění nejvíce rozšířenou a větvenou skupinou. Zde existují tři skupiny s mnoha podskupinami označenými písmeny A, B, C a číslicí. Příklad ze skupiny A je AtMEKK1 z huseníčku rolního (*A. thaliana*), která je nadřazená MAPKKs MPK4, MKK1 a MKK2 (Ichimura *et al.*, 1998; Mizoguchi *et al.*, 1998). AtMEKK1 je aktivována při vystavení rostliny suchu, soli, a dokonce i při doteku (Mizoguchi *et al.*, 1996). Z tabáku (*N. tabacum*) poté NtNPK1 náleží do A3 podskupiny. Podílí se na buněčném dělení a vrozené imunitě (Nishihama *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2002). MsOMTK1 je poté zástupce MAPKKKs z vojtěšky seté (*M. sativa*) náležící do A1 podskupiny.

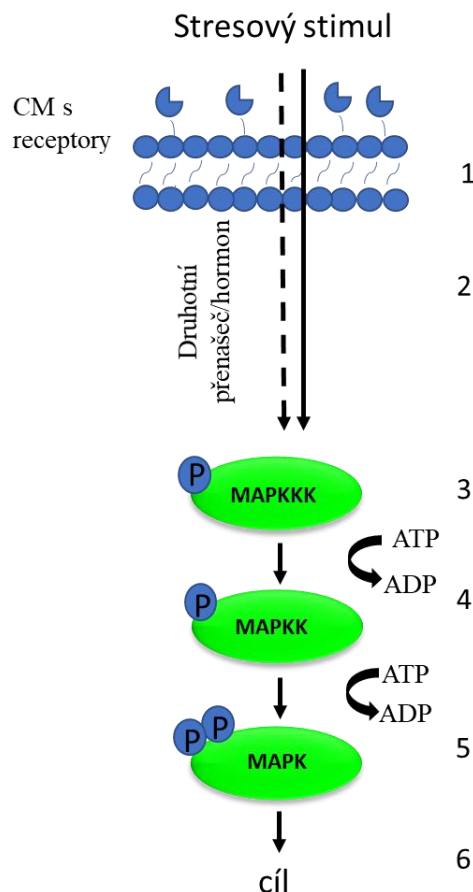
Ve skupině B jsou MAPKKKs z huseníčku rolního (*A. thaliana*) AtCTR1 a AtEDR1 a jejich analogy LeCTR1 z rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) a OsEDR1 z rýže seté (*Oryza sativa*). AtCTR1 je součástí ethylenové signální dráhy (Huang *et al.*, 2003). AtEDR1 zajišťuje obranu před napadením houbovým patogenem (Tang a Innes, 2002). Podobné funkce mají i jejich analogy z jiných druhů rostlin (Leclercq *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

Ze skupiny C pak jen jmenovitě AtMRK1 a ATN1 z huseníčku rolního (*A. thaliana*), GmPK6 ze sóji luštinaté (*Glycine max*) a jí podobné FsPK1 a FsPKF1 z buku lesního (*Fagus sylvatica*) (Ichimura *et al.*, 2002).

### 2.3.2 MAPK kaskáda

V eukaryotických buňkách se vyvinul postupem času velmi sofistikovaný princip přenosu signálu z vnějšího prostředí přes buněčné obaly až do vnitřního prostoru buňky. Tyto kaskády vznikly, aby mohly buňky flexibilně reagovat na změny způsobené různými druhy stresů či látkami v jejich okolí. Jedná se o chytré uskupení vypínačů, které se vzájemně ovlivňují na základě fosforylace/defosforylace konzervovaných threonin/tyrosinových či serin/threoninových domén (Kiegerl *et al.*, 2000).

MAPK kaskáda je složena z několika komponent. Na buněčné stěně a cytoplazmatické membráně rostlinných buněk jsou receptory pro příjem signálů z vnějšího prostředí. Receptory zachytí stimul způsobený stresem a aktivují tak vnitrobuněčnou signální kaskádu (Obr. 1). Po percepci signálu z vnějšího prostředí dovnitř buňky je pomocí druhotných přenašečů (např. ethylen či  $H_2O_2$ ) aktivována MAPKKK za přeměny ATP na ADP. Ta následně aktivuje fosforylací podřazenou MAPKK. Ta má duální specifitu a aktivuje podřazenou MAPK dvojitou fosforylací, opět za přeměny ATP na ADP (Ichimura *et al.*, 2002). MAPK následně ovlivňuje buněčné pochody např. syntézu hormonů (Mizoguchi *et al.*, 1994), jinou odpověď na stres, regulaci vývoje rostliny (Wilson *et al.*, 1997) nebo buněčný cyklus rostlinné buňky (Banno *et al.*, 1993; Calderini *et al.*, 1998).



Obr. 1 MAPKs kaskáda (Jiří Sojka, 2018) 1. příjem stresového stimulu z vnějšího prostředí pomocí receptorů na cytoplazmatické membráně (CM) 2. přenos signálu pomocí druhotných přenašečů nebo hormonů 3. aktivace MAPKKK fosforylací 4. aktivace MAPKK fosforylací 5. aktivace MAPK dvojitou fosforylací a 6. přenos stimulu a ovlivnění buněčných pochodů v důsledku odpovědi na stimul.

### 2.3.3 MAPKs u *Medicago sativa*

Stejně tak jako u ostatních rostlin, tak i u vojtěšky seté (*M. sativa*), se vyskytují v buňkách různé MAPKs. O MAPKs ve vojtěšce toho doposud moc publikováno nebylo. Princip přenosu signálu je stejný, jako je tomu u obecného schématu (Obr 1). Jsou zde zastoupeny jak MAPKKKs, tak i MAPKKs a MAPKs. Molekulové hmotnosti MAPKs u vojtěšky se pohybují mezi 44-46 kDa.

Jedna z prvních objevených a prozkoumaných MAPKs je SIMK (Stress-Induced MAP Kinase). Je exprimována především v kořenové části rostliny. Jak z názvu vypovídá, je aktivována stresem. Stejně jako její aktivátor SIMKK, je i SIMK indukována osmotickým stresem a vnikem houbových patogenních organismů (Cardinale *et al.*, 2000) Nejvíce však byla v této oblasti prozkoumána aktivace solným stresem, i proto se dříve označovala jako takzvaná Salt stress-Induced MAPK. Nyní je známo, že indukce této dráhy je způsobena i jinými typy stresu, např. oxidativním, stresem těžkými kovy, nebo ethylenem (Jonak *et al.*, 2004; Ouaked *et al.*, 2003). Ví se také, že se SIMK uplatňuje při vrcholovém růstu kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002). Jako další zástupce MAPKs u vojtěšky seté lze uvést SAMK (Stress-activated MAPK), MMK2 (Medicago MAPK 2) a MMK3 (Medicago MAPK 3). Poslední tři zmíněné MAPKs zprostředkovávají signalizaci po stresu těžkými kovy, především kadmia a mědi, dále oxidativním stresem a elicitory (Jonak *et al.*, 2004; Nakagami *et al.*, 2005). U MMK2 a MMK3 jsou nadřazené aktivační MAPKS neznámé, kdežto u SIMK a SAMK víme, že jsou aktivovány nadřazenou SIMKK (Nakagami *et al.*, 2005).

Mezi MAPKKs se řadí např. SIMKK (Stress-Induced MAP Kinase Kinase). Je zapojená do signalizačních drah shodných se SIMK (Jonak *et al.*, 2004; Ouaked *et al.*, 2003). Další známá PRKK (Pathogen-Responsive MAPKK) se podílí na odpovědi rostliny po napadení houbou, které vede k produkci elicitorů. PRKK následně aktivuje SIMK, MMK3 a SAMK (Cardinale *et al.*, 2002).

Mezi známé MAPKKK u *M. sativa* patří OMTK1. Reguluje odpověď rostliny po působení oxidativního stresu a podílí se na hypersensitivní odpovědi a programované buněčné smrti (Nakagami *et al.*, 2004).

## 2.4 Abiotický stres u rostlin

Abiotickým stresem se rozumí stres způsobený fyzikálními i chemickými vlivy. Může být způsobený např. zvýšeným obsahem soli v půdě, suchem, chladem, či nadměrnou tvorbou kyslíkových radikálů, jako je peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) (Mittler a Blumwald, 2010; Hu a Xiong, 2014). V důsledku působení stresových podmínek se buňky rostlin mezi sebou snaží komunikovat a bránit. V tomto mechanismu signalizace je zapojena mimo jiné i výše zmíněná MAPKs kaskáda. V rostlinách jsou i jiné mechanismy signalizace abiotického stresu, např. přes kyselinu abscisovou (ABA) (Cramer *et al.*, 2011).

Jedním z nejčastějších typů abiotického stresu je oxidativní. Působením kyslíkových radikálů mohou být poškozeny struktury buňky, jako jsou deoxyribonukleové kyseliny, ribonukleové kyseliny, proteiny, lipidy a karbohydráty (Gill a Tuteja, 2010). Většina volných radikálů v rostlinné buňce vzniká v chloroplastech ve fotosystému I a II. Volné radikály se však vytváří i v mitochondrii v elektronovém transportním řetězci. K minimalizaci poškození z tohoto v rostlině přirozeně se vyskytujícího stresu, produkuje rostlina enzymy, které tyto toxické kyslíkové radikály mění na netoxické a nebezpečné. Takovýmto enzymem jsou např. superoxid dismutasa, katalasa, glutathion peroxidasa a další (Dietz *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2012). V obraně proti působení oxidativního stresu jsou zapojeny např. u rýže i ZFP36 (Zinc-Finger Proteins 36), které jsou aktivovány pomocí kyseliny abscisové indukované prostřednictvím OsMPKs. Následně jsou více exprimovány jak enzym NADPH oxidasa, tak i MAPKs geny. Hlavním mediátorem komunikace mezi MAPKs, NADPH oxidasou a  $H_2O_2$  je ZFP36 (Zhang *et al.*, 2014). Studiemi na huseníčku rolním (*A. thaliana*) bylo zjištěno, že MAPKs kaskády hrají stěžejní roli při signalizaci kyslíkových radikálů (Kovtun *et al.*, 2000). Toto zjištění bylo potvrzeno i na bavlníku bylinném (*Gossypium herbaceum*), kde vyšší exprese *GhMCK1*, vedla k signifikantně vyšší schopnosti rostliny tvořit antioxidanty, zachytávat a detoxikovat kyslíkové radikály vznikající při stresu ze sucha a soli (Lu *et al.*, 2013). Naproti tomu vyšší exprese *GhMCK5* vedla u rostliny tabáku (*Nicotiana benthamiana*) k hypersenzitivitě a časté programované buněčné smrti (Zhang *et al.*, 2012b). Negativní regulaci při působení abiotického i biotického stresu u bavlníku můžeme sledovat v případě *GhMPK6a* (Li *et al.*, 2013).

Reaktivní formy kyslíku se podílí na signalizaci biotického stresu. Napadení rostliny určitým býložravým hmyzem indukuje v buňkách vyšší tvorbu kyslíkových radikálů, které vede k aktivaci MAPKs kaskád a k příslušné odpovědi rostlinné buňky (Yu *et al.*, 2014). U huseníčka rolního (*A. thaliana*) je známo několik MAPKs proteinů, např. MPK3 a MPK6, které se podílí na odpovědi rostlin při působení abiotického i biotického stresu. Pro potvrzení této skutečnosti byli připraveni mutanti *mpk3* a *mpk6* (Beckers *et al.*, 2009).

## 2.5 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je jedna z metod sloužící k propagaci velkého množství rostlinného materiálu. Základ pletivových kultur položil rakouský vědec Gottlieb Haberlandt již v roce 1902, kdy vyslovil teorii totipotence rostlinné buňky. Totipotencí rostlinné buňky rozumíme schopnost rostlin vytvořit kompletního nového jedince z jediné somatické buňky. K pokroku propagačních technik pletivových kultur došlo především v rozmezí let 1940 až 1960. Od roku 1990 byl zaznamenán velký vzestup těchto technik v praxi. To šlo ruku v ruce se vznikem nových kulturních plodin. Somatická embryogeneze se uplatňuje v laboratořích i ve firmách zabývajících se výzkumem nebo produkcí rostlin. Výhodou metody je fakt, že z malého počátečního množství rostlinného materiálu je možné vyprodukovat velké množství rostlin nových, a to za relativně nízkých nákladů. Rostliny vzniklé *in vitro* jsou bez virů a jiných patogenů. Nově vygenerované rostliny by také měly být, až na některé výjimky identické. Jednou z nevýhod je náročnost protokolů a také to, že pro každou rostlinu je postup přípravy somatickou embryogenezí odlišný. Hlavními oblastmi využití je produkce *in vitro* rostlin bez patogenů, uchování genetických zdrojů, klonální propagace, produkce rostlinných sekundárních metabolitů a vývoj nových plodin (Thorpe, 1990).

Některé somatické buňky tvořící již diferencovaná pletiva a orgány v rostlině, které se nepodílí na rozmnožování, mohou podléhat změně programu růstu zapříčiněné různými faktory, jako jsou rozličné typy abiotických stresů (Féher, 2014). V případě mrkve obecné (*Daucus carota*) bylo zjištěno, že somatická embryogeneze může být iniciována vyšší koncentrací soli v médiu, osmotickým stresem, vysokou teplotou a těžkými kovy (Kiyosue *et al.*, 1989, 1990; Kamada *et al.*, 1989, 1993, 1994). To bylo potvrzeno i u huseníčku rolního (*A. thaliana*), jakož to modelové dvouděložné rostlině (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003).

Většina rostlin, vojtěšky seté (*M. sativa*) nevyjímaje, potřebuje pro indukci embryogeneze obsah auxinu v médiu a následný přesun na médium s malým, či žádným obsahem tohoto růstového hormonu (Lu *et al.*, 1983; Ikeda-Iwai *et al.*, 2002; Wernicke a Brettell, 1980).

Existují dva typy somatické embryogeneze, přímá a nepřímá (Sharp *et al.*, 1980). Při nepřímé somatické embryogenezi prochází rostlinný explantát z donorové rostliny nejprve dediferenciací.

Tvoří se kalus a poté znovu ustanovením tvaru a vzoru při tvorbě somatického embrya. Při přímé embryogenezi dochází k tvorbě embryí bez stádia kalusu (Williams a Maheswaran, 1986). Somatické embryo je bipolární struktura, které je složeno z apikálních, proliferujících buněk na jedné straně a neproliferujících buněk s velkými vakuolami na straně druhé. Z bazálních buněk s vakuolami se následně vytváří suspensor, který můžeme pozorovat již v proembryogenním stádiu (Filonova *et al.*, 2000).

## 2.5.1 Pět fází somatické embryogeneze

### 2.5.1.1 Iniclace

Iniclace embryogenních kultur z primárních explantátů probíhá na médiu s obsahem rostlinných růstových regulátorů, jako je auxin a cytokinin. Somatické buňky pletiv obsahují genetickou informaci nutnou pro vytvoření celistvé rostliny. V iniciační fázi je důležité změnit genovou expresi vedoucí k exprimování embryogenních genů. Na tento proces má vliv auxin. Auxin podporuje prodlužovací růst buněk, v médiu slouží především k indukci kořenové části rostliny. Pomáhá methylovat DNA a způsobuje zmírnění exprese genů v diferenciovaných buňkách (Lo Schiavo *et al.*, 1989). Další z možností je použití kombinace růstových regulátorů a různých stresových podmínek, které vedou k reprogramování genové exprese a indukci buněčného dělení. Tímto způsobem vzniká buď kalus nebo polarizované embryo (Dudits *et al.*, 1995). V kalusu se formují buňky, které jsou více vnímavé na růstové regulátory (Dudits *et al.*, 1995), nebo obsahují na svém povrchu receptory na auxin. To poté vede buď k symetrickému buněčnému dělení nebo asymetrickému buněčnému dělení a následně vzniku embryogenních buněk (Lo Schiavo, 1994).

Ne každé pletivo daného druhu je vhodné pro tuto metodu. Je nutné vybrat buněčnou linii, o které víme, že embrya produkuje (Lo Schiavo, 1995).

U vojtěšky seté (*M. sativa*), mrkve obecné (*Daucus carota*) a mnoha dalších druhů je významný vliv vnějšího prostředí a stupeň stádia vývoje rostliny. Z tohoto důvodu se jako vhodné explantáty vybírají embryonické a vysoce juvenilní pletiva (Litz a Gray, 1995).



### 2.5.1.2 Proliferace

Toto stádium většinou probíhá na pevném či v tekutém médiu s přidavkem růstových regulátorů. Embryogenní buňky podléhají proliferaci a tvoří proembryogenní masu buněk (Proembryonic masses; PEMs). Pro proces proliferace je do média přidáván auxin. Ten však není vhodné používat při další kultivaci. Působí inhibičně při přeměně PEMs na somatická embrya (Filonova *et al.*, 2000a; De Vries *et al.*, 1988; Nomura a Komamine, 1985). Pro velkoobjemovou propagaci embryí je doporučeno využít suspenzních kultur, ve kterých je vývoj embryí více časově synchronizovaný (Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk, 2007).

### 2.5.1.3 Fáze před dozráním

Přeměna PEMs na embrya v určitém stádiu vyžaduje jejich přenos na médium bez přidavku syntetické formy auxinu kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). Ta pomáhá při stanovení a proliferaci embryogenních kultur, ale není metabolizována rostlinnými buňkami, a proto působí inhibičně. Z tohoto důvodu se v médiích nevyužívá ani přirozený auxin. Zabraňuje expresi genů nutných k přechodu na srdčité stádium vývoje embrya (Zimmerman, 1993).

### 2.5.1.4 Dozrávání

Během dozrávání neboli maturaci se somatická embrya mění v mnoha ohledech. Zejména po stránce anatomické, kdy embryo mění svůj tvar z bipolárního na globulární a následně srdčité. Dochází také k reorganizaci biochemických faktorů v závislosti na fázi vývoje embrya.

Jedná se především o proteiny PIN1, PIN4, PIN7, dále *WOX2*, *WOX8* a *WOX9* transkripční faktory (WUSCHEL related homeobox; *WOX*). Pohyb auxinu po embryu je řízen expresí *DR5* reportérového genu (Thomas, 1993; Gälweiler *et al.*, 1998; Petrášek *et al.*, 2006; Zažímalová *et al.*, 2007). V této fázi vývoje se hromadí zásobní látky v subcelulárních částech, stejně tak jako u zygotických embryí (Merkele *et al.*, 1995). Čas a množství ukládání zásobních látek se však mezi těmito dvěma typy embryí liší.

V zygotickém embryu se začínají postupně ukládat lipidy a proteiny v průběhu torpédovitého stádia do formujících se děložních lístků. Z endospermu čerpá embryo sacharidy a postupně vyplňuje dutinu.

Somatické embryo pěstované v *in vitro* podmínkách není obklopeno endospermem ani jinými ochrannými obaly. Látky potřebné ke svému růstu přijímá přímo z kultivačního média. Ukládá si ji rovněž hlavně do děložních lístků (Merkele *et al.*, 1995; Yeung, 1995).

### **2.5.1.5 Regenerace v celistvou rostlinu**

Poté se na médiích postrádajících růstové regulátory vyvíjejí embrya v malé rostlinky zvané semenáčky. Takto vyvinutá embrya se již moc neliší od přirozeně pěstovaných rostlin. U některých druhů rostlin např. tabáku (*N. benthamiana*) (Barbier a Dulieu, 1980), vojtěšky seté (*M. sativa*) (Bingham *et al.*, 1975) a pelargonie (*Pelargonium pentatum*) (Hildebrand, 1972) se může projevit somaklonální variace. Somaklonální variace je nestálost genetické informace vzniklá působením vnějších faktorů např. chemikálií. Buňky explantátu v podobě kalusu by měly být uniformní, ale v důsledku somaklonální variace se mohou jejich genomy mírně lišit. Déle trvající stádium kalusu a používání 2,4-D může mít za následek změnu genetickou i epigenetickou (Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk, 2007).

### **2.5.2 Genová regulace somatické embryogeneze**

Genová regulace somatické embryogeneze je dobře prostudována u modelové rostliny genetických studií huseníčku rolního (*A. thaliana*). Pochopení dějů na molekulární úrovni je velice složité díky velké genetické výbavě rostlin a jiným mechanismům, které různé druhy využívají odlišně. Toto téma se diskutuje především u dřevnatých rostlin, které mají navíc dlouhý životní cyklus (Merkle a Dean, 2000). Vědci se snaží regulační mechanismy pochopené u huseníčku rolního (*A. thaliana*) aplikovat i na ostatní rostlinné druhy.

#### **2.5.2.1 Pozitivní regulátory**

Pozitivní regulátory působící na indukci a průběh somatické embryogeneze rozdělujeme do čtyř základních skupin. První zmíněnou je gen zvaný *LEC* (*LEAFY COTYLEDON*), jehož funkce byla potvrzena experimentem s jeho vyřazením (Lotan *et al.*, 1998). Zahrnuje skupinu *AtLEC1* a *AtLEC2* podílející se na dozrání semen (Harada, 2001; Stone *et al.*, 2001). Z vegetativní buňky může vzniknout celá nová rostlina.

Na tomto procesu se podílí výše zmíněný *AtLEC1*, jehož ektopickou expresí probíhá indukce somatické embryogeneze (Lotan *et al.*, 1998; Gaj *et al.*, 2005). Ovlivňuje také úroveň syntézy auxinu (Junker *et al.*, 2012) a mnoho dalších aspektů. Druhý z jmenovaných *AtLEC2* má vliv na projev vlastností rostliny huseničku rolního (*A. thaliana*) v již kompletně vyvinutých, zralých pletivech (Stone *et al.*, 2001). Další z jeho účinků je regulace syntézy auxinu a auxin signálního genu *AtIAA30* (*INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 30*). *AtIAA30* je důležitý pro iniciaci embryogeneze (Stone *et al.*, 2008).

Gen *AtBI3*, reguluje ABA-responsivní geny a je sám ovlivněn pozitivně díky *AtLEC1*, *AtLEC2* a *AGAMOUS-like 15* (To *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2009). K vytvoření somatického embrya ze stonkového apikálního meristému je důležitý gen *AtAGL15*, kódující MADS-box transkripční faktory (Heck *et al.*, 1995). Dalšími jsou *AtBBM* (*BABY BOOM*) kódující *APETALA2*. Pokud je exprimován *BBM*, má vliv na formující se listy a děložní listy, společně s *AtEMK* (*EMBRYOMAKER*). Gen *AtEMK* je člen rodiny *APETALA* (Boultier *et al.*, 2002; Tsuwamoto *et al.*, 2010). Správnou anatomii, morfologii embrya a kmenové buňky zajišťuje mimo jiné i gen *WOX* (*WUSCHEL-related homeobox*) přes aktivaci *AtLEC* (Zuo *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Na pozitivní regulaci somatické embryogeneze u huseničku rolního (*A. thaliana*) se podílejí i další geny. Tato oblast výzkumu je stále otevřená.

### 2.5.2.2 Geny negativní regulace

Některé z genů např. *AtVAL1* a *AtVAL2*, kódující B3 VP1/ABI3-LIKE proteiny mají negativní vliv na *AtLEC* geny, které jak je výše uvedeno, jsou velice důležité při správném vývoji somatického embrya (Suzuki *et al.*, 2007). Další, který působí represivně na *AtLEC* je *AtPKL* (*PICKLE*).

Ten je zapojený v signální kaskádě kyseliny giberelinové, brassinosteroidů a zachycení světelného záření, což má za následek kratší hypokotyl (Ogas *et al.*, 1999; Dean Rider *et al.*, 2003; Zhang D. *et al.*, 2014). Za represi tvorby somatických embryí a dediferenciaci buněk kalusu zodpovídá *AtPRC2* (*Arabidopsis thaliana* Polycomb repressive complex 2). *AtPRC2* je regulátor chromatinu a zabezpečuje genovou represi prostřednictvím modifikace histonů. To vede k dediferenciaci zralých somatických buněk kořene huseničku rolního (*A. thaliana*). Mutanti se ztrátou funkce tohoto genu tvoří jednojaderné kořenové vlásky nerozlišitelné od rostliny divokého typu.

Tyto vlásky se však neumí diferencovat a tvoří neorganizovanou spleť a somatická embrya. Poté proběhne endoreduplikace a zvýší se ploidita buněk. To je však následováno normálním buněčným dělením. To přispělo k odhalení role *AtPRC2* při represí genů a zabránění změny programu růstu a vývoje diferencovaných somatických buněk (Ikeuchi *et al.*, 2015).

## 2.6 Složení médií a funkce sloučenin při somatické embryogenezi

Pro *in vitro* kultivaci rostlinného materiálu, pletivové kultury i somatickou embryogenezi je stěžejní složení média. Mezi základní a hlavní funkce média patří zajištění vody, potřeby minerálů a vitamínů, růstových regulátorů, aminokyselin, cukrů, výměnu plynů a odstranění rostlinných metabolitů (E.F. George *et al.*, 2008). Epstein (1971) definoval čtyři důsledky nedostatku určitých elementů při růstu a vývoji rostliny. První z důsledků je, že rostlina nemůže dokončit svůj životní cyklus. Za druhé, funkce dané látky je nenahraditelná jinou látkou. Třetí důsledek je, že účinek nedostatku určitých elementů na rostlinu je přímý a element v rostlinné molekule je nezbytný pro její funkci. Proto se komerčně vyvinula celá řada médií, aby splňovala všechna kritéria pro zdravý růst explantátu. Jedním z nejtypičtějších a nejvíce používaných kultivačních médií pro pletivové kultury a somatickou embryogenezi je dle Murashigeho a Skooga (1962).

