

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava nových linií *Medicago sativa* se sníženou
expresí mitogenem-aktivovaných proteinkinas**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petr Urbíš
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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

„Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce prof. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky, konzultace a pomoc při zpracovávání této práce. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Rád bych poděkoval i vedoucímu oddělení prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnění práce v laboratoři a využívání veškerého vybavení. Práce byla podpořena granty IGA (projekty č. IGA_PrF_2019_011 a IGA_PrF_2020_025) ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci a projektem OP VVV: Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje, č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat své rodině za trpělivost, podporu a motivaci v průběhu celého studia.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Urbíš
Název práce	Příprava nových linií <i>Medicago sativa</i> se sníženou expresí mitogenem-aktivovaných proteinkinas
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Významným faktorem pro vznik symbiotického vztahu mezi rostlinou a bakterií je signalizace prostřednictvím mitogenem-aktivovaných proteinkinas (MAPK), které jsou nezbytné pro přenos signálu z vnějšího prostředí. V *Medicago sativa* byla popsána solným stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (SIMK), která má vliv na dynamiku aktinového cytoskeletu, a tedy i na růst kořenových vlásků, což významně ovlivňuje vznik symbiotického vztahu mezi rostlinou a půdními bakteriemi rodu *Rhizobium*. Signálem k aktivaci MAPK mohou být elicitory bakterií a k aktivaci SIMK dochází prostřednictvím nadřazené SIMKK. Cílem této diplomové práce byla produkce transgenních rostlin *M. sativa* s potlačenou expresí *SIMK* (*SIMK RNAi*) a *SIMKK* (*SIMKK RNAi*) v expresní linii s vizualizací aktinového cytoskeletu (*FABD2-GFP*). Dokumentováním průběhu transformace a kvalitativní a kvantitativní determinace změn v úrovni exprese a produkce vybraných MAPK metodami imunoblot a RT-qPCR, byly vyselektovány rostliny s nejnižší hladinou produkce SIMK a SIMKK. U rostlin *M. sativa* *SIMK RNAi* byla pozorována délka kořenových vlásků, po aplikaci půdní bakterie *Sinorhizobium meliloti* byly pozorovány změny v aktivaci MAPK a byla pozorována struktura aktinového cytoskeletu u rostlin *SIMKK RNAi*^{*FABD2-GFP*}.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , SIMKK, SIMK, FABD2-GFP, <i>Sinorhizobium meliloti</i>
Počet stran	121
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Petr Urbíš
Title	Production of new lines of <i>Medicago sativa</i> with downregulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) expression
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

An important factor in the development of a symbiotic relationship between plants and bacteria is the signaling through mitogen-activated protein kinases (MAPKs) that are indispensable for signal transduction from the environment. In *Medicago sativa*, salt stress-induced mitogen-activated protein kinase (SIMK) has been described. SIMK affects the dynamics of the actin cytoskeleton and thus the root hair growth that significantly affects the formation of a symbiotic relationship between plants and soil bacteria of the genera *Rhizobia*. As external signals serve bacterial elicitors and SIMK is activated by the upstream activator SIMKK. The aim of this diploma thesis was obtaining of transgenic *M. sativa* plants with downregulation of *SIMK* (*SIMK RNAi*) and *SIMKK* (*SIMKK RNAi*) in the background of actin cytoskeleton visualization transgenic line (*FABD2-GFP*). Furthermore, by documenting the course of transformation and qualitative and quantitative determination of changes in the level of expression and production of selected MAPKs by western blot and RT-qPCR analyses, plants with the lowest level of SIMK and SIMKK production were selected. In *M. sativa SIMK RNAi* plants, length of root hairs and changes in MAPK activation were observed after application of soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. Finally, the structure of the actin cytoskeleton was observed in *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* plants.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , SIMKK, SIMK, FABD2-GFP, <i>Sinorhizobium meliloti</i>
Number of pages	121
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Metody transgenozy u rostlin	2
2.1.1 Přímé metody transgenozy	3
2.1.2 Metody transgenozy zprostředkované bakterií <i>Agrobacterium</i>	7
2.2 Transgenozy tolice vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>)	11
2.2.1 Metoda transformace listových explantátů vojtěšky podle Samac a Austin-Phillips ..	11
2.2.2 Metoda transformace vojtěšky infiltrací semenáčků podle Weeks <i>et al.</i> , 2008.....	13
2.3 Mitogenem-aktivované proteinkinasy (MAPK).....	14
2.3.1 Základní charakteristika MAPK.....	14
2.3.2 Stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (SIMKK)	16
2.3.3 Solným stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (SIMK).....	16
2.4 Reakce rostlin na abiotický stres	17
2.4.1 Teplotní stres	18
2.4.2 Solný stres	19
2.4.3 Stres ze sucha	20
2.4.4 Oxidativní stres.....	21
2.4.5 Stres z poranění	21
2.4.6 Stres způsobený těžkými kovy	22
2.5 Fenotypový projev rostlin při interakci se symbiotickými hlízkovými bakteriemi.....	23
2.5.1 Iniciační invaze kořenového systému rostlin.....	23
2.5.2 Vývoj infekčního vlákna.....	24
2.5.3 Vývoj hlízky a výměna živin.....	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Materiál.....	28
3.1.1 Použité chemikálie.....	28
3.1.2 Použité protilátky.....	31
3.1.3 Roztoky a média	32
3.1.4 Použité přístroje.....	38
3.1.5 Software pro zpracování výsledků.....	39
3.1.6 Rostlinný materiál.....	40
3.1.7 Bakteriální materiál.....	40
3.2 Metody.....	40

