

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Optimalizace kultivačních podmínek *in vitro* u *Medicago sativa*

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Viktor Janouch</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Petra Vypelová</b>
Rok:	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 .....

## Poděkování

Nejprve bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Vypelové za její cenné rady, ochotu a především trpělivost, kterou se mnou vždy měla v průběhu experimentální části a zpracování celé práce. Samozřejmě bych také rád poděkoval celému Oddělení buněčné biologie z CRH za umožnění práce v laboratořích a jejich přátelský přístup.

V neposlední řadě patří velké díky mé rodině za veškerou podporu v průběhu celého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Viktor Janouch
Název práce	Optimalizace kultivačních podmínek <i>in vitro</i> u <i>Medicago sativa</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP
Vedoucí práce	Mgr. Petra Vypelová
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací sterilních kultivačních podmínek u *Medicago sativa*. *M. sativa* je trvalá fialově kvetoucí rostlina, která dnes roste téměř po celém světě v mnoha různých biotypech. Vojtěška se především využívá jako krmivo a podsev při pěstování obilovin, ale i jako modelový organismus pro genetické studie. Kultivace *Medicago sativa* probíhá pomocí metody zvané somatická embryogeneze. Je to proces, při kterém se vyvíjejí embrya ze somatických buněk. Hlavním cílem této práce byla kultivace vojtěšky skrze somatickou embryogenezi s modifikacemi ve sterilizaci listů, složení jednotlivých médií i samotné délky kultivace. V rámci experimentu byly použity jak kontrolní rostliny, tak i transgenní rostliny *M. sativa*. Pro ověření, zda se během propagace rostlinného materiálu produkují rostliny se stejnou genetickou úpravou, jsme využili analytickou techniku zvanou Western blot. Během experimentu byla provedena fotodokumentace, která mapuje průběh celé kultivace. Zjistili jsme, že kontrolním rostlinám se více dařilo při kultivaci podle původního protokolu. Naopak u transgenních rostlin byla větší úspěšnost kultivace zaznamenána po úpravě původního protokolu. Z výsledků byl navržen optimální protokol pro možné budoucí kultivace *M. sativa*.

Klíčová slova	Somatická embryogeneze, <i>Medicago sativa</i>
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Viktor Janouch
Title	Optimization of <i>in vitro</i> cultivation conditions of <i>Medicago sativa</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology, Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. Petra Vypelová
The year of presentation	2018

### Abstract

This bachelor thesis deals with the optimization of the sterile cultivation conditions of *Medicago sativa*. *M. sativa* is a violet blossoming plant that grows almost all over the world in many different biotypes. Alfalfa is mainly used as a feed for animals and for better productivity of grain cultivation, but also as a model organism for genetic studies. *Medicago sativa* is cultivated using a method called somatic embryogenesis. It is a process in which embryos develop from somatic cells. The main goal of this work was the cultivation of alfalfa through somatic embryogenesis with various modifications, for example, sterilization of leaves, composition of individual media and the length of cultivation itself. The control plant and the transgenic plant of *M. sativa* were used in the experiment. We used an analytical technique called Western blotting to verify if we cultivate plants with the same genetic conformation. During the experiment, photographic documentation was taken. We found that control plants were better at cultivation according to the original protocol. On the other hand, transgenic plants showed better cultivation success in modified protocols. An optimal protocol for possible future cultivation of *M. sativa* has been proposed.

Keywords	Somatic embryogenesis, <i>Medicago sativa</i>
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1	Rod <i>Medicago</i> .....	2
2.1.1	<i>Medicago sativa</i> .....	2
2.1.2	<i>Medicago truncatula</i> .....	4
2.2	Somatická embryogeneze .....	5
2.2.1	Somatická embryogeneze u <i>Medicago sativa</i> .....	7
2.2.2	Fytohormony .....	7
2.3	Antibiotika .....	9
2.4	Mitogen-aktivované protein kinasy .....	10
2.4.1	Mitogen-aktivované protein kinasy kinasy kinasy .....	11
2.4.2	Mitogen-aktivované protein kinasy kinasy .....	12
2.4.3	Mitogen-aktivované protein kinasy .....	12
2.4.4	Mitogen-aktivované protein kinasy u <i>M. sativa</i> .....	12
2.5	RNA interference .....	14
2.6	Western blot analýza .....	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	16
3.1	Rostlinný materiál .....	16
3.2	Materiál a metody .....	16
3.2.1	Přístroje a zařízení .....	16
3.2.2	Chemikálie .....	17
3.2.3	Roztoky a média .....	19
3.3	Metody .....	23
3.3.1	Somatická embryogeneze <i>Medicago sativa</i> – původní protokol .....	23
3.3.2	Somatická embryogeneze <i>Medicago sativa</i> – optimalizovaný protokol .....	23
3.4	Western blot .....	25
3.4.1	Příprava vzorků .....	25
3.4.2	Měření koncentrace proteinů .....	25
3.4.3	Příprava gelů .....	25
3.4.4	SDS gelová elektroforéza .....	26
3.4.5	Western blot .....	26
4	VYHODNOCENÍ A DISKUZE .....	27
4.1	Somatická embryogeneze .....	27
4.2	Western blot .....	41
5	ZÁVĚR .....	44

6	CITOVANÁ LITERATURA.....	45
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	50

## CÍLE

### Teoretická část

1. Zpracování literární rešerše na téma *Medicago sativa* a somatická embryogeneze, doplněné o mitogen-aktivované protein kinasy (MAPKs), zaměřené především na solným stresem aktivovanou MAPK u *Medicago sativa* – SIMK.

### Praktická část

1. Optimalizace povrchové sterilizace listů *Medicago sativa* kultivovaných v *in vitro* podmínkách
2. Optimalizace složení jednotlivých kultivačních médií a délky kultivace u *Medicago sativa*
3. Obrazová dokumentace průběhu somatické embryogeneze u *Medicago sativa* pomocí binokulární lupy a fotoaparátu
4. Ověření propagace rostlin se stejnou genetickou informací pomocí Western blot analýzy



# 1 ÚVOD

*In vitro* somatická embryogeneze je proces, při kterém se ze somatických buněk, jako jsou například listy, vyvíjejí embrya a následně i celé nové rostliny. Tato metoda byla objevena již téměř před 60 lety. V současné době patří mezi nejrozšířenější laboratorní metody pletivových kultur. Hlavním cílem pletivových kultur je snadná a rychlá regenerace nových rostlin. Somatická embryogeneze prováděna *in vitro* umožňuje manipulaci se složením růstového média i vnějších podmínek k zajištění vysoké frekvence regenerace. Díky této metodě jsme schopni za sterilních podmínek a bez potřeby kultivace v hlíně reprodukovat velké množství rostlin z jediného listu mateřské rostliny. Somatická embryogeneze může být prováděna dvěma způsoby – přímou a nepřímou metodou. U nepřímé metody, která využívá k regeneraci rostlin kalus, může docházet k tzv. somaklonální variabilitě. Ta reprezentuje genetické variace u rostlin, které vznikají technikou pletivových kultur. Změny se mohou projevit jako genotypové nebo fenotypové variace. Během kultivace prostřednictvím somatické embryogeneze mohou vznikat různé mutace, které naruší nebo dokonce zastaví normální vývoj rostliny během regenerace. V experimentální části této práce bude představeno šest somatických embryogenezí, z nichž první bude probíhat podle původního protokolu a u ostatních pěti bude protokol (právě za cílem předejít případným mutacím) v některých částech experimentu pozměněn.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rod *Medicago*

Rod *Medicago* (česky Tolice) patří do čeledi bobovité (*Fabaceae*), řádu bobotvaré (*Fabales*), třídy vyšších dvouděložných rostlin (*Rosopsida*). *Medicago* je také někdy zastarale zařazováno do čeledi *Leguminosae* (luštěniny), která je ale nyní součástí čeledě bobovité (Steele *et al.*, 2010; Hájková, 2015).

Zástupci rodu *Medicago* jsou převážně bílé, žlutě, modře nebo fialově kvetoucí rostliny, které dorůstají výšky od 8 cm do 100 cm. Jedná se o jednoleté i trvalé rostliny či keře, které rostou v mnoha odlišných biotypech (Monteiro, 2003; Mu Xu, 2010).

Původem *Medicago* pochází ze Středního východu, pravděpodobně z oblasti dnešního Íránu. Během starověku se rozšířila do Evropy a odtud na další kontinenty. Nejvíce druhů najdeme převážně v oblasti Středomoří, ale nachází se téměř po celém světě (Monteiro, 2003; Cibulka, 2007; Steele *et al.*, 2010).

Rod *Medicago* zahrnuje přes 80 druhů bylin a keřů včetně významné píce *Medicago sativa*, nebo *Medicago truncatula*, která se využívá jako modelová luštěnina pro genetický výzkum (Steele *et al.*, 2010).

#### 2.1.1 *Medicago sativa*

*Medicago sativa* (Obr. 1) (česky Tolice vojteška, vojteška setá nebo jen vojteška, mezinárodně Alfalfa) je fialově kvetoucí rostlina, která patří do rodu tolíce (*Medicago*), čeleď bobovité (*Fabaceae*) (Hájková, 2015).

Jedná se o vytrvalou rostlinu, která kvete od května do října. Dorůstá do výšky 30 cm až 100 cm. Její lodyha je vzpřímená, tupě hranatá, větvená. Listy jsou řapíkaté, trojčlenné s prostředním listem, který má nejdelší řapík. Listy jsou obvejčité, tj. listy ve tvaru vejce, které jsou nejširší v horní třetině; a obkopinaté, tj. listy jednoduché s čepelí, které jsou nejširší v horní třetině. Konce listů jsou mělce zubaté. Květenství je jednoduché hroznovité ve tvaru hlávky (těž strboulu), tj. květenství se zkráceným vretenem a přisedlými květy, obvykle polokruhovitého až oválného tvaru. Květenství vytváří 12 až 15 květů od bílé do sytě fialové barvy (Cibulka, 2007; Hájková, 2015; Holubová *et al.*, 2016; Pazdera *et al.*, 2016).



Obr. 1 – *Medicago sativa* (vojtěška). Její lodyha je vzpřímená, tupě hranatá, větvená. Listy jsou řapíkaté, obvejčité a obkopynaté. Květenství je jednoduché hroznovité ve tvaru hlávky, obvykle polokruhovitého až oválného tvaru. Květenství vytváří 12 až 15 květů fialové barvy. Převzato z en.wikipedia.org; originální ilustrace (Masclef, 1891).

*M. sativa* roste na mnoha různých typech půd, ale obecně upřednostňuje dobře odvodněné hlinité půdy s vysokým obsahem alkalických kovů. Vojtěšku můžeme nalézt jak v nížinách, tak v horských oblastech. Vyskytuje se také ve stepích, na skalnatých a travnatých svazích nebo v písčných dunách. V pobřežních oblastech se vojtěška vyskytuje na písčitéch a písčito-hlinitých půdách, zatímco v horských oblastech má tendenci růst na těžších jílovitých typech půd. V České republice ji můžeme volně nalézt především na loukách, mezích, podél cest nebo na rumišťích ve městech (Duke, 1981; Bennett *et al.*, 1998; Cibulka, 2007).

Vojtěšce se nedaří v zamokřených půdách, toleruje průměrné roční srážky až do 1 030 mm (v New Yorku, USA). Snese teploty od 4,3 °C až 28,5 °C a pH půdy mezi 4,3 až 8,7, ideálně však roste v teplejších oblastech s neutrálním pH půdy (Duke, 1981; Hájková, 2015).

Hlavní regiony, ve kterých se pěstuje vojtěška, jsou Severní Amerika (41 % z celosvětové výroby), Evropa (25 %), Jižní Amerika (23 %), Asie (8 %). Největšími producenty (v milionech ha) je USA (9), Argentina (6,9), Kanada (2), Rusko

(1,8), Itálie (1,3) a Čína (1,3). Celosvětová produkce vojtešky byla v roce 2006 okolo 436 milionu tun, a byla tak nejvíce pěstovaná pícnina na světě (Yuegao a Cash, 2009; Reddy *et al.*, 2014).

Vojteška se pěstuje především jako krmivo. Pro hospodářská zvířata má vysokou výživovou hodnotu, protože obsahuje velké množství bílkovin, vitamínů a minerálů. Vojteška produkuje více bílkovin na hektar než obilí, a je tak vysoce žádanou rostlinou na produkci sena a pastvy pro zvířata. Její další významnou vlastností je schopnost fixovat atmosférický dusík, a tím zvyšovat úrodnost půdy. Proto slouží jako základ pro udržitelné zemědělství, kde se používá jako podsev při pěstování obilovin. Pomáhá proti snižování podzemní hladiny vody, redukuje slanost suchých půd a poskytuje ochranu proti plevelu a onemocněním obilovin. Slouží také jako modelový organismus pro genetické studie (Hanson *et al.*, 1988; Bouton, 2001; Monteiro, 2003).

### **2.1.2 *Medicago truncatula***

*Medicago truncatula* (anglicky barrelclover či barrel medic) je žlutě kvetoucí rostlina. Dorůstá do výšky 10 cm až 60 cm. Listy jsou podobné jako u *M. sativa*, tj. řapíkaté trojčlenné, ale celkově širší. Listy jsou také obvejčité a obkopinaté. Konce listů jsou mělce zubaté. Květenství je opět jednoduché hroznovité ve tvaru hlávky (Young a Udvardi, 2009; Holubová *et al.*, 2016).

*M. truncatula* se vyskytuje v subtropických oblastech, především ve Středomoří, v Asii či v Austrálii. Hojně se pěstuje ale i v mírném podnebném pásu například ve Francii nebo v Severní Americe (Rhodes, 2016).

*M. truncatula* se využívá při krmení hospodářských zvířat především kvůli vysokému obsahu bílkovin. Pro schopnost fixovat dusík se používá i jako podsev při pěstování obilovin (Loi *et al.*, 2000; Rose, 2008).

Na rozdíl od *M. sativa*, které je cizosprašný tetraploid, je *M. truncatula* samosprašná diploidní rostlina. *M. truncatula* má oproti *M. sativa* malou velikost genomu a vyvinutí rostliny do dospělosti trvá jen asi tři měsíce. *M. truncatula* je tak ideální rostlina, která slouží jako modelová luštěnina genetických studií (Barker *et al.*, 1990; Somers a Samac, 2003).

Nejvíce pěstovaný a prozkoumaný kultivar *M. truncatula* je Jemalong. Jeho největší výhodou oproti jiným druhům je jeho dobrá regenerační schopnost, která je mezi ostatními luštěninami poměrně vzácná. Využívá se tak například k analýze fixace dusíku pomocí symbiózy s bakteriemi rodu *Rhizobium*, analýze genové exprese, analýze

funkce promotoru nebo k T-DNA mutagenesi. Během posledních 15 let byla *M. truncatula* využita jako modelová rostlina u nespočtu experimentů. Jedním z těchto experimentů je například výzkum španělských vědců, kde u rostlin *M. truncatula* nesoucí kořeny transformované pomocí *Agrobacterium rhizogenes* byl nadexprimován transkripční faktor *MtZpt2-1*. Během tohoto experimentu bylo pozorováno, že tyto upravené rostliny byly schopné normálního vývoje kořenů i v zasolené půdě (Merchan *et al.*, 2007; Rose, 2008).

Tolerance proti suchu je jeden z dalších oblastí výzkumů, kde bylo využito rostliny *M. truncatula*. Například Zhang *et al.* (2005) nadexprimovali transkripční faktor *WXPI*. U rostlin došlo ke zvětšení kutikulárního vosku, a tím ke zvýšené toleranci proti vysušení (Rose, 2008).

## 2.2 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je vývojový proces, který umožňuje ze somatických buněk vytvořit embrya, a nakonec i celé nové rostliny. Tento proces zahrnuje dediferenciaci somatických buněk a následnou rediferenciaci, což má za následek vytvoření nové rostliny. Jako zdroje somatických buněk se nejčastěji využívají listy nebo kořeny. Somatická embryogeneze je opak pro zygotickou embryogenezi, která využívá oplozené buňky – zygoty, které vznikají splynutím dvou pohlavních gamet (Pierik, 1997; Rose *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2010).