Všechny látky, které rostlina potřebuje ke svému růstu, musí být součástí kultivačního média. V průběhu pěti fází kultivace při somatické embryogenezi má rostlina jiné požadavky na složení. Obecně však potřebuje makronutrienty jako zdroje uhlíku, vodíku, dusíku či fosforu. Typický je obsah mikronutrientů (např. vitamínů, solí, kovů, minerálů). Minerální látky mají vliv na morfogenezi a správný vývoj kořenového systému rostliny (Lopez-Bucio *et al.*, 2003) a mimo jiné i na regulaci vývoje celé rostliny (Ramage a Williams, 2002). Nedílnou součástí médií jsou růstové regulátory a fytohormony, jako jsou auxiny, cytokininy, brasinosteroidy, kyselina abscisová (ABA), giberelinová (GA) a ethylen. Média můžeme využívat buď jako tuhá nebo tekutá. Tekutá se používají pro suspenzní kultury. Pro přípravu tuhých typů médií je nutné použít ztužovací činidlo. Nejčastěji se jedná o agar, fytoagar, agarosu a gellan gum. Především do selekčních médií se často přidávají antibiotika z důvodu výběru modifikovaných rostlinných linií. Některá antibiotika také slouží jako ochrana před patogeny. V případě jejich použití musíme brát ohled na to, aby nezpůsobovala změnu genetických vlastností rostliny. K tomu může docházet často ve stádiu kalusu při nepřímé somatické embryogenezi. Další z parametrů vyžadovaných rostlinou je stálost hodnoty pH. Z tohoto důvodu se používají stabilizační činidla též známé jako pufry.

## 2.6.1 Makronutrienty

Mezi makronutrienty v médiích řadíme uhlík, vodík, kyslík, dusík, vápník, hořčík, síru a fosfor. Bez těchto látek by rostlinný explantát v *in vitro* podmínkách nemohl přežít. Mohou být dodány buď v čisté formě, nebo ve formě směsí, či extraktů.

### 2.6.1.1 Uhlík

Nejtypičtějším a k životu rostliny v *in vitro* podmínkách esenciálním zdrojem uhlíku je určitá forma cukru. Můžeme použít např. disacharid sacharosu nebo i monosacharidy glukosu, fruktosu a jiné. Obsah cukrů musí být však předem znám k adekvátnímu typu explantátu, jelikož bychom mohli způsobit rostlinným buňkám osmotický stres. Je však známo, že se cukry a škroby akumulují v rostlinných buňkách při vyšším obsahu solí a slouží zde jako osmoprotektanti (Parida *et al.*, 2002). Jeden z disacharidů, trehalosa, se akumuluje v buňkách rostliny při zvýšeném obsahu soli v půdě a ochraňuje tak buněčné membrány a proteiny od denaturace (Singer a Lindquist, 1998).

### 2.6.1.2 Dusík

Dusíkaté látky jsou důležité pro správný průběh morfogeneze a růstu rostliny. Je součástí mnoha organických molekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Funkce dusíku při růstu rostliny byla potvrzena na regeneraci celé rostliny indické rýže (*Oryza sativa*) z embryogenního kalusu (Grimes a Hodges, 1990). Redukované formy mají přímý vliv na indukci somatické embryogeneze ve stádiu vývoje embrya (Kamada a Haraka, 1979). Walker a Sato v roce 1981 porovnávali různé poměry dusíkatých iontů na kalusech vojtěšky (*M. sativa*) Zjistili, že se neformují žádná embrya, pokud nejsou tyto ionty přítomny. Dusík v rostlině musí spolupracovat i s ostatními látkami, nevyjímaje cukrů. Společně s nimi urychluje a zlepšuje proces morfogeneze (Margara a Rancillac, 1966; Gamborg *et al.*, 1974). Fruktóza zpomaluje vstřebávání nitrátu, naopak sacharóza a glukóza urychluje (Hew *et al.*, 1988). Bobovité rostliny mají schopnost za pomoci symbiotických bakterií vázat vzdušný dusík  $N_2$  do molekuly  $NO_3^-$ , a dále redukovat do  $NH_4^+$  formy. Příjem iontů dusíku je závislý na množství energie a kyslíku (Heimer a Filner, 1971; Buwalda a Greenway, 1989). Forma, ve které je dusík přijat ovlivňuje vnitřní pH. Příjmutím nitrátu do rostliny se stává méně kyselé, v případě amonného iontu je tomu právě naopak.

Takto se podílí na udržení podílu protonů a hydroxylových aniontů vzniklých metabolismem a udržuje homeostázi (Raven, 1986). Pokud je v médiu velký obsah dusíkatých iontů může dojít k inhibici růstu, a to nejen díky pH, ale i toxicitě těchto látek (Mott *et al.*, 1985).

Zdroje dusíku v médiích jsou směsi aminokyselin, samostatné aminokyseliny, primární aminy, močovina, allantoin, hydrolyzát kaseinu, kvasinkový extrakt. Každý z nich má své výhody a nevýhody. Dle Lea *et al.* (1979) je allantoin a kyselina allantoinová lepším zdrojem dusíku než močovina. Na médiu s močovinou rostou explantáty pomaleji než na nitrátovém či amonném (Kirby *et al.*, 1987). Samotné amonné ionty mohou mít na rostlinu zhoubný vliv, jelikož inhibují fotosyntézu (Yoshida a Kohno, 1982). Další pokusy odhalily, že rostlina vojtěšky seté (*M. sativa*) zprvu dobře roste na médiu s obsahem  $\text{NH}_4^+$ , ale po několika dnech, kdy se začnou buňky v kalusech více dělit, se lépe vyvíjí na médiu s  $\text{NO}_3^-$  (Walker a Sato, 1981).

Sloučeniny dusíku se podílí i na tvorbě květu a jeho růstu (Berghoef a Bruinsma, 1979a). Mají vliv na rostlinné regulátory, cytokininy (Meyer a Abel, 1975b) a auxiny (Chu *et al.*, 1975). Bylo zjištěno, že v médiu s obsahem amonných iontů byly rostliny nezávislé na cytokininu (Sargent a King, 1974).

### **2.6.1.3 Fosfát**

Fosfát je jeden z nejdůležitějších elementů v biosféře. Je součástí biomakromolekul nukleových kyselin, fosfolipidů, enzymů a koenzymů. Účastní se energetického metabolismu v buňce, kdy je ve formě fosfátu vázán pyrofosfátovou vazbou do makroergické molekuly ATP. Dále se účastní fotosyntézy, respirace, regulace a aktivace určitých metabolických drah v buňkách, např. i MAPKs kaskád. V rostlině se vyskytuje v plně oxidované formě  $\text{PO}_4^{3-}$ . V kultivačním médiu je nejčastěji obsažen ve formě soli nebo hydrogensoli (George *et al.*, 1988). Fosfát v médiu vázaný v organické molekule může být vstřebán rostlinou pomocí fosfatasy (Ciarrocchi *et al.*, 1981).

### **2.6.1.4 Draslík**

Draslík je jeden z nejvíce zastoupených kationtů v cytoplasmě a chloroplastech rostlin. Vyskytuje se ve formě  $\text{K}^+$ . Ovlivňuje osmotický potenciál buňky a účastní se přenosu přes membránu, toku výživy na velkou vzdálenost, uzavírání průduchů v podmínkách sucha a udržování hladiny pH uvnitř buňky.

V některých proteinech slouží jako kofaktor. Mění konformaci k tomu, aby aktivoval enzym (George *et al.*, 1988). Jeho nedostatek vede ke ztrátě turgoru v rostlině a hyperhydricitě (Pasqualetto *et al.*, 1988), horšímu vstřebávání fosfátu, kde slouží jako antiporter (Chin a Miller, 1982).

### **2.6.1.5 Sodík**

Sodné ionty Na<sup>+</sup> nejsou ve většině případů esenciální pro růst a vývoj rostliny. Slouží především k udržení osmotické hodnoty u rostlin adaptovaných na vyšší koncentrace soli. Jejich nejvyšší koncentrace je ve vakuolách, kde pomáhají zajistit adekvátní turgor v buňce (E.F. George, 2008). U některých rostlin má benefiční i funkční účinky (Subbarao *et al.*, 2003). Zvyšuje šťavnatost listů i stonku a podporuje zvětšování buněk u slanorožce evropského (*Salicornia europaea*), což je rostlina rostoucí i na zasolené půdě (Lv *et al.*, 2012b). U dalších rostlin může sodík nahradit draslík (Sharma a Singh, 1990). Hraje významnou roli při fotosyntéze C4 a halofylních rostlin, a také při fixaci oxidu uhličitého (George *et al.*, 1988).

### **2.6.1.6 Hořčík**

Hořčík je součástí molekul chlorofylu. Jako centrální atom porfyrinového kruhu se účastní přenosu elektronu díky jeho oxidačně-redukčnímu potenciálu. Ovlivňuje aktivitu enzymů ze třídy fosfotransferas. Uplatňuje se při translaci. Agreguje malou a velkou podjednotku ribozomu a slouží jako kofaktor ATP-syntasy (George, 1988). V pokusu s kalusy vojtěšky seté (*M. sativa*) bylo zjištěno, že pokud se nepřidá do média dostatečné množství Mg<sup>2+</sup>, vyvine se výrazně méně somatických embryí (Walker a Sato, 1981). Podobného výsledku bylo dosaženo i v případě přímé embryogeneze u melounu (Kintzios *et al.*, 2004).

### **2.6.1.7 Síra**

Síra je součástí aminokyselin, podílí se na sekundárních strukturách proteinů, syntéze lipidů a slouží jako ligand v metaloproteinech a enzymech. Nepřímo se účastní detoxifikace reaktivních forem kyslíku jako součást glutathionu (George *et al.*, 1988). Nedostatek síry může zpomalovat růst v suspenzních kulturách (Klapheck *et al.*, 1982). Do rostliny se dostává společně s dusíkem (Reuveny *et al.*, 1980) a nutí rostlinu k exkreci hydroxylových aniontů. Tím dochází k alkalizaci média.



### 2.6.1.8 Vápník

Vápník je jeden z hlavních kationtů v rostlinných buňkách, který je však imobilizován na membránách buněk a střední lamelle buněčné stěny. Má strukturní a fyziologickou funkci a závisí na něm několik enzymů např. syntasa celulosy, glukanu a enzymy hydrolyzující ATP. V nízkých koncentracích uvnitř buňky slouží jako druhý posel (Hepler a Wayne, 1985; Sanders *et al.*, 1999). Hraje významnou roli při odpovědi rostliny na gravitropismus, rostlinné hormony a tok cytoplasmy. Účastní se buněčného dělení, sekrece z buňky i aktivace enzymů. (Ferguson a Drbak 1988; Poovaiah, 1988). Vápník se také podílí na vývojových procesech závislých na fytochromu (Shacklock *et al.*, 1992). Zvýšení cytosolického vápníku vede k osmoadaptaci (Taylor *et al.*, 1996), termotoleranci (Gong *et al.*, 1998), indukci detoxifikačních činidel pro kyslíkové radikály (Price *et al.*, 1994) a k syntéze fytoalexinu (Knight *et al.*, 1991). Má vliv na obsah a činnost cytokininu (Tanimoto a Harada, 1986). Jako součást kultivačních médií může zvyšovat počet somatických embryí (Jansen *et al.*, 1990). Nedostatek vápníku vede k nekrotám a horšímu růstu rostliny. Časté je žloutnutí listů, jejich opad a menší vývoj kořenového systému (Wyn Jones a Hunt, 1967). Nekrotizující vrcholy vykazovaly deficienci vápníku (Debergh, 1988), avšak tento vliv závisí na druhu rostliny a jejím genotypu (Sha *et al.*, 1985).

### 2.6.1.9 Chlór

Rains (1976) uvádí chlór mezi mikronutrienty, jelikož se vyskytuje v rostlině v malém množství. Tento prvek je však zapojen do mnoha velice důležitých dějů a mechanismů, ačkoliv ve vyšších koncentracích může být letálně toxický. Účastní se např. osmoregulace v průvodních buňkách průduchů (George *et al.*, 1988) a je součástí proteinového komplexu fotosystému II generujícího kyslík (Bov *et al.*, 1963; Mengel a Kirby, 1982; Shkolnik, 1984). Spolu s ostatními ionty udržuje kapilární tlak ve vodivých pletivech (George *et al.*, 1988). Nejsnadněji se do rostliny dostává při nižším pH (Jacobson *et al.*, 1971).

## 2.6.2 Mikronutrienty

Mezi mikronutrienty patří především mangan, zinek, bor, měď, molybden, kobalt, nikl a křemík. Rostliny je vyžadují v malém množství a často nejsou esenciální pro životní cyklus. Mají spíše zvýhodňující charakter. Role mikronutrientů v normálním růstu rostlin byla objevena na začátku minulého století. Jako jeden z prvních mikronutričních prvků bylo definováno železo. Deficit železa způsobuje snížení množství chlorofylu a zhoršuje fungování chloroplastů (Sundqvist *et al.*, 1980). O zapojení zinku, manganu a boru do růstu vyšších zelených rostlin se zasadili vědci Sommer a Lipman (1926). Při svých pokusech s ječmenem setým (*Hordeum vulgare*) a slunečnicí roční (*Helianthus annuus*) zjistili, že kontrolní rostliny s vyváženou koncentrací zinku, manganu a boru jsou výrazně fenotypově vitálnější než ty rostoucí v médiu bez obsahu těchto prvků.

### 2.6.2.1 Mangan

Mangan je součástí metaloproteinů účastnících se přenosu elektronů při respiračním cyklu a fotosyntéze (Clarkson a Hanson, 1980). V některých enzymech nahrazuje hořčnaté ionty (Hewitt, 1948). Má vliv na zvýšení syntézy kyseliny indol-3-octové (IAA). Mangan je kofaktor IAA oxidas (Galston a Hillman, 1961). Pokud se vyskytuje společně s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), má vliv na přírodní IAA. V porovnání s přirozeně se vyskytující IAA, není tento efekt sledován u syntetických analogů auxinů, jako je např. kyselina 1-naftyloctová (NAA) a kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). To potvrdili MacLachlan a Waygood v roce 1956.

### 2.6.2.2 Zinek

Zinek je stejně jako výše uvedený mangan součástí mnoha metaloproteinů. Je obsažen ve struktuře enzymů, např. alkohol dehydrogenasy, superoxid dismutasy a RNA-polymerasy (Clarkson a Hanson, 1980). Je zde předpoklad, že je zapojený do syntézy auxinu a růstu celé rostliny (Skoog, 1944; Tsui, 1948; Klein *et al.*, 1962). Zinek je součástí proteinové struktury nazývané zinkové prsty.

Tento protein hraje roli při vývoji rostliny a při jejich odpovědi na biotický a abiotický stres. Slouží jako regulátor exprese deoxyribonukleové kyseliny (DNA) za stresových podmínek (Cutler *et al.*, 2011; Giri *et al.*, 2011).

### **2.6.2.3 Bor**

Tento prvek se účastní stavby a funkčnosti buněčné stěny a cytoplasmatické membrány (Pollard *et al.*, 1977; Clarkson a Hanson, 1980). Je kofaktor některých enzymů důležitých při syntéze nukleových kyselin. Především se podílí na syntéze ribonukleových, ale i deoxyribonukleových kyselin v rostlinné buňce. Z tohoto důvodu je esenciální (Mengel a Kirby, 1982; Moore a Hirsch, 1981). Dále se uplatňuje při tvorbě ligninu a odpovídi rostliny na pozitivní a negativní gravitropismus (Tanada, 1978).

### **2.6.2.4 Měď**

Měď je jedna z esenciálních mikronutrientů. Je součástí plastocyaninu, tím pádem i elektron transportního řetězce. Účastní se oxidace a hydroxylace kyseliny abscisové (ABA) a dopaminu (Lerch, 1981). V určité koncentraci může způsobovat velký růst. Ve vysoké koncentraci je však toxický.

### **2.6.2.5 Molybden**

Je součástí enzymů nitrogenasy a nitrát reduktasy účastnící se fixace dusíku. V médiích, kde je ho nedostatek, dochází k hromadění nitrátu z důvodu nefunkční redukce nitrátu na amoniový iont (Sherameti *et al.*, 2002; Hille *et al.*, 2011). Příznaky nedostatku molybdenu jsou žloutnutí listů a jejich opad. V některých případech může být nedostatek molybdenu pro organismus letální (Arnon a Stout, 1939).

### **2.6.2.6 Kobalt**

Kobalt je esenciální komponenta mnoha uměle připravovaných typů médií, či směsí vitamínů. Může mít vliv na regulaci morfogeneze (Miller, 1954; Salisbury, 1959). Kobalamin (vitamín B12) se zapojuje v procesu syntézy nukleových kyselin (Fries, 1962). Ionty kobaltu  $\text{Co}^{2+}$  mohou inhibovat syntézu ethylenu.

### **2.6.2.7 Nikl**

Nikelnaté ionty nejsou esenciální v normálním vývoji rostliny (Mishra a Kar, 1975). Účastní se konverze močoviny na amoniový iont, jelikož se vyskytuje v enzymu ureasa (Dixon *et al.*, 1975; Polacco, 1977a). Hromadění močoviny v rostlinách vede k toxickému efektu a může být letální. Je tak důležitou komponentou médií bobovitých rostlin a všech rostlin fixujících dusík, kam patří i vojtěška setá (*M. sativa*) (Witte *et al.*, 2002).

### **2.6.2.8 Křemík**

Po uhlíku je křemík druhý nejvíce se vyskytující prvek na Zemi. Je zapojen v procesech odpovědi rostlin na abiotický a biotický stres (Epstein, 1971). Na pokusech s okurkou (*Cucumis sativus*) bylo prokázáno, že má vliv na zvýšení čerstvé hmoty a obsah chlorofylu v listech (Adatia a Besford, 1986).

### **2.6.3 Chelatační činidla**

Nejznámějším a nejpoužívanějším činidlem vychytávajícím volné ionty je kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA). Má efekt na růst rostliny podobný auxinu. Působí na prodlužování buněk koleoptyle, hypokotylů pěstovaných ve tmě a inhibici růstu kořene některých rostlin (Heath a Clark, 1956a.b; Weinstein *et al.*, 1956; Burstrom, 1961, 1963). Mezi další chelatační činidla řadíme také kyselinu etylenglykol-bis(2-aminoethylether)-tetraoctovou (EGTA), kyselinu etylendiamin-di(o-hydroxyfenyl) octovou (EDDHA) a kyselinu 1,3-diamino-2-hydroxypropan-tetraoctovou (DHPT).

### **2.6.4 Vitamíny**

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které jsou velice důležité při normálním vývoji rostliny. Slouží jako katalyzátory v mnoha biochemických reakcích. Rostliny je potřebují pro svůj růst a správný vývoj orgánů. Zprvu jim byly dodávány jako příměsi do médií ve formě kokosového mléka, šťávy z ovocných plodů nebo jako extrakt z kvasinek (George *et al.*, 2007).

Většina vitamínů dodávaných do médií jsou ze skupiny B. Thiamin (vitamín B<sub>1</sub>), niacin, pyridoxin (vitamín B<sub>6</sub>) a myo-inositol jsou esenciální pro růst mnoha rostlin (Bonner, 1940a; Gautheret, 1942; White, 1943b). Myo-inositol je řazen mezi karbohydrátové suplementy.

Tyto sloučeniny jsou součástí nejpoužívanějšího MS média dle Murashigeho a Skooga z roku 1962. Některé studie na explantátech řapíků rostlin *Begonia x heimalis* pokládají použití Nitsch a Nitsch (1965) jako zbytečné až inhibující (Welander, 1977).

Thiamin je důležitou součástí při metabolismu karbohydrátů, a to především ve formě pyrofosfátu. Je zapojen do syntézy několika aminokyselin. Některé rostliny si vystačí s vitamínem B<sub>1</sub>, který si sami syntetizují. V pokusech s kukuřicí (*Zea mays*) bylo potvrzeno, že je nezbytný pro růst a musí být obsažen v médiu (Polikarpochkina *et al.*, 1979). U sóji luštinaté (*Glycine max*) bylo zjištěno, že zvýšení jeho koncentrace z původních 3  $\mu\text{M}$  na 5  $\mu\text{M}$  vedlo ke zvýšení frekvence vzniku zygotických embryí z 33 % na 58 % (Barwale *et al.*, 1986). Dále působí na indukci embryogenního kalusu teplomilné japonské traviny (*Zoysia japonica*) a formaci adventivních kořenů tisu červeného (*Taxus baccata*) (Asano *et al.*, 1996; Chée, 1995). Thiamin interaguje i s růstovým hormonem cytokininem (Digby a Skoog, 1966).

Dalšími vitamíny jsou např. L-askorbová kyselina (vitamín C). Má pozitivní vliv na buněčné dělení a prodlužování buněk (de Pinto *et al.*, 1999). Nakonec je třeba zmínit i vitamíny ze skupiny D a E. Vitamín E je rozpustný v tucích, má antioxidační účinky a pomáhá rostlině se vypořádat s reaktivními kyslíkovými radikály.

### **2.6.5 Ztužující komponenty média**

Ve většině případů somatické embryogeneze se používají pevná média. Kultivace na pevných médiích skýtá řadu výhod, ale i nevýhod. Ke ztužení se používá řada látek, z nichž nejznámější je agar, agarosa a gellan gum.

### 2.6.5.1 Agar

Agar je přírodní polysacharid složený z monomerů galaktózy. Jeho hlavními součástmi jsou agarosa a agaropektin v určitém poměru. Poměr těchto složek se liší a závisí na místě původu řasy (Adrian a Assoumani, 1983). Je izolován z červených řas rodu *Floridae* a *Gelidium*. Má bod tání při 100 °C a tuhne při 45 °C. Poté co ztuhne, je již stabilní. Obsahuje další mikro- a makronutrienty jako je vápník, sodík a fosfor (Beruto *et al.*, 1995; Debergh, 1983; Scherer *et al.*, 1988).

### 2.6.5.2 Agarosa

Agarosa je součástí agaru. Je to polymer skládající se z  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 3) galaktopyranosy a 3,6-anhydro- $\alpha$ -L(1  $\rightarrow$  4) galaktopyranosy. Výhodou oproti agaru je její schopnost vázat na sebe toxické látky vznikající při kultivaci (George, Hall a Klerk, 2007). Používá se pro kultivaci protoplastů (Tor *et al.*, 1999) a kultur mikrospor (Bishnoi *et al.*, 2000).

### 2.6.5.3 Gellan gum

Gellan gum je též znám pod jménem Phytigel. Je to polysacharid složený ze dvou molekul D-glukosy, jedné molekuly D-glukuronové kyseliny a L-rhamnosy. Navíc obsahuje řadu kationtů ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ ), které pomáhají vytvářet  $\alpha$ -helixové struktury a ztužovat tak gel. Gel je čirý a je jednodušší na něm detekovat mikrobiální kontaminace než na gelu připraveném s agarem. Používá se na kalusové kultury, somatickou embryogenezi a regeneraci mnoha rostlin. Jeho výhody byly popsány na regeneraci cukrové třtiny (*Saccharum officinarum*) (Anders *et al.*, 1988) a somatické embryogenezi rýže seté (*Oryza sativa*) (Koetje *et al.*, 1989).

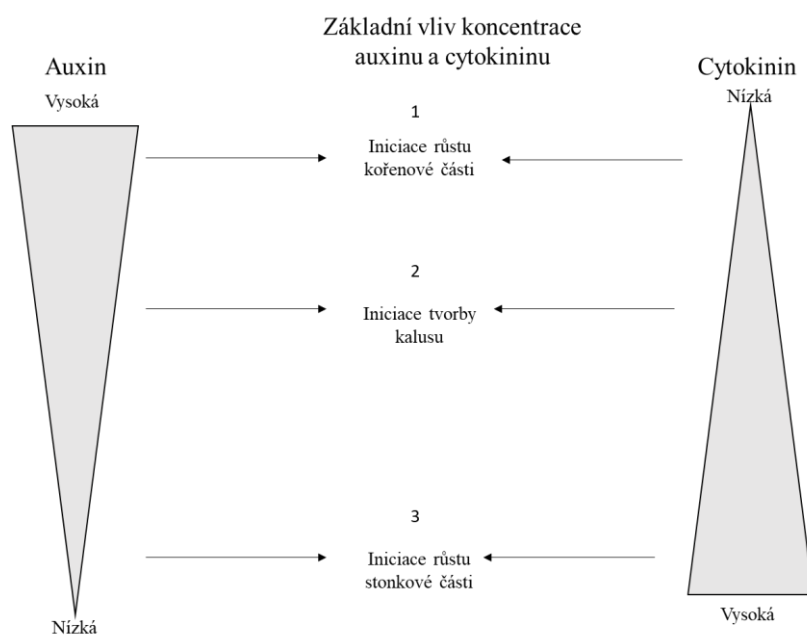
### 2.6.6 Růstové regulátory a rostlinné hormony

Růstové regulátory a rostlinné hormony jsou látky, které působí na vývoj rostliny v určitých fázích a podmínkách. Často jsou rostlinou produkovány přirozeně. Jsou aktivní již při malé koncentraci. Do kultivačních médií se nejčastěji přidávají syntetické analogy přirozených růstových hormonů a rostlinou jsou přijímány exogenní cestou nejčastěji přes kořeny.