3.2.1 Příprava bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
3.2.2 Sterilizace listů	41
3.2.3 Transformace listových explantátů vojtěšky	41
3.2.4 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze	42
3.2.5 Povrchová sterilizace a výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i> pMAT	42
3.2.6 Odběr vzorků	43
3.2.7 Homogenizace vzorků	43
3.2.8 Extrakce proteinů	43
3.2.9 Měření koncentrace proteinů	44
3.2.10 Příprava vzorků pro nanesení na gel	45
3.2.11 Výroba polyakrylamidových gelů	45
3.2.12 Výroba Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů	46
3.2.13 Gelová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného	46
3.2.14 Přenos proteinů na membránu	47
3.2.15 Blokování nespecifických vazeb a aplikace protilátek	48
3.2.16 Detekce proteinů	49
3.2.17 Odstranění navázaných protilátek z membrán	49
3.2.18 Vyhodnocování imunoblotové analýzy	49
3.2.19 Izolace RNA a gDNA fenolovou extrakcí	49
3.2.20 Aplikace DNasy	50
3.2.21 Izolace RNA fenolovou extrakcí	51
3.2.22 Reverzní transkripce	51
3.2.23 Primer Efficiency	53
3.2.24 Kvantitativní PCR	54
3.2.25 Statistické vyhodnocení	54
3.2.26 Příprava kultury <i>Sinorhizobium meliloti</i>	54
3.2.27 Mikroskopická analýza struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu	54
3.2.28 Aplikace <i>Sinorhizobium meliloti</i>	55
3.2.29 Měření délky kořenových vlásků <i>Medicago sativa</i> SIMK RNAi	55
4. VÝSLEDKY	56
4.1 Transformace listových explantátů tolíce vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>) kokultivací s <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
4.1.1 Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
4.1.2 Transformace listových explantátů tolíce vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>)	57
4.1.3. Regenerace rostlin somatickou embryogenezí	58
4.2 Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v úrovni exprese a produkce proteinů vybraných MAPK v transgenních rostlinách	65

4.2.1	Imunoblotová analýza transgenních rostlin <i>M. sativa SIMK RNAi</i>	65
4.2.2	Semikvantitativní PCR analýza v reálném čase transgenních rostlin <i>M. sativa SIMK RNAi</i>	68
4.2.3	Imunoblotová analýza <i>Medicago sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}</i>	71
4.2.4	Semikvantitativní PCR analýza v reálném čase transgenních rostlin <i>M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}</i>	74
4.3	Mikroskopická analýza aktinového cytoskeletu rostlin <i>M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}</i>	76
4.4	Aplikace symbiotických bakterií <i>Sinorhizobium meliloti</i> na <i>SIMK RNAi</i> linii 5	80
4.5	Měření délky kořenových vlásků kontrolních a <i>SIMK RNAi</i> rostlin	82
5.	DISKUZE	86
6.	ZÁVĚR	89
7.	SEZNAM LITERATURY	90
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	109

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování rešerše zaměřené na:

- téma transgenozy u rostlin, se speciálním zaměřením na vojtěšku
- reakce a odpovědi rostlin na abiotický stres
- souhrn poznatků o fenotypových projevech rostlin vojtěšky na úrovni pletiv, orgánů a celých rostlin při interakci se symbiotickými bakteriemi
- význam MAPK-MAPKK signálních modulů při kompartmentalizaci přenosu signálů v buňce

Praktická část

- zvládnutí přípravy klonů *Agrobacterium* s konstrukty pro cílenou transformaci vojtěšky
- praktická transformace listových segmentů vojtěšky s cílem regenerace transgenních stabilních linií se sníženou expresí vybraných mitogenem-aktivovaných proteinkinás (MAPK)
- nastavení kultivačních podmínek *in vitro* a *in vivo* pro regeneraci, selekci a úspěšný růst transformovaných linií vojtěšky
- kvalitativní a kvantitativní determinace změn v úrovni exprese, produkce proteinů a aktivitě vybraných MAPK v geneticky modifikovaných rostlinách s potlačením jejich exprese
- charakteristika fenotypových změn rostlin transgenních linií se sníženou expresí vybraných MAPK

1. ÚVOD

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je vytrvalá rostlina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), která je v zemědělství využívána především jako potrava pro dobytek. Díky symbióze s půdními hlízkovými bakteriemi rodu *Rhizobium*, fixujícími dusík, obohacuje půdu v okolí kořenů o dusíkaté látky, a tak produkuje velké množství proteinů (Yacoubi *et al.*, 2011). Proto je i využívána jako modelová rostlina pro interakci s půdními mikroorganismy (Bouton, 2012). Jelikož je vojtěška tetraploidní allogamní rostlina, je tedy její transformace relativně obtížná (Trinh *et al.*, 1998).

Významným faktorem pro vznik symbiotického vztahu mezi rostlinou a bakterií je signalizace prostřednictvím mitogenem-aktivovaných proteinkinazových (MAPK) kaskád, které jsou nezbytné pro přenos signálu z vnějšího prostředí, a tak se podílí na regulaci buněčného dělení, exprese genů, diferenciaci buněk a na odpovědích na biotické a abiotické stresové faktory (Kiegerl *et al.*, 2000). V *Medicago sativa* byla popsána solným stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (SIMK), která má vliv na dynamiku aktinového cytoskeletu, a tedy i na růst kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018). K aktivaci SIMK dochází, přenosem signálu z nadřazené SIMKK, také po působení elicitorů bakterií a hub (Cardinale *et al.*, 2000; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006).