Proces produkce somatických embryí byl poprvé popsán před téměř 60 lety. V roce 1958 vědci F. C. Steward a J. Reinert provedli *in vitro* somatickou embryogenezi ze suspenzní kultury *Daucus carota* (mrkve obecné) za přídavku růstového regulátoru kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a kokosového mléka, které sloužilo jako živná půda. Reinert zanedlouho objevil, že embryogeneze může probíhat i na syntetickém médiu. Steward následně popsal, že při izolaci jednotlivých buněk i buněčných seskupení dochází ke vzniku totipotence, díky které může být dosaženo regenerace celé rostliny (Steward *et al.*, 1958; Pierik, 1997).

V roce 1968 se M.C. Benbadis pokusil o regeneraci *Daucus carota* (mrkev obecná) pouze z jediné buňky suspendované v kapce vody na mikroskopickém sklíčku. Experiment ale nebyl příliš úspěšný, a byl tak nahrazen kultivací skupiny buněk v tzv. mikro-komůrkách. V těchto mikro-komůrkách byla buněčná kultura naočkována na agar vedle již naočkovaného mateřského kalusu, který pomohl stimulovat buněčné dělení (Nag a Street, 1973; Pierik, 1997).

Somatická embryogeneze se dnes dělí na metodu přímou a nepřímou. Přímá somatická embryogeneze je proces vytváření somatických embryí přímo z explantátu bez formování kalusu. Proces vychází z tzv. PEDC (pro-embryonic determined cells) buněk, neboli předem definovaných embryonálních buněk. Tyto buňky jsou již předem naprogramované k indukci embryí. Takovými buňkami mohou být například buňky listového mezofylu či meristému. U nepřímé metody dochází nejprve ke vzniku kalusu a teprve následnou kultivací kalusu se formují embrya. Vychází se z tzv. IED (induced embryogenic determined cells) buněk, neboli indukovaných embryonálních buněk. Takové buňky získáme například kultivací rozřízných listů na specifickém médiu (Conger *et al.*, 1983; Finer, 1995).

### **2.2.1 Somatická embryogeneze u *Medicago sativa***

S ohledem na masovou produkci a krmnou hodnotu, je *M. sativa* jedna z nejdůležitějších píceň. Efektivní regenerační schopnost z jedné nebo více buněk, je jeden z nejdůležitějších faktorů úspěšné aplikace technik pletivových kultur rostlin na zdokonalení genetickou modifikací. Somatická embrya postrádají endosperm, který je přírodním zdrojem rostlinných růstových regulátorů a živin. Rostlinné médium pro kultivaci je proto obohaceno o aminokyseliny, vitamíny a rostlinné růstové regulátory. Pro lepší somatickou embryogenezi a dozrávání embryí může pomoci přidání například kvasnic, kasein hydrolyzátu, kokosové vody nebo cyanobakteriálního extraktu. Schopnost produkce kvalitních somatických embryí nezáleží pouze na nutričních hodnotách kultivačního média, ale také na abiotickém stresu. Světlo a teplota nemusí ovlivnit jen růst rostliny, ale můžou změnit i chemické složení médií, především u rostlinných růstových regulátorů (Bender a Neumann, 1978; Dunlap *et al.*, 1986; Dunlap a Robacker, 1988; Anandarajah a McKersie, 1992; Rao a Suprasanna, 1999; Nirmal *et al.*, 2007; Palíková *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2011; Amini *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Fytohormony**

Růst, morfologii i zdraví rostlin ovlivňují rostlinné hormony neboli fytohormony. Pokud jsou tyto fytohormony uměle syntetizovány, hovoříme o rostlinných růstových regulátorech, které jsou důležitou součástí kultivačních médií nejen při somatické embryogenezi. Mezi hlavní zástupce rostlinných hormonů patří auxiny, cytokininy, gibbereliny, ethylen a kyselina abscisová (Eckardt, 2015).

Auxiny jsou nízkomolekulární organické kyseliny obsahující ve své struktuře heterocykl a karboxylovou skupinu. Nejběžnějším přirozeně se vyskytujícím se auxinem v přírodě je indol-3-octová kyselina (IAA). Mezi typické syntetické auxiny patří kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). 2,4-D je účinná především na podporu tvorby embryonálních kultur, protože je obvykle méně metabolizována buňkami než jiné auxiny. Auxiny u rostlin stimulují růst stonku, hlavního kořene a postranních kořínků. Dále mohou v rostlinách ovlivňovat i gravitropismus, fototropismus, formování listů či apikální dominanci. Auxiny jsou velmi široce používány v pletivových kulturách a tvoří obvykle nedílnou součást živného média (Leopold,

1955; von Arnold *et al.*, 2002; Woodward a Bartel 2005; George, 2007; Sauer *et al.*, 2013).

Cytokininy jsou deriváty N<sup>6</sup>-substituovaného purinu, které jsou schopné buněčného dělení. Miller *et al.* (1995) objevili, že cytokininy jsou přírodní rostlinné hormony, které ovlivňují normální rostlinný vývoj. Cytokininy v rostlinách regulují buněčný cyklus, stimulují dělení buněk, inhibují růst kořene a ovlivňují i vývoj chloroplastů. Mezi nejběžnější zástupce patří zeatin a kinetin (Mok, 1994; Mok a Mok, 2001; Eckardt, 2003).

V pletivových kulturách rostlin hraje obsah auxinů a cytokininů důležitou roli při morfogenezi. Při vysokém obsahu auxinů a cytokininů dochází k embryogenezi, vzniku kalusu a růstu kořene. Při nízkém obsahu těchto regulátorů dochází k bujení nadzemní části rostliny (George, 2007; Su *et al.*, 2011).

Gibereliny jsou metabolické produkty houby *Gibberella fujikuroi*. Je známo, že gibereliny jsou přítomny v cévnatých rostlinách, u některých hub a bakterií. Mezi zástupce patří kyselina giberelinová (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>), giberelin A<sub>1</sub> (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>) a giberelin A<sub>2</sub> (C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>). V rostlinách způsobují především intenzivnější růst listů a zvýšenou apikální dominanci. Gibereliny pomáhají také překonat dormanci semen, internodií a pupenů (Brian, 1959; Hedden a Sponsel, 2015).

Ethylen patří mezi nejjednodušší alkenové plyny. K jeho syntéze dochází během určitých fází vývoje rostliny v souvislosti s abiotickým a biotickým stresem. Ethylen ovlivňuje několik aspektů růstu rostliny, od vývoje rostliny až po jeho dopad na životní prostředí. Již v roce 1901 Dimitry Neljubow prokázal, že ethylen je aktivní součástí svítivých plynů, které ovlivňují rostliny. V 80. letech minulého století došlo díky příchodu nových molekulárně-biologických technik k výraznému průlomů v oblasti výzkumu ethylenu. Znalosti získané během tohoto výzkumu na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* jsou dnes aplikovány na mnoho dalších rostlinných druhů. V současné době došlo k detailnímu popsání regulace biosyntézy ethylenu a signální transdukce ethylenu. Ethylen stimuluje vývoj květů, dozrávání plodů, stárnutí a opadávání listů u mnoha různých druhů rostlin. Ethylen akumulovaný v pletivech může inhibovat růst a vývoj rostliny (McAfee a Page, 1971; Mayak a Halevy, 1972; Aharoni *et al.*, 1979; Chaves a de Mello-Farias, 2006; George, 2007; Bakshi *et al.*, 2015).

Pozorování ukázala, že ethylen a auxin můžou regulovat aktivitu toho druhého. Například auxin může snižovat schopnost ethylenu urychlovat procesy spojené se



stárnutím jako je dozrávání nebo opadávání listů. Vyšší koncentrace auxinu vede také k větší produkci ethylenu (George, 2007; Lin *et al.*, 2009).

Kyselina abscisová (ABA) je zapojena do mnoha různých fyziologických procesů u rostlin. Během růstu rostlin má ABA velmi důležitou roli v souvislosti s abiotickým stresem jako je sucho, chlad nebo vysoká slanost půdy. Při vývoji semen ABA zvyšuje toleranci proti vysušení a inhibuje předčasné klíčení. Kyselina abscisová také zlepšuje vývoj a dozrávání somatických embryí (Oliver a Bewley, 1997; Frey *et al.*, 1999; Blöchl *et al.*, 2005; Vahdati *et al.*, 2008; Amini *et al.*, 2016).

Vzhledem k relativně snadné manipulaci s fytohormony u kultivačních médií, jsme schopni se pokusit o optimalizaci kultivačních procesů, včetně somatické embryogeneze.

### **2.3 Antibiotika**

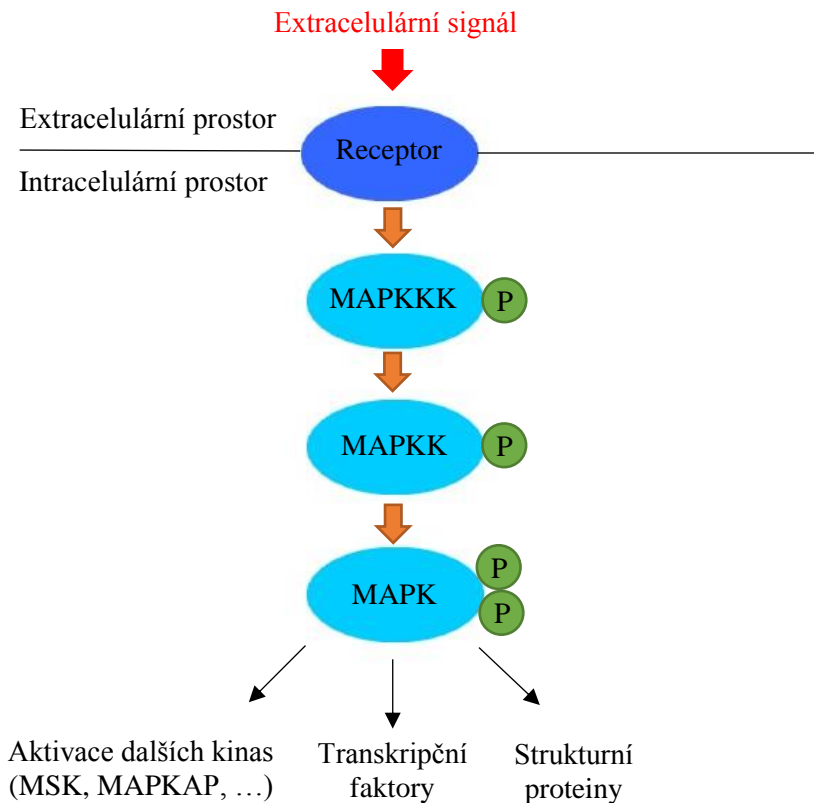
Během kultivace také často dochází ke kontaminaci explantátů. To může být zapříčiněno nedodržením aseptických podmínek, špatnou sterilizací listu již před samotou kultivací nebo nedůslednou manipulací během přenášení na médium. Na snížení tohoto rizika a zamezení růstu nežádoucí kontaminace se do médií přidávají různá antibiotika, například carbenicillin či ticarcillin. Jednou z nejvyužívanějších směsí antibiotik je ticarcillin (ticarcillin disodium) spolu s amoxicilin/klavulanátem (klavulanová kyselina; clavulanate potassium), prodávány také pod obchodním názvem Timentin™. Ticarcillin je derivát penicilinu, který patří do skupiny  $\beta$ -laktamových antibiotik. Ty inhibují syntézu bakteriální buněčné stěny. Klavulanová kyselina je  $\beta$ -laktamasový inhibitor.  $\beta$ -laktamasa je enzym, produkováný bakteriemi, který brání účinnost laktamového antibiotika. Klavulanová kyselina inhibuje tuto schopnost bakterie se bránit, a zvyšuje tak rozsah účinnosti antibiotik o další původně resistantní druhy. Timentin™ je vysoce efektivní při eliminaci *Agrobacteria* a gram-negativních bakterií. Vykazuje také stimulační efekty při organogenezi. Oproti další používané směsi antibiotik – carbenicillinu a cefotaximu, je Timentin™ stabilnější a rezistentní proti inaktivaci  $\beta$ -laktamasou (Saxon *et al.*, 1987; Nauerby *et al.*, 1997; Ling *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2000; Liras a Martín, 2009; Gentry *et al.*, 1985; Shaikh *et al.*, 2015).

## 2.4 Mitogen-aktivované protein kinasy

Mitogen-aktivované protein kinasy (MAPKs nebo MAP kinasy) jsou enzymy ze skupiny serin/threonin protein kinas. Reprezentují jednu z největších skupin enzymů, tvoří přibližně 2 % všech eukaryotických proteinů. MAPKs jsou hlavní součástí procesů jakými jsou kontrola embryogeneze, buněčná diferenciace, proliferace i buněčná smrt. Hlavní funkcí MAPKs je regulace genové exprese u eukaryot v reakci na extracelulární signály. MAP kinasy přímo regulují genovou expresi pomocí fosforylačních transkripčních faktorů (Pearson *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Kobe a Kemp, 2010).

MAP kinasy jsou regulovány fosforylační kaskádou (Obr. 2). MAPK kaskáda se skládá z modulu složeného z MAPK kinasy kinasy (MAPKKK), MAPK kinasy (MAPKK) a MAPK. Tento modul protein kinas je napojen na síť různých receptorů, které jsou stimulovány vnějšími podněty. Signál je skrz MAPK kaskádu šířen tak, že dochází k postupné fosforylaci a aktivaci jednotlivých kinas. To následně může vést až k aktivaci cílových regulátorových proteinů, transkripčních faktorů nebo proteinů zapojených do cytoskeletu (Nakagami *et al.*, 2005; Plotnikov *et al.*, 2011).

Inaktivace MAPK kaskády může zabránit napadení určitými patogeny, nebo zvýšit toleranci proti stresovým podmínkám (Lewis *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2004).



Obr. 2 – MAPK kaskáda a přenos signálu. MAPKKK je pomocí fosforylace aktivována receptorem, který reaguje na vnější podnět. MAPKKK fosforyluje MAPKK, a ta duálně fosforyluje MAPK na obou koncích residua. Aktivovaná MAPK může dále aktivovat další kinasy, jako MSK nebo MAPKAP, transkripční faktory nebo strukturní proteiny.

#### 2.4.1 Mitogen-aktivované protein kinasy kinasy kinasy

Mitogen-aktivované protein kinasy kinasy kinasy (MAPKKK, MAP3K nebo MEKK) jsou největší skupinou protein kinas patřící do MAPK kaskády. Ačkoliv skupina MAPKKK tvoří největší a nejvíce homologní skupinu MAPK kaskády, ukázalo se, že pouze v některých případech jsou tyto MAPKKK aktivátory MAPKK. I když jsou všechny MAPKKK velmi příbuzné, můžou být rozděleny do dvou hlavních podskupin – MEKK a Raf. Podskupina MEKK je tvořena kinasami, u kterých bylo ověřeno, že jsou zapojeny do MAPK kaskády. Tyto kinasy aktivují MAPKK pomocí fosforylace serinového nebo threoninového residua. MEKK kinasy zahrnují OMTK1 u *Medicago*; ANP1, ANP2, ANP3, MEKK1 a YODA u *Arabidopsis*. Podskupina Raf jsou kinasy, u kterých nebylo zatím dokázáno, že fungují jako aktivní MAPKKK v MAPK kaskádě. Mezi Raf kinasy patří například CTR1 u *Medicago* nebo EDR1 u *Arabidopsis*.

EDR1 hraje roli při resistenci proti patogenu, jeho funkce jako MAPKKK je ale zatím nejasná (Nakagami *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2015).

Aktivace MAPKKK může docházet prostřednictvím MAPKKK kinas (MAP4K) nebo extracelulárním stimulem prostřednictvím membránových receptorů (Nakagami *et al.*, 2005).