Růstové regulátory a hormony dělíme do sedmi základních skupin. Jsou to auxiny, cytokininy, gibereliny, ethylen, kyselina abscisová, brasinosteroidy a steroly. Každá z těchto látek ovlivňuje v rostlině jiný proces. Většinou mají hned několik funkcí (George *et al.*, 1988).

Auxin bývá často přidáván do médií v kombinaci s cytokininem. Jsou důležité při vývoji kalusu, buněčných suspenzí, dělení buněk a elongaci. Auxin zprostředkovává odpověď na gravitropismus a fototropismus (Friml, 2003). Je hlavním hormonem určujícím apikální dominanci rostliny (Cline, 1994) a je důležitý pro polární růst buněk (Friml, 2003). Ovlivňuje i replikaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA), zatímco cytokininy ovlivňují mitózu (Jouanneau, 1971). Přírodní auxin je např. kyselina indol-3-octová (IAA). Endogenní formou je poté kyselina 4-chloro-indol-3-octová (Engvild, 1985), kyselina indol-3-máselná (Ludwig-Müller a Epstein, 1991) a další. V komerčních médiích se často používá syntetická kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) a naftalen-octová kyselina (NAA). Při somatické embryogenezi je stěžejní poměr auxinů a cytokininů. Obecně je známo, že vyšší množství auxinu podporuje vznik kořenů (Aloni, 2004). Vyrovnaná koncentrace auxinu a cytokininu dává vzniku kalusu a větší množství cytokininu zase vznik stonkové části (Obr. 2). Oba, auxin i cytokinin, ovlivňují MAPKs kaskády účastníci se buněčného cyklu (John *et al.*, 1993).

Cytokinin je společně s auxinem jeden z nejvýznamnějších rostlinných hormonů. Je zapojen v procesu buněčného dělení a formace nadzemní části při přímé i nepřímé embryogenezi. Tento poznatek byl potvrzen při výzkumu cukrové třtiny (*Saccharum officinarum*) (Konwar a Coutts, 1990). Bylo zjištěno, že cytokinin má vliv i na kořenový systém některých jiných rostlin (Nemeth, 1979). V dnešní době jsou známy dvě formy, tj. přírodní a syntetická. Z přírodních je to např. *trans*-zeatin, *cis*-zeatin a  $N^6 - \Delta^2$  *iso*-pentenyl adenin (iPA). *Cis*-zeatin je izolován ve velké míře z mořských trav (Stirk *et al.*, 2003) a má menší aktivitu než *trans*-zeatin (Van Staden a Drewes, 1991). Přírodní cytokininy se v laboratořích neuvírají díky jejich vysoké ceně. Proto bylo zaměřeno úsilí na syntézu levnějších, uměle vytvořených analogů. Jeden z nich je benzyladenin (BA), který má vliv na morfogenezi (Wilcox *et al.*, 1978, 1981). V dnešní době se v pletivových kulturách nejvíce používá syntetický derivát purinu, benzylu a aminu tj. 6-benzylaminopurin (BAP). Za zmínku stojí také struktura cytokininu, která byla syntetizována v České republice a je známá pod názvem olomoucín (Havlicek *et al.*, 1997).



Obr. 2 Základní vliv koncentrace auxinu a cytokininu (Jiří Sojka, 2018). 1. Pokud je koncentrace auxinu v médiu vyšší než cytokininu, dochází k indukci růstu kořenové části. 2. Pokud jsou koncentrace těchto dvou rostlinných hormonů vyrovnány, vzniká kalusové pletivo. 3. V případě, že je koncentrace auxinu v médiu nižší oproti koncentraci cytokininu, dochází k iniciaci růstu stonkové části.

## 2.7 Western blot

Western blot je biochemická metoda detekce proteinů migrujících podle jejich molekulové hmotnosti v elektrickém poli na gelu. Metoda je složena z pěti kroků, které shrnuli a popsali ve své práci Mahmood a Yang v roce 2012.

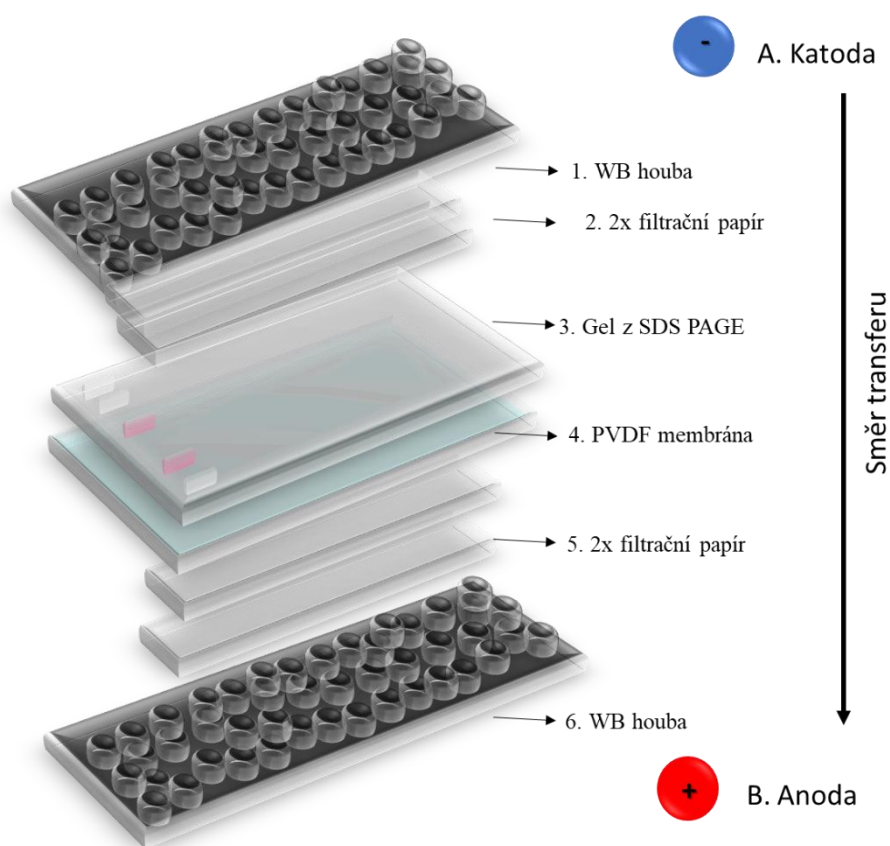
Prvním krokem je příprava vzorků proteinů. Je velice důležité zabránit denaturaci proteinů. Práce s proteiny se provádí při nízké teplotě a do extrakční směsi se přidávají inhibitory proteas. Proteasy jsou enzymy, které štěpí polypeptidový řetězec na určitých místech. Tímto degradují vzorek proteinů (Neurath a Walsh, 1976). Pro extrakci proteinů ze vzorku se používá homogenizace nebo sonikace. V principu se jedná o mechanické rozrušení struktur vyššího stupně.

Druhým krokem je gelová elektroforéza. Proteiny migrují v gelu na základě svého náboje a molekulové hmotnosti. Gel pro elektroforézu je složen ze dvou částí. Horní, zaostřovací gel, napomáhá zaostřit a srovnat nanesené vzorky proteinů do jednoho proužku tak, aby jejich migrace probíhala ve stejném čase.



Spodní, separační gel, napomáhá k rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Menší proteiny se pohybují v elektrickém poli rychleji a snáz než ty s větší molekulovou hmotností.

Třetí krok je samotný přenos (blot) separovaných proteinů z gelu na membránu. Nejčastěji se používá membrána z nitrocelulosity nebo polivinylidendifluoridu (PVDF) (Timmons a Dunbar, 1990). Transfer probíhá pomocí elektrického pole, které působí kolmým směrem od katody k anodě (Obr. 3). To umožňuje přenos proteinů z gelu na membránu.



Obr. 3 Schéma "sandwiche" pro Western blot. (Jiří Sojka, 2018) 1. Houba, 2. 2x filtrační papír, 3. Gel z SDS PAGE, 4. PVDF membrána, 5. 2x filtrační papír, 6. Houba, A.→B. směr transferu

Po transferu z gelu na membránu následuje její blokace a inkubace s primární a sekundární protilátkou. Blokace je velmi důležitá, jelikož zamezuje nespecifickému navázání primární protilátky. K blokaci se používá např. hovězí sérový albumin (BSA), odtučněné mléko v prášku či želatina.

Volba primární protilátky závisí na typu proteinu, který chceme detekovat. Je neznačená, a tudíž nelze přímo detekovat. K finální detekci proteinů našeho zájmu se využívá sekundární protilátky. Ta obsahuje enzym např. křenovou peroxidasu (HRP), která přeměňuje substrát na barevný produkt, který se dá zachytit a detekovat.

Posledním krokem při Western blotu je kvantifikace proteinů. Signál na membráně je zachycen a kvantifikován. Můžeme tedy zjistit dle síly signálu přibližnou abundanci vybraných proteinů. Její přesné stanovení není možné, protože metoda Western blot je pouze semikvantitativní.

## 2.8 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR, též známá jako qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) nebo RT PCR (ReaT-Time Polymerase Chain Reaction), je biochemická metoda založená na kvantifikaci amplifikované DNA a detekci jednoduchých polymorfismů (Deepak *et al.*, 2007). Nukleotidy mají fluorescenční sondu. Když je nový nukleotid přiřčen k řetězci, je vyzářeno světlo určité vlnové délky náležející danému nukleotidu. Tímto způsobem je čtena genetická informace vybraného genu v reálném čase v průběhu polymerázové řetězové reakce (Stephenson, 2016).

Použití qPCR při kvantifikaci rostlinné DNA nebo RNA je složité a pro každý druh rostliny se protokol liší. Při extrakci RNA z rostlinných buněk je nutné zabránit degradaci RNA enzymy (RNAsami), které ji štěpí (Deepak *et al.*, 2007). Toho je dosaženo přidáním inhibitoru tohoto enzymu (Fairfax a Salimnina, 2010).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie**

##### **Bio-Rad**

4x Laemli Sample Buffer (USA), akrylamid/bis-akrylamid (USA), Clarity™ Western ECL Substrate (USA), Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (USA), TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions (USA)

##### **Duchefa Biochemie**

Gamborg's B5 basal salt mixture (Nizozemí), Gamborg's B5 vitamin mixture (Nizozemí), Murashige Skoog's salt mixture (Nizozemí), Nitschand Nitsch vitamin mixture (Nizozemí), 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES; Nizozemí)

##### **GE Healthcare**

Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF BlottigMembrane (Německo)

##### **GenScript**

Primární králičí polyklonální MMK3 protilátka (USA)

##### **Invitrogen by Thermo Fisher Scientific**

10 mM dNTPs (Lotyšsko), 6x DNA Loading Dye (USA), DNase I (Lotyšsko), DreamTaq DNA polymerase (Lotyšsko), DreamTaq 10x buffer (Lotyšsko), GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (USA), Goat anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> sekundární protilátkaHRP (USA), ROX reference dye (USA)

##### **Promega**

M-MLV reverse transcriptase (USA), M-MLV reverse transcriptase 5x buffer (USA), RNasin® Ribonuclease Inhibitors (USA)

##### **Roche**

cOmplete™ EDTA free(USA), PhoSTOP™ (Švýcarsko)

##### **Serva**

Bradfordovo činidlo (Německo)

## **Sigma**

Adenin (Čína), dithiotreitol (DTT; Kanada), dodecylsírán sodný (SDS; USA), dusičnan draselný ( $\text{KNO}_3$ ; Japonsko), ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina (EGTA, USA), ethanol 96% (Německo), ethanol 70% (Německo), fluorid sodný ( $\text{NaF}$ ; USA), glutamin (USA), glycerol (USA), hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin, BSA, USA), hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ ; Švýcarsko), hypochlorid sodný (Německo), chlorid hořečnatý ( $\text{MgCl}_2$ ; Německo), chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ ; Dánsko), L-glutation (Japonsko), L-prolin (Francie), 2-propanol ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ ), L-serin (Čína), methanol (Francie), sacharosa (Německo), N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Tris (USA), Tween 20 (USA), 2-merkapt ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ ; Německo), persírán amonný (APS), sacharosa ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ), Ponceau S, kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Tris-base, fenol, chloroformisoamylalkohol:fenol, chloroformisoamylalkohol

**Ostatní:** Midori Green (Nippon Genetics, Japonsko), 2x ImmoMix (Bioline, Velká Británie)

### 3.1.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy (XA 110/2X, Radwag, Polsko)

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Aparatura pro elektroforézu nukleových kyselin Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA)

Aparatura pro transfer proteinů Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Binokulární mikroskop (Leica, Německo)

Dokumentační zařízení ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad, USA)

Dokumentační zařízení ChemiDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA)

Chlazená centrifuga (Beckman, USA)

Inkubátor IN55 (Mettler, Německo)

Kultivační místnost (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)

Kývačka Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko)

Laboratorní digestoř M 1200 (Merci, Brno)

Laminární box (Merci, Brno)

Magnetická míchačka (MSH-420, Boeco, Německo)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments, USA)

Předvážky S1502 (BEL Engineering, Itálie)

Spektrofotometr DU® 730 UV/VIS (BeckmanCoulter, USA)

Teplotní sterilizátor (Schuett-biotec.de solaris, Německo)

Termoblok ThermoCell Cooling & Heating Block (Bioer, Čína)

Termocycler StepOnePlus Real Time PCR systém (Applied Biosystems™, USA)

Termocycler T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA)

Třepačka (Labnet, USA)

Vortex-Genie 1 (Scientific Industries, USA)

Zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA)

Zdroj napětí PowerPac™ Basic (Bio-Rad, USA)

### 3.1.3 Roztoky a média

#### Extrakční pufr E

1,19 g	HEPES (pH 7,5)
0,43 g	NaCl
0,038 g	EGTA
100 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (1 mol·l <sup>-1</sup> )
0,004 g	NaF
10 ml	glycerol
89,9 ml	dH <sub>2</sub> O

#### 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 6,8)

6,05 g	Tris-base
100 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 6,8 (HCl)	

#### 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,8)

18,16 g	Tris-base
100 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 8,8 (HCl)	

#### 10% rozdělovací gel

6,250 ml	40% Akrylamid
6,250 ml	1,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,8)
12,125 ml	dH <sub>2</sub> O
0,250 ml	10% SDS
0,0125 ml	TEMED
0,125 ml	Ammonium persulfát (c= 4 mg/ 40 $\mu$ l)

### **10% zaostřovací gel**

2,5 ml	40% Akrylamid
6,3 ml	0,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 6,8)
15,9 ml	dH <sub>2</sub> O
0,250 ml	10% SDS
0,025 ml	TEMED
0,125 ml	Ammonium persulfát (c= 4 mg/ 40 µl)

### **10x elektroforetický pufr (zásobní roztok)**

3,0 g	Tris-base
14,4 g	Glycin
10 ml	10% SDS
990 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 8,3	

### **1x Elektroforetický pufr**

100 ml	10x elektroforetický pufr
900 ml	dH <sub>2</sub> O

### **10x transferový pufr (zásobní roztok)**

3,0 g	Tris-base
14,4 g	Glycin
200 ml	Methanol
800 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 8,3	

### **1x transferový pufr**

100 ml	10x transfer pufr
50 ml	Methanol
850 ml	dH <sub>2</sub> O

**TBS (zásobní roztok)**

2,42 g	Tris-base
8,78 g	NaCl
1000 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 7,4	

**TBS-T**

100 ml	TBS
900 ml	dH <sub>2</sub> O
1 ml	Tween 20

**Ponceau S**

0,5 g	Ponceau S
25 ml	Kyselina octová
475 ml	dH <sub>2</sub> O

**0,5 mol·l<sup>-1</sup>NaOH**

20 g	NaOH
1000 ml	dH <sub>2</sub> O

**0,015 mol·l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

153,2 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)
99,85 ml	dH <sub>2</sub> O

**Roztok aminokyselin (zásobní)**

6,65 g	Glutamin
0,83 g	Serin
0,004 g	Adenin
0,083 g	L-glutathion
250 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo 4°C	



**Roztok 2,4-D (zásobní)**

0,01 g	2,4-D
50 µl	Ethanol
800 µl	dH <sub>2</sub> O
150 µl	NaOH (1M)
9 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo -20°C	

**Roztok kinetinu (zásobní)**

0,001 g	Kinetin
20 µl	NaOH (1M)
9,980 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo -20°C	

**Gamborg B5 basal salt mixture**

0,001 g	Kinetin
20 µl	NaOH (1M)
9,980 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo -20°C	

**MS basal salt mix**

0,001 g	Kinetin
20 µl	NaOH (1M)
9,980 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo -20°C	

**1000X Gamborg vitamíny**

0,001 g	Kinetin
20 µl	NaOH (1M)
9,980 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo -20°C	

### **1000X Nitsch a Nitsch vitamíny**

0,001 g	Kinetin
20 µl	NaOH (1M)
9,980 ml	dH <sub>2</sub> O
Uloženo -20°C	

### **Sterilizační roztok na listy**

1. 30 ml 70% ethanol
2. 2 ml 10% Hypochlorid sodný
- 18 ml dH<sub>2</sub>O
- 0,1 ml Tween 20

### **Médium B5H**

3,1 g	Gamborg B5 basal salt mixture
1 ml	1000X Gamborg vitamíny
0,5 g	KNO <sub>3</sub>
0,25 g	MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O
0,5 g	Prolin
30 g	Sacharosa
4,5 g	Gellam Gum
1000 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 5.7 (1 M KOH)	(autokláv, zchlazení na 55 °C)
30 ml	Roztoku aminokyselin
1 ml	Roztoku 2,4-D
1 ml	Roztoku Kinetinu

### **Médium B50**

3,1 g	Gamborg B5 basal salt mixture
1 ml	1000X Gamborg vitamíny
0,5 g	KNO <sub>3</sub>
0,25 g	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
0,5 g	Prolin
30 g	Sacharosa
4,5 g	Gellam Gum
1000 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 5.7 (1M KOH)	(autokláv, zchlazení na 55 °C)
30 ml	Roztoku aminokyselin

### **Médium MMS**

4,3 g	MS basal salt mix
1 ml	1000X Nitsch a Nitsch vitamíny
0,1 g	Myo-inositol
30 g	Sacharosa
4,5 g	Gellam Gum
1000 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 5.7 (1M KOH)	(autokláv, zchlazení na 55 °C)

### **Médium MS**

4,3 g	MS basal salt mixture
30 g	Sacharosa
4,5 g	Gellam Gum Pouder
1000 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 5.7 (1M KOH)	(autokláv, zchlazení na 55 °C)

**50x TAE pufr**

121 g	Tris
28,55 ml	Kyselina octová
50 ml	EDTA
421,45 ml	dH <sub>2</sub> O
pH 8	

**1x TAE pufr**

10 ml	50x TAE pufr
490 ml	dH <sub>2</sub> O

**1% Agarosový gel**

0,75 g	Agarosa
75 ml	1x TAE pufr
3,75 µl	Midori green

**2x SybrGreen**

1000 µl	2x ImmoMix
50 µl	ROX reference
3,2 µl	100x SybrGreen
946,8 µl	PCR H <sub>2</sub> O

### 3.1.4 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly v experimentální části práce použity kontrolní i transgenní rostliny vojtěšky seté (*Medicago sativa*), kultivaru Regen SY (RSY). Původní mateřské rostliny *Medicago sativa* určené pro propagaci prostřednictvím somatické embryogeneze byly pěstovány jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách. *In vitro* podmínky byly navozeny v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) s neustále konstantními hodnotami teploty, fotoperiody a vlhkosti (21 °C, 16/8, 70 %). Rostliny z *in vivo* podmínek byly pěstovány v síťovniku na poli, kde se kultivační podmínky neustále měnily v závislosti na počasí. Z těchto rostlin byly odebrány středně staré, nepoškozené a patogeny nenapadené listy a byly použity jako explantáty pro následné rozmnožení somatickou embryogenezí. Pro Western blot i qPCR analýzu byly následně použity již plně vyvinuté 3–4 týdny staré rostliny.

Jako transgenní rostlinný materiál byla použita linie se sníženou expresí *SIMKK* genu označená jako *SIMKK RNAi 2A/2*, jejíž příprava nebyla součástí předkládané práce.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Průběh somatické embryogeneze

Pro přípravu kontrolního i transgenního rostlinného materiálu *Medicago sativa* somatickou embryogenezí byl využit protokol popsáný podle Samac a Austin-Phillips (2006). Veškerá práce v průběhu somatické embryogeneze probíhala v aseptických podmínkách v laminárním boxu (Merci, Brno).

Veškeré nástroje byly v průběhu práce opětovně sterilizovány 96% etanolem a teplotním sterilizátorem (Schuett-biotec.de solaris, Německo). Kultivace kontrolních i transgenních explantátů, kalusů, embryí i nově vzniklých rostlin probíhala v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) za konstantních podmínek (21 °C, fotoperioda 16/8, vlhkost 70 %, intenzita světla 60 - 80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### **3.2.1.1 Sterilizace rostlinného materiálu *Medicago sativa* z *in vitro* podmínek kultivace**

Listy ze 3-4 týdeních kontrolních i transgenních rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*) byly odebrány a sterilizovány v roztoku 10% hyperchloridu sodného s přídavkem Tween 20 (0,05% w/v) po dobu 2,5 min a 3x promyty ve sterilní dH<sub>2</sub>O. Transgenní linie použitá z *in vitro* kultivačních podmínek byla označena jako *SIMKK RNAi 2A/2* č. 4.

### **3.2.1.2 Sterilizace rostlinného materiálu *Medicago sativa* z *in vivo* podmínek kultivace**

Listy ze 3-4 týdeních kontrolních i transgenních rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*) byly odebrány a sterilizovány nejprve v 70% ethanolu po dobu 5 s. Poté byly promyty v roztoku 10% hyperchloridu sodného s přídavkem Tween 20 (0,05% w/v) po dobu 2,5 min a nakonec 3x promyty ve sterilní dH<sub>2</sub>O. Transgenní linie použitá z *in vivo* kultivačních podmínek byla označena jako *SIMKK RNAi 2A/2* č. 21.

Následné kultivace na jednotlivých médiích probíhaly již shodně jak pro rostlinný materiál z *in vitro*, tak pro rostliny z *in vivo* podmínek.

### **3.2.1.3 Kultivace *M. sativa* na B5H médiu**

Dediferenciační B5H kultivační médium bylo připraveno dle návodu v protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Médium obsahuje zejména růstové regulátory, auxiny a cytokininy, které iniciují tvorbu kalusu. Již sterilní listy kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa* byly pomocí sterilního skalpele rozpůleny a přeloženy na Petriho misku s dediferenciačním B5H kultivačním médiem tak, aby byly celou svou plochou ve styku s médiem. Misky s rostlinným materiálem byly popsány (a sterilně zaizolovány páskou k zabránění kontaminace. Jejich kultivace probíhala po dobu 22 dní až do úplné dediferenciace rostlinných buněk a vzniku kalusu v důsledku vyšší koncentrace 2,4-D (auxin) než kinetinu (cytokinin).

#### **3.2.1.4 Kultivace *M. sativa* na B50 médiu**

Médium B50, podporující vznik somatických embryí bylo připraveno dle návodu v protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Vzniklé kalusy byly přeloženy na B50 médium za účelem tvorby somatických embryí, která se začala formovat po 2–3 týdnech kultivace.

#### **3.2.1.5 Kultivace *M. sativa* na MMS médiu**

MMS médium indukující růst kořenového systému ze somatických embryí bylo připraveno dle protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Vzniklá somatická embrya byla jednotlivě přenesena a zanořena do MMS média cca ze 2/3 jejich délky.

V MMS médiu byla somatická embrya v důsledku začínajícího černání kultivována 5 dní (v případě embryí získaných z rostlinného materiálu z *in vitro* podmínek) a 6 dní (v případě embryí získaných z rostlinného materiálu z *in vivo* podmínek).

#### **3.2.1.6 Kultivace *M. sativa* na MS médiu**

MS médium, vhodné pro následnou kultivaci nově vzniklých rostlin, bylo připraveno dle protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Dle velikosti byly nově vzniklé kontrolní i transgenní rostliny *M. sativa* postupně umisťovány do čtvercových boxů po 4–9 rostlinách, poté jednotlivě do plastových kbelíků. Po 3–4 týdnech kultivace byly připraveny k plánovaným experimentům.

### **3.2.2 Western blot analýza**

#### **3.2.2.1 Oxidativní stres**

Sledování vlivu oxidativního stresu na kontrolní i transgenní rostliny *M. sativa* bylo docíleno aplikací 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v roztoku tekutého ½ MS média na kořeny 3–4 týdny starých rostlin propagovaných somatickou embryogenezí. Pro tento experiment byly použity kontrolní a transgenní rostliny z *in vitro* podmínek (linie *SIMKK RNAi 2A/2* č. 21). Kořeny byly odebrány v čase 30 min. Kromě „suché kontroly“ odebrané ihned po odřezání kořenů od zbytku rostliny byla odebrána také „mokrý kontrola“.

Kořeny kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa* byly inkubovány v tekutém MS médiu opět po dobu 30 min. Vždy po odebrání byly kořeny ihned vloženy do předchlazených třecích misek a ihned zmrazeny tekutým dusíkem.

Poté byly kořeny zhomogenizovány na prášek za neustálého udržování v tekutém dusíku tak, aby neroztály. Nakonec byly vzorky přeneseny do předchlazených 2 ml zkumavek a uchovány v mrazicím boxu při -80 °C.