Předkládaná diplomová práce se věnuje produkci transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* a *M. sativa SIMKK RNAi* v expresní linii *FABD2-GFP*, stabilně exprimující fúzní protein FABD2-GFP. Součástí diplomové práce byla dokumentace průběhu regenerace transgenních rostlin procesem somatické embryogeneze. Poté byla provedena kvalitativní a semikvantitativní determinace změn v úrovni exprese a produkce vybraných MAPK, čímž byly vyselektovány rostliny s nejnižší hladinou produkce SIMK a SIMKK. U rostlin *M. sativa SIMK RNAi* byla pozorována délka kořenových vlásků a po aplikaci půdní bakterie *Sinorhizobium meliloti* byly pozorovány změny v aktivaci MAPK. Nakonec byla zdokumentována struktura a uspořádání aktinového cytoskeletu u *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metody transgenozy u rostlin

Transgenozy rostlin je proces genetické manipulace pro vnesení exogenního genetického materiálu do rostlin pro jejich genetickou modifikaci. Metody vnášení genů do rostlin se dělí na přenos přímý, a tedy bez využití jiného organismu, a nepřímý, tedy vektorem zprostředkovaný přenos genů (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Nejčastěji dochází k nepřímému přenosu genetické informace pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes* (Zupan *et al.*, 2000; Lessard *et al.*, 2002; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Hwang *et al.*, 2017). Další dělení metod transformace rostlin závisí na integraci cizorodé genetické informace. Rozlišujeme metody, které jsou určeny pro transientní (dočasnou) transformaci rostlin a metody pro transformaci stabilní a trvalou (Ingelbrecht *et al.*, 1989; Lessard *et al.*, 2002).

Při transientní transformaci dochází k přenosu genů, ale nedochází k integraci vnesené DNA do genomové DNA. V transientně transformované buňce probíhá dočasná proteosyntéza vnesených genů, ale vnesená DNA postupně vymizí. Tato metoda se využívá především k předběžnému testování exprese vnesených genů a ke studiu promotorů (Lessard *et al.*, 2002).

Při stabilní transformaci dochází k integraci exogenní DNA do genomu příjemce, a tedy k změně genetické informace, která má potenciál se přenést na potomstvo. Stabilně transformované plodiny mají široké spektrum využití. Vnesením transgenů lze docílit změny různých vlastností rostlin, jako je rezistence k herbicidům, odolnost vůči patogenům, a také zvýšení výnosu, například zvýšením obsahu živin, oddálením dozrávání plodů, tolerancí vůči biotickému a abiotickému stresu. Dále je možné vnášet do rostlin geny z evolučně vzdálených druhů rostlin, ale i evolučně vzdálených organismů, jako jsou živočichové, houby, bakterie a viry (Rivera *et al.*, 2012) a jejich využití v molekulárním farmaceutu pro produkci biopolymerů, rekombinantních proteinů a jiných terapeutik a jedlých vakcín (Lessard *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004; Cebadera a Camara, 2007; Yang *et al.*, 2008). V neposlední řadě je transgenozy využíváno ve vědě a výzkumu pro

studium rostlinného genomu, metabolismu a signálních drah (Barcelo *et al.*, 1994; Lessard *et al.*, 2002; Davey *et al.*, 2005).

2.1.1 Přímé metody transgenoz

2.1.1.1 Elektroporace

Princip této metody spočívá v přenosu genetické informace, která se nachází v roztoku, do buňky po vystavení krátkému elektrickému impulzu o vysokém napětí (Lindsey a Jones, 1987; Dekeyser *et al.*, 1990; D'Halluin *et al.*, 1992; Fennell a Hauptmann, 1992; Kloti *et al.*, 1993; Songstad *et al.*, 1993; Yadava *et al.*, 2017). Impulz vytvoří v cytoplasmatické membráně reverzibilní póry, přes které se DNA dostane do buňky. Účinnost této metody je závislá na koncentraci DNA, přítomnosti či absence buněčné stěny, toleranci buňky k vysokému napětí a tvorbě pórů v cytoplasmatické membráně (Shimamoto *et al.*, 1989).

Hlavní výhodou elektroporace spočívá v rychlosti a jednoduchosti. Metoda je z hlediska nákladů nenáročná a po provedení zanechává buňky neporušené. Elektroporaci je možné využít také k transientní transformaci jednoděložných rostlin (Terzaghi a Cashmore, 1997; Newell, 2000; Sorokin *et al.*, 2000; Lessard *et al.*, 2002). Mezi omezení této metody patří velmi nízké množství vložené DNA do rostlinných buněk, nebo naopak četné vložení transgenů, které může znamenat jeho nižší expresi (Hansen a Chilton, 1996; Lessard *et al.*, 2002). Hlavní nevýhodou elektroporace je ovšem obtížná regenerace rostlin po transformaci protoplastů a vysoce variabilní (nestandardní) účinnost, která je velmi závislá na rostlinném materiálu.

2.1.1.2 Mikroinjekce

Mikroinjekce je metoda přímého fyzického vložení transgenů do jádra nebo cytoplazmy buněk (Morikawa a Yamada, 1985; Crossway *et al.*, 1986; Rakoczy-Trojanowska, 2002). Metoda spočívá v imobilizaci cílové buňky přisáté v agarose pomocnou pipetou. Za použití mikroskopu je transgen vpraven do buňky speciální skleněnou kapilární mikropipetou. Mikroinjekce se využívá především k transformaci savčích buněk a rostlinných protoplastů. Při transformaci rostlinných buněk je velkou nevýhodou bariéra tvořená buněčnou stěnou a riziko porušení vakuol a uvolnění jejich obsahu do buňky. Zároveň

regenerace rostliny z protoplastů je velmi obtížná (Lörz *et al.*, 1981; Crossway *et al.*, 1986; Rakoczy-Trojanowska 2002). Hlavním omezením této metody je nákladné technické vybavení a časová náročnost. Naopak výhodou je možnost přenosu buněčných organel a manipulaci s chromosomy (Griesbach *et al.*, 1987; Jones-Villeneuve *et al.*, 1995; Rakoczy-Trojanowska, 2002).