#### **2.4.2 Mitogen-aktivované protein kinasy kinasy**

Mitogen-aktivované protein kinasy kinasy (MAPKKs, MAP2K nebo MKK) mají dvojitou specifitu. To znamená, že mohou být aktivovány na serinovém nebo threoninovém residuu v konzervovaném S/T-X<sub>3-5</sub>-S/T motivu. MAPKKs je několikanásobně menší počet než MAPKs. To naznačuje, že MAPKK pravděpodobně aktivuje několik MAPKs zároveň. MAPKK aktivují MAPK fosforylací threoninového i tyrosinového residua na T-X-Y residuu (Ichimura *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005).

U *Arabidopsis* bylo popsáno několik MAPKKs, například MKK1 nebo MKK2. MKK2 je aktivována pomocí MEKK1 při abiotickém stresu. U MKK1, která je také aktivována abiotickým stresem, ale zatím není známá nadřazená MAPKKK (Nakagami *et al.*, 2005).

#### **2.4.3 Mitogen-aktivované protein kinasy**

MAPK jsou aktivovány dvojitou fosforylací threoninového i tyrosinového residua pomocí MAPKK. Aktivovaná MAPK může fosforylací aktivovat další protein kinasy, například ribosomální S6 kinasu (RSK), MAPK-interagující kinasu (MNK), MAPK-aktivovanou protein kinasu (MAPKAP) nebo protein kinasu aktivovanou mitogenem nebo stresem (MSK), kde mnohé z nich regulují genovou expresi fosforylací histonů a transkripčních regulačních proteinů (Lewis *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2004).

U *Arabidopsis* nalezneme několik MAPK, například MPK3, MKP4 a MPK6. Všechny tyto tři MAPKs mohou být aktivované biotickým i abiotickým stresem (Nakagami *et al.*, 2005).

#### **2.4.4 Mitogen-aktivované protein kinasy u *M. sativa***

Mezi známé MAPKK kinasy u *M. sativa* patří constitutive triple response 1 (CTR1) a oxidačním stresem aktivovaná MAPKKK 1 (OMTK1). CTR1, která patří do skupiny

Raf MAPKK kinas, negativně reguluje reakce na ethylen. OMTK1 patří mezi MEKK MAPKK kinasy. Během experimentu s rostlinnými protoplasty OMTK1 prokázala kinasovou aktivitu, která způsobuje buněčnou smrt. Zvýšenou míru úmrtnosti buněk v rostlině způsobuje MMK3, která je aktivována OMTK1. Ta může být ale aktivována pouze peroxidem vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Chang, 2003; Nakagami *et al.*, 2004; Pareek *et al.*, 2010).

U *Medicago* byly identifikovány dvě MAPKKs – stresem indukovaná MAPKK (SIMKK) a patogen-reagující MAPKK (PRKK). SIMKK může být aktivována jak salinitou, tedy abiotickým stresem, tak stresem biotickým. SIMKK může aktivovat stresem indukovanou MAPK (SIMK). PRKK vyžaduje aktivaci nadřazenou MAPKKK, která je stimulována například houbovou infekcí. PRKK aktivuje tři MAPK – SIMK, *Medicago* MAPK 3 (MMK3) a stresem aktivovanou MAPK (SAMK) (Cardinale *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005).

U *M. sativa* byly doposud identifikovány čtyři významné stresem indukované MAPKs – *Medicago* MAPK 2 (MMK2), MMK3, SAMK a SIMK. Tyto protein kinasy napomáhají vojtěšce při obraně proti napadení patogenem a mimo jiné ovlivňují toleranci při stresových podmínkách. MAPKs mohou být aktivované buď biotickým stresem, jako je houbová či bakteriální infekce, nebo stresem abiotickým, což je například sucho, vlhkost, teplota, poranění nebo přítomnost těžkých kovů v půdě (Cardinale *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2004).

MMK3 není aktivována solným stresem přímo, ale pouze prostřednictvím SIMKK nebo PRKK. Naopak SIMK může být aktivována přímo působením solného stresu, nebo pomocí SIMKK či PRKK. Aktivace exprese SIMK solným stresem probíhá zejména v kořenovém meristému vojtěšky, kde dochází k přemísťování komponentů buněčného dělení jako preprofázního svazku (PPB) nebo fragmoplastu. Aktivace SIMK tak může bránit v normálním vývoji buňky. V současné době se proto začíná využívat metody zvané RNA interference (RNAi), díky které můžeme potlačit expresi SIMKK (Cardinale *et al.*, 2000; Baluška *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Blume *et al.*, 2008).

## 2.5 RNA interference

RNA interference je přirozený regulační mechanismus většiny eukaryotických buněk zapojený do obrany proti virům nebo genomickému zadržování retrotranspozomů. RNAi je jednoduchá a rychlá metoda umlčení genové exprese v řadě organismů. Využívá dvouvláknovou RNA (dsRNA), která reguluje genovou expresi. Umlčení genů je důsledkem degradace dsRNA pomocí enzymu dicer, ribonukleáza ze skupiny RNAas III. Ten ji štěpí do malých 21-22 párů bází dlouhých interferujících molekul (siRNA). siRNA tvoří multiproteinový RNA-Induced Silencing Complex (RISC), který využívá siRNA nebo miRNA (mikroRNA) jako templát pro rozpoznání komplementární mRNA. Při navázání komplementárního vlákna, RISC aktivuje RNAsu a degraduje cílenou RNA. RNA umlčující sekvence jsou obvykle dopraveny jako transgeny nebo jako část virusového vektoru. RNAi může umlčet specifické geny vytvořením knockdown fenotypů, pomocí stabilní transformace nebo pomocí infekce prostřednictvím rekombinantního RNA viru, který nese cílový gen. Výsledný fenotyp je buď identický ke geneticky nulovým mutantům nebo připomíná alelické série mutantů. Někdy je tato metoda nesprávně nazývána tzv. knockout technikou – vyřazení exprese genu. Protože ale RNAi úplně nezruší genovou expresi, jedná se tzv. knockdown techniku – potlačení genové exprese (Agrawal *et al.*, 2003; Burch-Smith *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2005; Kim a Rossi, 2008; Zhang, 2013).

Objevení techniky RNAi představuje jedno z nejnadějnějších oblastí funkční genomiky při zlepšení vlastností obilovin díky vylepšení metabolismu. V současné době se RNAi ukazuje jako slibná metoda na redukci aktivity specifických genů u rostlin, protože rostliny na rozdíl od zvířat nejsou citlivé na mutagenezi způsobenou umlčením specifického genu. RNA interference se tak velmi hojně využívá v experimentální biologii ke studiu funkce genů *in vivo* v různých modelových organismech. Technika RNAi byla úspěšně zavedena u několika rostlinných druhů, kde došlo ke zlepšení jejich nutričních hodnot, celkové kvality a odolnosti proti patogenům a chorobám (Chuang a Meyerowitz, 2000; Kerschen *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2010).

RNA interference nachází uplatnění i v medicíně. První klinická aplikace byla zaměřena proti makulární degeneraci, která způsobuje slepotu nebo omezené vidění především u starších lidí. V současné době se pracuje na léčebných aplikacích proti viru HIV, hepatitidě B i C nebo rakovině (Fattal a Bochot, 2006; Kim a Rossi, 2008).

## 2.6 Western blot analýza

Western blot je důležitá technika využívána především v buněčné a molekulární biologii, pomocí které jsme schopni oddělit a identifikovat specifické proteiny od ostatních proteinů získaných během extrakce buněk. Tato metoda využívá tři základní kroky – separace proteinů podle molekulové hmotnosti, jejich přenos na membránu a vizualizace zájmových proteinů pomocí primární a sekundární protilátky (Mahmood a Yang, 2012).

K separaci proteinů podle molekulové hmotnosti se využívá gelová elektroforéza, kde se separační gel skládá ze dvou částí. V prvním, zaostřovacím gelu se vzorky po nanesení rovnoměrně srovnají do jednoho proužku, takže migrace probíhá všude ve stejném čase. V druhém, rozdělovacím gelu se proteiny separují podle molekulové hmotnosti – menší proteiny migrují gelem snadněji a výrazně rychleji. Po denuraci mají proteiny negativní náboj, proto migrují směrem k pozitivní elektrodě (Mahmood a Yang, 2012).

Při blotování dochází k přenesení proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu. Dalším důležitým krokem Western blotu je blokování. To zamezuje navázání primární protilátky na nespecifické proteiny. Výběr protilátky záleží na antigenu, který má být detekován a také na tom, jaké protilátky jsou dostupné pro daný antigen. Primární protilátka není přímo detekovatelná. Na konečnou detekci se využívá protilátky sekundární. Obě protilátky se získávají imunizací laboratorních zvířat antigenem, kdy hostitelé primární i sekundární protilátky by měli být různé (Mahmood a Yang, 2012; Bass *et al.*, 2017).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál pro somatickou embryogenezi byly v mé bakalářské práci použity rostliny vojtěšky seté – *Medicago sativa* pěstované v hlíně a kultivovány v kultivační místnosti (Weiss Gallenkamp) při teplotě 21 °C, s fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma a intenzitou světla 60 až 80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . K Western blot analýze byly potom použity kořeny přibližně 20 týdnů starých rostlin *M. sativa* vzniklých prostřednictvím somatické embryogeneze kultivovaných *in vitro* na Murashige and Skoog médiu v kultivační místnosti (Weiss Gallenkamp) při teplotě 21 °C, s fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma a intenzitou světla 60 až 80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . V obou případech byla jako kontrolní rostlina použita *Medicago sativa*, kultivar Regen SY (RSY). Z transgenních linií *M. sativa* byla použita linie se sníženou expresí *SIMKK* (*SIMKK RNAi 1D/49*).

### 3.2 Materiál a metody

#### 3.2.1 Přístroje a zařízení

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

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

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

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Binokulární lupa (Leica, Německo)

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

Chlazená centrifuga (Beckman, USA)

Inkubátor IN55 (Memmert, 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 (Beckman Coulter, USA)



Termoblok ThermoCell Cooling & Heating Block (Bioer, Čína)

Třepačka (Labnet, USA)

Vortex-Genie 1 (Scientific Industries, USA)

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

### 3.2.2 Chemikálie

#### Alfa Aesar

- Gellan Gum Powder (Německo)

#### AppliChem

- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (Španělsko)

#### Bio-Rad

- Protein dual colour (USA), ECL substrát (Clarity™ Western ELC Substrat; USA), 4x Laemmli Sample Buffer, Blotting-Grade Blocker (odtučněné sušené mléko; Bio-Rad, USA)

#### Duchefa Biochemie

- Ticarcillin 2Na & Clavulanate K, 15:1 (Nizozemí), Gamborg's B5 basal salt mixture (Nizozemí), Gamborg's B5 vitamin mixture (Nizozemí); Murashige-Skoog's salt mixture (Nizozemí), Nitsch and Nitsch vitamin mixture (Nizozemí); 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina (HEPES; Nizozemí)

#### GE Healthcare

- Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF Blottig Membrane (Německo)

#### GenScript

- Primární králičí polyklonální MMK3 protilátka (USA)

#### Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

- Goat anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> sekundární protilátka HRP (USA)

#### Roche

- cOmplete™ (USA)
- PhoSTOP™ (Švýcarsko)

#### Serva

- Bradfordovo činidlo (Německo)

## **Sigma**

- Adenin (Čína), dithiotreitol (DTT; Kanada), dodecylsírán sodný (SDS; USA), dusičnan draselný (KNO<sub>3</sub>; Japonsko), 2-[2-[2-[2-[bis(karboxymethyl)amino]ethoxy]ethoxy]ethyl-(karboxymethyl)amino]octová kyselina (EGTA, USA), ethanol 96% (Německo), ethanol 70% (Německo), fluorid sodný (NaF; USA), glutamin (USA), glycerol (USA), hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin, BSA, USA), hydroxid sodný (NaOH; Švýcarsko), hypochlorid sodný (Německo), chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>; Německo), chlorid sodný (NaCl; Dánsko), L-glutation (Japonsko), L-prolin (Francie), L-serin (Čína), methanol (Francie), sacharosa (Německo), Tris (USA), Tween 20 (USA), β-merkptoethanol (Německo)

### 3.2.3 Roztoky a média

#### 1% hypochlorid sodný

- 1 ml 10% hypochlorid sodný
- 9 ml dH<sub>2</sub>O

#### Sterilizační roztok

- 10 ml 1% hypochlorid sodný
- 10  $\mu$  Tween 20

#### 1000x Gamborg's vitamin solution

- 112 g Gamborg's B5 vitamin mixture
- 1 l dH<sub>2</sub>O

#### Roztok aminokyselin

- 6,65 g.l<sup>-1</sup> glutamin
- 0,83 g.l<sup>-1</sup> serin
- 0,004 g.l<sup>-1</sup> adenin
- 0,0083 g.l<sup>-1</sup> L-glutation
- 1 l dH<sub>2</sub>O

#### B5H médium

- 3,1 g.l<sup>-1</sup> Gamborg's B5 basal salt mixture
- 1,0 ml.l<sup>-1</sup> 1000x Gamborg's vitamin solution
- 0,5 g.l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>
- 0,25 g.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O
- 0,5 g.l<sup>-1</sup> prolin
- 30 g.l<sup>-1</sup> sacharosa
- 4,5 g.l<sup>-1</sup> Gellan Gum Pouder
- 999 ml dH<sub>2</sub>O
- pH 5,7

Po autoklávování a vychladnutí média přibližně na 55 °C bylo přidáno 30 ml roztoku aminokyselin, 1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> kinetinu.

### **B50 médium**

- 3,1 g.l<sup>-1</sup> Gamborg's B5 basal salt mixture
- 1,0 ml.l<sup>-1</sup> 1000x Gamborg's vitamin solution
- 0,5 g.l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>
- 0,25 g.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O
- 0,5 g.l<sup>-1</sup> prolin
- 30 g.l<sup>-1</sup> sacharosa
- 4,5 g.l<sup>-1</sup> Gellan Gum Pouder
- 999 ml dH<sub>2</sub>O
- pH 5,7

Po autoklávování a vychladnutí média přibližně na 55 °C bylo přidáno 30 ml roztoku aminokyselin.

### **1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution**

- 108,73 g Nitsch vitamin mixture
- 1 l dH<sub>2</sub>O

### **MMS médium**

- 4,3 g.l<sup>-1</sup> MS basal salt mixture
- 1,0 ml.l<sup>-1</sup> 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution
- 30 g.l<sup>-1</sup> sacharosa
- 4,5 g.l<sup>-1</sup> Gellan Gum Pouder
- 999 ml dH<sub>2</sub>O
- pH 5,7

### **MS médium**

- 4,3 g.l<sup>-1</sup> MS basal salt mixture
- 30 g.l<sup>-1</sup> sacharosa
- 4,5 g.l<sup>-1</sup> Gellan Gum Pouder
- 1 l dH<sub>2</sub>O
- pH 5,7

### **Extrakční pufr E**

- 1,19 g HEPES
- 0,43 g NaCl
- 0,038 g EGTA
- 100  $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub>
- 0,004 g NaF
- 10 ml glycerol
- 100 ml dH<sub>2</sub>O

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

- 30 g Tris
- 144 g glycin
- 10 g SDS
- 1 l dH<sub>2</sub>O

### **1x elektroforetický pufr (pracovní roztok)**

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

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

- 24,2 g Tris
- 112,6 g glycin
- 1 l dH<sub>2</sub>O

### **1x transferový pufr (pracovní roztok)**

- 100 ml 10x transferový pufr
- 50 ml methanol
- 850 ml dH<sub>2</sub>O

### **10x TBS (zásobní roztok)**

- 24,2 g Tris
- 87,8 g NaCl
- 1 l dH<sub>2</sub>O

**1x TBS-T (pracovní roztok)**

- 100 ml TBS
- 0,1% Tween 20
- 900 ml dH<sub>2</sub>O

**5% BSA**

- 0,5 g BSA
- 10 ml TBS-T

**4% BSA**

- 0,4 g BSA
- 10 ml TBS-T

**3% BSA**

- 0,3 g BSA
- 10 ml TBS-T

**1% BSA**

- 0,1g BSA
- 10 ml TBS-T

**5% Blotting-Grade Blocker (odtučněné sušené mléko)**

- 0,5 g Blotting-Grade Blocker
- 10 ml TBS-T

**4% Blotting-Grade Blocker (odtučněné sušené mléko)**

- 0,4 g Blotting-Grade Blocker
- 10 ml TBS-T

**3% Blotting-Grade Blocker (odtučněné sušené mléko)**

- 0,3 g Blotting-Grade Blocker
- 10 ml TBS-T

**1% Blotting-Grade Blocker (odtučněné sušené mléko)**

- 0,1 g Blotting-Grade Blocker
- 10 ml TBS-T

### **3.3 Metody**

#### **3.3.1 Somatická embryogeneze *Medicago sativa* – původní protokol**

##### **3.3.1.1 Povrchová sterilizace listů *Medicago sativa***

Při první somatické embryogenezi (SE 1) se postupovalo dle původního protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Z rostlin *Medicago sativa*, které byly pěstovány v hlíně v kultivační místnosti (Weiss Gallenkamp; 21 °C, 16/8 fotoperioda, intenzita světla 60 až 80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) byly opatrně odstříhnuty listy a vloženy do 50 ml kónické zkumavky s kohoutkovou vodou. Sterilizace byla provedena nejprve v 70% ethanolu po dobu 10 s, poté v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 1,5 min. Listy byly nakonec 3x promyty destilovanou vodou. Celý proces sterilizace byl proveden v laminárním boxu (Merci).