### **3.2.2.2 Extrakce proteinů z kontrolních i transgenních kořenů *M. sativa***

Pro extrakci proteinů z kontrolních i transgenních kořenů vojtěšky seté byl použit pufr E skladovaný při -20 °C. Po jeho rozmrazení a těsně před jeho použitím do něho byly přidány inhibitory proteas cOmplete Tablets EDTA-free, fosfatas – PhosSTOP a redukční činidlo 1 mol·l<sup>-1</sup> DTT (1 μl/1 ml). Takto připravený extrakční pufr E byl přidán ke každému předem zhomogenizovanému vzorku, který byl přemístěn z mrazicího boxu na led. Objem přidaného extrakčního pufru E byl přibližně 1 ml na 1 g vzorku. Následně byly vzorky intenzivně zvortexovány na vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA) a inkubovány na ledu po dobu 30 min. Poté byly vzorky zcentrifugovány v předem předchlazené centrifuze (Beckman; 8000 g, 20 min, 4 °C) Vzniklý supernatant, který obsahoval vyizolované proteiny byl přenesen do nových zkumavek a skladován v mrazicím boxu při -80 °C.

### **3.2.2.3 Stanovení koncentrace vyizolovaných proteinů**

Výsledná absorbance vyizolovaných proteinů z kontrolních i transgenních kořenů *M. sativa* byla měřena pomocí „micro-assay“ metody. Do každé jamky v mikrodestičce určené k měření absorbance byl napipetován 1 μl vzorku, 239 μl dH<sub>2</sub>O a 60 μl Bradfordova činidla. V referenčním vzorku (blanku) byl vzorek jednotlivých vyizolovaných proteinů nahrazen 1 μl extrakčního pufru E. Vzorky byly propipetovány a inkubovány po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Mikrodestička se vzorky byla poté vložena do spektrofotometru DU<sup>®</sup> 730 UV/VIS (BeckmanCoulter, USA). Výsledná absorbance byla změřena při vlnové délce  $\lambda = 595$  nm.



Zároveň byla sestavena kalibrační křivka, která byla zhotovena na základě měření absorbancí roztoků albuminu (BSA) o známých koncentracích (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). Podle rovnice grafu byla poté vypočtená výsledná koncentrace vyizolovaných proteinů.

#### **3.2.2.4 SDS elektroforéza**

Ke vzorkům extrahovaných proteinů z kořenů kontrolních i transgenních rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*) o celkovém obsahu proteinů 20  $\mu\text{g}/1$  jamka bylo přidáno činidlo 4x Laemmli Sample Buffer (BioRad, USA) v poměru 3:1 (vzorek proteinu: 4x Laemmli).

Následně byl ke vzorkům s 4x Laemmli pufrům přidán 2-merkapt ethanol tak, aby jeho finální koncentrace byla 5 %. Takto připravené vzorky byly zahřáty v termobloku CHB-202 (Bioer, Čína) na 95 °C po dobu 5 min, aby proběhla denaturace obsažených proteinů. Mezitím byla sestavena aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA) na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE). Do elektroforetické vany byly umístěny předem připravené gely a vana byla doplněna 1x elektroforetickým pufrům po rysku. Do první jamky v gelu bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  standardu Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, do ostatních jamek potom jednotlivé vzorky proteinů. Aparatura byla napojena na zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA). Separace proteinů probíhala při konstantním proudu (10 mA/1 gel) po dobu 3–4 h a při teplotě 4 °C.

#### **3.2.2.5 Western blot**

Poté co byly proteiny rozděleny na základě své molekulové hmotnosti byl gel přenesen a promyt po dobu 10 min v 1x transferovém pufru (bez methanolu).

Polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána Amersham™ Hybond™-P (GE Healthcare, Německo) o velikosti 6 x 9 cm byla nejdříve aktivována v methanolu po dobu 30 s a poté také vložena a promyta po dobu 10 min v 1x transferovém pufru (s methanolem). Byl sestaven „sandwich“ (Obr. 3), v průběhu jehož skládání byly pomocí válečku vytlačovány vzduchové bubliny a jehož jednotlivé komponenty byly vždy předem vlhčeny v 1x transferovém pufru (s methanolem). Seskládaný „sandwich“ byl poté vložen do blotovací aparatury Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA) napojené na zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA).

Transfer proteinů z gelu na PVDF membránu probíhal při konstantním napětí 100 V po dobu 90 min při teplotě 4°C. Po ukončení transferu byla membrána obarvená pomocí Ponceau S (1 min) a vyfocena pro zjištění úspěšnosti přenosu proteinů z gelu na membránu.

Barvivo bylo z membrány důkladně vymyto dH<sub>2</sub>O a TBS-T. Pro dvojí kontrolu nanešení proteinů byly použity 10% polyakrylamidové Stain free gely TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions (Bio-Rad, USA).

Po transferu byla membrána dána do blokační směsi. Tento proces je nutný v případě detekce jakéhokoliv proteinu na membráně k zabránění nespecifické vazby protilátek. Na blokování jedné membrány bylo zapotřebí připravit 10 ml blokovacího roztoku, který se skládal z 5 % BSA a 5 % sušeného odtučněného mléka rozpuštěného v TBS-T v případě použití MMK3 a MPK6 primární protilátky. Pro fosfospecifickou pERK protilátku bylo pro blokaci membrány použito 5% BSA v TBS-T. Blokování ve všech případech trvalo 2 h při laboratorní teplotě.

Po blokaci nespecifických vazeb byla membrána 3x promyta v TBS-T pufru po dobu 2 min. Poté byly membrány inkubovány s primárními protilátkami. V této bakalářské práci byly použity celkem 3 primární protilátky: primární specifická polyklonální králičí protilátka MMK3 (Medicago MAPK 3) ředěná 1:5000 v 3% sušeném odtučněném mléku, primární králičí protilátka anti AtMPK6 ředěná 1:15000 v 4 % BSA a fosfospecifická králičí pERK protilátka ředěná 1:1000 v 5 % BSA. Membrány byly s primárními protilátkami inkubovány po dobu 2 h při laboratorní teplotě.

Po inkubaci membrán s primárními protilátkami byly membrány 3x promyty v TBS-T vždy po dobu 10 min a poté byly inkubovány s protilátkou sekundární.

V mém případě byla použita vždy stejná sekundární protilátka goat anti-rabbit IgG F(ab') s fúzovanou křenovou peroxidaseou (HRP) ředěná v poměru 1:5000 v 1 % BSA. Po inkubaci trvající 1,5 h při laboratorní teplotě byly membrány 5x promyty v TBS-T vždy po dobu 10 min.

Pro detekci proteinů byl na membránu aplikován detekční roztok Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA) v poměru 1:1 pro aktivaci signálu. Po 2 min inkubace byl roztok odstraněn a membrána byla vložena do dokumentačního zařízení ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA), kde byl luminiscenční produkt reakce substrátu

s křenovou peroxidasou detekován a využit tak i pro detekci hledaných proteinů. Pro následné zpracování a měření intenzity abundance proteinů byl použit program Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA).

### 3.2.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

#### 3.2.3.1 Rostlinný materiál a příprava vzorku

Pro získání genetické informace pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci byly použity kořeny rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*). Jako kontrola byly použity regeneranty kontrolní rostliny RSY linie kultivovaných v *in vitro* i *in vivo* podmínkách. . Dále byly otestovány rostliny *M. sativa* se sníženou expresí genu *SIMKK* označeny jako *SIMKK RNAi 2A/2* linie č.4 (regeneranty z *in vitro*) a *SIMKK RNAi 2A/2* linie č.21 (regeneranty z *in vivo*)

Rostliny připravené somatickou embryogenezí byly kultivovány v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) při konstantních podmínkách (70 %, 16/8, 21 °C) na MS médiu. Den před izolací rostlinného materiálu byly kořeny za sterilních podmínek vytaženy z MS média k zamezení exprese genů a aktivace proteinů zapojených v signalizaci stresu. Po 24 hodin byly skalpelem odřezány kořeny rostlin pro „suchou kontrolu“, poté byly vloženy do předchlazené třecí misky a ihned zality tekutým dusíkem. Následně byly vzorky zhomogenizovány tloučkem na jemný prášek a dány do 2 ml uzavíratelných vychlazených zkumavek. Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C v mrazícím boxu. Tímto způsobem byly homogenizovány a skladovány i další vzorky. Další část kořenů pro „mokrou kontrolu“ z kontrolních RSY i transgenních *SIMKK RNAi 2A/2* byla vložena do nádoby s tekutým ½ MS médiem na 30 minut. Následně byly kořeny z těchto rostlin odříznuty skalpelem a zhomogenizovány výše popsaným způsobem. Poslední část kořenů opět RSY a *SIMKK RNAi 2A/2* bylo umístěno do nádoby s tekutým ½ MS médiem s 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 30 min. Následně byly kořeny z těchto rostlin odříznuty skalpelem a zhomogenizovány. Vzorky byly uloženy na -80 °C do mrazícího boxu.

### 3.2.3.2 Měření koncentrace

Pro změření koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích byl použit přístroj NanoDrop<sup>TM</sup> spectrophotometr Lite (Thermo Scientific, USA). Z extrahovaných vzorků nukleových kyselin byl pomocí automatické pipety odebrán 1,5  $\mu$ l a nanesen na místo kudy prochází paprsek. Přístroj byl nastaven zprvu na program DNA při měření celkového obsahu nukleových kyselin ve vzorcích. Při následném měření koncentrace RNA byl přístroj nastaven na příslušný program. Nukleové kyseliny absorbují v oblasti vlnové délky 260 nm. NanoDrop<sup>TM</sup> spectrophotometr Lite (Thermo Scientific, USA) byl schopen z poměru A 260/280 určit čistotu vzorku, která by měla dosahovat hodnot 1,80. Pokud je číslo dáno poměrem menší je zde velké riziko kontaminace proteiny nebo fenolem používaným při izolaci, které mají absorpční maximum při 280 nm.

### 3.2.3.3 Izolace nukleových kyselin

Po odebrání rostlinného materiálu byla extrahována genetická informace v podobě DNA a RNA. Do předem popsané sady uzavíratelných sterilních zkumavek s 500  $\mu$ l RNA extrakčního pufru a 500  $\mu$ l fenolu bylo přeneseno 0,5 g zhomogenizovaného vzorku. Zkumavky se vzorky byly poté řádně protřepány a vloženy do přednastavené (10 min, 8000 g, 21 °C) centrifugy (Beckman, USA).

Supernatant byl následně přenesen pomocí automatické pipety se sterilní špičkou do druhé sady uzavíratelných zkumavek s 500  $\mu$ l roztoku chloroformisoamylalkohol: fenolu. Vzorky byly s roztokem řádně smíseny a vloženy do centrifugy (Beckman, USA) na 8 minut při stejných parametrech. Supernatant byl následně přenesen do třetí sady zkumavek s 500  $\mu$ l roztoku chloroformisoamylalkoholu pro odstranění fenolu, řádně smísen protřepáním a zcentrifugován (Beckman, USA) na 6 min, 8000 g, 21 °C. Tento krok byl opakován ještě jednou pro preciznější odstranění fenolu ze vzorku. Vzorky byly stáčeny za stejných parametrů jen dobu 5 min. Následně byl supernatant přenesen do nových předchlazených zkumavek s 1 ml absolutního ethanolu a 48  $\mu$ l 3M octanu sodného (pH 4,8). Nukleové kyseliny ze vzorků byly precipitovány ve zkumavkách přes noc na -80 °C v mrazícím boxu.

V dalším kroku byly vzorky ve zkumavkách s ethanolem a 48  $\mu$ l 3M octanu sodného (pH 4,8) centrifugovány (40 min, 8000 g, 4 °C). Poté byl supernatant slit a zbytky roztoku odsáty automatickou pipetou.

Zkumavky s pelety byly inkubovány 40 min při teplotě 4 °C pro odpaření roztoku ethanolu a octanu sodného. Ke vzorkům bylo přidáno 50 µl sterilní destilované vody bez obsahu enzymů štěpících RNA (voda bez RNAs) a zkumavky s pelety byly zvortexovány do úplného rozpuštění peletu. Následně byly nukleové kyseliny ve vzorcích připraveny pro agarosovou elektroforézu. K 1 µl vzorku byl přidán 1 µl LD 6X a 4 µl vody bez RNAs. Vzorky byly nanесeny do 1% agarosového gelu (0,75 g agarosy, 75 ml 1X TAE pufru, 3,75 µl Midori green). Aparatura pro elektroforézu Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA) byla před prací vyčištěna 96% ethanolem. Elektroforéza byla nastavena na 2x 20 minut při 120 V, proudu 400 mA (zdroj napětí PowerPac™ Basic, Bio-Rad, USA) v elektroforetické vaně, 1x TAE pufr byl dolit po rysku. Následně byl pořízen snímek na dokumentačním zařízení ChemiDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA) a to v časech 20 a 40 min pro lepší detekci separace nukleových kyselin.

K 50 µl vzorku s nukleovými kyselinami bylo přidáno 50 µl roztoku pro degradaci DNA (složení roztoku: 560 µl vody bez RNAs, 200 µl pufru 10x, 20 µl DNAs I, 20 µl RNasin® Ribonuclease Inhibitors). Vzorky byly inkubovány 60 min při 37 °C v inkubátoru. Pro kontrolu toho, zda byla DNA odstraněna úspěšně byly připraveny vzorky pro elektroforézu (1 µl vzorku, 1 µl LD 6X, 4 µl vody bez RNAs).

Elektroforéza byla nastavena na 2x 20 min při 120 V, proudu 400 mA v elektroforetické aparatuře Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA) s 1x TAE puftrem. Načež byly pořízeny snímky na dokumentačním zařízení ChemiDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA) v časech 20 a 40 min.

Pro zajištění čistoty RNA ve vzorcích pro následnou PCR bylo nutné provést fenolchloroformovou extrakci. Ke 48 µl vzorků s RNA bylo přidáno 452 µl vody bez RNAs a 500 µl fenolu.

Zkumavky se vzorkem a fenolem byly řádně protřepány a vloženy do centrifugy (Beckman, USA) na 10 min, 8000 g, při 21 °C. Dále byl supernatant přenesen do druhé sady zkumavek s roztokem chloroformisoamylalkohol:fenolu, opět řádně protřepán a vložen do centrifugy (Beckman, USA) při stejných parametrech na 8 min. Supernatant byl přenesen do třetí sady zkumavek s chloroformisoamylalkoholem, řádně protřepán a vložen do centrifugy (Beckman, USA) na 5 min při stejných podmínkách.

Supernatant byl opět přenesen do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  předchlazeného roztoku 1 ml absolutního ethanolu s 48  $\mu\text{l}$  3M octanu sodného (pH 4.8) a ponechány přes noc k precipitaci při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v mrazícím boxu.

Další den byly vzorky stočeny ve vychlazené centrifuze (Beckman, USA) na 40 min, 8000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně bylo k peletům přidáno 20  $\mu\text{l}$  vody bez RNase, poté byly řádně promíchány. Na závěr byla změřena koncentrace RNA na NanoDrop<sup>TM</sup> spectrophotometr Lite (Thermo Scientific, USA) dle výše popsaného postupu. Souběžně byly připraveny vzorky pro elektroforézu (1  $\mu\text{l}$  vzorku, 1  $\mu\text{l}$  LD 6X, 4  $\mu\text{l}$  vody bez RNAs) na 1% agarosovém gelu. Elektroforéza byla připravena na 2x 20 min při 120 V, proudu 400 mA v elektroforetické aparatuře Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA) naplněné 1x TAE pufrem. Poté byly pořízeny snímky gelu na dokumentačním zařízení ChemiDoc<sup>TM</sup> EZ Imager (Bio-Rad, USA) po 20 a 40 min průběhu elektroforézy.

#### **3.2.3.4 Přepis vzorku mRNA do cDNA**

Vzorky mRNA byly naředěny vodou určenou pro PCR tak, aby jejich výsledná koncentrace odpovídala 500 ng v 11  $\mu\text{l}$  vody. Následně bylo přidáno 2  $\mu\text{l}$  10 mM dinukleotidů (dNTPs) a 1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  OligoDT sloužících jako primery tak, aby výsledný objem reakční směsi činil 14  $\mu\text{l}$ . Vzorky při práci byly neustále chlazeny na ledu.

Poté byly vloženy do termocycleru T100<sup>TM</sup> Thermal cycler (Bio-Rad, USA) na 5 min při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro denaturaci mRNA. Po denaturaci byla přidána ke 14  $\mu\text{l}$  zdenaturované mRNA druhá směs pro reverzní transkripci skládající se pro jednu reakci z 4  $\mu\text{l}$  M-MLV Reverse transcriptase 5x pufu, 1  $\mu\text{l}$  rekombinantního RNAsinu a 1  $\mu\text{l}$  M-MLV reverzní transkriptasy. Výsledný objem reakce činil 20  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly opět vloženy do termocycleru na 50 min při  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro přepis mRNA do cDNA. Pro deaktivaci reverzní transkriptasy byly nakonec zahřáty na  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 10 min. Nakonec bylo přidáno 60  $\mu\text{l}$  PCR vody.

#### **3.2.3.5 Semikvantitativní PCR**

Pro získání většího množství genů našeho zájmu byla použita semikvantitativní PCR reakce s primery pro *SIMK*, *MMK3*. Pro kontrolu, že reakce proběhla v pořádku byly použity primery pro gen *ACT2* (Tab. 1).

Následně byla k 1  $\mu$ l vzorků cDNA z kořenů přidána v pořadí třetí směs o objemu 49  $\mu$ l do každé reakce. Směs byla složena pro jednu reakci z 37,5  $\mu$ l PCR vody, 5  $\mu$ l TaqDream 10x pufru, 1  $\mu$ l dinukleotidů, 2,5  $\mu$ l příslušného forward primeru (10  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ l reverse primeru (10  $\mu$ M) a 0,25  $\mu$ l DreamTaq polymerasy. Reakční objem činil celkem 50  $\mu$ l. Pro validaci byla použita reakce s čistou vodou jako negativní kontrola, již dříve potvrzená cDNA jako pozitivní kontrola a genomická DNA vždy o objemu 1  $\mu$ l. Vzorky cDNA byly při průběhu práce neustále chlazeny na ledu, se vzorky se manipulovalo se sterilními nástroji při podmínkách blízkých aseptickým. Poté byly vzorky vloženy do termocycleru T100<sup>TM</sup> Thermal cycler (Bio-Rad, USA) s nastaveným teplotním programem (Tab. 2) na 40 cyklů polymerázové reakce.

Tab. 1 Sekvence primerů pro geny detekované v qPCR

Primer	Sekvence
qACT2 (forward)	5' GGATAAGAGGTGAGATCGGAGGG 3'
qACT2 (reverse)	5' GCAACCAACCTACAGACATCCAG 3'
qSIMK (forward)	5' AATGGACACCGACCTTCACCA 3'
qSIMK (reverse)	5' CAGTGCTCCTCCGATAGTGCT 3'
qMMK3 (forward)	5' GGCTTGCCAGAACAACCTCT 3'
qMMK3 (reverse)	5' TCAAAATGCAACCAACCGACC 3'

Tab. 2 Teplotní program při PCR

Číslo kroku	Teplota (°C)	Čas (min)	Reakce
1	95 °C	3	Iniciace denaturace
2	95 °C	0,5	Dokončení denaturace
3	60 °C	0,5	Nasednutí primerů
4	72 °C	1	Polymerace
5	72 °C	15	Dokončení polymerace
6	8 °C	5	Zchlazení

Po skončení polymerázové řetězové reakce byly vzorky připraveny na elektroforézu ve 2% agarosovém gelu (2g agarosy, 5 µl Midori green, 100 ml 1x TAE pufry). K 10 µl vzorku bylo přidáno 2 µl LD 6X. Elektroforéza probíhala v aparatuře Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA) se zdrojem konstantního napětí 90 V PowerPac™ Basic (Bio-Rad, USA) 20, 30 a 40 minut. V každém časovém úseku byl gel se vzorky nasnímán na dokumentačním zařízení ChemiDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA).

### 3.2.3.5 Kvantitativní PCR

Pro kvantifikaci obsahu genů *SIMK* a *MMK3* byla použita kvantitativní PCR. Jako referenční gen byl vybrán gen pro aktin *ACT2*. Nejprve byly připraveny reakční směsi pro každý hodnocený gen zvlášť. Reakční směs byla složena z 66 µl vody pro PCR, 165 µl 2x SybrGreen, 16,5 µl příslušného počátečního a koncového primeru. Tato reakční směs byla přenesena automatickou pipetou do destičky pro kvantitativní PCR tak, aby objem reakční směsi v jedné jamce činil 8 µl. Následně byly přidány 2 µl vzorku cDNA pomocí automatické pipety na okraj jamky, a to vždy za sebou ve třech opakováních. Poté byla destička s reakční směsí a vzorky cDNA stočena v centrifuze. Následně byla vložena do přednastaveného Termocycler StepOnePlus Real Time PCR system (Applied Biosystems™, USA) na 40 cyklů reakce. Jako pozitivní kontrola reakce byl použit vzorek s cDNA, která vyšla v předešlé semikvantitativní PCR jako nejvíce koncentrovaná. Jako negativní kontrola byla použita čistá voda pro PCR s příslušnými primery.



Práce byla prováděna za stálého chlazení na ledu, se vzorky se manipulovalo se sterilními nástroji při podmínkách blízkých aseptickým. Bylo také udržováno co nejčistší prostředí z důvodu případné kontaminace. Pro statistické zhodnocení byl celý experiment zopakován třikrát. Primery, které byly použity pro kvantitativní PCR se nelišily od těch z semikvantitativní PCR.

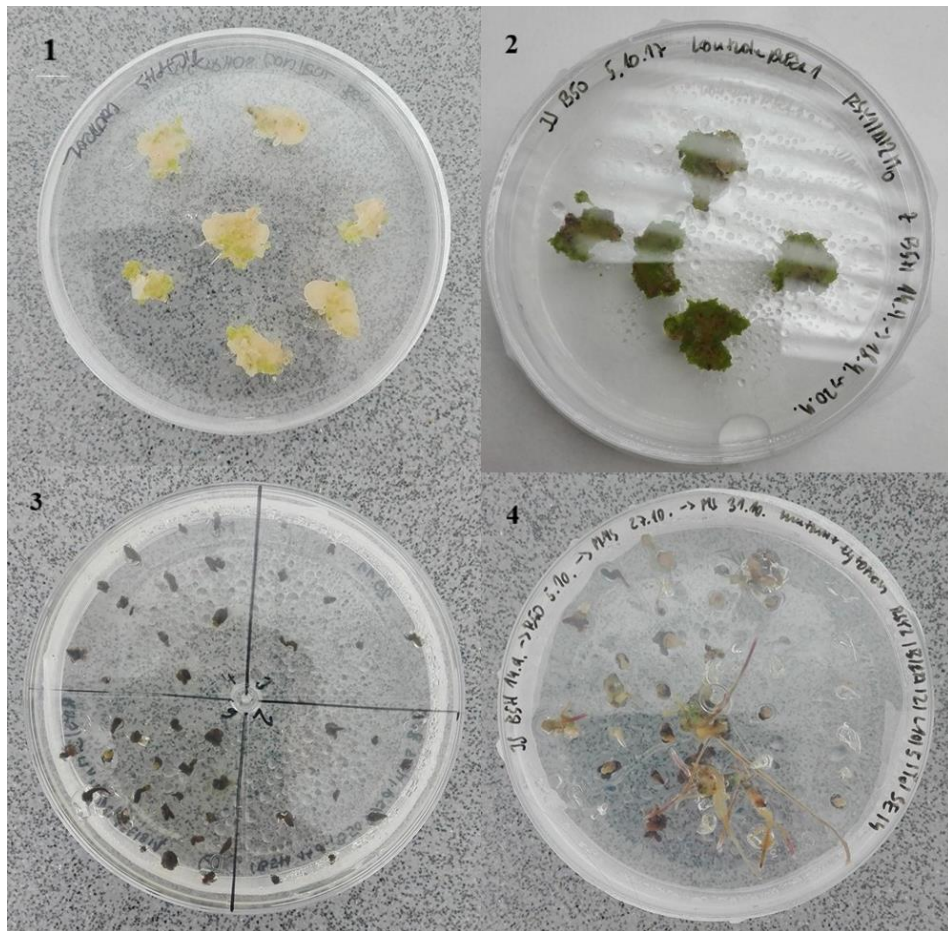
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky získané v průběhu bakalářské práce jsou členěny na tři části. První část je zaměřena na výsledky ze somatické embryogeneze použité pro přípravu rostlinného materiálu z vybraných mateřských transgenních rostlin linie *SIMKK RNAi 2A/2* a rostlin kultivaru RSY použitých jako kontrola z *in vivo* a *in vitro* podmínek růstu. Druhá část je věnována zjištění aktivity a abundance vybraných MAPKs při stresových i kontrolních podmínkách pomocí proteomické metody Western blot s protilátkami vůči zjišťovaným enzymům a vyhodnocení pomocí bioinformatických nástrojů, především programu ImageLab. Třetí část obsahuje výsledky z qPCR analýzy ke zjištění množství cDNA kódující hledané MAPKs ve vzorcích z kořene rostlin.