2.1.1.3 Biolistická metoda

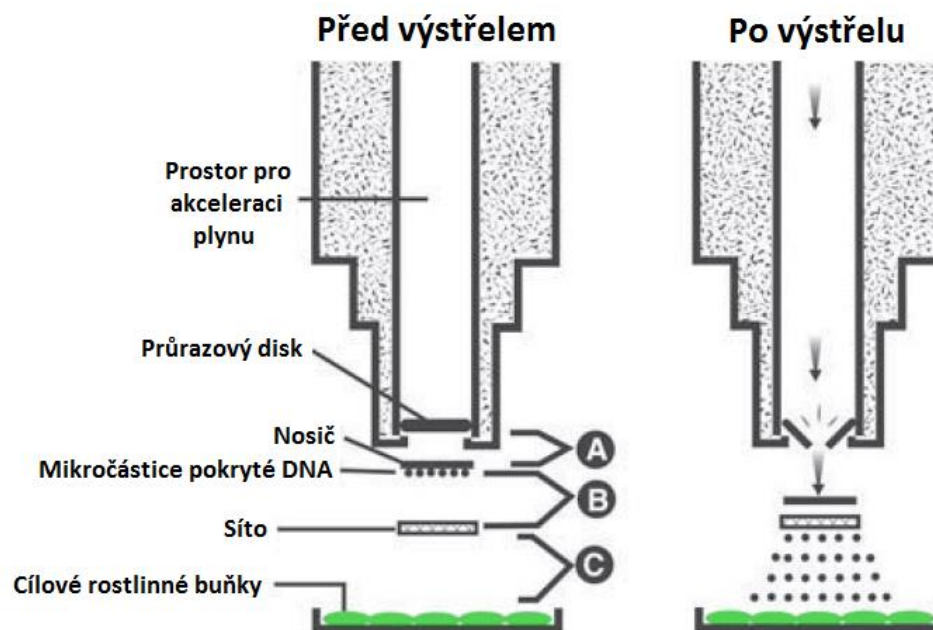
Mezi nejefektivnější metody přímé transformace patří mikroprojektilová biolistická metoda, také známá jako genové dělo (Sanford *et al.*, 1987; Becker *et al.*, 1994; Yadava *et al.*, 2017). Využívá se především pro transienční transformaci rostlinných pletiv (Stanford, 1990; Koziel *et al.*, 1993; Barcelo *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1994; Lessard *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2005; Yadava *et al.*, 2017) a ke studiu a analýze promotorů a regulace exprese genů (Matzke *et al.*, 1989; Rocha-Sosa *et al.*, 1989; Knusen a Müller, 1991; Becker *et al.*, 1994).

Metoda spočívá v pokrytí mikročástic (0,6 - 1 μm) zlata (Barcelo *et al.*, 1994; Lessard *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2005; Kikkert *et al.*, 2005) nebo wolframu (Gan, 1989; Lessard *et al.*, 2002; Kikkert *et al.*, 2005) roztokem plazmidové DNA s vneseným transgenem a následné odpaření na kruhovém plastovém nosiči. Nosič je poté umístěn do komory pod průrazový disk, nad síto, které slouží k propuštění a nasměrování mikročástic na cíl, který je umístěn ve spodní části komory (Obr. 1). Po sestavení genového děla je v celé komoře vytvořeno vakuum. Prostor pro zrychlení plynu je naplněn heliem, dokud není dosaženo maximálního tlaku pro průrazový disk. Když se disk roztrhne, následná heliová rázová vlna vypustí nosič, na kterém jsou mikronosiče pokryté DNA. Nosič letí dál, dokud nenarazí na zastavovací síto, zatímco mikročástice jsou vypuštěny a pokračují vysokou rychlostí dál, dokud neproniknou do cílových buněk (Barcelo *et al.*, 1994; Kikkert *et al.*, 2005). Rychlost mikročástic je závislá na tlaku helia v plynové zrychlovací trubici, vzdálenosti od průrazového disku k nosiči (Obr. 1 - A), vzdálenosti dráhy nosiče k zastavovací síti (Obr. 1 - B), vzdálenosti mezi sítí a cílovými buňkami (Obr. 1 - C) a množstvím vakua v prostoru pro akceleraci plynu (Kikkert *et al.*, 2005).

Výhodou bombardování mikročásticemi je efektivní přenos genů na celá pletiva a úspěšná transgeneze jednoděložných rostlin, u kterých je značně limitovaná transformace

zprostředkovaná bakterií *Agrobacterium* (Sanford *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1994; Breitler *et al.*, 2002). Nespornou výhodou je tedy i velká variabilita ve výběru druhů rostlin, které je možné použít pro transformaci. Další výhodou je možnost přenosu velkých fragmentů DNA (Van Eck *et al.*, 1995; Breitler *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2005), a také přenosu genů a jejich integraci do genomu mitochondrií a plastidů (Lessard *et al.*, 2002; Kikkert *et al.*, 2005).

Hlavními nevýhodami genového děla je, podobně jako u elektroporace, velmi nízká účinnost transformace v důsledku použití malého množství genetické informace, a zároveň umlčení genů, způsobené velkým množstvím kopií vloženého transgenu (Hunold *et al.*, 1994; Hansen a Chilton, 1996; Clark *et al.*, 1997; Breitler *et al.*, 2002; Lessard *et al.*, 2002; Taylor a Fauquet, 2002; Agrawal *et al.*, 2005; Yadava *et al.*, 2017). V důsledku nesprávného nastavení vakua, tlaku a následné rychlosti bombardování dochází často k poškození rostlinných pletiv, zejména pokud jsou použity příliš velké mikročástice, které mají vliv na zrychlení, a tedy i na hloubku průniku do pletiva a míru jeho poškození (Taylor a Fauquet, 2002; Kikkert *et al.*, 2005).



Obr. 1 Proces transformace rostlinných buněk pomocí bombardování genovým dělem. (Upraveno podle Kikkert *et al.*, 2005).