##### **3.3.1.2 Průběh somatické embryogeneze**

Listy kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa* byly přemístěny na sterilní filtrační papír a pomocí skalpelu rozříznuty na dvě poloviny. Ty byly přeloženy na Petriho misku s B5H médiem pro iniciaci kalusu. Po 3 týdnech byly kalusy přeloženy na B50 médium, které iniciuje tvorbu embryí. Po 2-3 týdnech byla jednotlivá embrya ze 2/3 jejich délky vertikálně vložena do MMS média pro iniciaci růstu kořene. Po zhruba 1 týdnů byla embrya s viditelnými malými kořínky přeložena na MS médium pro dokončení a udržování nové rostliny *in vitro*. Do všech výše použitých médií byl vždy přidán ticarcillin ( $1\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pro zamezení kontaminace a kultivace probíhala v kultivační místnosti (Weiss Gallenkamp) s konstantní teplotou 21 °C, fotoperiodou 16/8 a intenzitou světla 60 až 80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### **3.3.2 Somatická embryogeneze *Medicago sativa* – optimalizovaný protokol**

##### **3.3.2.1 Modifikace ve sterilizaci**

Druhá somatická embryogeneze (SE 2) probíhala podle původního protokolu, ale s tím rozdílem, že při sterilizaci listů bylo vynecháno promývání v 70% ethanolu. Listy byly tedy sterilizovány pouze v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 1,5 min.

### **3.3.2.2 Modifikace ve sterilizaci a absence MMS média**

Během somatické embryogeneze číslo 3 (SE 3) byly listy sterilizovány 5 min v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma). Zároveň bylo při kultivaci explantátů vynecháno MMS médium. Kalusy byly tedy z B50 média rovnou přeneseny na MS médium.

### **3.3.2.3 Modifikace ve sterilizaci a zvýšení koncentrace růstových regulátorů u B5H média**

Sterilizace v této somatické embryogenezi číslo 4 (SE 4) byla provedena v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 2,5 min. Bylo pozměněno i složení B5H média, do kterého byla přidána 4x vyšší koncentrace 2,4-D a kinetinu ( $4 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D;  $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$  kinetinu). Z několika testovaných koncentrací těchto regulátorů, je podle Amini *et al.* (2016) nejvhodnější právě tato.

### **3.3.2.4 Modifikace ve sterilizaci a absence ticarcillinu**

Během somatické embryogeneze číslo 5 (SE 5) byla sterilizace opět provedena v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 2,5 min. Během kultivace nebyl přidán ticarcillin ( $1 \text{ ml.l}^{-1}$ ) do žádného z použitých médií.

### **3.3.2.5 Modifikace ve sterilizaci a snížení koncentrace růstových regulátorů u B5H média**

Sterilizace u somatické embryogeneze číslo 6 (SE 6) byla opět provedena v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 2,5 min. Do B5H média byla přidána 4x nižší koncentrace 2,4-D a kinetinu ( $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D;  $0,025 \text{ mg.l}^{-1}$  kinetinu).



## 3.4 Western blot

### 3.4.1 Příprava vzorků

Proteiny byly z kontrolních i transgenních kořenů *M. sativa* izolovány extrakčním pufrem E. Před samotnou izolací proteinů byly vzorky rostlinného materiálu homogenizovány za neustálého chlazení tekutým dusíkem tak, aby neroztály. Extrakční pufr E byl skladován při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a před jeho použitím do něj bylo přidáno DTT ( $1\text{ }\mu\text{l.ml}^{-1}$ ), PhoSTOP™ ( $20\text{ }\mu\text{l.ml}^{-1}$ ) a cOmplete™ ( $20\text{ }\mu\text{l.ml}^{-1}$ ). Připravený extrakční pufr E byl napipetován ke každému vzorku zhomogenizovaného rostlinného materiálu (na 1 g vzorku byl přidán 1 ml pufru). Vzorky byly řádně zvortexovány a umístěny na led po dobu 30 min. Poté byly zcentrifugovány v předem předchlazené centrifuze (Beckman, 20 min, 8000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Vzniklý supernatant obsahující vyizolované proteiny byl přepipetován do nových tub a skladován při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.2 Měření koncentrace proteinů

Absorbance vyizolovaných proteinů byla měřena metodou podle Bradfordové pomocí spektrofotometru (Beckman Coulter). Do  $198\text{ }\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O byly přidány vždy  $2\text{ }\mu\text{l}$  z každého vzorku proteinu. Do referenčního vzorku byly namísto vyizolovaného proteinu přidány  $2\text{ }\mu\text{l}$  extrakčního pufru E. Nakonec bylo do všech vzorků připipetováno  $800\text{ }\mu\text{l}$  Bradfordova činidla, které bylo nejdříve naředěno 1:10 s dH<sub>2</sub>O. Vzorky byly důkladně promíchány a inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Poté bylo vždy  $100\text{ }\mu\text{l}$  z každého vzorku napipetováno do kyvety a ta byla následně vložena do spektrofotometru (Beckman Coulter). Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm a výsledná koncentrace byla vypočítána z kalibrační křivky roztoku albuminu.

### 3.4.3 Příprava gelů

Po sestavení aparatury na přípravu gelů bylo mezi skla napipetováno 5 ml rozdělovacího gelu a pro srovnání hladiny i tenká vrstva isopropanolu. Poté, co byly vzorky odstaveny na cca 45 min, aby gel ztuhnul, byl isopropanol pomocí filtračního papíru odsán a místo něho napipetován zaostřovací gel.

### 3.4.4 SDS gelová elektroforéza

Do vzorků byl přidán 4x Laemml Sample Buffer (Bio-Rad) s 5%  $\beta$ -merkaptoethanolem (Sigma). Vzorky byly denaturovány v termobloku (Bioer) při 95 °C po dobu 5 min. Připravený gel byl vložen do elektroforetické vany a ta byla doplněna po rysku 1x elektroforetickým pufrem. Po odstranění hřebínku byl do první jamky napipetován standard (Protein dual colour, Bio-Rad) a do ostatních jamek postupně všechny vzorky vyizolovaných proteinů o stejné koncentraci. Nádoba s aparaturou byla přikryta víkem a zapojena do elektrického zdroje (PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Bio-Rad). Separace proteinů na SDS gelu probíhala při konstantním proudu (10 mA na 1 gel) po dobu cca 3 h při 4°C.

### 3.4.5 Western blot

Po rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti byl gel promyt v 1x transferovém pufru (10 min). Amersham™ Hybond™ P 0.45 polyvinyliden difluorid (PVDF) membrána (GE Healthcare) byla nejprve aktivována 30 s v methanolu a poté promyta v 1x transferovém pufru (10 min). Sestavená Mini-PROTEAN Tetra Cell aparatura (Bio-Rad), naplněná 1x transferovým pufrem po rysku, byla uzavřena víkem a napojena na zdroj napětí. Transfer proteinů z gelu na membránu probíhal buď 1,5 h (100 V, 4 °C) nebo 16 h (16 V, 4 °C). Přebílované membrány byly nejdříve promyty v 1x TBS-T pufru (10 min) a poté blokovány v roztoku 5% BSA (Sigma) a 5% Blotting-Grade Blocker (odtučně sušené mléko; Bio-Rad) po dobu 2 h při laboratorní teplotě. Poté byly promyty v 1x TBS-T (1 min) a následně byly inkubovány s primární protilátkou. V této bakalářské práci byla použita specifická polyklonální králičí protilátka proti MMK3 u *M. sativa* (MsMMK3; GenScript, USA). Tato primární protilátka byla naředěna v poměru 1:5000 v 3% Blotting-Grade Blocker (odtučně sušené mléko; Bio-Rad). Inkubace probíhala po dobu 2 h při laboratorní teplotě. Poté byly membrány promyty v 1x TBS-T (3x10 min) a dále inkubovány se sekundární protilátkou Goat anti-rabbit IgG HRP (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) ředěnou v poměru 1:5000 v 1% BSA po dobu 1,5 h při laboratorní teplotě. Nakonec byly opět promyty v 1x TBS-T (5x10 min). Pro detekci proteinů byl na membránu aplikován Clarity™ Western ELC Substrat (Bio-Rad). Po 2 min inkubace vykazovaly hledané proteiny na membráně luminiscenci, která byla detekována dokumentačním zařízením ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

## 4 VYHODNOCENÍ A DISKUZE

V následující kapitole jsou shrnuty výsledky, které byly cílem této bakalářské práce. Kapitola výsledků je rozdělena na dvě části. V první části jsou představeny výsledky jednotlivých protokolů, které měly za cíl optimalizovat podmínky kultivace somatických embryogenezí provedených u *M. sativa*. V této části je také zachycen průběh vývoje explantátů na fotografiích, které byly pořízeny pomocí binokulární lupy (Leica, Německo) a fotoaparátu. Na snímcích lze spatřit původní sterilizovaný list *M. sativa* a jeho následný vývoj přes kalus, embryo až po dospělou rostlinu.

Ve druhé části jsou zobrazeny výsledky Western blot analýzy, která byla provedena pro potvrzení, zda se u transgenních linií zachovává MMK3 protein. Vyhodnocení Western blot analýzy bylo provedeno pomocí softwaru Image Lab™ (Bio-Rad).

### 4.1 Somatická embryogeneze

Jak již bylo zmíněno, *M. sativa* je jednou z nejdůležitějších píceňin, a tak je porozumění a optimalizace regeneračních schopností jedním z nejdůležitějších faktorů pro úspěšnou aplikaci technik pletivových kultur. Schopnost produkce somatických embryí záleží na chemickém složení médií i na abiotickém stresu. Zatímco v tomto experimentu byla teplota i světlo konstantní (21 °C, 16/8 h fotoperioda, intenzita světla 60-80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), chemické složení médií a doba kultivace byla v každé somatické embryogenezi pozměněna.

Prvním krokem somatické embryogeneze je sterilizace listů. Následuje kultivace na B5H médiu, které iniciuje tvorbu kalusu. Úspěšnost kultivace explantátů na B5H médiu u různých postupů sterilizací je zobrazena v tabulce 1 (Tab. 1). Nejlépe se dařilo rostlinám vzniklým v průběhu SE 6 – listy kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa* byly sterilizovány po dobu 2,5 min v hypochloridu sodném spolu s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) a k iniciaci kalusu sloužilo B5H médium se 4x menší koncentrací 2,4-D a kinetinu.

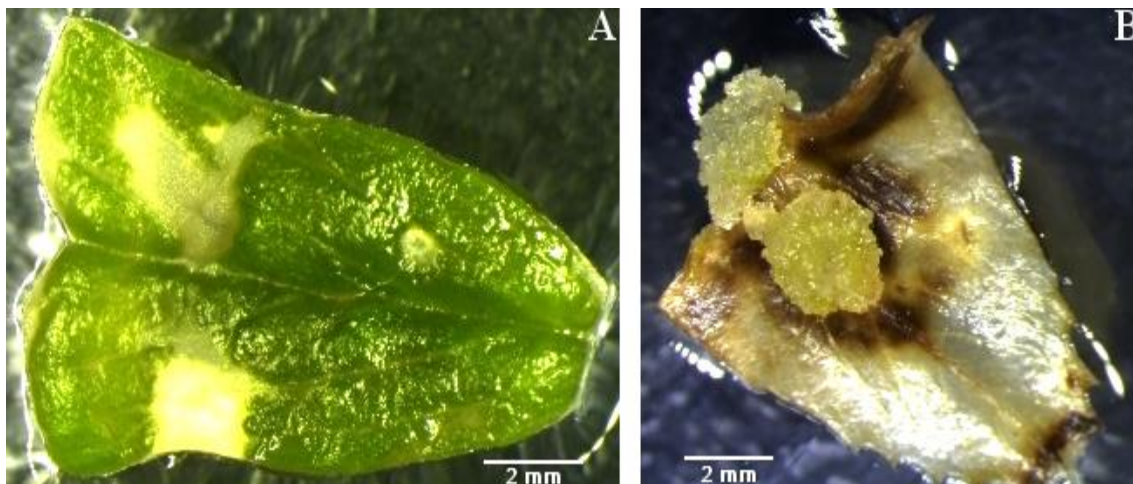
Naopak nejhůře dopadla SE 3, při které byly explantáty sterilizovány 5 min v hypochloridu sodném spolu s 0,1% Tweenem 20 (Sigma). Úspěšnost regenerace transgenní rostliny *M. sativa* byla pouze 3 %. Tento špatný výsledek se dá vysvětlit sterilizací v hypochloridu sodném spolu s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 5 min, při které listy zbělaly. Přes dobrou úspěšnost SE 1 jsme i zde pozorovali větší množství

bělejších listů. Tento stav byl pravděpodobně způsoben použitím ethanolu při sterilizaci listů.

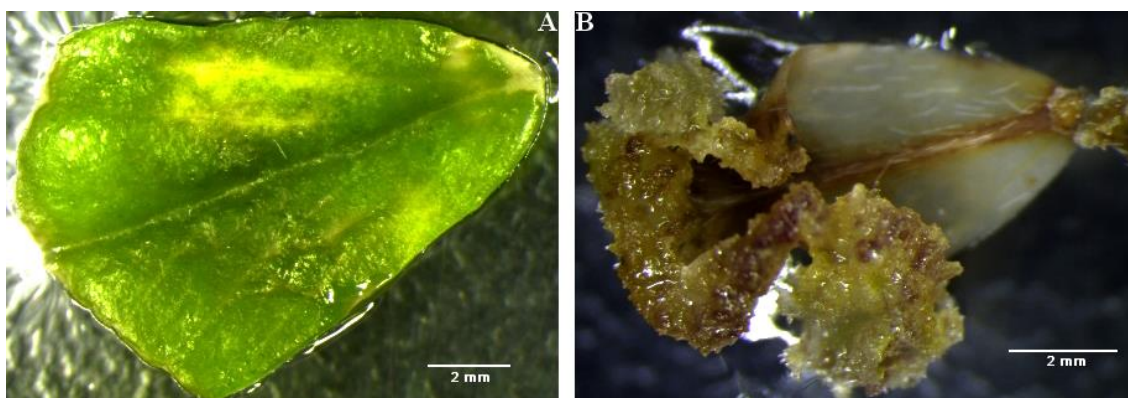
Tab. 1 – Úspěšnost kultivace explantátů na B5H médiu z kontrolních i transgenních listů *M. sativa* na B5H médiu po 2,5 týdnech kultivace.