### 4.1 Somatická embryogeneze

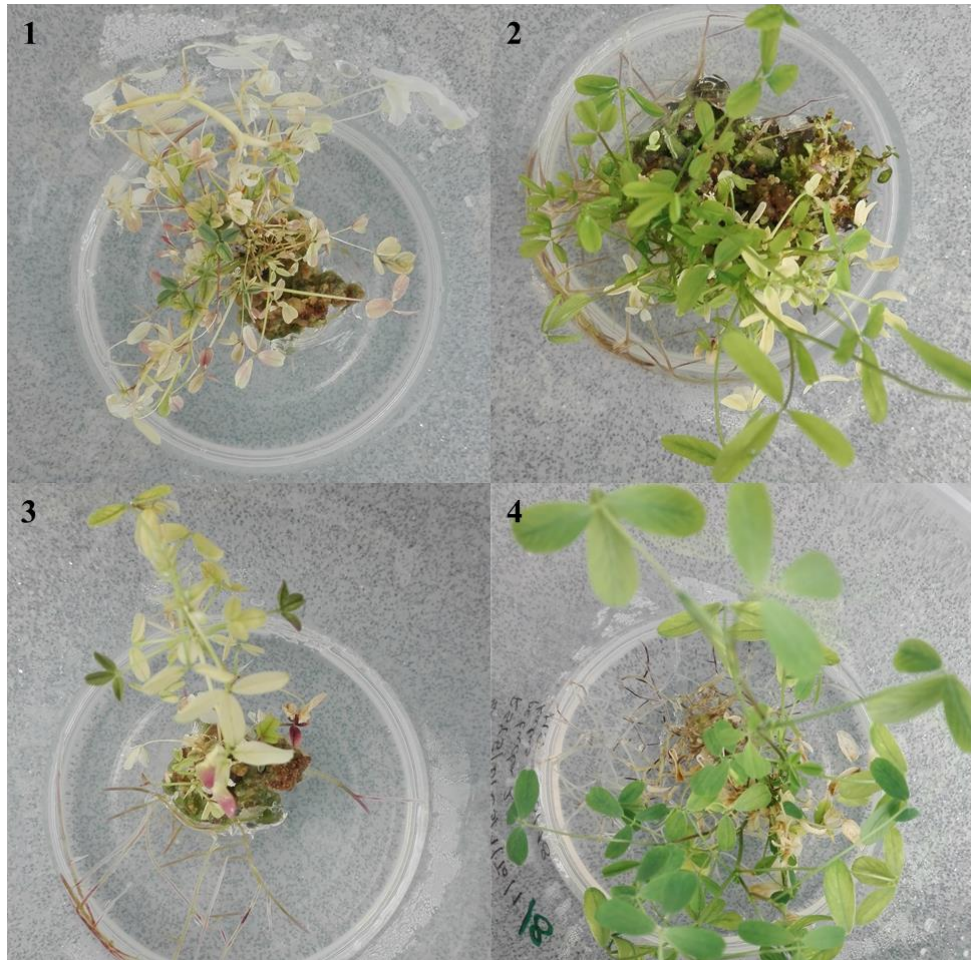
Rostlinný materiál byl propagován pomocí somatické embryogeneze z kultivaru RSY sloužícího jako kontrola a *SIMKK RNAi 2A/2* transgenních linií se sníženou expresí genu *SIMKK* (Obr. 4). Očekávalo se, že rostliny budou geneticky identické v porovnání s rodičovskými rostlinami. V důsledku možné somaklonální variability, která může nastat v průběhu regenerace v celistvou rostlinu ze somatických embryí, lze vzniklé rostliny brát jako samostatné nové linie pěstované *in vitro*.

Expresie určitých genů a následně i proteinů může u těchto rostlin probíhat v jiné míře oproti rodičovským rostlinám. Regenerované rostliny vykazovaly různé fenotypové anomálie. V průběhu jejich růstu v kultivačních médiích byl pozorován u některých rostlin malý nárůst kořenového systému (Obr. 5). Fenotypové odlišnosti byly patrné u kontrolních i transgenních rostlin. Variabilita se vyskytovala nejen v porovnání rostlin různých linií, ale i v rámci jedné linie docházelo k morfologickým rozličnostem.



Obr. 4 Kultivace rostlinného materiálu (*M. sativa*) na růstových médiích 1. B5H – dediferenciace somatických buněk listu a tvorba kalusu; 2. B50 - rediferenciace a tvorba somatických embryí; 3. MMS - zakořenění somatických embryí; 4. MS - regenerace somatických embryí v celou rostlinu

Rozdíly při regeneraci rostlin transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie a rostlin kultivaru RSY použitých jako kontrola nejsou v průběhu dediferenciace a rediferenciace natolik patrné. Embrya jsou anatomicky téměř shodná. Ke změnám dochází až při kultivaci na MS médiu, kdy některé rostliny vytváří kořenový systém více vyvinutý a daleko rychleji než ostatní rostliny stejné linie (Obr. 4). Embrya, která jsou nejvíce viabilní, jsou použita pro následné analýzy.



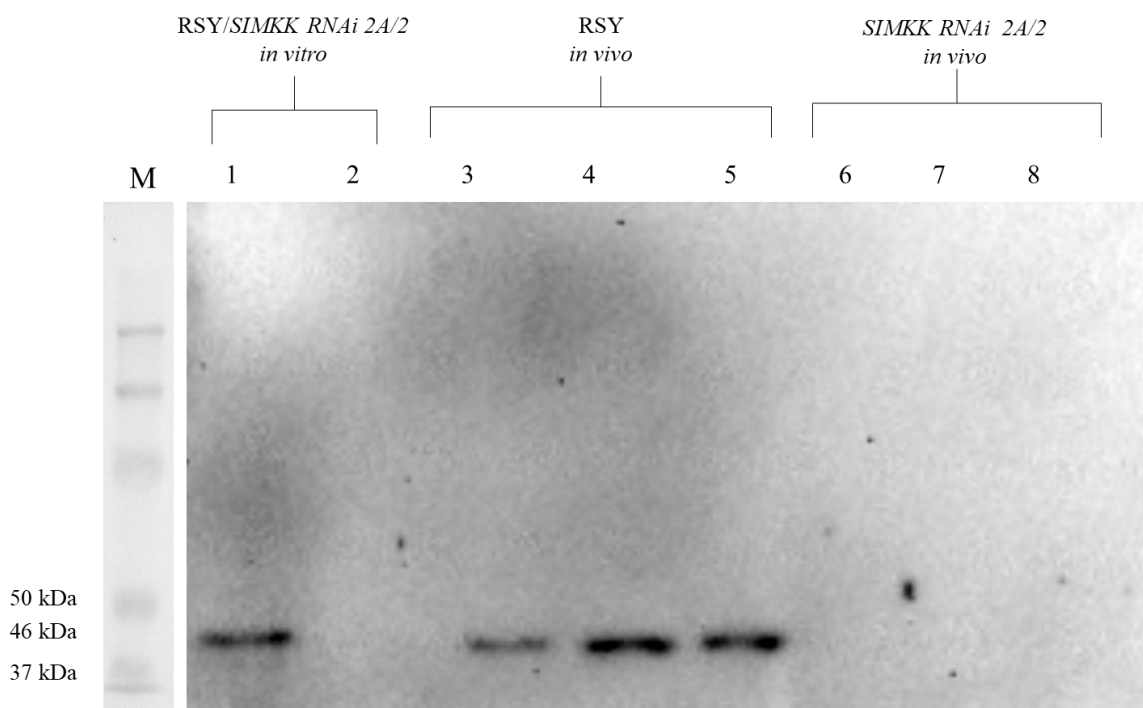
Obr. 5 Fenotypy *in vitro* regenerovaných rostlin. 1. regenerant z *in vivo* kultivované mateřské rostliny *SIMKK RNAi 2A/2* linie; 2. regenerant z *in vivo* kultivované mateřské rostliny (RSY) sloužící jako kontrola; 3. regenerant z *in vitro* kultivované mateřské rostliny *SIMKK RNAi 2A/2* linie; 4. regenerant z *in vitro* kultivované mateřské rostliny (RSY) sloužící jako kontrola

Transgenní regenerované rostliny *SIMKK RNAi 2A/2* linie vypadají celkově méně viabilní než rostliny kultivaru RSY sloužící jako kontrola. Je patrné, že v těchto transgenních rostlinách dochází ke snížení obsahu chlorofylu v listech, a také k menšímu vývinu kořenového systému oproti kontrolním rostlinám, ačkoliv byly kultivovány od počátku ve stejných podmínkách nastavených v kultivační místnosti. Kontrolní i transgenní rostliny regenerované z *in vitro* kultivované mateřské rostliny vytvářely kořenový systém lépe než porovnatelné rostliny z *in vivo* kultivované mateřské rostliny.

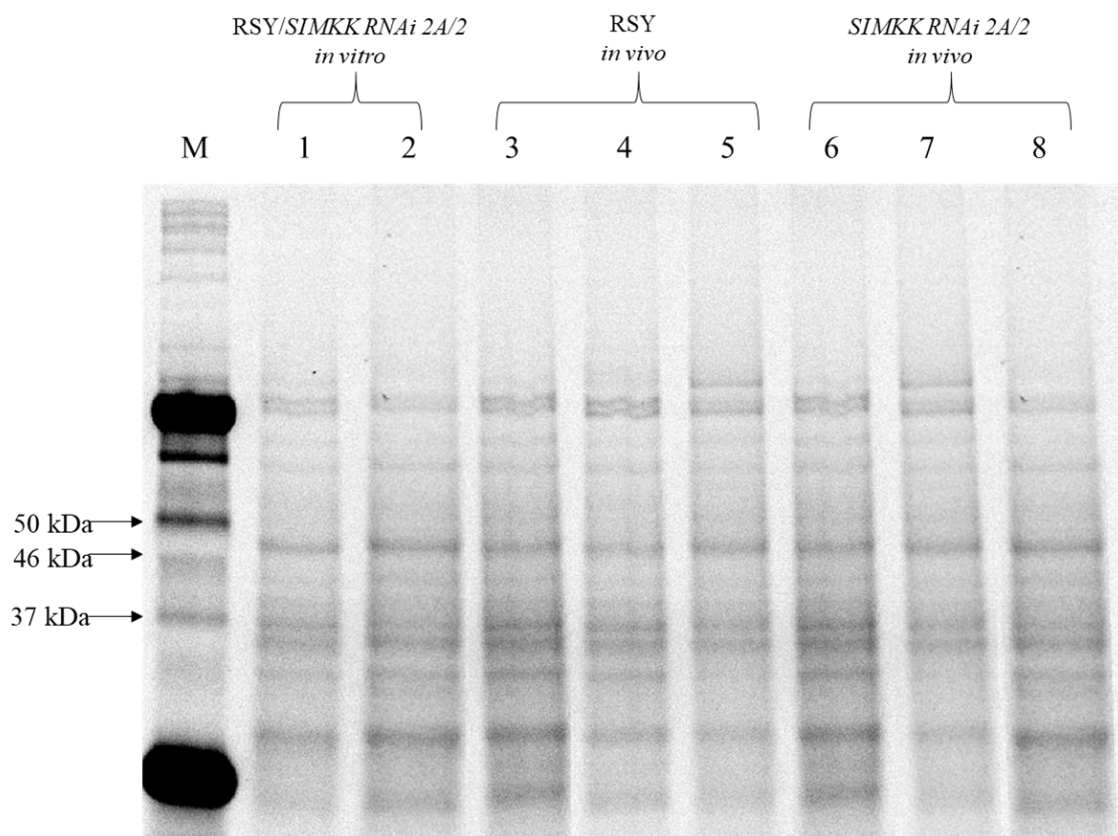
## 4.2 Western blot analýza

### 4.2.1 Abundance SIMK v kořenech *M. sativa*

Výsledky z měření abundance SIMK v kořenech transgenních *SIMKK RNAi 2A/2* liniích a kontrolního kultivaru RSY regenerovaných rostlin sloužící jako kontrola z příslušných mateřských rostlin *M. sativa* pěstovaných v *in vitro* a *in vivo* podmínkách přispívají již ke zjištěné asociaci MAPKs SIMKK a SIMK. Úroveň exprese SIMKK v buňce ovlivňuje aktivitu a množství v kaskádě podřazené SIMK.

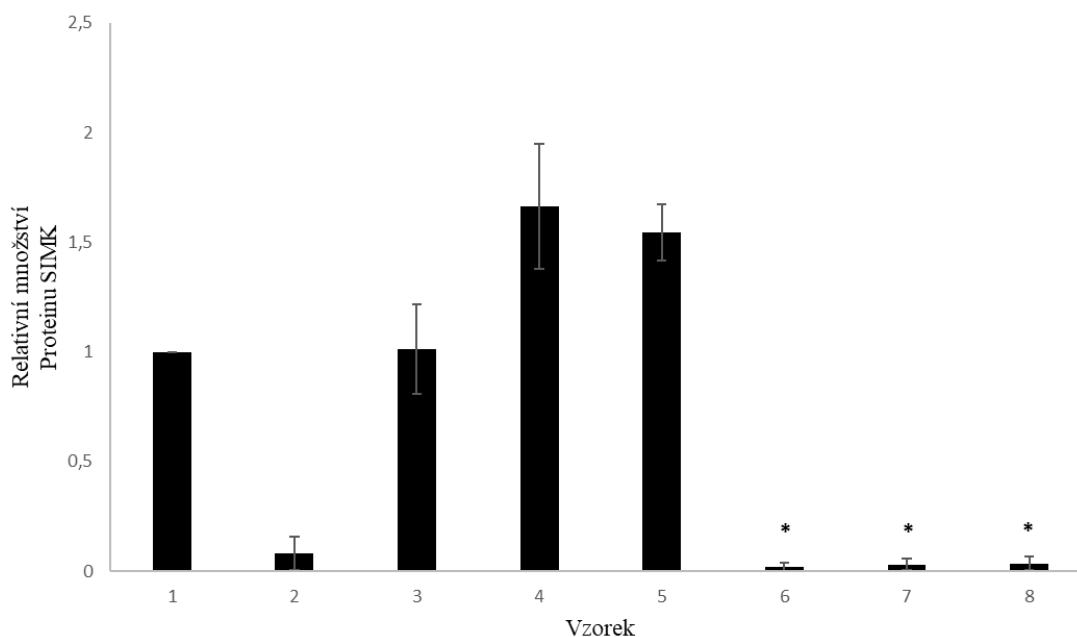


Obr. 6 Protein SIMK detekován protilátkou anti-AtMPK6 (homolog k SIMK), typické pásy se nachází v oblasti 46 kDa, což je molekulová hmotnost SIMK. Ve sloupci 1 je vzorek proteinů z kontrolního kořene (RSY) připraven jako suchá kontrola (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vitro*). Ve sloupci 2 odpovídající *SIMKK RNAi 2A/2* linie připravena jako suchá kontrola (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vitro*). Ve sloupcích 3, 4 a 5 je opět RSY linie (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vivo*). V případě sloupce 3 se jedná o suchou kontrolu, 4 mokrá kontrola, kdy byly kořeny před extrakcí inkubovány 30 min v tekutém ½ MS médiu a v 5 sloupci byly kořeny před extrakcí inkubovány 30 min v ½ MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. Ve sloupcích 6, 7 a 8 jsou vzorky proteinů z kořenů *SIMKK RNAi 2A/2* (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vivo*). Ve sloupci 6 suchá kontrola, ve sloupci 7 mokrá kontrola, kdy byly kořeny rostliny před extrakcí inkubovány 30 min v tekutém ½ MS médiu. Ve sloupci 8 byly naneseny proteiny, kdy byly kořeny před extrakcí proteinů inkubovány 30 min v ½ MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. M – je marker molekulových hmotností.



Obr. 7 Kontrola nanesení proteinů na gel (Stain free gel TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions) odpovídající membráně Obr. 6 pro detekci SIMK proteinu.

V *SIMKK RNAi 2A/2* liniích, ať už se jedná o regeneranty z *in vitro* nebo *in vivo* podmínek, je patrné, že došlo ke snížení abundance proteinu SIMK v kořenech v důsledku utlumení její nadřazené MAPKK (*SIMKK*) u původních rostlin (Obr. 6). U kontrolních rostlin lze vidět, že dochází ke zvýšení množství SIMK v kořeni při působení stresových podmínek. Oproti suché kontrole, která nebyla vystavena působení stresu se zvyšuje její množství v podmínkách působení ½ MS média po dobu 30 min (Obr. 6, sloupec 4). K tomu dochází díky přítomnosti sacharosy v médiu, která může způsobovat osmotický stres. Zvýšenou abundancí můžeme také zaznamenat po působení oxidativního stresu navozeným ½ MS médiem s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM při době působení 30 min. Při porovnání kořenových buněk rostlin kontrolních RSY linií regenerovaných z rostlin rostoucích v *in vitro* a *in vivo* podmínkách, na které nebyl aplikován stresový stimul je vidět, že dochází k mírnému zvýšení množství SIMK u *in vitro* rostlin (Obr. 6). Specifický signál odpovídající SIMK je patrný jen v těchto liniích, ačkoliv protein odpovídající této molekulové hmotnosti je dle kontroly nanesení patrný ve všech sloupcích (Obr. 7). Jedná se nejspíše o jiné proteiny.



Obr. 8 Relativní množství proteinu SIMK ve vzorcích kořenů rostlin kultivaru RSY původně z mateřských rostlin pěstovaných v *in vivo* a *in vitro* podmínkách použitých jako kontrola a regenerantů transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie původně z mateřské rostliny z *in vitro* a *in vivo* podmínek. Relativní množství proteinu je srovnáno s kontrolním vzorkem (vzorek 1). Vzorek 1 odpovídá regenerantu kontrolní rostliny kultivaru RSY původně pěstované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorek 2 *SIMKK RNAi 2A/2* původem z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorky 3, 4 a 5 jsou kontrolní rostliny kultivaru RSY původem z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 3 – suchá kontrola, 4 –30 min v ½ tekutém MS médiu, 5 –30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). Vzorky 6, 7 a 8 odpovídají regenerantům *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 6 – suchá kontrola, 7 –30 min v ½ tekutém MS médiu, 8 –30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). (\* -výsledek s p ≥ 0,05)

Z grafu, který byl vyhotoven z dat sbíraných ze tří biologických replik je patrné, že dochází ke zvýšení abundance SIMK v kořenech vojtěšky seté (*M. sativa*) při podmínkách mokré kontroly a podmínkách stresu navozeném 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kořenů rostlin kultivaru RSY sloužící jako kontrola regenerovaných z *in vivo* kultivované mateřské rostliny oproti suché kontrole. U regenerantů rostlin *SIMKK RNAi 2A/2* linie dochází ke snížení abundance SIMK. V případě *in vivo* regenerantů, kdy nebyl detekován téměř žádný signál, je možné vidět téměř úplné vyřazení proteinu SIMK na proteomické úrovni.

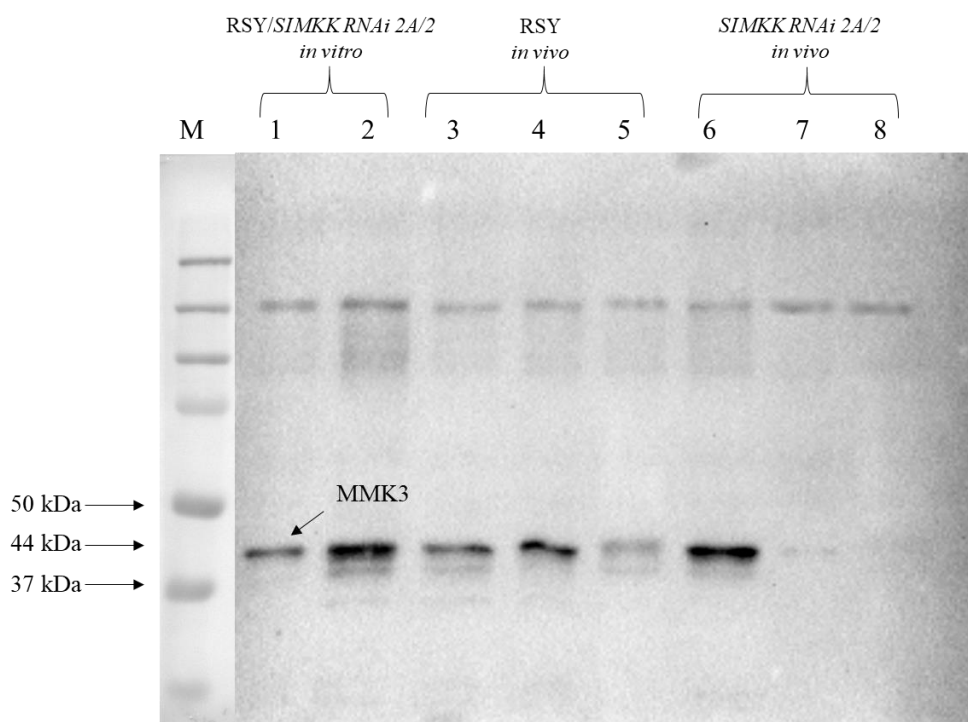
Oproti kontrolní rostlině kultivaru RSY z mateřské *in vitro* kultivované rostliny v podmínkách suché kontroly je v kořenech rostliny *SIMKK RNAi 2A/2* transgenní linie snižená abundance proteinu SIMK přibližně o 90 %.

Umlčení genu *SIMKK* v transgenních liniích vede ke snížení abundance v kaskádě podřazeného proteinu SIMK v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 8). Z výsledků je možné usuzovat, že se množství proteinu zvyšuje v podmínkách mokré kontroly navozenými tekutým ½ MS médiem při 30 min trvání, které může způsobovat osmotický stres, než při působení ½ MS média s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM způsobující oxidativní stres. Tento výsledek však není díky statistické odchylce zcela signifikantní a byla by třeba provést opakovaná měření.

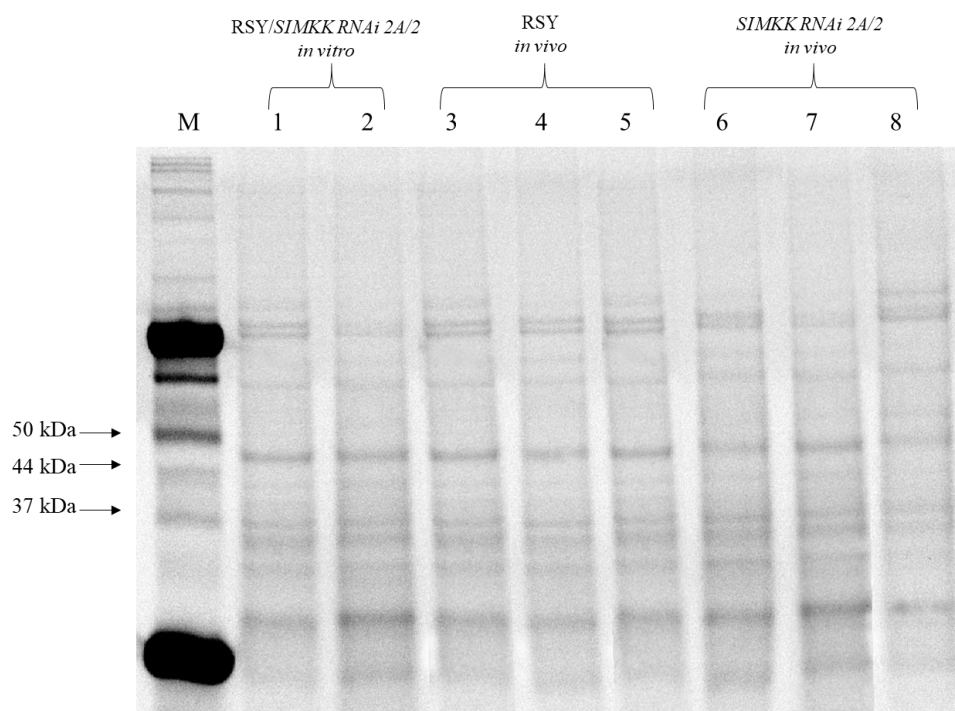


#### 4.2.2 Abundance MMK3 v kořenech *M. sativa*

SIMKK, jak je známo, aktivuje v MAPK kaskádě podřazenou MAPK MMK3. Při podmínkách stresu by se množství nadřazené SIMKK a následně i MMK3 mělo zvyšovat. Výsledky pro potvrzení této skutečnosti však neodpovídají očekávání. V experimentech jsou porovnávány regenerantní kontrolní rostliny RSY linie z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* i *in vivo* podmínkách s transgenními rostlinami *SIMKK RNAi 2A/2* linie, taktéž připravených z mateřských *in vitro* a *in vivo* kultivovaných rostlin.



Obr. 9 Protein MMK3 detekovaný protilátkou anti-MMK3, typické pásy se nachází v oblasti 44 kDa, což je molekulová hmotnost MMK3. Ve sloupci 1 je vzorek proteinů z kontrolního kořene (RSY) připraven jako suchá kontrola (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vitro*). Ve sloupci 2 odpovídající *SIMKK RNAi 2A/2* linie připravena jako suchá kontrola (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vitro*). Ve sloupcích 3, 4 a 5 je opět kontrolní RSY linie (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vivo*). V případě sloupce 3 se jedná o suchou kontrolu, 4 mokrá kontrola, kdy byly kořeny před extrakcí inkubovány na 30 min v tekutém ½ MS médiu a v 5 sloupci byly kořeny před extrakcí inkubovány 30 min v ½ MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. Ve sloupcích 6,7 a 8 jsou vzorky proteinů z kořenů *SIMKK RNAi 2A/2* (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vivo*). Ve sloupci 6 suchá kontrola, ve sloupci 7 mokrá kontrola, kdy byly kořeny rostliny před extrakcí inkubovány 30 min v tekuté ½ MS médiu. Ve sloupci 8 byly naneseny proteiny, kdy byly kořeny před extrakcí proteinů inkubovány 30 min v ½ MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. M – je marker molekulových hmotností.