2.1.1.4 Transgenoze zprostředkovaná polyethylenglykolem

Další metodou tvorby transgenních rostlin je využití polyethylenglykolu (PEG) v přítomnosti Ca^{2+} kationtů, což způsobí reverzibilní destabilizaci a vznik pórů v plazmatické membráně, která je dočasně schopná propustit do buňky cizí DNA (De Filippis *et al.*, 2000). Metoda je velmi jednoduchá, ovšem vyžaduje degradaci buněčné stěny rostlinných buněk a přípravu protoplastů. Výhodou této metody je možnost transformace velkého počtu protoplastů a variabilita ve výběru druhů rostlin, které je možné transformovat. Metoda je opět limitována obtížnou regenerací transformovaných rostlin a náhodnou inzercí transgenu. DNA, určená k přenosu, je při této metodě velmi náchylná na degradaci (Davey *et al.*, 2005).

2.1.1.5 Transgenoze zprostředkovaná liposomy (lipofekce)

Lipofekce je metoda, při které jsou makromolekuly DNA obaleny vrstvou synteticky připravených lipidů, zvanými liposomy (Gad *et al.*, 1990). Liposomy jsou malé kulaté vezikuly tvořené dvěma vrstvami fosfolipidů, které vytvářejí na povrchu vezikul kladný náboj, čímž na sebe vážou záporně nabitou DNA, a jsou zároveň schopné navázat se na plazmatickou membránu a endocytosou proniknout dovnitř buňky (Deshayes *et al.*, 1985). Nejprve dojde k adhezi liposomů s DNA k povrchu plazmatické membrány buňky, poté dojde k fúzi a následně k uvolnění genetické informace do cytoplasmy.

Výhodou lipofekce je synergický efekt s metodou transformace s polyethylenglykolem a částečná ochrana DNA navázané na liposomy. Omezením této metody je vysoká náročnost a nízká účinnost (Gad *et al.*, 1990), spojená s obtížnou regenerací transformovaných rostlin z protoplastů.

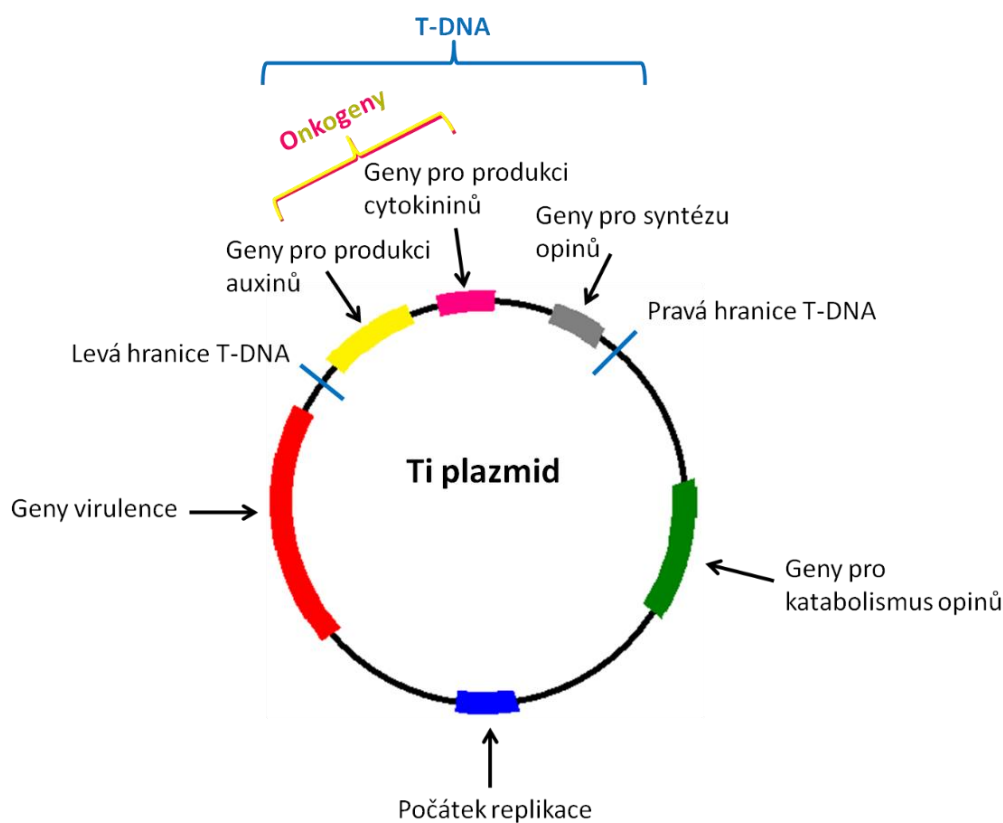
2.1.1.6 Transgenoze zprostředkovaná vlákny z karbidu křemíku

Jednou z méně známých metod tvorby transgenních rostlin je využití malých krystalů (průměr 0,5 – 0,6 μm ; délka 5 až 80 μm) karbidu křemíku (SiC). Krystaly karbidu křemíku jsou velmi pevné, pružné, mají velmi dobrou odolnost vůči degradaci (Choi, 1997; Arshad a Asad, 2011) a jejich ostré hrany umožňují penetraci do buňky (Kaeppeler *et al.*, 1990; Kaeppeler *et al.*, 1992; Bronwyn *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Arshad a Asad, 2011). Používají se k transformaci embryí, buněčných suspenzních kultur jednoděložných i

dvouděložných rostlin. Krystaly se smíchají s vektorem s vneseným transgenem a buňkami. Směs se intenzivně promíchá použitím vortexu (Asano *et al.*, 1990; Kaepler *et al.*, 1990; Dunahay, 1992; Dunahay, 1993; Arshad a Asad, 2011). DNA se dostává do buňky v místech poranění (Frame *et al.*, 1994; Arshad a Asad, 2011). Metoda je tedy velmi jednoduchá, ale závislá na době míchání a velikostí krystalů. Nevýhodou metody je poškození buněk, nízká účinnost transformace a náročná regenerace rostlin po transformaci. Zároveň zde hrozí nebezpečí inhalace vláken karbidu křemíku při manipulaci (Kaepler *et al.*, 1992; Songstad *et al.*, 1995; Arshad a Asad, 2011).