Číslo SE	Linie	Počet explantátů	Počet explantátů po 2,5 týdnech kultivace na B5H	Úspěšnost (počet explantátů po 2,5 týdnech kultivace na B5H/počet původních explantátů)
1	Kontrolní rostlina	63	52	83 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	63	42	67 %
2	Kontrolní rostlina	63	51	81 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	63	27	43 %
3	Kontrolní rostlina	63	36	57 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	63	2	3 %
4	Kontrolní rostlina	63	45	71 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	63	33	52 %
5	Kontrolní rostlina	63	37	59 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	63	54	86 %
6	Kontrolní rostlina	63	44	70 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	63	58	92 %

U SE 1 a 3 byl pozorován mnohem větší počet sušších a bělejších listů v průběhu kultivace než u ostatních somatických embryogenezí. Jednalo se zejména o listy transgenních rostlin *SIMKK RNAi 1D/49*, kde především u SE 3 nebyla většina listů schopna dalšího růstu, nebo rostla jen velmi omezeně (Obr. 3 a Obr. 4). U listů kontrolních rostlin kultivaru Regen SY bylo pozorováno zblednutí v podstatně menší míře (Obr. 5 a Obr. 6). Vysušení listů bylo pravděpodobně způsobeno použitím 70% ethanolu při sterilizaci v případě SE 1 nebo sterilizací 5 min v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) u SE 3. U ostatních somatických embryogenezí byla sterilizace ethanolem vynechána a v případě použití roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) byla doba sterilizace maximálně 2,5 min. U těchto somatických embryogenezí (SE 2, 4, 5 a 6) nebyly takto vysušené listy pozorovány (Obr. 7 a Obr. 8).

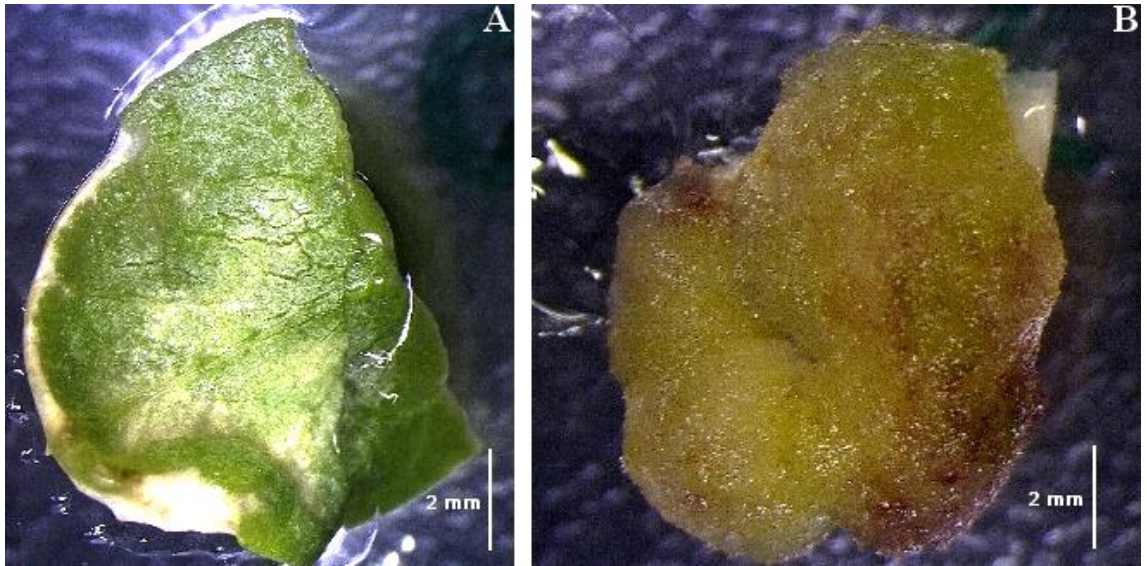


Obr. 3 – Transgenní rostlina *SIMKK RNAi 1D/49* u SE 1; **A** – list, 1. týden kultivace, B5H médium; **B** – kalus, 3. týden kultivace, B5H médium.

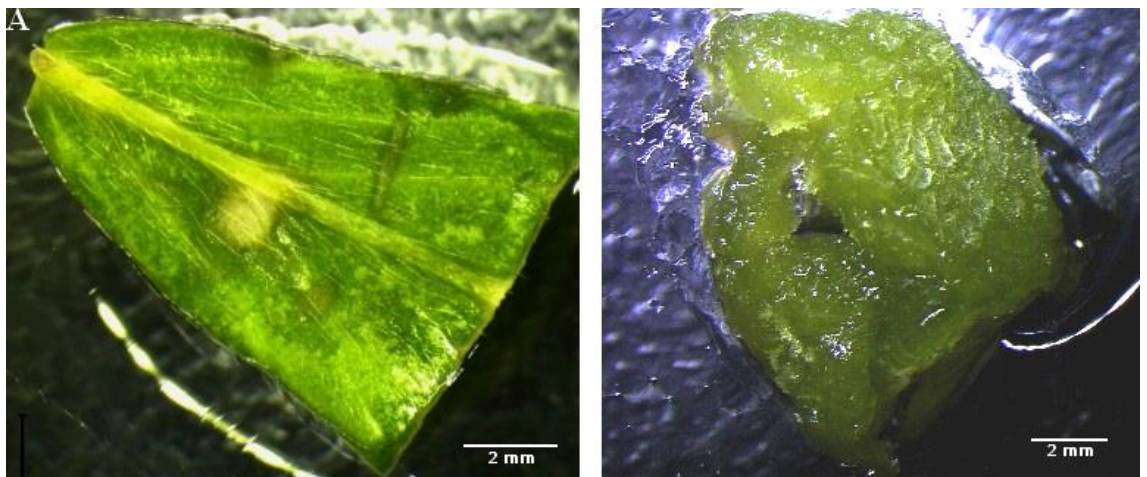


Obr. 4 – Transgenní rostlina *SIMKK RNAi 1D/49* u SE 3; **A** – list, 1. týden kultivace, B5H médium; **B** – kalus, 3. týden kultivace, B5H médium.





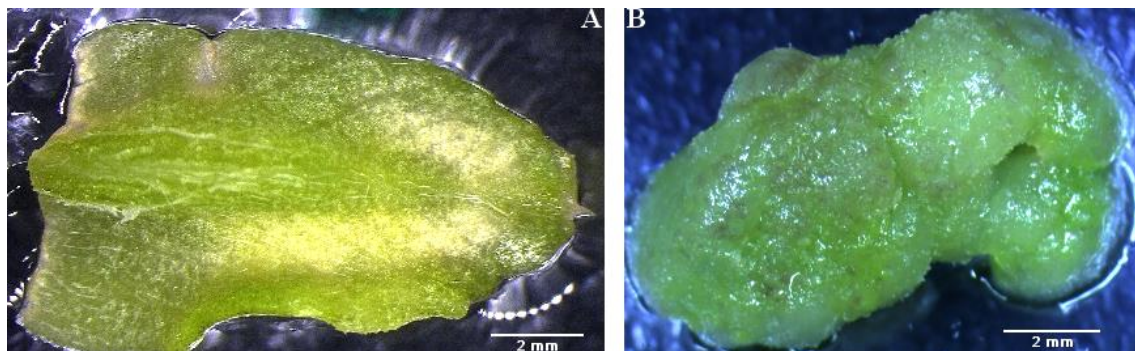
Obr. 5 – Kontrolní rostlina kultivaru Regen SY u SE 1; **A** – list, 1. týden kultivace, B5H médium; **B** – kalus, 3. týden kultivace, B5H médium.



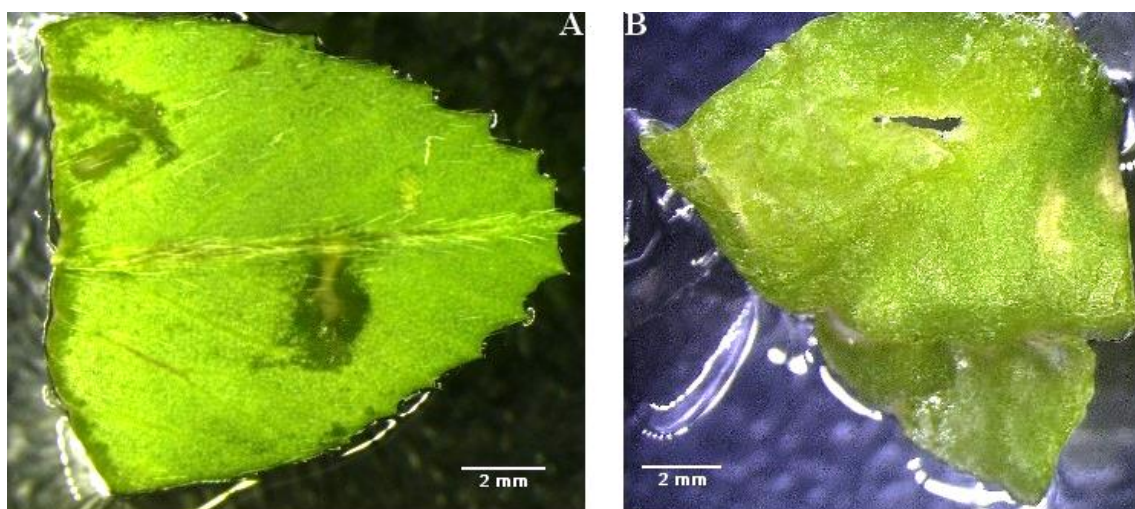
Obr. 6 – Kontrolní rostlina kultivaru Regen SY u SE 3; **A** – list, 1. týden kultivace, B5H médium; **B** – kalus, 3. týden kultivace, B5H médium.

V prvním kroku SE 2 byly listy kontrolních rostlin kultivaru Regen SY (Obr. 7) i transgenních rostlin *SIMKK RNAi 1D/49* (Obr. 8) velmi podobné. Listy a následně vzniklé kalusy byly oproti SE 1 a SE 3 zelenější, zdravější a měly mazlavější strukturu.

SE 4, 5 a 6 zde nebyly zobrazeny, protože byly téměř identické k SE 2.



Obr. 7 – Kontrolní rostlina kultivaru Regen SY u SE 2; **A** – list, 1. týden kultivace, B5H médium; **B** – kalus, 3. týden kultivace, B5H médium.



Obr. 8 – Transgenní rostlina *SIMKK RNAi 1D/49* u SE 2; **A** – list, 1. týden kultivace, B5H médium; **B** – dediferenciace listu, 2. týden kultivace, B5H médium; **C** – kalus, 3. týden kultivace, B5H médium.

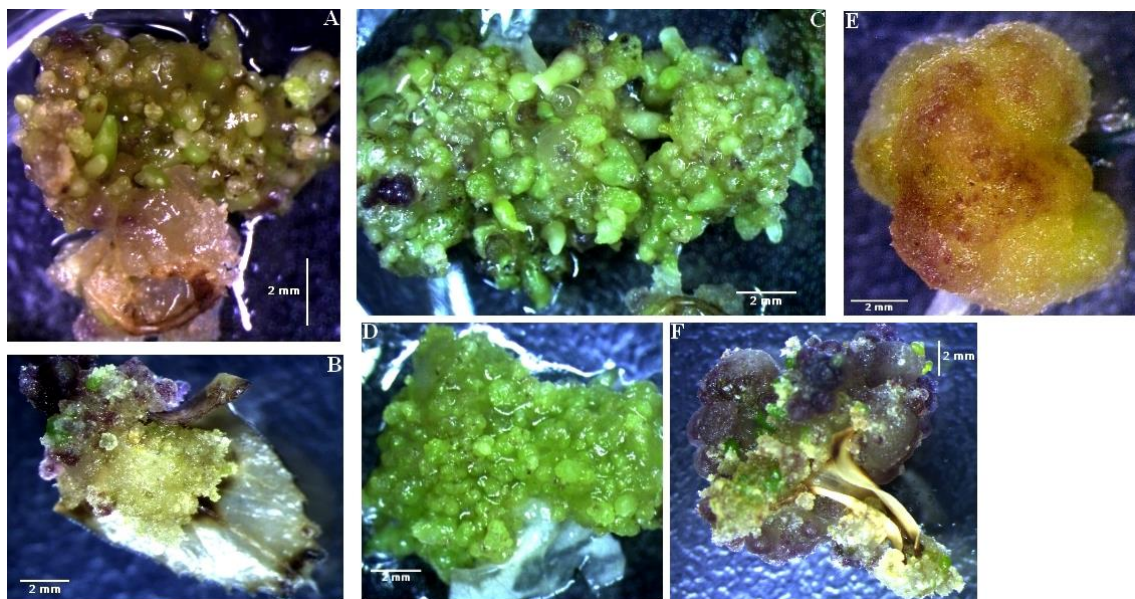


Po 3 týdnech kultivace na B5H médiu byly explantáty přeneseny na B50 médium, kde dochází k tvorbě embryí na kalusu (Obr. 9). Počet takto vzniklých embryí byl po 2 týdnech zaznamenán v tabulce 2 (Tab. 2). Zároveň lze v tabulce nalézt výtěžek – počet vzniklých embryí ku počtu explantátů po 2,5 týdnech na B5H médiu (Tab. 2). Největší počet embryí získaných z explantátů jsme zaznamenali v průběhu SE 5 a to u transgenních rostlin *M. sativa*, jejichž kultivace probíhala bez použití ticarcillinu. Enormní procentuální výtěžek, až 1600 %, jsme zaznamenali u SE 3, kde z pouhých dvou explantátů transgenní rostliny vzniklo 32 transgenních embryí. Naopak nejmenší počet embryí byl formován v průběhu SE 2, kde z 51 explantátů kontrolní rostliny nevznikla žádná embrya.

Tab. 2 – Počet vzniklých embryí po 2 týdnech kultivace kontrolních i transgenních explantátů *M. sativa* na B50 médiu.

Číslo SE	Linie	Počet explantátů po 2,5 týdnech kultivace na B5H	Počet jednotlivých embryí po 2 týdnech kultivace na B50	Výtěžek (počet embryí/počet explantátů po 2,5 týdnech na B5H)
1	Kontrolní rostlina	52	34	65 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	42	30	75 %
2	Kontrolní rostlina	51	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	27	8	30 %
3	Kontrolní rostlina	36	18	50 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	2	32	1600 %
4	Kontrolní rostlina	45	46	102 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	33	68	206 %
5	Kontrolní rostlina	37	23	62 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	54	136	251 %
6	Kontrolní rostlina	44	15	34 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	58	47	81 %





Obr. 9 – Kalus s embryi, 5. týden kultivace, B50 médium; **A** – Kontrolní rostlina kultivaru Regen SY u SE 1; **B** – Transgenní rostlina *SIMKK RNAi 1D/49* u SE 1; **C** – Kontrolní rostlina kultivaru Regen SY u SE 2; **D** – Transgenní rostlina *SIMKK RNAi 1D/49* u SE 2; **E** – Kontrolní rostlina kultivaru Regen SY u SE 3; kalus obsahující embrya uvnitř; **F** – Transgenní rostlina *SIMKK RNAi 1D/49* u SE 3.