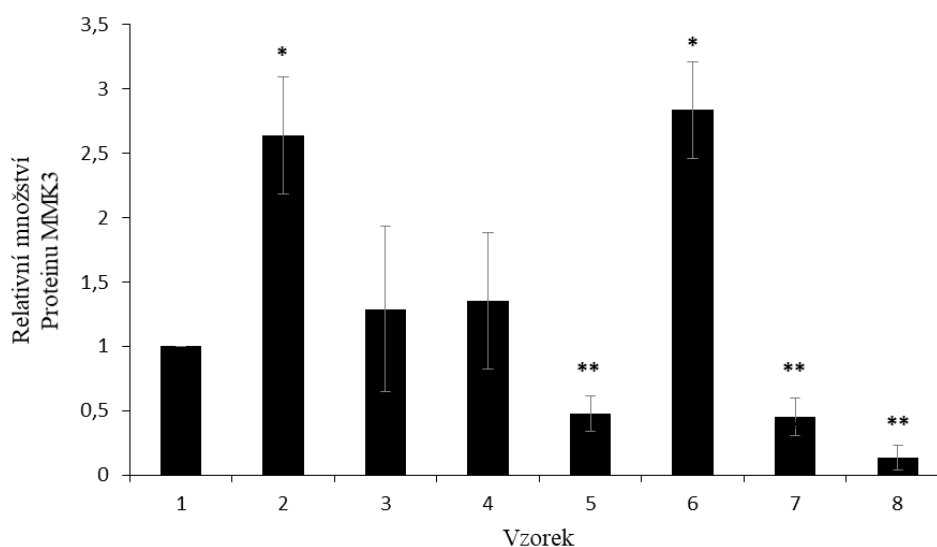


Obr. 10 Kontrola nanesení proteinů na gel (Stain free gel TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions) odpovídající membráně Obr. 9 pro detekci MMK3 proteinu.

Z výsledků proteomické Western blot analýzy s anti-MMK3 primární protilátkou (Obr. 9) je patrné, že došlo v kořenových buňkách regenerantů rostlin *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské *in vitro* kultivované rostliny ke zvýšení množství proteinu MMK3 v podmínkách suché kontroly v porovnání s rostlinami kultivaru RSY sloužících jako kontrola ve stejných podmínkách. Stejný trend můžeme pozorovat i u transgenní linie v případě regenerantů z *in vivo* rostliny v suché kontrole, kdy je zastoupení MMK3 nejvyšší. Z grafu je patrné, že množství MMK3 v transgenní linii je až 2,5x vyšší v porovnání s odpovídající kontrolní rostlinou (Obr. 11). U regenerantů kontrolních rostlin kultivaru RSY z *in vivo* kultivované mateřské rostliny dochází v porovnání s *in vitro* kontrolní rostlinou k mírnému zvýšení abundance MMK3 při podmínkách suché kontroly, což však není zcela signifikantní díky statistické odchylce tohoto měření. Při působení tekutého ½ MS média dochází u kontrolních rostlin k možnému vzrůstu množství MMK3. To však není ze získaných dat zcela signifikantní, bylo by třeba tento experiment zopakovat ve více vyhotoveních. Při působení oxidativního stresu můžeme pozorovat až dvojnásobné snížení v porovnání se suchou kontrolou. K tomuto snížení mohlo dojít v důsledku dlouhého působení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

U regenerantů *SIMKK RNAi 2A/2* z *in vivo* pěstované mateřské rostliny dochází k velkému poklesu množství MMK3 v podmínkách mokré kontroly (Obr. 9, sloupec 7) a ještě více při působení stresu (Obr. 9, sloupec 8). Tento výsledek tak koreluje s trendem patrným u kontrolních rostlin kultivaru RSY regenerovaných z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* podmínkách (Obr. 9, sloupec 3, 4 a 5).

Z Western blot analýzy (Obr. 9) je však patrné, že primární protilátka anti-MMK3 se váže i nespecificky na jiné proteiny na PVDF membráně. V průběhu experimentů bylo zjištěno, že protilátka ztrácí postupem času svoji aktivitu. Na začátku experimentů se vážala na proteiny ukotvené na membráně bez problémů, ale postupem času se její vazebná schopnost snížila. Snížení vazebné schopnosti této protilátky se projevilo tím, že při pořízení snímku v dokumentačním zařízení se jevila membrána čistá, bez proteinů v typické oblasti molekulové hmotnosti 44 kDa, která odpovídá MMK3, a to i přesto, že protein nanesen byl v přibližně stejném množství (Obr. 10). I z tohoto důvodu byl navrhnout experiment kvantitativní PCR zjišťující množství transkriptu genu *MMK3*.



Obr. 11 Relativní množství proteinu MMK3 ve vzorcích kořenů rostlin kultivaru RSY původně z mateřských rostlin pěstovaných v *in vivo* a *in vitro* podmínkách použitých jako kontrola a kořenů transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie původně z mateřské rostliny z *in vitro* a *in vivo* podmínek. Relativní množství proteinu je srovnáno s kontrolním vzorkem (vzorek 1). Vzorek 1 odpovídá regenerantu kontrolní rostliny kultivaru RSY původně pěstované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorek 2 *SIMKK RNAi 2A/2* původem z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorky 3, 4 a 5 jsou kontrolní rostliny kultivaru RSY původem z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 3 – suchá kontrola, 4 –30 min v ½ tekutém MS médiu, 5 –30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). Vzorky 6, 7 a 8 odpovídají regenerantům *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 6 – suchá kontrola, 7 –30 min v ½ tekutém MS médiu, 8 –30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). (\* - výsledek s  $p \geq 0,05$ ; \*\* - výsledek s  $p \geq 0,005$ )

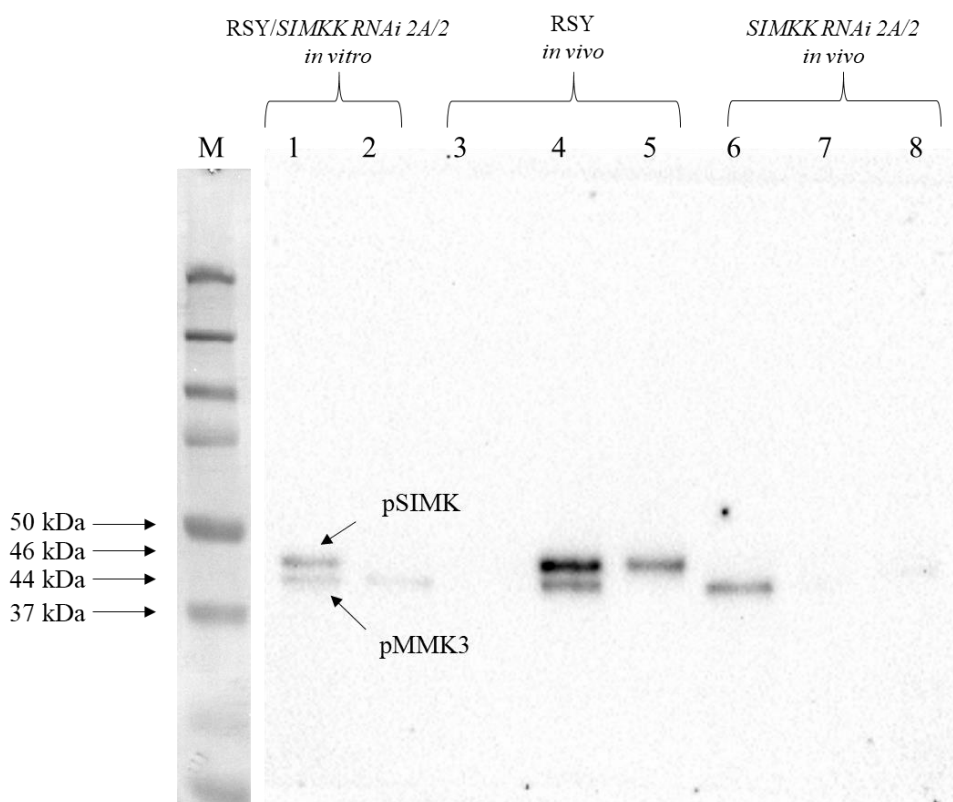
### 4.2.3 Aktivita MMK3 a SIMK v kořenech *M. sativa*

Celková aktivita MAPKs SIMK a MMK3 měřená dle abundance fosforylovaných forem těchto proteinů v kořenových buňkách rostlin pomocí fosfospecifické primární Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) protilátky vykazuje odlišnosti oproti očekávaným výsledkům. Míra aktivity se projevuje zvýšeným či sníženým výskytem fosforylovaných forem těchto MAPKs. Zvýšení fosforylace zde měřených SIMK a MMK3 u kultivaru RSY používaného jako kontrolní rostlina by se mělo, dle dříve vyhotovených prací zabývajících se touto tematikou, projevit ve stresových podmínkách.

Celková abundance fosforylovaných forem SIMK a MMK3 by měla být tedy při oxidativním stresu vyšší oproti rostlinám v podmínkách suché kontroly (Bekešová *et al.*, 2015). Mírné zvýšení abundance fosforylované formy MAPKs bylo očekáváno i při mokré kontrole oproti suché kontrole. Největší aktivita však byla očekávána při působení oxidativního stresu. U transgenních linií, které mají sníženou expresi nadřazené SIMKK mělo docházet zhruba k poloviční aktivaci SIMK a MMK3 v porovnání s příslušnými kontrolními rostlinami kultivaru RSY.

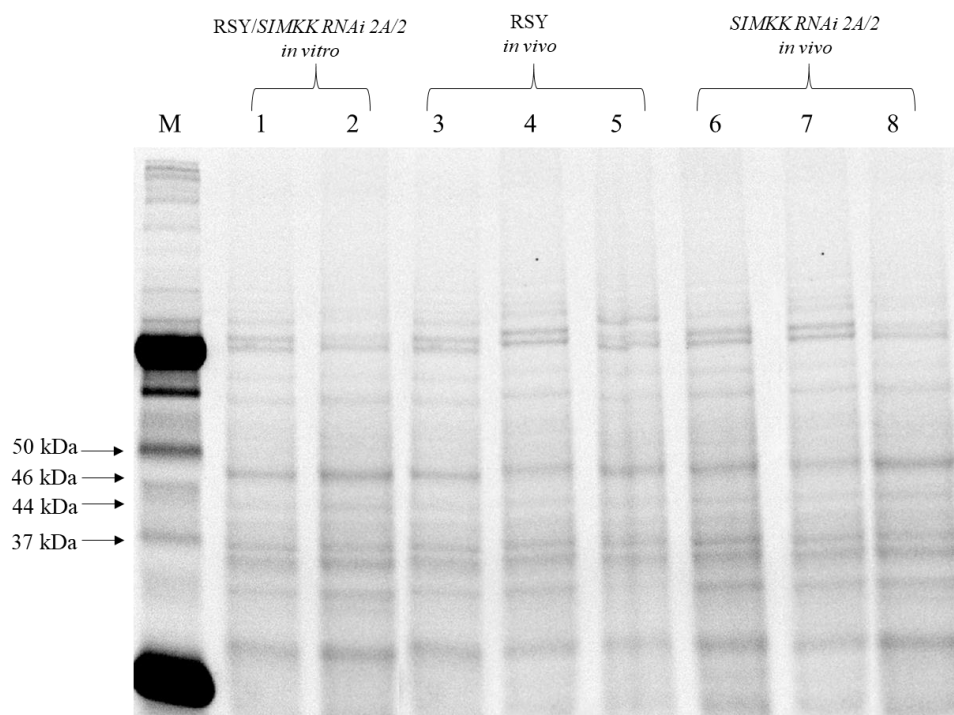
#### 4.2.3.1 Aktivita SIMK v kořenech *M. sativa*

Měření aktivity proteinů SIMK ve vzorcích z kořenů regenerantů pomocí fosfospecifické Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) primární protilátky (Obr. 12) naznačuje, že nejvyšší zastoupení fosforylované formy této MAPK je detekována v kořenech rostlin kultivaru RSY, zde použitého jako kontrola, při podmínkách mokré kontroly, a to i ve srovnání se stresovými podmínkami navozenými tekutým ½ MS médiem s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM po dobu 30 min.



Obr. 12 Proteiny pSIMK a pMMK3 detekovány fosfospecifickou protilátkou Phospho p44/p42 MAPK (Erk1/2), typické pásy pSIMK se nachází v oblasti 46 kDa, což je přibližná molekulová hmotnost pSIMK. Typické pásy pro pMMK3 se nachází v oblasti 44 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti pMMK3. Ve sloupci 1 je vzorek proteinů z kořene kontrolní rostliny (RSY) připraven jako suchá kontrola (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vitro*). Ve sloupci 2 odpovídající *SIMKK RNAi 2A/2* linie připravena jako suchá kontrola (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vitro*). Ve sloupcích 3, 4 a 5 je opět kontrolní RSY linie (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vivo*). V případě sloupce 3 se jedná o suchou kontrolu, 4 mokrá kontrola, kdy byly kořeny před extrakcí inkubovány 30 min v tekutém ½ MS médiu a v 5 sloupci byly kořeny před extrakcí inkubovány 30 min v ½ MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. Ve sloupcích 6,7 a 8 jsou proteiny z kořenů *SIMKK RNAi 2A/2* (regenerant z mateřské rostliny pěstované *in vivo*). Ve sloupci 6 suchá kontrola, ve sloupci 7 mokrá kontrola, kdy byly kořeny rostliny před extrakcí inkubovány 30 min v tekuté ½ MS médiu. Ve sloupci 8 byly naneseny proteiny, kdy byly kořeny před extrakcí proteinů inkubovány 30 min v ½ MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. M – je marker molekulových hmotností.

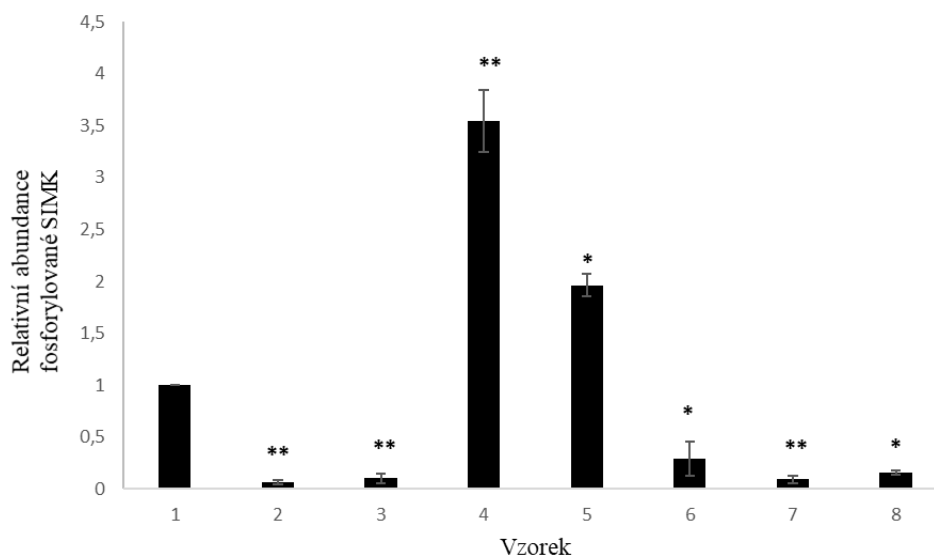
Tento výsledek je možná způsobený dlouhým časovým intervalem působení stresu. Po 30 min působení stresu může docházet ke zpětné defosforylaci MAPKs. Při podmínkách suché kontroly u regenerantů z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* podmínkách kultivaru RSY je signál minimální, což značí, že SIMK nebyla natolik fosforylována v kontrolních podmínkách. Její množství bylo přibližně stejné jako u ekvivalentní rostliny kultivaru RSY regenerované z mateřské rostliny pěstované *in vitro* podmínkách (Obr. 8; Obr. 14). Množství naneseného proteinu bylo téměř stejné (Obr. 13).



Obr. 13 Kontrola nanesení proteinů na gel (Stain free gel TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions) odpovídající membráně Obr. 12 pro detekci fosforylovaných forem SIMK a MMK3 pomocí Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) fosfospecifické primární protilátky

U transgenních rostlin *SIMKK RNAi 2A/2* linií připravených z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* podmínkách můžeme vidět snížené množství pSIMK v kořenech suché kontroly zhruba o polovinu oproti kořenům suché kontroly rostlin RSY regenerovaných z rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách. Kořeny transgenní linie vykazovaly nižší množství pSIMK i při podmínkách mokré kontroly a oxidativním stresu v porovnání se suchou kontrolou *SIMKK RNAi 2A/2* linií (Obr. 14).

Dochází také k očekávanému snížení množství pSIMK v buňkách kořene regenerantů transgenní linie z *in vitro* pěstované mateřské rostliny, kdy byly vzorky kořenů odebrány v podmínkách suché kontroly, vůči odpovídající kontrolní rostlině regenerované také z mateřské rostliny kultivaru RSY pěstované v *in vitro* podmínkách. To je způsobené i celkovou nižší abundancí SIMK v kořenech transgenních rostlin.



Obr. 14 Relativní množství fosforylovaného proteinu pSIMK ve vzorcích kořenů rostlin kultivaru RSY původně z mateřských rostlin pěstovaných v *in vivo* a *in vitro* podmínkách použitých jako kontrola a kořenů transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie původně z mateřské rostliny z *in vitro* a *in vivo* podmínek. Relativní množství proteinu je srovnáno s kontrolním vzorkem (vzorek 1.). Vzorek 1 odpovídá regenerantu kontrolní rostliny kultivaru RSY původně pěstované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorek 2 *SIMKK RNAi 2A/2* původem z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorky 3, 4 a 5 jsou kontrolní rostliny kultivaru RSY původem z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 3 – suchá kontrola, 4 – před extrakcí 30 min v ½ tekutém MS médiu, 5 – 30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). Vzorky 6, 7 a 8 odpovídají regenerantům *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 6 – suchá kontrola, 7 – 30 min v ½ tekutém MS médiu, 8 – 30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). (\* - výsledek s  $p \geq 0,05$ ; \*\* - výsledek s  $p \geq 0,005$ )

#### 4.2.3.2 Aktivita MMK3 v kořenech *M. sativa*

Abundance fosforylované aktivní formy pMMK3 byla nejvyšší v kořenech *SIMKK RNAi* 2A/2 linie regenerované z *in vivo* kultivované mateřské rostliny v suché kontrole. Množství pMMK3 bylo až 3x vyšší v porovnání se suchou kontrolou rostliny kultivaru RSY regenerovanou z mateřské rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách (Obr. 15, sloupec 1). Poté v podmínkách mokré kontroly a oxidativního stresu, který byl aplikován na rostliny po dobu 30 min, množství pMMK3 u těchto transgenních linií z *in vivo* mateřské rostliny signifikantně výrazně klesá.

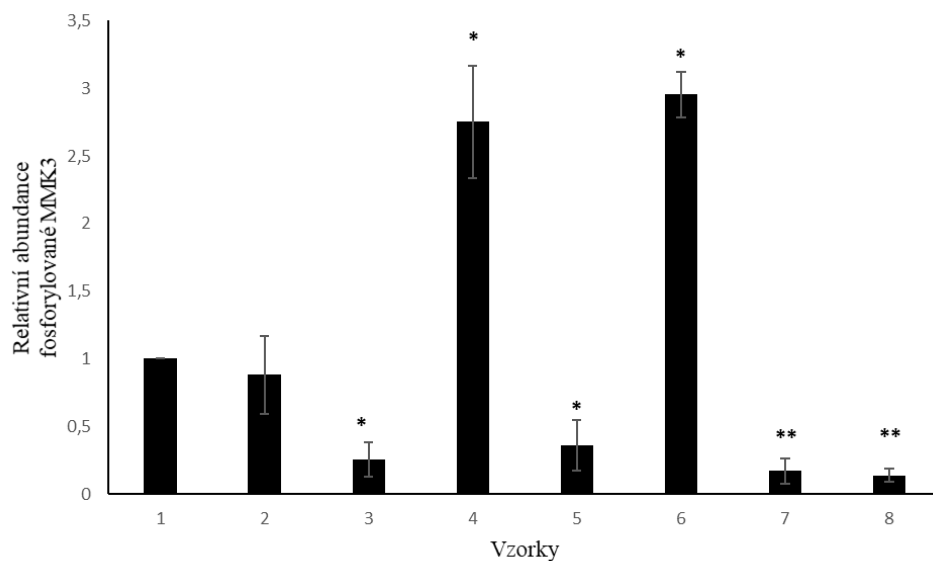
Kořeny transgenních rostlin regenerovaných z mateřské rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách v suché kontrole vykazují jen mírně sníženou abundanci pMMK3 v porovnání s ekvivalentní suchou kontrolou kultivaru RSY. Toto snížení však není statisticky signifikantní.

Na první pohled lze vidět, že dochází ke sníženému množství pMMK3 v kořenech kontrolní rostliny kultivaru RSY regenerované z *in vivo* pěstované mateřské rostliny. S největší pravděpodobností vlivem působení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po dobu 30 min, což má za následek opětovné navrácení abundance aktivované MMK3 na bazální hladinu. Kořeny kultivaru RSY regenerované z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* podmínkách ve vzorku odpovídajícímu mokré kontrole vykazuje zvýšenou abundanci pMMK3 oproti suché kontrole i oxidativnímu stresu.

Zvýšení kvantity pMMK3 je také patrné v suché kontrole transgenních rostlin (Obr. 15, sloupec 6). Rostlinná buňka si tímto nejspíše kompenzuje menší množství transkriptu genu *MMK3* (Obr. 16). Protein v aktivní podobě není odbouráván, aby byla zajištěna určitá hladina signalizačních MAPKs. Tato hypotéza by mohla sloužit jako námět pro další studie.

Pro zachycení, kdy je abundance pSIMK i pMMK3 nejvyšší, by bylo vhodnější odebírat materiál v časových intervalech 0, 10, 20 a 30 min. V důsledku nedostatku použitelného rostlinného materiálu však k experimentům s časovými intervaly působení stresu nemohlo dojít.

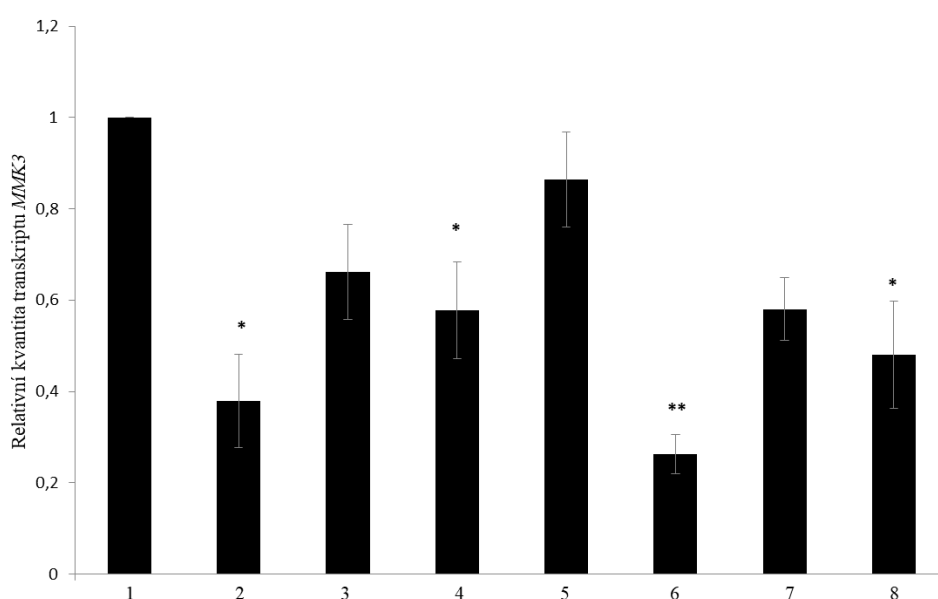




Obr. 15 Relativní množství fosforylovaného proteinu pMMK3 ve vzorcích kořenů rostlin kultivaru RSY původně z mateřských rostlin pěstovaných v *in vivo* a *in vitro* podmínkách použitých jako kontrolní rostliny a kořenů transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie původně z mateřské rostliny z *in vitro* a *in vivo* podmínek. Relativní množství proteinu je srovnáno s kontrolním vzorkem (vzorek 1). Vzorek 1 odpovídá regenerantu rostliny kultivaru RSY původně pěstované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorek 2 *SIMKK RNAi 2A/2* původem z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorky 3, 4 a 5 jsou kontrolní rostliny kultivaru RSY původem z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 3 – suchá kontrola, 4 – před extrakcí 30 min v ½ tekutém MS médiu, 5 – 30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). Vzorky 6, 7 a 8 odpovídají regenerantům *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 6 – suchá kontrola, 7 – 30 min v ½ tekutém MS médiu, 8 – 30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). (\* - výsledek s  $p \geq 0,05$ ; \*\* - výsledek s  $p \geq 0,005$ )

### 4.3 Kvantitativní PCR reakce

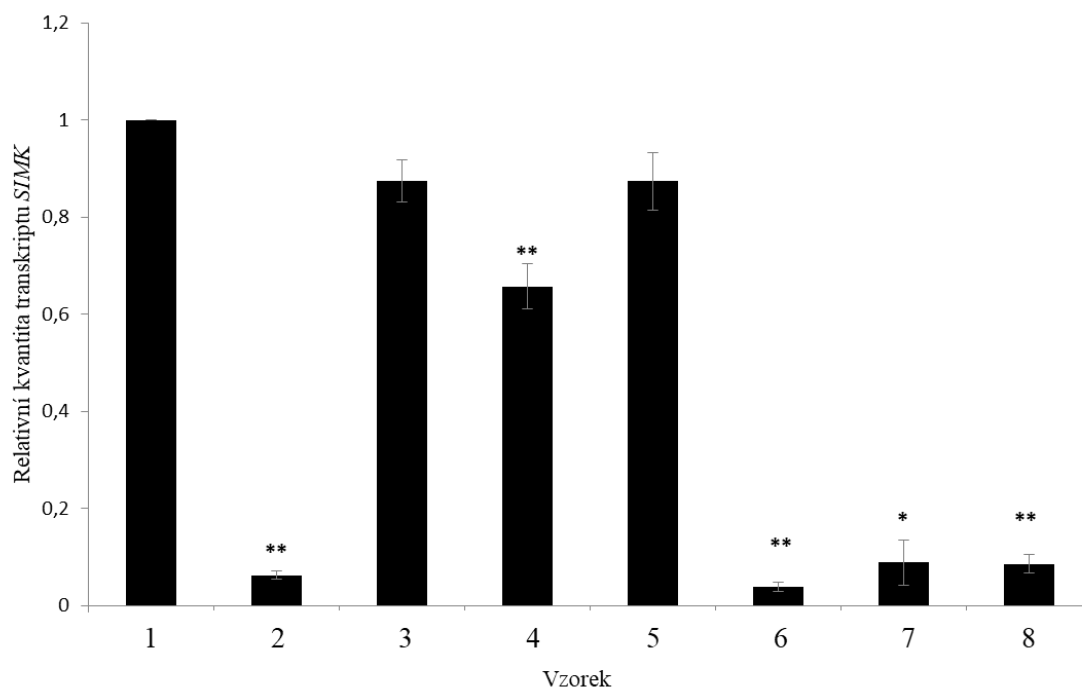
Experiment kvantitativní PCR reakce byl vyhotoven pro podložení výsledků z proteomické analýzy na úrovni transkriptu genů pro proteiny SIMK a MMK3. Výsledky jsou řazeny a porovnávány ve stejném duchu jako při Western blot analýze. Jako referenční gen byl použit *ACT2* kódující v rostlinných buňkách aktin. Jeho použití je opodstatněné, jelikož by měla být jeho exprese v rozličných podmínkách konstantní. Pro správný průběh reakcí qPCR byly příchozí primery testovány na efektivitu. Výsledky z této zkoušky však nejsou součástí této práce.