2.1.2 Metody transgenozie zprostředkované bakterií *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens je půdní gram-negativní bakterie řádu *Rhizobiales*, způsobující na rostlinách tvorbu nádorovitých útvarů (Zupan *et al.*, 2000; Gelvin, 2003; Bourras *et al.*, 2015; Yadava *et al.*, 2017). Řadí se mezi biotrofní, genetické parazity, neboť je schopná přenosu a integrace T-DNA (transferové DNA) z tumor-indukujícího (Ti) plazmidu (Obr. 2) do jader rostlinných buněk, a tak stabilně změnit jejich genetickou informaci (Chilton a Drummond, 1978; Shell *et al.*, 1979; Howard a Citovsky, 1990; van Wordragen a Dons, 1992; Gelvin, 2003; Tzfira a Citovsky, 2006; Yadava *et al.*, 2017). Bakterie přirozeně nese v T-DNA 2 typy genů: onkogeny, které jsou zodpovědné za syntézu auxinů a cytokininů (Shell *et al.*, 1979; Akyoshi *et al.*, 1984; Lessard *et al.*, 2002), a tedy tvorbu nádoru, a geny pro syntézu opinů, které jsou syntetizovány rostlinou v nádorových buňkách a slouží bakterii jako zdroj uhlíku a dusíku (Chilton a Drummond, 1978; Kalogeraki a Winans, 1995; Zhu *et al.*, 2000). *Agrobacterium* vyhledává rostliny, které vlivem poranění uvolňují fenolické látky (acetosyringon), jež působí pro bakterii jako chemoatraktant (Stachel *et al.*, 1985; Bolton *et al.*, 1986; Stachel *et al.*, 1986; Spencer a Towers, 1988; Usami *et al.*, 1988; Melchers *et al.*, 1989; Morris a Morris, 1990; Song *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992; Hooykaas a Beijersbergen, 1994; Lee *et al.*, 1995; Dye *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2017).

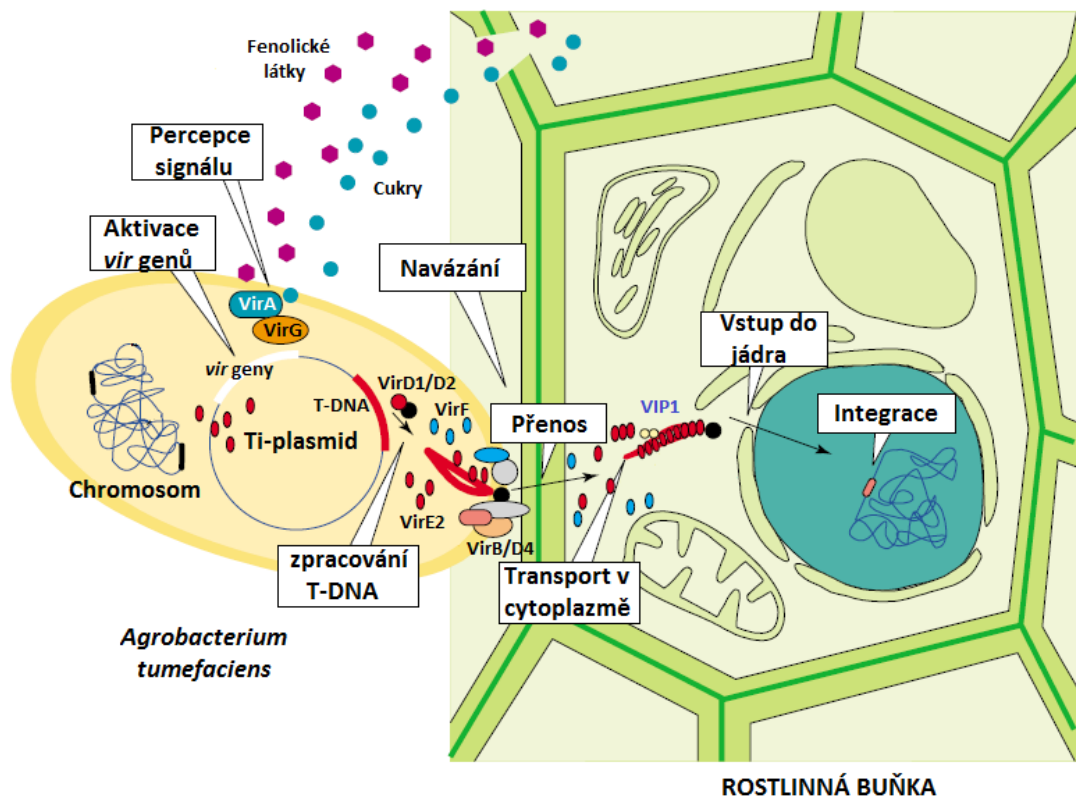


Obr. 2 Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens*. (Upraveno podle Alkudsi *et al.*, 2014).

Pomocí proteinů VirA a VirG dochází k rozpoznávání fenolických látek (Obr. 3; Stachel a Zambryski, 1986; Albright *et al.*, 1989; Winans, 1991; Jin *et al.*, 1993; Mclean *et al.*, 1994; Turk *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Doty *et al.*, 1996; Gelvin, 2000; van Kregten *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009;) a následně protein VirG funguje jako transkripční faktor a indukuje expresi ostatních *vir* genů (Jin *et al.*, 1990; Winans, 1992; Sheng a Citovsky, 1996; Christie, 1997; Akiyoshi *et al.*, 2004;). Po navázání bakterie k povrchu buněčné stěny hostitelské buňky *Agrobacterium* syntetizuje celulosu. Celulosová vlákna pevně vážou bakterii k povrchu buňky (Matthysse *et al.*, 1981; Matthysse *et al.*, 1982; Matthysse, 1983; Deasey a Matthysse, 1984; Matthysse, 1986; Matthysse, 1987; Matthysse, 1995; Matthysse *et al.*, 1995; Gelvin, 2000; Escobar a Dandekar, 2003). Proteiny VirD1 a VirD2 vyštěpí jednořetězcovou molekulu T-DNA (Obr. 3; De Vos a Zambryski, 1989; Winans, 1992; Scheiffle *et al.*, 1995; Christie, 1997). VirD2 protein, který obsahuje dva jaderné lokalizační signály, se kovalentně naváže na 5' konec řetězce nukleové kyseliny (Herrera-Estrella, 1988; Ward a Barnes, 1988; Young a