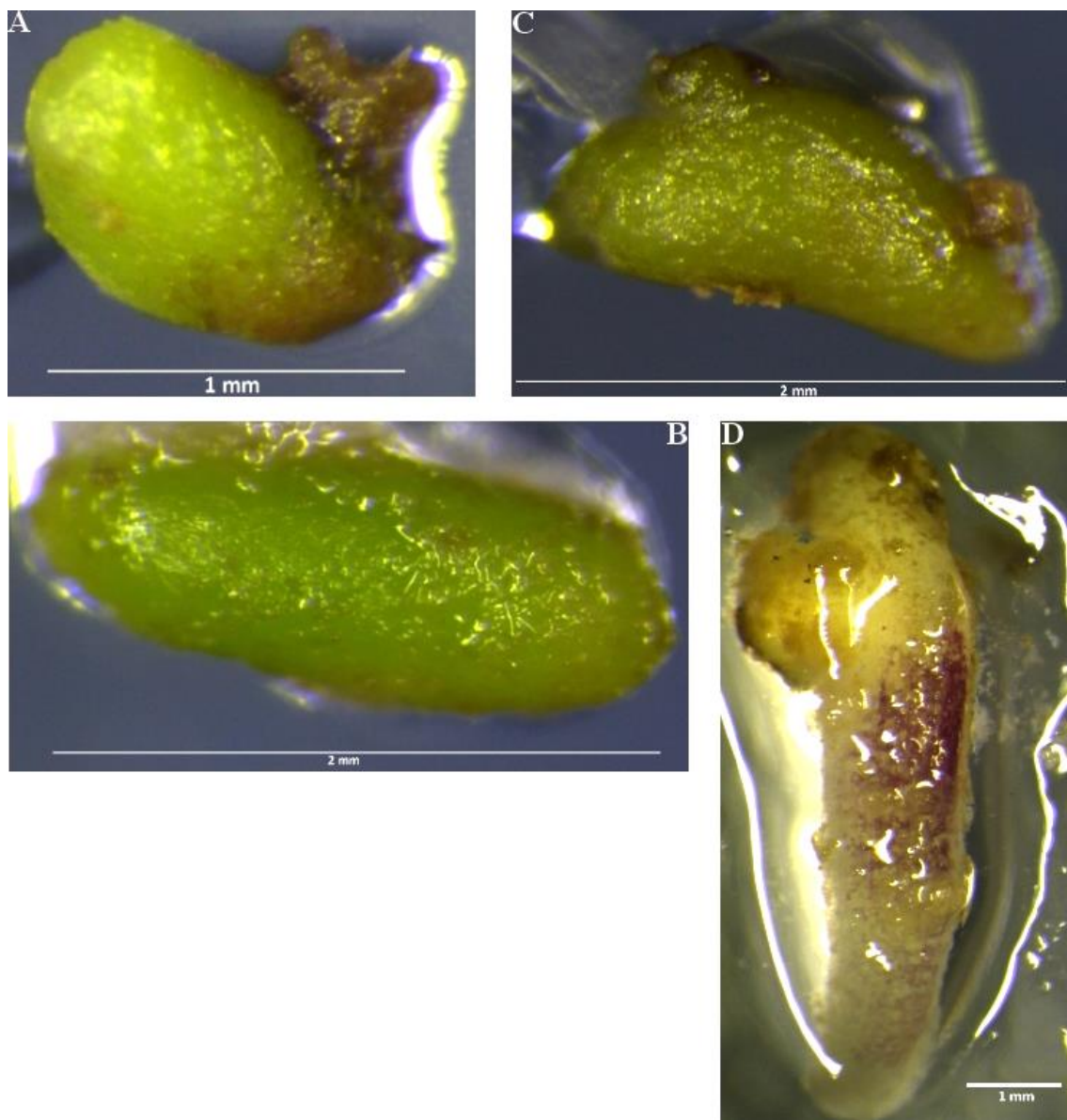
Následujícím krokem somatické embryogeneze je přenesení jednotlivých embryí na MMS médium, kde dochází k jejich dalšímu vývoji a k iniciaci kořenů (Obr. 10 a Obr. 11). Počet embryí, u kterých se vytvořil kořen během kultivace na MMS médiu, byl zaznamenán v následující tabulce 3 (Tab. 3). Nejvíce úspěšnou byla SE 1, která byla provedena na základě původního protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Zde jsme pozorovali iniciaci kořenů u 2 transgenních embryí a 1 kořene u embrya kontrolní rostliny. SE 5 byla jedinou další embryogenezí, u které jsme zaznamenali iniciaci kořene u kontrolního i transgenního embrya. U SE 2, 4 a 6 jsme nezaznamenali iniciaci kořenů ani u kontrolních, ani u transgenních embryí. Při SE 3 byla vynechána fáze kultivace na MMS médiu za cílem zjištění jeho vlivu na indukci kořenů. V předchozích experimentech se explantátům v této fázi kultivace příliš nedařilo. Při kultivaci embryí na MMS médiu delším než 1 týden začala embrya v průběhu experimentu černat a zdálo se, že odumírají. Na základě předchozího pozorování jsme se rozhodli postup SE 3 pozměnit. Jednotlivá embrya byla přenesena z B50 média přímo na MS médium.

Tab. 3 – Počet kontrolních i transgenních *M. sativa* embryí s kořeny po 1 týdnů kultivace na MMS médiu.

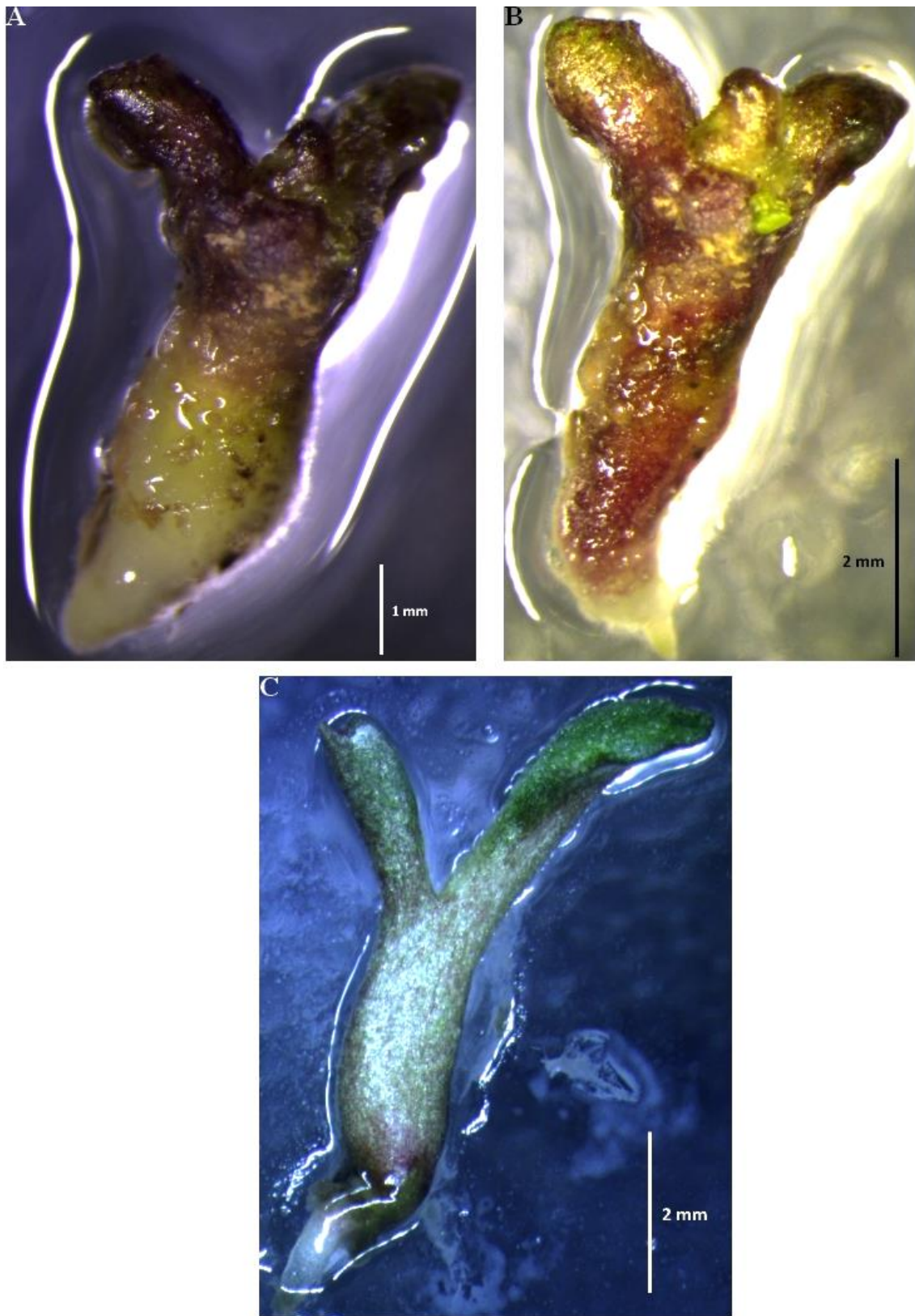
Číslo SE	Linie	Počet jednotlivých embryí po 2 týdnech kultivace na B50	Počet jednotlivých embryí s kořenem po 1 týdnů kultivace na MMS	Úspěšnost (počet embryí s kořenem/počet embryí na B50)
1	Kontrolní rostlina	34	1	3 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	30	2	7 %
2	Kontrolní rostlina	0	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	8	0	0 %
3	Kontrolní rostlina	18	-	-
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	32	-	-
4	Kontrolní rostlina	46	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	68	0	0 %
5	Kontrolní rostlina	23	1	4 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	136	1	1 %
6	Kontrolní rostlina	15	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	47	0	0 %

Následující stádia vývoje kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa* byla u všech somatických embryogenezí totožná, proto je zde demonstrována pouze kontrolní rostlina kultivaru Regen SY propagovaná v průběhu SE 1.

Zde je zobrazen postupný vývoj embrya od globulárního stádia (Obr. 10A) přes torpédovité (Obr. 10B), srdcovité (Obr. 10C) až po kotyledonární stádium (Obr. 10D).



Obr. 10 – Stádia vývoje embrya kontrolní rostliny kultivaru Regen SY u SE 1; **A** – globulární embryo, 5. týden kultivace, MMS médium; **B** – torpédovité embryo, 5. týden kultivace, MMS médium; **C** – srdcovité embryo, 5. týden kultivace, MMS médium; **D** – kotyledonární embryo, 6. týden kultivace, MS médium.



Obr. 11 – Stádia vývoje embrya kontrolní rostliny kultivaru Regen SY u SE 1; **A** – embryo, 7. týden kultivace, MS médium; **B** – embryo, 8. týden kultivace, MS médium; **C** – embryo s děložními listy, 9. týden kultivace, MMS médium.



Jak bylo zmíněno výše, embrya kontrolní i transgenní rostliny *M. sativa* u SE 3 byly přeneseny z B50 média přímo na MS médium. Embrya ostatních SE byla po týdnu kultivace na MMS médiu přenesena na MS médium, kde pokračoval jejich další vývoj. Po čtyřech týdnech kultivace byl zaznamenán celkový počet embryí, tedy jak těch, u kterých kořen vyrostl, tak i těch, u kterých k jeho vývoji nedošlo (Tab. 4). Transgenním rostlinám se nejlépe dařilo v průběhu SE 1. Po 4 týdnech kultivace na MS médiu došlo k indukci kořene u 19 ze 27 transgenních embryí a u 4 ze 7 kontrolních embryí. Úspěšný výsledek jsme zaznamenali také u SE 5, kde byl pozorován nárůst kořene u 23 z 69 transgenních embryí a v případě SE 6, jsme kořeny pozorovali u 10 ze 30 transgenních embryí. Kromě transgenních rostlin SE 1, 5 a 6 jsme nepozorovali příliš velké množství embryí s kořenem. U rostlin propagovaných v průběhu SE 3 došlo k indukci kořene jen u zhruba čtvrtiny embryí a u rostlin SE 4 dosahoval tento počet 19 %. Jednoznačně nejhorší výsledek jsme zaznamenali u SE 2, konkrétně u kontrolní rostliny, kde již v předchozí fázi nevznikla žádná embrya.

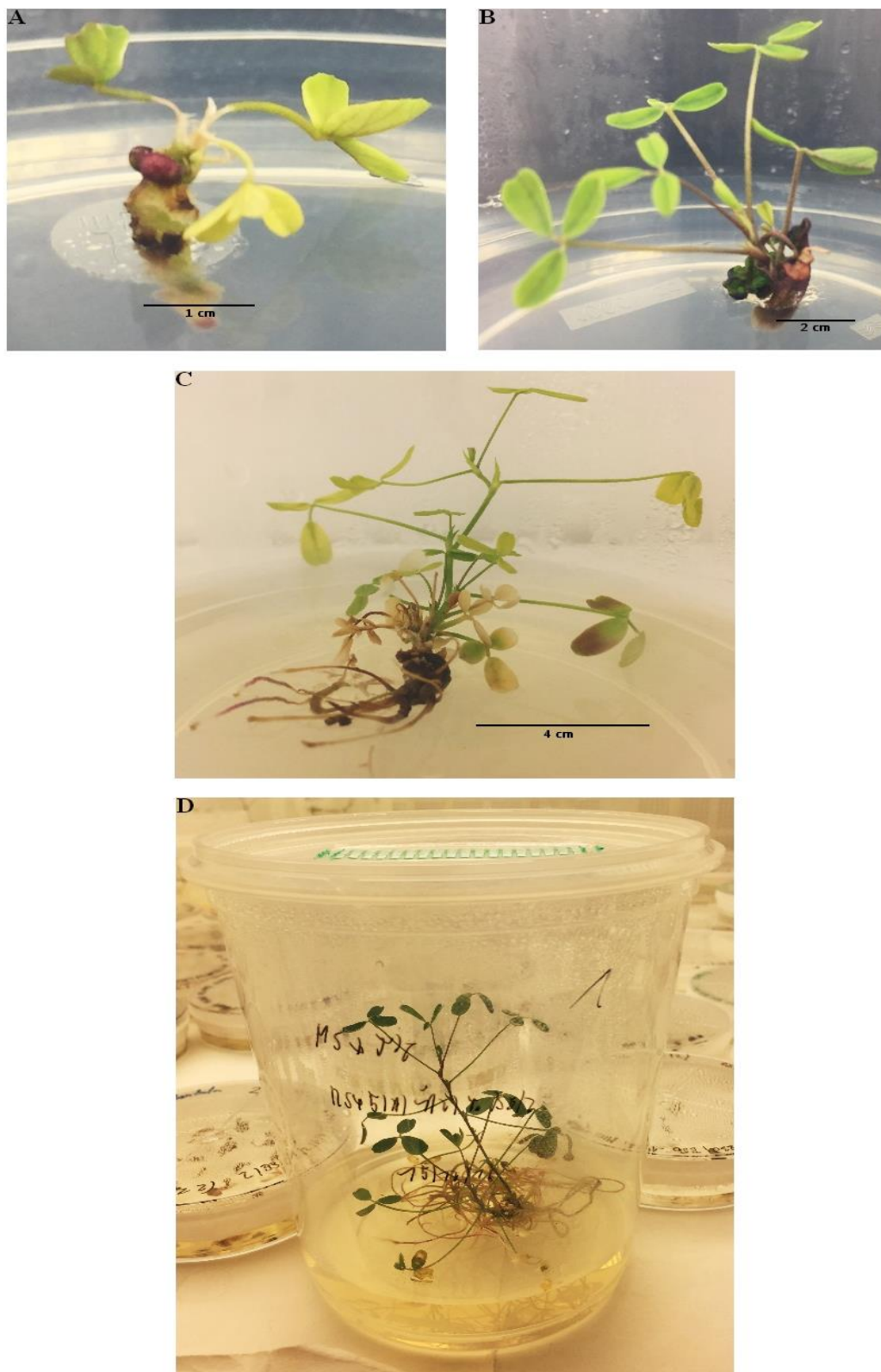
Tab. 4 – Počet kontrolních i transgenních embryí *M. sativa* po 4 týdnech kultivace na MS médiu.