Obr. 16 Kvantifikace transkriptu genu *MMK3* ve vzorcích kořenů kultivaru RSY původně z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* a *in vitro* podmínkách použitých jako kontrola a kořenů transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie původně z mateřské rostliny pěstované v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Relativní množství transkriptu je srovnáno s kontrolním vzorkem (vzorek 1). Vzorek 1 odpovídá regenerantu kontrolní rostliny kultivaru RSY původně pěstované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorek 2 *SIMKK RNAi 2A/2* původem z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorky 3, 4 a 5 jsou kontrolní rostliny kultivaru RSY původem z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 3 – suchá kontrola, 4 –30 min v ½ tekutém MS médiu, 5 –30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). Vzorky 6, 7 a 8 odpovídají regenerantům *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 6 – suchá kontrola, 7 –30 min v ½ tekutém MS médiu, 8 –30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). (\* - výsledek s  $p \geq 0,05$ ; \*\* - výsledek s  $p \geq 0,005$ )

Výsledky z kvantitativní PCR genu *MMK3* jsou porovnávány k suché kontrole kultivaru RSY, zde sloužící jako kontrolní rostliny stejně tak jako u Western blot analýzy. U transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie (*in vitro*) došlo ke snížení exprese mRNA zhruba o polovinu v porovnání s kontrolou (Obr. 16). Podobné hodnoty můžeme vidět i u transgenních rostlin s původem mateřské rostliny z *in vivo* podmínek. Tyto dva vzorky naopak vykazují při proteomické analýze vyšší abundanci proteinu MMK3, což je zapříčiněno nejspíše tím, že se protein tak rychle nedegraduje a zůstává aktivní. V případě suché kontroly RSY linie (*in vivo*) dochází ke snížení exprese mRNA oproti stejné rostlině původem z *in vitro* podmínek. V případě mokré kontroly u RSY linie (*in vivo*) je exprese v porovnání se suchou kontrolou přibližně stejná a zvyšuje se při působení oxidativního stresu, ale pořád je nižší než u kontrolního vzorku. Statisticky potvrzené je více jak poloviční snížení úrovně exprese *MMK3* u transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie oproti kontrole z *in vivo* mateřských rostlin. V případě mokré kontroly u transgenních *in vivo* linií dochází k vyšší expresi než u rostlin vystavených oxidativnímu stresu, což však není z dostupných měření zcela signifikantní. Možné vysvětlení tohoto snížení je negativní ovlivnění exprese při delším působení stresu.

Při porovnání výsledků z proteomické analýzy MMK3 (Obr. 11) a qPCR (Obr. 16) transkriptu genu *MMK3* je možné vidět určitý vzor chování buňky. Pokud dojde ke snížení exprese na úrovni transkripce, protein je v kořenech zvýšeně abundantní a nedochází zřejmě k jeho degradaci (Obr. 11, sloupec 2; Obr. 16, vzorek 2). Pokud však nastane zvýšení relativní úrovně transkriptu, dochází ke snížení abundance proteinu (Obr. 11, sloupec 5; Obr.16, vzorek 5). Tato sledování však nemusí být zcela ve shodě v důsledku špatné funkčnosti protilátky anti-MMK3 a jejímu nespecifickému vázání v proteomické analýze. Proto můžeme brát data z qPCR jako více validní a informativní.



Obr. 17 Kvantifikace transkriptu genu *SIMK* ve vzorcích kořenů kultivaru RSY původně z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* a *in vitro* podmínkách, použitých jako kontrola a kořenů transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie původně z mateřské rostliny pěstované v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Relativní množství transkriptu je srovnáno s kontrolním vzorkem (vzorek 1). Vzorek 1 odpovídá regenerantu kontrolní rostliny kultivaru RSY původně pěstované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorek 2 *SIMKK RNAi 2A/2* původem z mateřské rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách (suchá kontrola), vzorky 3, 4 a 5 jsou kontrolní rostliny kultivaru RSY původem z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 3 – suchá kontrola, 4 – 30 min v ½ tekutém MS médiu, 5 – 30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). Vzorky 6, 7 a 8 odpovídají regenerantům *SIMKK RNAi 2A/2* linie z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách (vzorek 6 – suchá kontrola, 7 – 30 min v ½ tekutém MS médiu, 8 – 30 min v ½ tekutém MS médiu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 15 mM). (\* - výsledek s  $p \geq 0,05$ ; \*\* - výsledek s  $p \geq 0,005$ )

Relativní exprese genu *SIMK* v kořenech rostlin jak kontrolních RSY liniích, tak i transgenních *SIMKK RNAi 2A/2* liniích je znázorněn v grafu (Obr 17). V případě rostlin kultivaru RSY regenerovaných z mateřských rostlin pěstovaných v *in vitro* i *in vivo* podmínkách připravených jako suché kontroly, mají přibližně stejnou míru exprese *SIMK*. V případě mokré kontroly u rostlin kultivaru RSY došlo k mírnému snížení oproti suché kontrole. Při podmínkách oxidativního stresu vykazovaly buňky kořene kultivaru RSY rostlin nárůst množství *SIMK* oproti mokré kontrole a přibližně stejnou expresi jako v suché kontrole.

Přibližně stejného množství transkriptu *SIMK* dosahují v porovnání mezi sebou i transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie připravené jako suchá kontrola. U transgenních rostlin regenerovaných z mateřské rostliny kultivované v *in vivo* podmínkách došlo k mírnému zvýšení exprese *SIMK* v kořeni ošetřeném tekutým ½ MS médiem oproti suché kontrole stejné transgenní linie. Buňky kořenů vystavené oxidativnímu stresu vykazují zvýšení hodnot oproti suché kontrole u transgenních rostlin. Zároveň vykazovaly přibližně stejné množství *SIMK* v kořenech připravených jako mokrá kontrola. Celkově je patrné, že snížení *SIMKK* v transgenních rostlinách vojtěšky seté (*M. sativa*) vede i ke snížení exprese *SIMK* z čehož můžeme usuzovat, že exprese *SIMK* závisí také na množství *SIMKK*. Tyto dvě MAPK úzce spolupracují při signalizaci exogenních stresových podmínek.

Při porovnání s proteomickou analýzou lze spatřit jistá shoda v množství proteinu *SIMK* a transkriptu *SIMK* ve vzorcích. V případě kontrolních rostlin kultivaru RSY, regenerovaných z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* podmínkách, je patrné podobné množství *SIMK* a proteinu *SIMK* v podmínkách suché kontroly (Obr. 8, sloupec 4; Obr. 17, vzorek 4). Při podmínkách mokré kontroly je patrné vyšší množství proteinu oproti transkriptu, a tak i v porovnání množství proteinu a transkriptu u kořenů vystavených stresu (Obr. 8, sloupec 5; Obr. 17, vzorek 5). To může být způsobené tím, že u těchto rostlin došlo k situaci, kdy dostatek proteinu vedl ke zpětné reakci a snížení úrovně transkripce. Tento proces by mohl probíhat i opačným směrem, tedy zvýšení množství transkriptu by blokovalo proteosyntézu. U transgenních rostlin *SIMKK RNAi 2A/2* linie regenerovaných z mateřské rostliny pěstované v *in vivo* podmínkách je trend stejný jak u proteomické, tak i transkriptomické analýzy (Obr. 8, sloupce 6, 7, 8; Obr. 17, vzorky 6, 7, 8). Dochází ke snížení množství transkriptu v kořenových buňkách a tím pádem i proteinu oproti kořenovým buňkám kultivaru rostlin RSY, které v této práci slouží jako kontroly. Regeneranti z *in vitro* mateřských rostlin vykazují opět shodu v několikanásobném snížení abundance *SIMK* resp. *SIMK* u transgenních linií i u kontrolních RSY rostlin (Obr. 8, sloupce 1, 2; Obr. 17, vzorky 1, 2).

## 5 ZÁVĚR

V úvodní kapitole experimentální části byla provedena propagace kontrolního i transgenního rostlinného materiálu *Medicago sativa* pomocí somatické embryogeneze. Tento materiál byl později využit k proteomickým a transkriptomickým studiím. Transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linie vykazovaly oproti kontrolním RSY liniím fenotypové rozdíly. Měly snížené množství chlorofylu v listech a sníženou schopnost tvořit kořenovou část.

Následující část byla věnována zejména sledování aktivity a abundance vybraných proteinů – MMK3 a SIMK. U transgenních rostlin *SIMKK RNAi 2A/2* linie došlo ke snížení relativního množství proteinu SIMK a to o více jak 95 % v porovnání s kontrolními rostlinami kultivaru RSY kultivovaných ve stejných podmínkách. Snížení bylo potvrzeno i pomocí qPCR na úrovni transkriptu, kde však bylo zaznamenáno snížení oproti kontrolním rostlinám o méně než 90 %. Z toho lze usuzovat, že ačkoliv dochází k přepisu DNA do mRNA, translaci bylo určitými mechanismy v buňce bráněno nebo byl protein rychle odbouráván. Potvrdila se dřívější pozorování, kdy snížená exprese v kaskádě nadřazené SIMKK ovlivňuje i expresi podřazené SIMK.

Abundance pSIMK měřená pomocí detekce fosforylované formy byla u transgenní linie nižší, a to z důvodu celkové menší abundance SIMK. V případě kontrolních rostlin kultivaru RSY docházelo k nejvyšší míře fosforylace v mokré kontrole oproti tomu, kdy rostliny téhož kultivaru nebyly stresu vystaveny vůbec. Obsah sacharosy v médiu může navozovat osmotický stres působící po delší časový interval bez známek snížení množství pSIMK. Kdežto v případě působení oxidativního stresu z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mohlo dojít po časovém intervalu 30 min ke zpětnému snížení množství pSIMK. Tyto procesy snížení aktivity a zpětné negativní regulace byly zaznamenány i u živočišných MAPKs (Davis *et al.*, 2000).

MMK3 by měla být stejně jako SIMK aktivována a ovlivňována SIMKK. Bylo zjištěno, že MMK3 je silně exprimována v transgenních rostlinách *SIMKK RNAi 2A/2* linie v suché kontrole a následně v mokré kontrole u těchto transgenních rostlin dochází k výraznému snížení množství MMK3. Ještě menší množství bylo zdetekováno při působení oxidativního stresu navozeným H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM. Je možné, že působením oxidativního stresu může docházet k degradaci tohoto proteinu.

Stejný případ byl zaznamenán i u kontrolní rostliny kultivaru RSY kdy oproti podmínkám suché kontroly a mokré kontroly, které vykazovaly přibližně stejné množství proteinu, došlo ke snížení abundance MMK3 vlivem působení oxidativního stresu zhruba o polovinu.

V poslední části věnované kvantitativní PCR bylo zjištěno, že v kořenech transgenních *SIMKK RNAi 2A/2* linií rostlin dochází ke snížení transkriptu oproti kontrolním rostlinám kultivaru RSY zhruba o polovinu v případě nestresových podmínek suché kontroly.

Množství transkriptu *MMK3* u transgenní linie vzrostlo v mokré kontrole i v podmínkách oxidativního stresu, vyvolaným H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o koncentraci 15 mM, oproti podmínkám suché kontroly bez stresu ekvivalentní transgenní rostliny. Z pozorování abundance MMK3 a kvantitativní *MMK3* bylo zjištěno, že tam kde dochází ke zvýšené abundanci MMK3 je v buňkách celkově méně transkriptu *MMK3* a naopak. Což by mohlo nasvědčovat tomu, že pokud je v buňce menší množství transkriptu *MMK3* nedochází k rychlému odbourání MMK3 proteinu a ten je v buňkách hromaděn. Opačně, když je dostatek transkriptu *MMK3* připraveného na proteosyntézu, není v určitý okamžik třeba velkého množství proteinu MMK3 a je tak degradován. Tento poznatek shledávám velice zajímavým a stál by za další prozkoumání tohoto možného propojení transkriptomické a proteomické úrovně regulace této MAPK.

Aktivita měřená pomocí abundance pMMK3 byla snížena v transgenní *SIMKK RNAi 2A/2* linii v mokré kontrole a oxidativního stresu. U kontrolní linie však podmínky mokré kontroly měly vliv na zvýšenou aktivitu a v prostředí oxidativního stresu docházelo ke snížení aktivity. Jak už bylo výše zmíněno, delší působení stresu mohlo mít vliv na zpětnou defosforylaci MAPKs. Na tento jev mohlo mít pravděpodobně vliv i množství a druh stresu. Pro potvrzení této skutečnosti by však chtělo provést další výzkum. Nejvyšší aktivitu MMK3 vykazuje transgenní rostlina v případě suché kontroly bez působení stresových podmínek u regenerantů *in vivo* pěstované mateřské rostliny i oproti ekvivalentní transgenní rostlině z *in vitro* kultivované mateřské rostliny v podmínkách bez působení stresu. K tomu však mohlo dojít v důsledku nespecifického navázání jedné z protilátek.

## 7 LITERATURA

- Adatia M.H., Besford R.T. (1986): The effect of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Annals of Botany* **58**, 343-351.
- Adrian J., Assoumani M. (1983): Gums and hydrocolloids in nutrition. In: *Handbook of Nutritional Supplements*, Vol. 2, *Agricultural use*. (Rechcigl ed.), CRC Press Inc., Baton Rouge, 301-333.
- Aloni R. (2004): The induction of vascular tissues by auxin. In: *Plant Hormones*. (Davies P.J. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland, 471-492.
- Anders J., Larrabee P.L., Fahey J.W. (1988): Evaluation of gelrite and numerous agar sources for in vitro regeneration of sugarcane. *HortScience* **23**, 755.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Arnon, D. I., & Stout, P. R. (1939): Molybdenum as an essential element for higher plants. *Plant Physiology* **14**(3), 599-602.
- Asano Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y., Fujii A. (1996): Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and  $\alpha$ -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. *Journal of Plant Physiology* **149**, 413-417.
- Atkinson, N. J., Urwin P.E. (2012): The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**(10), 3523-3543.
- Banno, H., Hirano, K., Nakamura, T., Irie, K., Nomoto, S., Matsumoto, K., Machida, Y. (1993). *NPK1*, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11 and BYR2 protein kinases. *Molecular and Cell Biology* **13**, 4745-4752.
- Barbier, M.; Dulieu, H.L. (1980): Effets génétiques observés sur des plantes de Tabac régénérées à partir de cotylédons par culture in vitro. *Ann Amélior Plant* **30**, 321-344.
- Barwale U.B., Kerns H.R., Widholm J.M. (1986): Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* **167**, 473-481.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., Conrath, U. (2009): Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **21**(3), 944-953.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vyplelová P., Ovečka M., Luptovčiak I., Illés P., Kuchařová A., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Front. Plant Sci.* **6**, 336.
- Berghoef J., Bruinsma J. (1979a): Flower development of *Begonia franconis* Liebm. II. Effects of nutrition and growthregulating substances on the growth of flower buds in vitro. *Z. Pflanzenphysiologie* **93**, 345-357.
- Beruto D., Beruto M., Ciccarelli C., Debergh P. (1995): Matric potential evaluations and measurements for gelled substrates. *Physiology of Plant* **94**, 151-157.
- Bingham, E.T., Hurley, L.V., Kaatz, D.M., Saunders, J.W. (1975): Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Science* **15**, 719-721.
- Bishnoi U.S., Jain R.K., Gupta K.R., Chowdhury V.K., Chowdhury J.B. (2000): High frequency androgenesis in indica x Basmati rice hybrids using liquid culture media. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **61**, 153-159.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP kinase isactivated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**, 101-113.
- Bonner J. (1940a): Specificity of nicotinic acid as a growth factor for isolated pea roots. *Plant Physiology* **15**, 553-557.
- Boutillier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.M., van Lammeren A.A., Miki B.L., Custers J.B., van Lookeren Campagne M.M. (2002): Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**(8), 1737-1749.
- Bov J.M., Bov C., Whatley F.R., Arnon D.I. (1963): Chloride requirement for oxygen evolution in photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung Teil B* **18**, 683-688.



- Burstrom H. (1961): Growth action of EDTA in light and darkness. *Physiology of Plant* **14**, 354-377.
- Buwalda F., Greenway H. (1989): Nitrogen uptake and growth of wheat during O<sub>2</sub> deficiency in root media containing NO<sub>3</sub>-only, or NO<sub>3</sub>-plus NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *New Phytology* **111**, 161-166.
- Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998): A cell cycle regulated MAPkinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* **111**, 3091-3100.
- Calderini O., Glab N., Bergounioux C., Heberle-Bors E., Wilson C. (2001): A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18139-18145.
- Calderini, O., Bogre, L., Vicente, O., Binarova, P., Heberle-Bors, E., Wilson, C. (1998): A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* **111**, 3091-3100.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **14**, 703-711.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **14**, 703-711.
- 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.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., Hirt, H. (2002). Convergence and Divergence of Stress-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways at the Level of Two Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. *The Plant Cell*, **14**(3), 703-711.
- Cardinale, Francesca, Jonak C., Ligsterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential Activation of Four Specific MAPK Pathways by Distinct Elicitors. *Journal of Biological Chemistry* **275**(47), 36734-36740.
- Ciarrocchi G., Cella R., Nielsen E. (1981): Release of nucleotide-cleaving acid phosphatase from carrot cells grown in suspension culture. *Physiology of Plant* **53**, 375-377.
- Clarkson D.T., Hanson J.B. (1980): The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 239-298.
- Cline M.G. (1994): The role of hormones in apical dominance-new approaches to an old problem in plant development. *Physiology of Plant* **90**, 230-237.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011): Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* **11**, 163.
- Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Li, J. (2006): Increased Expression of MAP KINASE KINASE7 Causes Deficiency in Polar Auxin Transport and Leads to Plant Architectural Abnormality in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**(2), 308-320.
- Davis S., Vanhoutte P., Pages C., Caboche J., Laroche S. (2000): The MAPK/ERK Cascade Targets Both Elk-1 and cAMP Response Element-Binding Protein to Control Long-Term Potentiation-Dependent Gene Expression in the Dentate Gyrus *In Vivo*. *Journal of Neuroscience* **20** (12), 4563-4572.
- De Pinto M.C., Francis D., De Gara D. (1999): The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **209**, 90-97.
- De Vries S.C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde D.H., Thomas T.L., Van Kammen A. (1988b): Acquisition of embryogenic potential in carrot cell suspension cultures. *Planta* **176**, 196-204.
- Debergh P.C. (1983): Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiology of Plant* **59**, 270-276.
- Debergh P.C. (1988): Micropropagation of woody species-state of the art on in vitro aspects. *Acta Horticulturae* **227**, 287-295.

- Deepak S.A., Kottapalli K.R., Rakwal R., Oros G., Rangappa K.S., Iwahashi H., Masuo Y., Agrawal G.K. (2007): Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics* **8**(4), 234-251.
- Dickinson, R. J. & Keyse, S. M. (2006): *Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases*. *Journal of Cell Science* **119**, 4607–4615.
- Dietz K. J., Jacob S., Oelze M. L., Laxa M., Tognetti V., De Miranda S. M., et al. (2006): The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1697–1709.
- Digby J., Skoog F. (1966): Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. *Plant Physiology* **41**, 647-652.
- Dixon N.E., Gazzola C., Blakeley R.L., Zerner B. (1975): Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society* **97**, 4131-4133.
- Dudits D., Gyorgyey J., Borge L., Bako L., (1995): Molecular biology of somatic embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in plant.*, (Thorpe T.A. ed.), Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Netherland, 267-308.
- George E. F. (2007): The components of plant tissue culture media I: macro and micro-nutrients. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Vol. 1, (George E.F., Hall M.A., de Klerk G.J., eds), Springer, Dordrecht, Netherland, 115–173.
- El-Nil A.; Hildebrandt, A.C. (1972): Morphological changes in geranium plants differentiated from anther cultures. *In vitro* **7**, 258.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., and Kiss, G. B. (2002): A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962–966.
- Engvold K.C. (1985): Pollen irradiation and possible gene transfer in Nicotiana species. *Theoretical and Applied Genetics* **69**, 457-461.
- Epstein E. (1971): *Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives*. 132nd ed., John Wiley and Sons Inc., New York, U.S.A., 412 stran.
- Fairfax M., Salimnia R., Salimnia H. (2010): Quantitative PCR an Introduction. In: *Molecular Diagnostics*. (Grody W.W., Nakamura R.M., Kiechle F.L., Strom C. eds.), Elsevier, London, England, 3-14.
- Fehér, A. (2014): Somatic embryogenesis – Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1849**, 385-402.
- Ferguson I.B., Drbak B.K. (1988): Calcium, mineral nutrition and salinity. *HortScience* **23**, 262-269.
- Feurtado J.A., Huang D., Wicki-Stordeur L., Hemstock L.E., Potentier M.S. (2011): The Arabidopsis C2H2 zinc finger Indeterminate Domain1/Enhydrous promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *The Plant Cell* **23**: 1772–1794.
- Filonova L.H., Bozhkov P.V., Brukhin V.B., Daniel G., Zhivotovsky B., von Arnold S. (2000a): Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* **113**, 4399–4411.
- Filonova L.H., Bozhkov P.V., Von Arnold S. (2000b): Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* **51**, 249–264.
- Fries L. (1962): Vitamin B12 in *Pisum sativum* (L.). *Physiologia Plantarum* **15**, 566-571.
- Friml, J. (2003): Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 1-6.
- Gallois J.L., Nora F.R., Mizukami Y., Sablowski R. (2004): WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes and Development* **18**(4), 375-380.
- Galston A.W., Hillman W.S. (1961): The degradation of auxin. *Encyclopedia of Plant Physiology* **14**, 647-670.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K. (1998): Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226 -2230.