Nester, 1988; Durenberger *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 1989; Herrera-Estrella *et al.*, 1996; Filichkin a Gelvin, 1993; Howard *et al.*, 1992; Shurvinton *et al.*, 1992; Gelvin, 2000; Mysore *et al.*, 2000; Zupan *et al.*, 2000; Ziemienowicz *et al.*, 2001; Gelvin, 2003) a VirE2 proteiny pokrývají T-DNA a chrání ji před nukleasami v cytoplasmě hostitelské buňky (Obr. 3; Gietl *et al.*, 1987; Citovsky *et al.*, 1988; Das *et al.*, 1988; Herrera-Estrella *et al.*, 1988; Christie *et al.*, 1988; Citovsky *et al.*, 1989; Sen *et al.*, 1989; Rossi *et al.*, 1996; Gelvin, 2000; Zupan *et al.*, 2000; Gelvin, 2003; Lacroix a Citovsky, 2013).

Pomocí VirD2 a VirE2 proteinů je T-DNA transportována do jádra (Zambryski, 1992). Celý komplex je přenesen i s dalšími Vir proteiny do hostitelské buňky. VirE3 a VirF hrají důležitou úlohu v integraci T-DNA (Vergunst *et al.*, 2003). Po přenosu do jádra dojde k odštěpení VirD2 a VirE2 proteinů a začlenění T-DNA do genomu hostitelské buňky (Winans *et al.*, 1986; Winans, 1992; Sheng a Citovsky, 1996; Christie, 1997; Zambryski, 1997; Zupan *et al.*, 2000). VirE2 protein interaguje s proteinem VIP1 a VIP2 (Tzfira *et al.*, 2001; Gelvin, 2003; Anand *et al.*, 2007), které transportují komplex do jádra (Tzfira *et al.*, 2001). Následně dojde k vytvoření komplexu VIP1-VirE2-VirF, který způsobí odštěpení VirE2 od T-DNA. Poté VirF protein způsobí degradaci obou proteinů VIP1 a VirE2 (Tzfira *et al.*, 2004; Tzfira a Citovsky, 2006; Zaltsman *et al.*, 2010a, 2010b; Hwang *et al.*, 2017). Integrace transferové genetické informace probíhá na základě nehomologní rekombinace.



Obr. 3 Model procesu transformace zprostředkované *Agrobacterium*. (Upraveno podle Gelvin, 2003).

Velkou výhodou je využití *A. tumefaciens* s vhodným binárním vektorem. Binární vektory jsou konstruovány rozdělením velkého Ti plasmidu na dva menší plasmidy k oddělení úseku pro geny virulence a T-DNA (Hoekema *et al.*, 1983; Bevan, 1984; Lessard *et al.*, 2002). Další výhodou je možnost vkládání definovaného počtu kopií, případně velkého insertu transgenů (Hiei *et al.*, 1994; Samac a Austin-Phillips, 2006) s přesně definovanými konci, a tím zajistit, aby nedocházelo k umlčování genů (Samac a Austin-Phillips, 2006; Yadava *et al.*, 2017). Metoda je vhodná pro jednoděložné i dvouděložné rostliny (Graves a Goldman, 1986; Bytebier *et al.*, 1987; Grimsey *et al.*, 1987; Gould *et al.*, 1991; Hiei *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2004; Zhang-Hua *et al.*, 2005; Yadava *et al.*, 2017) a je možné ji použít jak pro transientní, tak pro stabilní a *in planta* transformaci (Clough a Bent, 1998; Yadava *et al.*, 2017). Jde o přirozený způsob přenosu genů (Lessard *et al.*, 2002), při kterém je možné transformovat různé typy explantátů (buňky, pletiva, orgány) a dochází k efektivní regeneraci transgenních rostlin (Ishida *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998; Gordon-

Kamm *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Chumakov *et al.*, 2006; Samac a Austin-Phillips, 2006; Vladimir *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2008; Abhishek *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2017; Yadava *et al.*, 2017).

Limitací *Agrobacterium* zprostředkované metody transgenozy je omezení pro použití u určitých druhů jednoděložných rostlin (Hiei *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 2017), u kterých nedochází k přirozenému infikování. Často také dochází vlivem nehomologní rekombinace k náhodné delecii části hostitelské DNA (Hiei *et al.*, 1994; Brunaud *et al.*, 2002).

2.2 Transgenozy tolice vojtěšky (*Medicago sativa*)

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je trvalá rostlina, která má mnoho způsobů využití (Randuška, 1986; Schauer, 2007). Díky symbióze s půdními hlízkovými bakteriemi fixujícími dusík obohacuje půdu v okolí kořenů o dusíkaté látky, a zároveň produkuje velké množství proteinů (Yacoubi *et al.*, 2011). Jelikož je vojtěška tetraploidní allogamní rostlina, její transformace je relativně obtížná (Blondon *et al.*, 1994; Trinh *et al.*, 1998).

Jedním z potenciálních způsobů, jak obejít kroky tkáňové kultury, a tím snížit čas a práci související s vytvářením transgenních rostlin, je bombardování pylu mikročásticemi (Ramaiah a Skinner, 1997; Trinh *et al.*, 1998). Transformovaná pylová zrna jsou poté použita k opylování samičích sterilních květů. Bohužel, pouze 27 % získaných rostlin vykazovalo integraci T-DNA do genomu. Pereira a Erickson (1995) popsali stabilní jadernou transformaci vojtěšky bombardováním mikročásticemi.