Číslo SE	Linie	Počet jednotlivých embryí po 2 týdnech kultivace na B50	Celkový počet embryí na MS po 4 týdnech (s kořenem)	Úspěšnost kultivace (celkový počet embryí na MS/počet embryí na B50), Úspěšnost indukce kořene (počet embryí s kořenem/počet embryí na MS po 4 týdnech)
1	Kontrolní rostlina	34	7 (4)	21 % (57 %)
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	30	27 (19)	90 % (70 %)
2	Kontrolní rostlina	0	0 (0)	0 % (0 %)
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	8	4 (0)	50 % (0 %)
3	Kontrolní rostlina	18	14 (3)	78 % (21 %)
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	32	15 (4)	47 % (26 %)
4	Kontrolní rostlina	46	25 (3)	54 % (12 %)
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	68	27 (5)	40 % (19 %)
5	Kontrolní rostlina	23	23 (3)	100 % (13 %)
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	136	69 (23)	51 % (33 %)
6	Kontrolní rostlina	15	2 (1)	13 % (50 %)
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	47	30 (10)	64 % (33 %)

Na konci tohoto experimentu byla embrya, u kterých došlo k úspěšnému vývoji podzemní i nadzemní části rostliny, přenesena do krabic s MS médiem (Obr. 12). Z porovnání počtu embryí po čtyřtýdenní kultivaci na MS médiu a z nich vzniklých rostlin (Tab. 5) vyplývá, že nejvyšší úspěšnosti bylo dosaženo u kontrolní rostliny propagované v SE 1, která probíhala na základě původního protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Zde se podařilo z celkových 7 embryí vykultivovat 7 nových rostlin *M. sativa*. Bohužel pro transgenní explantáty nebyl tento protokol příliš vhodný. Nejhoršího výsledku bylo dosaženo u SE 4, kde byly explantáty zpočátku kultivovány na B5H médiu se čtyřnásobně vyšší koncentrací 2,4-D a kinetinu a zároveň u SE 6, kde byly explantáty zpočátku kultivovány na B5H médiu se čtyřnásobně nižší koncentrací 2,4-D a kinetinu. V obou případech, jak u kontrolních, tak i transgenních embryí nedošlo ke vzniku žádných nových rostlin. Naopak u transgenní rostliny při SE 2 byla pozorována nejvyšší úspěšnost ze všech transgenních rostlin – 50 %. V průběhu SE 2 byla pozměněna sterilizace, u které byl vynechán krok použití 70% ethanolu, a tak sterilizace probíhala pouze v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 1,5 min. Ačkoliv u SE 3 byla úspěšnost u transgenní rostliny pouze 13 %, zpozorovali jsme zde ale nejrychlejší regeneraci. Nová rostlina se z embrya vyvinula i přesto, že byla přeskočena fáze kultivace na MMS médium. Z toho nám vyplývá, že vynechání MMS média nemělo při kultivaci *SIMKK RNAi 1D/49* transgenní linie *M. sativa* na konečné výsledky žádný negativní vliv.

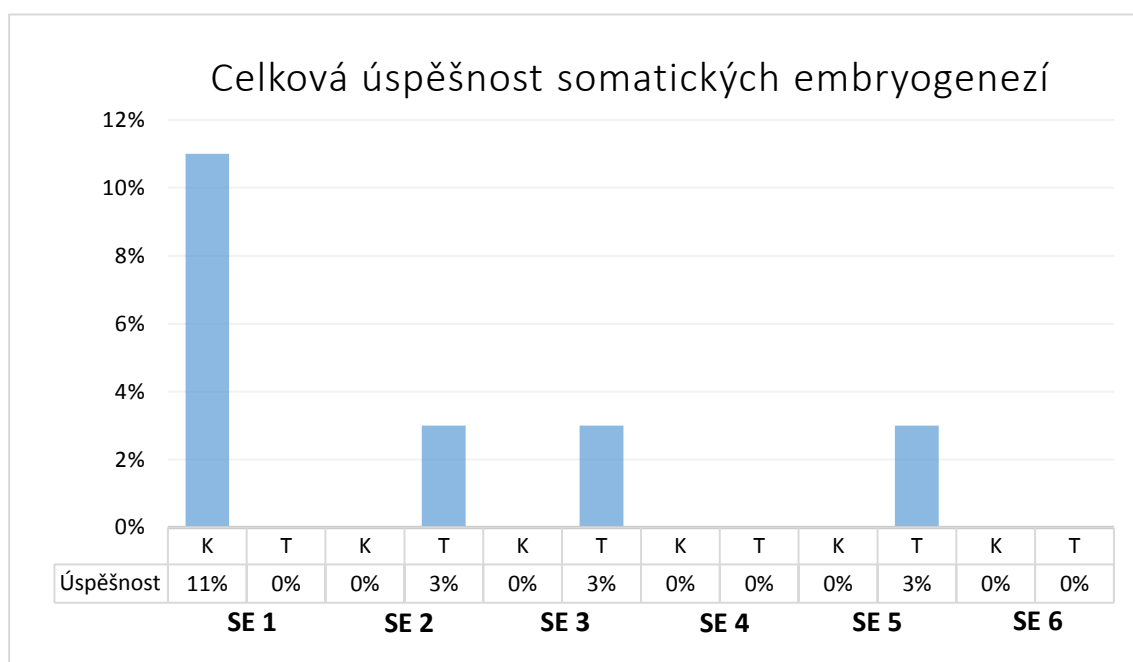
Tab. 5 – Počet nově vzniklých kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa* na MS médiu.

Číslo SE	Linie	Počet embryí na MS po 4 týdnech	Počet nových rostlin	Úspěšnost (počet nových rostlin/počet embryí na MS po 4 týdnech)
1	Kontrolní rostlina	7	7	100 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	27	0	0 %
2	Kontrolní rostlina	0	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	4	2	50 %
3	Kontrolní rostlina	14	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	15	2	13 %
4	Kontrolní rostlina	25	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	27	0	0 %
5	Kontrolní rostlina	23	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	69	2	3 %
6	Kontrolní rostlina	15	0	0 %
	<i>SIMKK RNAi 1D/49</i>	30	0	0 %



Obr. 12 – Dospívající kontrolní rostlina *M. sativa* kultivaru Regen SY u SE 1 na MS médiu; **A** – 12. týden kultivace; **B** – 15. týden kultivace; **C** – 18. týden kultivace; **D** – 21. týden kultivace.

Na základě poměru počtu nově vzniklých rostlin a všech původních explantátů byl sestaven graf (Obr. 13), ve kterém jsou zobrazeny úspěšnosti všech šesti somatických embryogenezí. Z grafu je patrné, že největší úspěšnost měla kultivace kontrolní rostliny v průběhu SE 1, která probíhala podle původního protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Naopak transgenním rostlinám se více dařilo při kultivaci podle pozměněných protokolů, konkrétně u SE 2, 3 a 5. V případě SE 2 bylo při sterilizaci listů vynecháno promývání v 70% ethanolu, a listy tak byly sterilizovány pouze v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 1,5 min. Během SE 3 byly listy sterilizovány 5 min v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma). Zároveň bylo při kultivaci explantátů vynecháno MMS médium. Kalusy byly z B50 média přeneseny rovnou na MS médium. U SE 5 byla sterilizace opět provedena v roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) avšak tentokrát po dobu 2,5 min. Během kultivace nebyl přidán ticarcillin ( $1 \text{ ml.l}^{-1}$ ) do žádného z použitých médií. Nejhorší výsledek jsme zaznamenali při kultivaci kontrolních i transgenních rostlin u SE 4 a 6, u kterých byl pozměněn, jak postup při sterilizaci listů, tak i složení B5H média.



Obr. 13 – Celková úspěšnost somatických embryogenezí – počet nově vzniklých rostlin/počet původních explantátů (63). K – kontrolní rostliny kultivaru Regen SY, T – transgenní rostliny *SIMKK RNAi 1D/49*.



Z dílčích výsledků jsme se pokusili sestavit optimální protokol pro nejefektivnější regeneraci *M. sativa*:

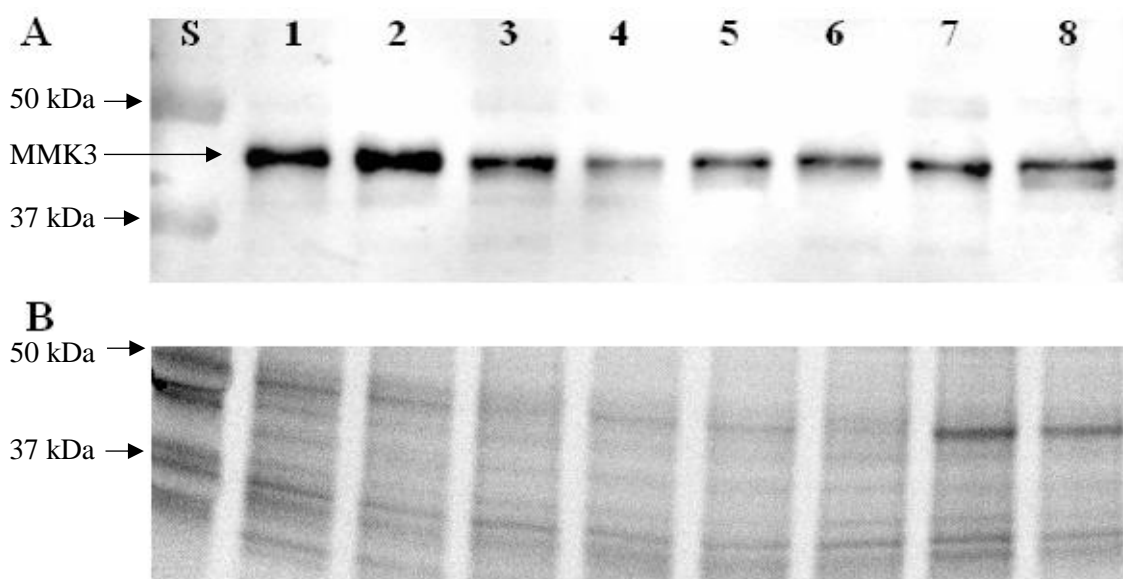
- Sterilizace listů pouze hypochloridem sodným spolu s 0,1% Tweenem 20 (Sigma) po dobu 2,5 min
- Kultivace bez ticarcillinu
- B5H médium bez změny koncentrace růstových hormonů (původní koncentrace: 1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> kinetinu)
- Kultivace bez MMS média

Regenerace *M. sativa* je ale závislá především na genotypu rostliny a jen pár genotypů u některých kultivarů může být použito na regeneraci prostřednictvím právě somatické embryogeneze (Arcioni *et al.*, 1990; Crea *et al.*, 1995). Při nepřímé somatické embryogenezi, kterou jsme využívali v průběhu této práce, může navíc dojít k tzv. somaklonální variabilitě, která představuje genetické změny u rostlin, které vznikají technikou pletivových kultur. Jsou to například mutace, které naruší nebo zastaví normální vývoj rostliny během regenerace. Z tohoto důvodu, všechny naše výsledky dosažené během pokusu optimalizovat kultivační protokol u kontrolní rostliny *M. sativa* kultivar Regen SY a transgenní rostliny *M. sativa SIMKK RNAi 1D/49* nemusí platit v případě použití jiného genotypu či kultivaru této rostliny.

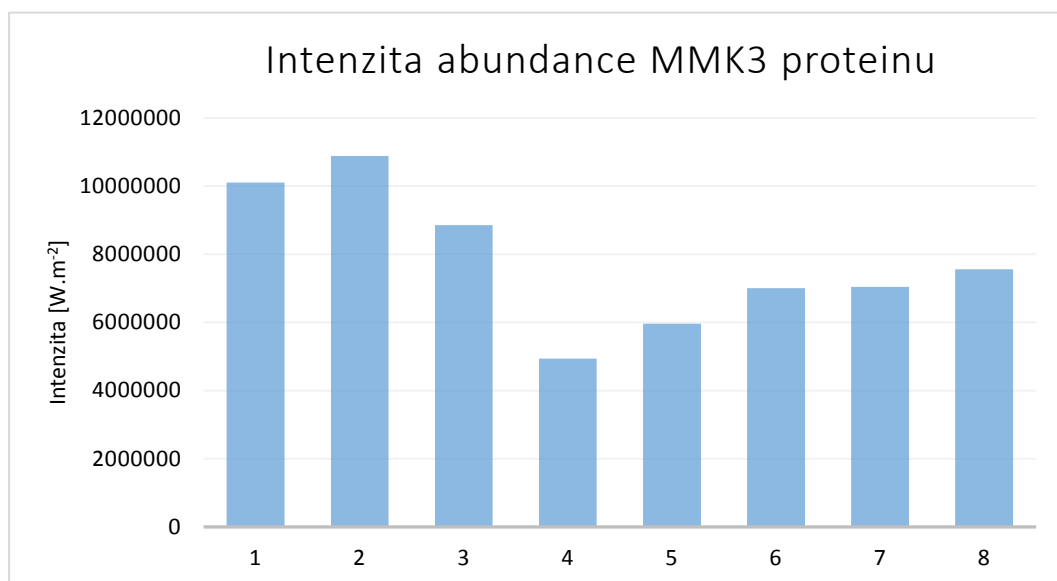
## 4.2 Western blot

Pro ověření skutečnosti, že propagace prostřednictvím somatické embryogeneze nemění a/nebo neovlivňuje genetické vlastnosti nově vzniklých transgenních rostlin, byla využita specifická *de novo* připravená polyklonální primární protilátka proti Medicago MAP kinase 3 (MMK3). Tento protein je v ethylenové signální kaskádě u *M. sativa* aktivován pomocí SIMKK, což je jeho nadřazená MAP kinasa kinasa (Nakagami *et al.*, 2004). V transgenních rostlinách *M. sativa* vzniklých v průběhu experimentální práce byla snížena exprese právě výše zmíněného genu *SIMKK*. Cílem bylo zjištění přítomnosti a případné abundance podřazeného proteinu MMK3. Pomocí metody Western blot byl jak v kontrolních, tak i v transgenních rostlinách *M. sativa* detekován proužek o velikosti přibližně 44 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti MMK3 proteinu (Obr. 14A). Před samotnou inkubací membrány s primární protilátkou byla provedena i kontrola nanesení přibližně stejného množství všech vzorků pomocí

dokumentačního zařízení ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) (Obr. 14B). Již pouhým okem je zřejmé, že intenzita signálu je v kontrolních rostlinách vyšší než u rostlin transgenních. Pro ověření této skutečnosti byla v programu Image Lab™ (Bio-Rad) přesná intenzita signálu, tzn. abundance MMK3 proteinu změřena (Obr. 15). Původní předpoklad, že z důvodu snížené exprese SIMKK pomocí RNAi bude v transgenních rostlinách *SIMKK RNAi 1D/49* linie i snížené množství podřazeného MMK3 proteinu se potvrdil (Obr. 15).



Obr. 14 – Detekce proteinu MMK3 u kontrolních i transgenních rostlin *M. sativa*. **A** – Membrána inkubovaná s primární králičí polyklonální MMK3 protilátkou ředěnou v poměru 1:5000. S – standard; 1,2 – kontrolní rostliny *M. sativa* kultivar Regen SY; 3-8 transgenní rostliny *M. sativa* linie *SIMKK RNAi 1D/49*; dlouhá černá šipka znázorňuje proužek představující protein MMK3; **B** – Gel, sloužící jako kontrola nanesení vzorků po SDS gelové elektroforéze.



Obr. 15 – Měření intenzity abundance MMK3 proteinu u kontrolních rostlin 1-2; a transgenních rostlin 3-8.

## 5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala především somatickou embryogenezí a optimalizací kultivačních podmínek *in vitro* u kontrolních i transgenních rostlin *Medicago sativa*. V teoretické části byly vysvětleny základní pojmy a principy, jako například somatická embryogeneze, RNA interference nebo metoda Western blot.

V experimentální části jsme tyto principy reálně vyzkoušeli v praxi a pokusili se o zlepšení regenerační schopnosti rostlin pomocí změn v původním protokolu somatické embryogeneze. V rámci těchto změn jsme se snažili zdokonalit proces sterilizace a kultivace, a navrhnout ideální protokol. V rámci šesti somatických embryogenezí jsme sledovali regenerační schopnosti a průběh kultivace u kontrolní rostliny *M. sativa* kultivar Regen SY a transgenní rostliny *M. sativa* se sníženou expresí *SIMKK* genu (linie *SIMKK RNAi 1D/49*). K našemu překvapení se kontrolním rostlinám dařilo lépe při kultivaci dle původního protokolu. Naopak transgenní rostliny dosáhly lepších výsledků u protokolu pozměněných. Celková schopnost regenerace skrze nepřímou somatickou embryogenezi byla velmi malá, proto byl pro možné budoucí studie navržen nový optimální protokol, podle kterého by mohla být regenerace *M. sativa* úspěšnější.