- Gamborg O.L., Constabel F., Shyluk J.P. (1974): Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiology of Plant* **30**, 125-128.
- Gautheret R.J. (1942): *Manuel Technique de Culture des Tissu Végétaux*. Masson et Cie, Paris, France, 170 stran.
- George E.F., Hall M., De Klerk G.J. (2007): *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed., Springer, Dordrecht, Germany, 479 stran.
- George E.F., Puttock D.J.M., George H.J. (1988): *Plant Culture Media*. 2nd ed., Exegetics Ltd., Westbury, England, 488 stran.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909–930.
- Giri J., Vij S., Dansana P.K., Tyagi A.K. (2011): Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *New Phytology* **191**: 721–732.
- Gong M., Van De Luit A.H., Knight M.R., Trewavas A.J. (1998): Heat-shock-induced changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology* **116**, 429-437.
- Gough, C., Cullimore, J. (2011): Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions* **24**, 867–878.
- Grimes H.D., Hodges T.K. (1990): The inorganic NO<sub>3</sub> - –NH<sub>4</sub> + ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* **136**, 362-367.
- Haberlandt, G. (1902): Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. *Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* **111**, 69–92.
- Hageman, R. V., and R. H. Bums. (1978): Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **75**, 2699-2702.
- Harada J. J. (2001): Role of *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *Journal of Plant Physiology* **158**, 405–409.
- Havlicek L., Hanus J., Vesely J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997): Cytokinin-derived cyclindependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 408-412.
- He Ch., Haw Tien Fong S., Yang D., Wang G.L. (1999): BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **12**, 1064–1073.
- Heath O.V.S., Clark J.E. (1956a): Chelating agents as plant growth substances. A possible clue to the mode of action of auxin. *Nature* **177**, 1118-1121.
- Heck G.R., Perry S.E., Nichols K.W., Fernandez D.E. (1995): AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *Plant Cell* **7**(8),1271-1282.
- Heimer Y.M., Filner P. (1971): Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **230**, 362-372.
- Hepler P.K., Wayne R.O. (1985): Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology* **36**, 397-439.
- Hew C.S., Ting S.K., Chia T.F. (1988): Substrate utilization by Dendrobium tissues. *Botanical Gazette* **149**, 153-157.
- Hewitt E.J. (1948): Relation of manganese and some other metals to the iron status of plants. *Nature* **161**, 489.
- Hille R., Nishino, T., Bittner, F. (2011): Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination Chemistry Reviews* **255**(9-10), 1179–1205.
- Hu H., Xiong L. (2014): Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. *Annual Review of Plant Biology* **65**(1). 715-741.
- Huang Y., Li H., Hutchison C.E., Laskey J., Kieber J.J. (2003): Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant Journal* **33**, 221–233.

- Huang, Y., Li H., Gupta R., Morris P. C., Luan S., Kieber J. J. (2000): AtMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated *in vitro* by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiology* **122**, 1301–1310.
- Chee P.P. (1995): Stimulation of adventitious rooting of *Taxus* species by thiamine. *Plant Cell Reports* **14**, 753-757.
- Cheong Y. H., Moon B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Kim M. C., Kim I. H., Park C. Y., Kim J.C., Park B.O., Koo S.C., Yoon H.W., Chung W.S., Lim C.O., Lee S.Y., Cho M.J. (2003): BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology* **132**, 1961–1972.
- Cheong Y.H., Kim M.C. (2010): Functions of MAPK cascade pathways in plant defense signaling. *Plant Pathology Journal*. **26**, 101-109.
- Chim C., Miller D. (1982): Some characteristics of the phosphate uptake by *Petunia* cells. *HortScience* **17**, 488.
- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y., Bi F.Y. (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* **18**, 659-668.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Isolation of AtMEKK1 (a MAPkinase kinase kinase) – interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 532–543.
- Ikeda-Iwai, M., Satoh, S., Kamada, H. (2002): Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1575-1580.
- Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., Kamada, H. (2003): Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **34**, 107-114.
- Ikeuchi M., Iwase A., Rymen B., Harashima H., Shibata M., Ohnuma M., Breuer C., Morao A.K., de Lucas M., De Veylder L., Goodrich J., Brady S.M., Roudier F., Sugimoto K. (2015): PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*. *Nature Plants* **29**; 1:15089.
- Jacobson L., Cooper B.R., Volz M.G. (1971): The interaction of pH and aeration in Cl uptake by barley roots. *Physiology of Plant* **25**, 432-435.
- Jansen M.A.K., Booij H., Schel J.H.N., De Vries S.C. (1990): Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* **9**, 221-223.
- Jin H., Axtell M.J., Dahlbeck D., Ekwenna O., Zhang S., Staskawicz B., Baker B. (2002): NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Developmental Cell* **3**, 291–297.
- John P.C.L., Zhang K., Dong C., Diederich L., Wightman F. (1993): P34(CDC2) related proteins in control of cell-cycle progression. The switch between division and differentiation in tissue development and stimulation and division by auxin and cytokinin. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**, 503-526.
- 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., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1996). Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **93**, 11274–11279.
- Jouanneau J.P. (1971): Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de tabac. *Experimental Cell Research* **67**, 329-337.
- Junker A., Mönke G., Rutten T., Keilwagen J., Seifert M., Thi T.M., Renou J.P., Balzergue S., Viehöver P., Hähnel U., Ludwig-Müller J., Altschmied L., Conrad U., Weisshaar B., Bäumlein H. (2012): Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **71**(3), 427-442.
- Kamada H., Harada H. (1979): Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiologie* **91**, 453-463.
- Kamada, H., Ishikawa, K., Saga, H., Harada, H. (1993): Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Culture Letters* **10**, 38-44.

- Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T. and Harada, H. (1989): Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell. Development Biology* **25**, 1163-1166.
- Kamada, H., Tachikawa, Y., Saitou, T., Harada, H. (1994): Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cultures Letters* **11**, 229-232.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Kereszt A., Mergaert P., Kondorosi E. (2011): Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**(11), 1300-1309.
- Khurana P., Gaikwad K. (2005): The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.
- 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* **11**, 2247-2258.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Meskiene I. (2000): SIMKK, a Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase, Is a Specific Activator of the Salt Stress-Induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**(11), 2247-2258.
- Kim J.A., Agrawal G.K., Rakwal R., Han K.S., Kim K.N., Yun C.H., Heu S., Park S.Y., Lee Y.H., Jwa N.S. (2003): Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of Arabidopsis AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**, 868-876.
- Kintzios S., Stavropoulou E.R., Skamneli S. (2004): Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of in vitro dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). *Plant Science* **167**, 655-664.
- Kirby E.G., Leustek T., Lee M.S. (1987): Nitrogen nutrition. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol 1, *General Principles and Biotechnology*. (Bonga, Durzan eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherland, 67-88.
- Kiyosue, T., Kamada, H. Harada, H. (1989): Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. *Plant Tissue Culture Letters* **6**, 162-164.
- Kiyosue, T., Takano, K., Kamada, H. Harada, H. (1990): Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Canadian Journal of Botany* **68**, 2301-2303.
- Klapheck S., Grosse W., Bergmann L. (1982): Effect of sulphur deficiency on protein synthesis and amino acid accumulation in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiologie* **108**, 235-245.
- Klein R.M., Caputo E.M., Witterholt B.A. (1962): The role of zinc in the growth of plant tissue cultures. *American Journal of Botany* **49**, 323-327.
- Knight M.R., Campbell A.K., Smith T.M., Trewavas A.J. (1991): Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**, 424-426.
- Koetje D.S., Grimes H.D., Wang Y.C., Hodges T.K. (1989): Regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) from primary callus from immature embryos. *Journal of Plant Physiology* **13**, 184-190.
- Kolomoets T.P., Turaev N.S. (1977): Morphological and biological features of gall midges, inhabiting Fabaceae in Ural and neighboring regions of West Siberia and Kazakhstan. In: *Insect pests of Fabaceae plants in Ural*. Vol. 46, *Proceedings of Sverdlovsk agricultural institute* (Turaev N.S ed.), Perm' agricultural institute, Perm', 69-132.
- Kondoh, K., Nishida, E. (2007): *Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**, 1227-1237.
- Konwar B.K., Coutts R.H.A. (1990): Rapid regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants from in vitro cultures. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Vol. 9, *Science and Biotechnology in Agriculture* (Nijkamp H.J.J., Van Der Plas L.H.W., Van Aartrijk J. eds.), Springer, Dordrecht, Netherland, 114-118.

- 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 U S A* **97**, 2940–2945.
- Kreitlow K.W. (1962): Verticillium wilt of alfalfa. A destructive disease in Britain and Europe not yet observed in the United States. *Crop Research ARS* **34-40**, 1-15.
- Leclercq J., Adams-Phillips L.C., Zegzouti H., Jones B., Latché A., Giovannoni J.J., Pech J.C., Bouzayen M. (2002): LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology* **130**, 1132–1142.
- Lerch K. (1981): Copper monooxygenases: tyrosine and dopamine b-monooxygenase. In: *Metal Ions in Biological Systems*. Vol. 13, (Sigel ed.), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 143-186.
- Li, Y., Zhang, L., Wang, X., Zhang, W., Hao, L., Chu, X. and Guo, X. (2013): Cotton *GhMPK6* negatively regulates osmotic tolerance and bacterial infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*, and plays a pivotal role in development. *FEBS Journal* **280**, 5128–5144.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., and Geurts, R. (2003): LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**, 630–633.
- Litz R.E. Gray D.J. (1995): Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 416-425.
- Lo schiavo F. (1994): The genetics and physiology of the totipotent cell. In: *Plant molecular biology*. (Couzzi G., Puigdomenech P. eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 73-84.
- Lo schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Veraga. R., Orselli S., Terzi M. (1989): DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation differentiation, hormones and hypomethylation drugs. *Theoretical and Applied Genetics* **77**, 325.
- Loan C.C. (1980) Plant bug hosts of some euphorine parasites near Belleville, Ontario, Canada. *Le Naturaliste Canadien* **107**, 87-93.
- Lopez-Bucio J., Cruz-Ramirez A., Herreraestrella L. (2003): The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 280-287.
- Lotan T., Ohto M., Yee K.M., West M.A., Lo R., Kwong R.W., Yamagishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. (1998): Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**(7), 1195-1205.
- Lu W., Chu X., Li Y., Wang C., Guo X. (2013): Cotton GhMCK1 induces the tolerance of salt and drought stress, and mediates defence responses to pathogen infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* **8**(7), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068503>.
- Lu, C., Vasil, V., Vasil, I. K. (1983): Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays*L.). *Theoretical and Applied Genetics* **66**, 285-289.
- Ludwig-Muller J., Epstein E. (1991): Occurrence and in vivo biosynthesis of indole 3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* **97**, 765-770.
- Lv S., Nie L., Fan P., Wang X., Jiang D., Chen X., Li Y. (2012b): Sodium plays a more important role than potassium and chloride in growth of *Salicornia europaea*. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**, 503–513.
- Maclachlan G.A., Waygood E.R. (1956): Catalysis of indoleacetic acid oxidation by manganic ions. *Physiology of Plant* **9**, 321-330.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**, 637–640.
- Mao P., Duan M., Wei C., Li Y. (2007): WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiology* **48**, 833–842.
- Margara J., Rancillac M. (1966): Observations préliminaires sur le rôle du milieu nutritif dans l'initiation florale des bourgeons néoformés in vitro chez *Cichorium intybus* L. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **263** (D), 1455-1458.

- 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. *Plant Journal* **29**, 637–647.
- Mengel K., Kirkby E.A. (1982): *Principles of Plant Nutrition*. 3rd ed., International Potash Institute, Bern, Switzerland, 654 stran.
- Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S. (1995): Morphogenic aspects of somatis embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in plants*. (Thorpe T.A. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 155-203.
- Merkle S.A., Dean J.F. (2000): Forest tree biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **11**(3), 298-302.
- Meyer Y., Abel W.O. (1975b): Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo-wall and wall formation. *Planta* **125**, 1-13.
- Meyer Y., Belin C., Delorme-Hinoux V., Reichheld J. P., Riondet C. (2012): Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants and Redox Signaling* **17**, 1124–1160.
- Miller C.O. (1954): The influence of cobalt and sugar upon the elongation of etiolated pea stem segments. *Plant Physiology* **29**, 79-82.
- Mishra D., Kar M. (1975): Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review* **40**, 395-452.
- Mittler R., Blumwald E. (2010): Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 443–462.
- Mizoguchi T. Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **93**, 765–769.
- Mizoguchi T. Ichimuraab K. Iriec K., Morris P., Girau J., Matsumoto K., Shinozakia K. (1998): Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Letters* **437**, 56–60.
- Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H., Shinozaki, K. (1994): Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant Journal* **5**, 111–122.
- Moore H.M., Hirsch A.M. (1981): DNA synthesis and mitosis in boron-deficient and control sunflower root tips. *Plant Physiology* **67**, Suppl., 12.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., Palme, K. (1998): AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal* **17**, 6903-6911.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant* **15**, 473-497.
- 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., Pitzschke, A., Hirt, H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Science* **10**, 339-346.
- Napoli, C. A., D. H. Hubbell. (1975): Ultrastructure of *Rhizobium*-induced infection threads in clover root hairs. *Journal of Applied Microbiology* **30**, 1003-1009.
- Nemeth G. (1979): Benzyladenine-stimulated rooting in fruit-tree rootstocks cultured *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiologie* **95**, 389-396.
- Neurath, H., Walsh, K. A. (1976): Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **73**, 3825–3832.
- Nishihama, R. Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001): The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Development* **15**, 352–363.

- Nitsch J.P., Nitsch C. (1965): Néof ormation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts: *Plumbaga indica* L. *Ann. Phys. Vég.* **7**, 251-256.
- Nomura K., Komamine A. (1985): Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology* **79**, 988-991.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO Journal* **22**, 1282–1288.
- Parida A.K., Das A.B., Das P. (2002): NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology* **45**, 28–36.
- Pasqualetto P.-L., Zimmerman R.H., Fordham I. (1988): The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **14**, 31-40.
- Pearson G., Fred Robinson F., Tara Beers Gibson T.B., Bing-e Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Melanie H. Cobb M.H. (2001): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* **22**(2), 153–183.
- Petrášek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J., Abas, M., Seifertová, D., Wísniowska, J., Tadele, Z., Kubeš, M., Čovanová, M. Čovanová M., Dhonukshe P., Skupa P., Benková E., Perry L., Krecek P., Lee O.R., Fink G.R., Geisler M., Murphy A.S., Luschnig C., Zazimalová E., Friml J. (2006): PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914-918.
- Polacco J.C. (1977a): Is nickel a universal component of plant ureases?. *Plant Science Letters* **10**, 249-255.
- Polikarpochkina R.T., Gamburg K.Z., Khavin E.E. (1979): Cell-suspension culture of maize (*Zea mays* L.). *Z. Pflanzenphysiologie* **95**, 57-67.
- Pollard A.S., Parr A.J., Loughman C.L. (1977): Boron in relation to membrane function in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **28**, 831-841.
- Poovaiah B.W. (1988): Molecular and cellular aspects of calcium action in plants. *HortScience* **23**, 267-271.
- Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., Dinesh-Kumar, S. P. (2009): MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes and Development* **23**(1), 80–92.
- Prell, J., Poole, P. (2006): Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology* **14**, 161–168.
- Price A.H., Taylor A., Ripley S.J., Griffith A., Trewavas A.J., Knight M.R. (1994): Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**, 1301-1310.
- Rains D.W. (1976): Mineral metabolism. In: *Plant biochemistry* (Bonner J., Varner J.L. eds.), Academic Press, New York, U.S.A., 561-597.
- Ramage C.M., Williams R.R. (2002): Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* **38**, 116-124.
- Raven J.A. (1986): Biochemical disposal of excess H<sup>+</sup> in growing plants. *New Phytology* **104**, 175-206.
- Reuveny Z., Dougall D.K., Trenity P.M. (1980): Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **77**, 6670-6672.
- Salisbury F.B. (1959): Growth regulators and flowering. II. The cobaltous ion. *Plant Physiology* **34**, 598-604.
- Samac D.A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.) In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 343, *Agrobacterium Protocols*, 2/e, Vol 1, (Wang K. ed.), Humana Press Inc., Totowa, U.S.A., 301-311.
- Samaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkman 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.
- Sanders D., Brownlee C., Harper J.F. (1999): Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706.



- Sargent P.A., King J. (1974): Investigations of growthpromoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: cytokinin-like compounds. *Canadian Journal of Botany* **52**, 2459-2463.
- Sha L., McCown B.H., Peterson L.A. (1985): Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal American Society for Horticultural Science* **110**, 631-634.
- Shacklock P.S., Read N.D., Trewavas A.J. (1992): Cytosolic free calcium mediates red-light induced photomorphogenesis. *Nature* **358**, 753-755.
- Sharma C.P. Singh S. (1990): Sodium helps overcome potassium deficiency effects on water relations of cauliflower. *HortScience* **25**, 458-459.
- Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Maraffa S.B. (1980): Growth and behavior of cell culture. In: *Horticultural Reviews*. Vol. 2, (Janick, J., ed.), AVI Publishing Co, Westport, U.S.A., 268.
- Sherameti I., Sopory S.K., Trebicka A., Pfannschmidt T., Roelmuller R. (2002): Photosynthetic Electron Transport Determines Nitrate Reductase Gene Expression and Activity in Higher Plants. *Journal of Biological Chemistry* **277**(48), 46594-46600.
- Shkolnik M.Y.A. (1984): *Developments in Crop Science* Vol. **6.**, Elsevier, Amsterdam, Netherland, 463 stran.
- Scherer P.A. (1988): Standardization of plant micropropagation by usage of a liquid medium with polyurethane foam plugs or a solidified medium with the gellan gum gelrite instead of agar. *Acta Horticulturae* **226**, 107-114.
- Singer M.A., Lindquist S. (1998): Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell* **1**, 639-648.
- Skoog F. (1944): Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *American Journal of Botany* **31**, 19-24.
- Slavík B., (2000): *Květena České republiky*. 6th ed., Academia, Praha, Česká republika, 770 stran.
- Sommer A.L., Lipman C.B. (1926): Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant Physiology* **1**, 231-249.
- Stafstrom J. P., Altschuler M., Anderson D.H. (1993): Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Molecular Biology* **22**(1),83-90.
- Stephenson, F. H. (2016): *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. 3rd ed., Elsevier, London, England, 496 stran.
- Stirk W.A., Strnad M., Novak O., Van Staden J. (2003): Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation* **41**, 13-24.
- Stone S.L., Braybrook S.A., Paula S.L., Kwong L.W., Meuser J., Pelletier J., Hsieh T.F., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. (2008): Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **105**(8), 3151-3156.
- Stone S.L., Kwong L.W., Yee K.M., Pelletier J., Lepiniec L., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. (2001): LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **98**(20), 11806-11811.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T. (2002): A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.
- Su Y.H., Zhao X.Y., Liu Y.B., Zhang C.L., O'Neill S.D., Zhang X.S. (2009): Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* **59**(3), 448-460.
- Subbarao G.V., Ito O., Berry W.L., Wheeler R.M. (2003): Sodium – a functional plant nutrient. *Critical Review of Plant Science* **22**, 391-416.
- Sundqvist C., Bjorn L.O., Virgin H.I. (1980): Chloroplast. In: *Results and Problems in Cell Differentiation*. Vol. 10., (Reinert J. ed.), Springer, Berlin, Germany, 201-224.
- Suzuki M., Wang H.H., McCarty D.R. (2007): Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiology* **143**(2), 902-911.
- Šamaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Hirt, H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal* **21**(13), 3296-3306.

- Tanada T. (1978): Boron - key element in the actions of phytochrome and gravity. *Planta* **143**, 109-111.
- Tang, D., Innes, R.W. (2002): Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Journal* **32**, 975-983.
- Tanimoto S., Harada H. (1986): Involvement of calcium in adventitious bud initiation in *Torenia* stem segments. *Plant Cell Physiology* **27**, 1-10.
- Tanoue T., Adachi M., Moriguchi T., Nishida E. (2000): A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* **2**, 110-116.
- Taylor A.R., Manison.F.H., Fernandez C., Wood J., Brownlee C. (1996): Spatial organization of calcium signalling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* **8**, 2115-2031.
- Thomas T.L., (1993): Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. *The Plant Cell* **5**, 14724-14733.
- Thorpe, T. A. (1990): The current status of plant tissue culture. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. (Bhojwani, S. S., ed.), Elsevier, Amsterdam, Netherland, 1-33.
- Timmers, A. C. J., Auriac, M. C., De Billy, F., Truchet, G. (1998): Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* **125**, 339-349.
- Tor M., Twyford C.T., Funes I., Boccon-Gibod J., Ainsworth C.C., Manstell S.H. (1998): Isolation and culture of protoplasts from immature leaves and embryogenic cell suspensions of *Dioscorea* yams: tools for transient gene expression studies. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **53**, 113-125.
- Tsui C. (1948): The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. *American Journal of Botany* **35**, 172-178.
- Tsuwamoto R., Yokoi S., Takahata Y. (2010): Arabidopsis EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Molecular Biology* **73**(4-5), 481-492.
- Valicek P. (2002): *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. 2nd ed., Academia, Praha, Česká republika, 486 stran.
- Van Staden J., Drewes F.E. (1991): The biological activity of cytokinin derivatives in the soybean callus bioassay. *Plant Growth Regulation* **10**, 109-115.
- Vincent, J. M. (1974): Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In: *The biology of nitrogen fixation*. (Quispel A. ed.), North Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherland, 265-341.
- Walker K.A., Sato S.J. (1981): Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cultures* **1**, 109-121.
- Wang X., Niu Q.W., Teng C., Li C., Mu J., Chua N.H., Zuo J. (2009): Overexpression of PGA37/MYB118 and MYB115 promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Cell Res.* **19**(2), 224-235.
- Weinstein L.H., Meiss A.N., Uhler R.L., Purvis E.R. (1956): Growth-promoting effects of ethylenediamine tetra-acetic acid. *Nature* **178**, 1188.
- Welander T. (1977): In vitro organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia hiemalis*. *Physiology of Plant* **41**, 142-145.
- Wernicke, W., Brettell, R. (1980): Somatic embryogenesis from *Sorgum bicolor* leaves. *Nature* **287**, 138-139.
- White P.R. (1943b): Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth* **7**, 53-65.
- Wilcox E.J., Selby C., Wain R.L. (1978): Studies on plant growth-regulating substances. L. The cytokinin activity of some substituted benzyloxypurines. *Annals of Applied Biology* **88**, 439-444.
- Wilcox E.J., Selby C., Wain R.L. (1981): The cytokinin activities of 6- $\alpha$ -alkylbenzyloxy-purines. *Annals of Applied Biology* **97**, 221-226.
- Williams E., Maheswaran G. (1986): Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Annals of Botany* **57**(4), 443-462.
- Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E. (1997). A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *The Plant Cell* **9**, 2093-2100.
- Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E. (1997): A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**, 2093-2100.

- Witte C.P., Tiller S.A., Taylor M.A., Davies H.V. (2002): Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **68**, 103-104.
- Wyn Jones R.G., Hunt O.R. (1967): The function of calcium in plants. *The Botanical Review* **33**, 407-426.
- XU, H. a J. NIE. (2006): Identification, Characterization, and Molecular Detection of Alfalfa mosaic virus in Potato. *Phytopathology* **96**(11), 1237-1242.
- Yeung E.C. (1995): Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in plants*. (Thorpe T.A. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nizozemsko, 205-248.
- Yoshida F., Kohno H. (1982): Effects of media containing NH<sub>4</sub> as the sole nitrogen source on cultured cells of tobacco and rice. In: *Plant Tissue Culture*. (Fujiwara A. ed.), Japan association Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, 231-232.
- Yyang P.C., Mahmood T. (2012): Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. **4**(9), 429.
- Zažímalová, E., Křeček, P., Skůpa, P., Hoyerová, K. and Petrášek, J. (2007): Polar transport of the plant hormone auxin: the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Science* **64**, 1621 -1637.
- Zhang H., Liu Y., Wen F., Yao D., Wang L., Guo J., et al. (2014): A novel rice C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5795–5809.
- Zhang L., Li Y., Lu W., Meng F., Wu C. A., Guo X. (2012b): Cotton GhMKK5 affects disease resistance, induces HR-like cell death, and reduces the tolerance to salt and drought stress in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3935–3951.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1994): Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704–711.
- Zhou, J., Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Chen, Z., & Yu, J.-Q. (2014). *RBOH1*-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. *Journal of Experimental Botany* **65**(2), 595–607.
- Zimmerman, J. L. (1993): Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell* **5**(10), 1411-1423.
- Zuo J., Niu Q.W., Frugis G., Chua N.H. (2002): The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant Journal* **30**(3), 349-359.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctová
A	absorbance
ABA	kyselina abscisová
AMV	virus mozaiky vojtěšky
BA	benzyladenin
BAP	6-benzylaminopurin
<i>BBM</i>	„baby boom“
BSA	hovězí sérový albumin
BWMK	poraněním indukovaná MAP kinasa
CM	cytoplasmatická membrána
DHPT	kyselina 1,3-diamino-2-hydroxypropan-tetraoctová
DTT	dithiotreitol
EDDHA	kyselina etylendiamin-di(o-hydroxyfenyl) octová
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctovou
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová
<i>EMK</i>	„embryomaker“
GA	kyselina giberelinová
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina
HRP	křenová peroxidasa
IAA	kyselina indol-3-octová
<i>IAA30</i>	indol-3-octovou kyselinou indukovatelný gen 30
iPA	N <sup>6</sup> – Δ <sup>2</sup> <i>iso</i> -pentenyl adenin

<i>LEC</i>	„leafy cotyledon“
MAPK	mitogen-aktivované protein kinasy
MAPKK	mitogen-aktivované protein kinasy kinasy
MAPKKK	mitogen-aktivované protein kinasy kinasy kinasy
MMK	<i>Medicago</i> MAP kinasa
MPK	MAP kinasa
MS médium	Murashige & Skoog médium
NAA	kyselina 1-naftyloctová
NTF	jaderný transportní faktor
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEM	proembryogenní masa buněk
<i>PKL</i>	„pickle“
<i>PRC2</i>	polykombní represivní komplex 2
PRKK	patogen-responzivní MAP kinasa kinasa
PVDF	polivinylidendifluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RB	elektroforetický pufr
RCF	relativní centrifugační síla
RT PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SAMK	stresem aktivovaná MAP kinasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SIMK	stresem indukovaná MAP kinasa
SIMKK	stresem indukovaná MAP kinasa kinasa

TAE	Pufř s Tris-bází, octovou kyselinou a EDTA
TB	transferový pufř
TBS	Tris-HCl solný pufř
TBS-T	Tris-HCl solný pufř s přídavkem Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
WOX	„WUSCHEL related homeobox“
ZFP	protein zinkových prstů