Během celé práce byla provedena fotodokumentace, která mapovala celý průběh somatické embryogeneze a jednotlivá stádia vývoje *M. sativa*.

Na závěr byla provedena analytická metoda Western blot, díky které jsme zjistili přítomnost proteinu MMK3 a zároveň nám potvrdila, že z důvodu snížené exprese *SIMKK* pomocí RNAi je snížené i množství tohoto proteinu u transgenních rostlin *SIMKK RNAi 1D/49* linie.

## 6 CITOVANÁ LITERATURA

- Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohmmmed A., Malhotra P. (2003): RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 657-685.
- Aharoni N., Lieberman N., Sisler H. (1979): Patterns of Ethylene Production in Senescing Leaves. *Plant Physiol* **64**, 796-800.
- Ahmed A.B.A., Rao A.S., Rao M.V., Taha R.M. (2011): Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyla nodiflora* (L.) Greene. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **54**, 7-13.
- Ali N., Datta S., Datta K. (2010): RNA interference in designing transgenic crops. *Genetically modified crops* **1**, 207-213.
- Amini M., Deljou A., Nabiabad H.S. (2016): Improvement of *in vitro* embryo maturation, plantlet regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **22**, 321-330.
- Anandarajah K., McKersie B.D. (1992): Influence of plating density, sucrose and light during development on the germination and vigour of *Medicago sativa* L. somatic embryos after desiccation. *Seed Science Research* **2**, 133-140.
- Arcioni S., Damiani F., Pezzotti M., Lupotto E. (1990): Alfalfa, Lucerne (*Medicago* spp.). In: *Legumes and Oilseed Crops I*. 1st ed., (Y. P. S. Bajaj ed.), Springer, Berlin. 682 stran.
- Bakshi A., Shemansky J.M., Chang C., Binder B.M. (2015): History of Research on the Plant Hormone Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**, 809-827.
- Baluška F., Ovečka M., Hirt H. (2000): Salt stress induces changes in amounts and localization of the mitogen-activated protein kinase SIMK in alfalfa roots. *Protoplasma*, 262-267.
- Barker D.G., Bianchi S. Blondon F. (1990): *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* **212**, 40-49.
- Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D. (2017): An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **27**, 4-25.
- Bender L., Neumann K.H. (1978): Investigations on the Indole-3-Acetic Acid Metabolism of Carrot Tissue Cultures (*Daucus carota* L.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **88**, 209-217.
- Bennett S.J., Maxted N., Sabanci C.O. (1998): The ecogeography and collection of grain, forage and pasture legumes in south-west Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* **45**, 253-262.
- Blöchl A., March G.G., Sourdioux M., Peterbauer T., Richter A. (2005): Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science* **168**, 1075-1082.
- Blume Y.B. (2008): *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology*. 1st ed. (W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviaro eds.), Springer, Netherlands, 457 stran.
- Bouton J.H. (2001): Alfalfa. *International Grassland Congress*.  
<http://www.internationalgrasslands.org/files/igc/publications/2001/tema14-1.pdf> (21.12.2016).
- Brian P.W. (1959): Effects of Gibberellins on Plant Growth and Development. *Biological Reviews* **34**, 37-77.
- Burch-Smith T., Anderson J., Martin G., Dinesh-Kumar S. (2004): Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal* **39**, 734-746.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The 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**, 703-711.
- Cibulka R. (2007): Botany.cz: <http://botany.cz/cs/medicago-sativa/> (18.12.2016).
- Chang C. (2003): Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed. *Trends in Plant Science* **8**, 365-368.

- Chaves A.L.S., de Mello-Farias P.C. (2006): Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology* **29**, 508-515.
- Chuang C., Meyerowitz E. (2000): Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4985-4990.
- Conger B.V., Hanning G.E., Gray D.J., McDaniel J.K. (1983): Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. *Science* **221**, 850-851.
- Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H., Cecon P.R. (2000): Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato. *Plant Cell Reports* **19**, 327-332.
- Crea F., Bellucci M., Damiani F., Arcioni S. (1995): Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Adriana). *Euphytica* **81**, 151-155.
- Duke J.A. (1981): *Handbook of Legumes of World Economic Importance*. 1st ed., Plenum Press, New York, 346 stran.
- Dunlap J.R., Kresovich S., McGee R.E. (1986): The Effect of Salt Concentration on Auxin Stability in Culture Media. *Plant Physiology* **81**, 934-936.
- Dunlap J., Robacker K. (1988): Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic Acid in tissue culture media. *Plant Physiology* **88**, 379-382.
- Eckardt N.A. (2003): A New Classic of Cytokinin Research: Cytokinin-Deficient Arabidopsis Plants Provide New Insights into Cytokinin Biology. *Plant Cell* **15**, 2489-2492.
- Eckardt N.A. (2015): The Plant Cell Reviews Dynamic Aspects of Plant Hormone Signaling and Crosstalk. *The Plant Cell* **27**, 1-2.
- Fattal E., Bochot A. (2006): Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* **15**, 1203-1223.
- Finer J.J. (1995): Direct Somatic Embryogenesis. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (O.L. Gamborg, G.C. Phillips), Springer, Berlin, Germany, 91-102.
- Frey A., Audran C., Marin E., Sotta B., Marion-Poll A. (1999): Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Molecular Biology* **39**, 1267-1274.
- Furukawa T. (2015): Impacts of activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology* **5**.
- Gentry L.O., Macko V., Lind R. (1985): Ticarcillin plus clavulanic acid (timentin) therapy for osteomyelitis. *The American Journal of Medicine* **79**, 116-121.
- George E.F., Machakova I., Zazimalova E. (2007): Plant Growth Regulators I: Introduction, Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. (E.F. George ed.), Springer, Basingstoke, UK, 175-204.
- Hájková J. (2015): Příroda.cz: <http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=2758> (19.12.2016).
- Hanson A.A., Barnes D.K. (1988): Alfalfa and Alfalfa Improvement. In: *Agronomy*. (R.R. Hill ed.), American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, 17 (XVII).
- Harada J.J., Belmonte M.F., Kwong R. (2010): Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic). *eLS*.
- Hedden P., Sponsel V. (2015): A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**, 740-760.
- Hernández-Fernández M.M., Christie B. R. (1989): Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genome* **32**, 318-321.
- Holubová D., Danihelka J., Bártová Dittrichová D., Kůrová J. (2016): Botanická fotogalerie: [http://www.botanickafotogalerie.cz/napoveda/typ\\_kvtenstvi.php](http://www.botanickafotogalerie.cz/napoveda/typ_kvtenstvi.php) (19.12.2016).
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt, H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol* **136**, 3276-3283.
- Jonak C., Ökrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415-424.
- Kerschen A., Napoli C., Jorgensen R., Müller A.E. (2004): Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Letters*, 223-228.
- Kim D.H., Rossi, J.J. (2008): RNAi mechanisms and applications. *BioTechniques* **44**, 613-616.

- Kobe B., Kemp B.E. (2010): Principles of Kinase Regulation. In: *Handbook of Cell Signaling*. 2nd ed., (R.A. Bradshaw, E.A. Dennis), Elsevier, Amsterdam, Netherlands 559-563.
- Leopold A.C. (1955): *Auxins and Plant Growth*. 3rd ed., University of California Press, Berkeley, CA, USA, 354 stran.
- Lewis T., Shapiro P., Ahn N. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research* **74**, 49-139.
- Li L., Ye C., Zhao R., Li X., Liu W., Wu F., Yan J., Jiang Y., Yang B. (2015): Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) 4 from rapeseed (*Brassica napus* L.) is a novel member inducing ROS accumulation and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **467**, 792-797.
- Ling H.-Q., Kriseleit D., Ganai M.W. (1998): Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Reports* **17**, 843-847.
- Lin Z., Zhong S., Grierson D. (2009): Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3311-3336.
- Liras P., Martín J. (2009):  $\beta$ -Lactam Antibiotics. In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3. ed., (M. Schaechter ed.), Academic Press, León, Spain, 274-289.
- Loi A., Nutt B., McRobb R., Ewing M.A. (2000): Potential new alternative annual pasture legumes for Australian Mediterranean farming system. In: *Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses*. (L. Sulas ed.), CIHEAM, Zaragoza, Spain, 51-54.
- Mahmood T., Yang P.C. (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**, 429-434.
- Masclef A. (1891): *Atlas des plantes de France*  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa#/media/File:75\\_Medicago\\_sativa\\_L.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa#/media/File:75_Medicago_sativa_L.jpg).
- Mayak S., Halevy A. (1972): Interrelationships of ethylene and abscisic Acid in the control of rose petal senescence. *Plant Physiol* **50**, 341-346.
- McAfee J. A., Page M.W. (1971): Rates of production and internal levels of ethylene in the vegetative cotton plant. *Plant & Cell Physiology* **12**, 839-847.
- Merchan F., de Lorenzo L., Rizzo S.G., Niebel A., Manyani H., Frugier F., Sousa C., Crespi M., (2007): Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **51**, 1-17.
- Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. (1995): Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392.
- Mok D.W., Mok M.C. (2001): Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 89-118.
- Mok M.C. (1994): Cytokinins and Plant Development – An Overview. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. (D.W. Mok ed.), CRC Press. Inc., Boca Raton, FL, USA, 155-166.
- Monteiro M. (2003): Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. *Scientia Agricola* **60**, 683-689.
- Mu Xu S. (2010): *Medicago* Linnaeus, *Flora of China* **10**, 553-557.
- Nag K.K., Street H.E. (1973): Carrot Embryogenesis from Frozen Cultured Cells. *Nature* **245**, 270-272.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *The Journal of biological chemistry* **279**, 26959-26966.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**, 339-346.
- Nauerby B., Billing K., Wyndaele R. (1997): Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **123**, 169-177.
- Nirmal J., Biswas B.K., Yadav A.K. (2007): Somatic Embryogenesis and Plant Development in *Centella asiatica* L., a Highly Prized Medicinal Plant of the Tropics. *HortScience* **42**, 633-637.
- Oliver M.J., Bewley J.D. (1997): Desiccation-Tolerance of Plant Tissues: A Mechanistic Overview. *Horticultural Reviews* **18**, 171-213.

- Palíková M., Krejčí R., Hilscherová K., Babica P., Navrátil S., Kopp R., Bláha L. (2007): Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* **81**, 312-318.
- Pareek A. (2010): *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. 1st ed., (S. Sopory, H. Bohnert, Govindjee eds.), Springer, Netherlands. 526 stran.
- Pazdera Z., Netušil P., Wronská W., Zavadil V. (2016): *Herbář Wendys*.  
<http://botanika.wendys.cz/index.php/21-slovník/1350-strboul-hlavka-capitulum> (19.12.2016).
- Pearson G., Robinson F., Gibson T.B., Bing-e X., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* **22**, 153-183.
- Pierik R.L.M. (1997): *In Vitro Culture of Higher Plants*. 1st ed., Springer, New York City, NY, USA, 328 stran.
- Plotnikov A., Zehora, E., Procaccia S., Seger, R. (2011): The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**, 1619-1933.
- Rao P. S., Suprasanna P. (1999): Augmenting plant productivity through plant tissue culture and genetic engineering. *Journal of Plant Biology* **26**, 119-127.
- Reddy M.S. (2014): *Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture*. (R.O. Ilao, P.S. Faylon, W.D. Dar, W.D. Batchelor eds.), Cambridge Scholars Publishing, Newcastle upon Tyne, UK, 540 stran.
- Rhodes L. (2016): *Medicago truncatula*, Barell Clover. *The IUCN Red List of Threatened Species*.  
<http://www.iucnredlist.org/details/176489/0>
- Rose R.J. (2008): *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions. *Functional Plant Biology* **35**, 253-264.
- Rose R.J., Mantiri F.R., Kurdyukov S., Chen S.K., Wang X.D., Nolan K.E., Sheahan M.B. (2010): Developmental Biology of Somatic Embryogenesis. In: *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*. Springer, Berlin, Germany, 3-26.
- Samac D.A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In: *Agrobacterium Protocols*. (K. Wang), Humana Press, Totowa, NJ, USA, 301-312.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013): Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2585-2577.
- Saxon A., Beall G., Rohr A., Adelman D. (1987): Immediate hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. *Annals of Internal Medicine* **107**, 201-215.
- Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizv S.M.D., Kamal M.A. (2015): Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* **22**, 90-101.
- Shapiro P., Cha H., Dangi S., Hancock C. (2004): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases and Receptors. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. (L. Martini ed.), Maryland, USA, 252-257.
- Somers D.A., Samac D.A. (2003): Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol* **131**, 892-899.
- Steele K.P., Ickert-Bond S.M., Zarre S., Wojciechowski M.F. (2010): Phylogeny and character evolution in *Medicago* (Leguminosae): Evidence from analyses of plastid *trnK/matK* and nuclear *GA3ox1* sequences. *American Journal of Botany* **97**, 1142-1155.
- Steward F.C., Mapes M.O., Mears K. (1958): Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany* **45**, 705-708.
- Su Y.H., Liu Y.B., Zhang X.S. (2011): Auxin–Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Molecular Plant* **4**, 616-625.
- von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Daychok J., Filonova L. (2002): Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**, 233-249.
- Woodward A.W., Bartel B. (2005): Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Wikipedia: [https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa#/media/File:75\\_Medicago\\_sativa\\_L.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa#/media/File:75_Medicago_sativa_L.jpg)  
 (16.2.2018)



- Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. (2003): Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320**, 3-21.
- Yin Y., Chory J., Baulcombe D. (2005): RNAi in transgenic plants. *Current Protocols in Molecular Biology* **26**, 1-19.
- Young N., Udvardi M. (2009): Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 193-201.
- Yuegao H., (2009): *Alfalfa Management Guide for Ningxia*. (D. Cash ed.), Ningxia, China, 114 stran.
- Zhang Y. (2013): RNA-induced Silencing Complex (RISC). In: *Encyclopedia of Systems Biology*. (W. Dubitzky, O.Wolkenhauer, K.H. Cho, H. Yokota eds.), Springer, NY, USA, 1876-1876.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
CTR1	constitutive triple response1
dsRNA	dvouvláknová RNA
DTT	dithiotreitol
EDR1	enhanced disease resistance 1
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	2-[2-[2-[2-[bis(karboxymethyl)amino]ethoxy]ethoxy]ethyl-(karboxymethyl)amino]octová kyselina
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonová kyselina
IED	induced embryogenic determined cells
IgG	imunoglobulin G
MAP4K	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa kinasa
MAPK	mitogen-aktivovaná protein kinasa
MAPKAP	mitogen-aktivovaná protein kinasa aktivovanou protein kinasou
MAPKK, MAP2K	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa
MAPKKK, MAP3K, MEKK	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	heptahydrát síranu hořečnatého
miRNA	mikroRNA
MMK2	<i>Medicago</i> MAP kinasa 2
MMK3	<i>Medicago</i> MAP kinasa 3
MNK	MAPK-interagující kinasa
MPK3, MKP4 a MPK6	mitogen-aktivovaná protein kinasa 3, 4, 6
MS	Murashige & Skoog médium
MSK	protein kinasa aktivovaná mitogenem nebo stresem
NaF	fluorid sodný

NaOH	hydroxid sodný
OMTK1	oxidačním stresem aktivovaná MAPKKK1
PEDC	pro-embryonic determined cells
PVDF	polyvinyliden difluorid
Raf	transformující gen u mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
RISC	multiproteinový RNA-Induced Silencing Complex
RNAi	RNA interference
RSK	ribosomální S6 kinasa
SAMK	stresem aktivovaná MAPK
SDS	dodecylsírán sodný
SE	somatická embryogeneze
SIMK	solným stresem aktivovaná mitogen- aktivovaná protein kinasa
SIMKK	solným stresem aktivovaná mitogen- aktivovaná protein kinasa kinasa
siRNA	malá interferující RNA