Nejúčinnějšími metodami získání transgenních rostlin vojtěšky se však staly metody transformace zprostředkované *Agrobacterium tumefaciens* (Samac a Temple, 2004).

2.2.1 Metoda transformace listových explantátů vojtěšky podle Samac a Austin-Phillips

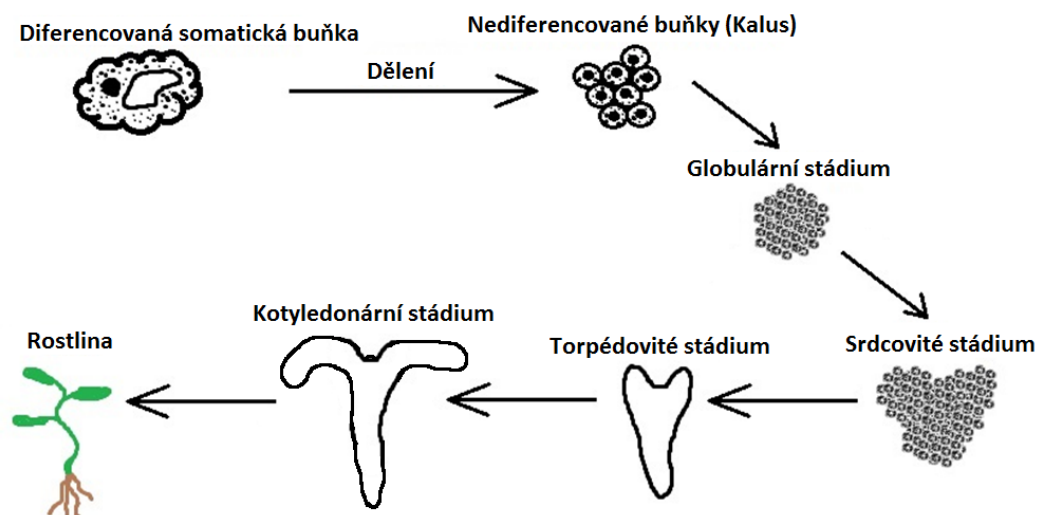
Jednou z nejpoužívanějších metod transgenozy vojtěšky je metoda podle Samac a Austin-Phillips, upravena Wangem z roku 2006. Principem této vysoce účinné a rychlé metody je kokultivace listových explantátů vojtěšky s *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí požadovaný vektor T-DNA (Hiei *et al.*, 1994; Samac a Austin-Phillips, 2006) a následná regenerace transgenních rostlin procesem somatické embryogeneze (Obr. 4, Brown a

Atanassov, 1985, Barbulova *et al.*, 2002). Protokol využívá vysoce regenerativní genotyp Regen-SY (Bingham, 1991; Trepp *et al.*, 1997; Samac, 2004; Samac a Austin-Phillips, 2006; Wang, 2006). Explantáty jsou odvozeny z povrchově sterilizovaných listů a jsou spolu se suspenzí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* smíchány v tekutém kokultivačním médiu. Následně jsou explantáty přeneseny na pevné kokultivační médium. Pro nejefektivnější výsledek transformace jsou explantáty ponechány na kokultivačním médiu 7 až 8 dní (Du *et al.*, 1994; Austin *et al.*, 1995; Samac, 1995; Samac, 2004; Samac a Austin-Phillips, 2006; Wang, 2006).

Poté se bakterie odstraňují oplachováním explantátů ve sterilní destilované vodě a kultivací na regeneračním médiu s rostlinnými hormony (auxin, cytokinin) a selekčními antibiotiky (Parrott *et al.*, 1995; Tabe *et al.*, 1995; Barbulova *et al.*, 2002; Samac a Austin-Phillips, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Nofouzi *et al.*, 2019). Tvorba kalusu vyžaduje 2 až 3 týdny. Somatická embrya jsou indukována kultivací kalusu na médiu bez regulátorů růstu. Na netransformovaných částech explantátu se při selekci vytvoří malé množství kalusového pletiva, ale embrya se netvoří (Samac a Temple, 2004; Samac a Austin-Phillips, 2006). Zralá embrya kotyledonárního stádia se tvoří po 2 až 3 týdnech. Následně jsou přenesena na médium pro indukci vývoje kořenů, a poté jsou přenesena na MS (Murashige a Skoog, 1962) médium pro vývoj výhonků. Transformované rostliny je možné získat 9 až 14 týdnů po kokultivaci a mohou být přeneseny do půdy (Samac a Temple, 2004; Samac a Austin-Phillips, 2006).

Průměrně 60 až 80 % naočkovaných explantátů vede k selekci somatických embryí, z nichž se vyvíjí 80 až 100 % rostlin, které obsahují T-DNA (Samac a Austin-Phillips, 2006). Metoda byla použita u tolice vojtěšky (*Medicago sativa*) pro produkci průmyslových enzymů (Austin *et al.*, 1995; Austin a Bingham, 1997; Austin-Phillips *et al.*, 1999a, 1999b; Zeigelhoffer *et al.*, 1999; Austin a Zeigelhoffer, 2001; Ullah *et al.*, 2002; Samac a Austin-Phillips, 2006), výrobu vysoce hodnotných sloučenin (Saruul, 2002; Samac a Austin-Phillips, 2006), zvýšení tolerance vůči patogenům (Samac a Smigocki, 2003; Samac *et al.*, 2004; Samac a Austin-Phillips, 2006; Tohidfar *et al.*, 2012; Nofouzi *et al.*, 2019), abiotickému stresu (Tsfaye *et al.*, 2001; Samac a Austin-Phillips, 2006; Jin *et al.*, 2010; Zhang a Wang, 2015; Nofouzi *et al.*, 2019) a pro studium promotorů genů

(Pathirana *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Trepp *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 1999; Samac a Austin-Phillips, 2006).



Obr. 4 Schéma procesu somatické embryogeneze.

2.2.2 Metoda transformace vojtešky infiltrací semenáčků podle Weeks *et al.*, 2008

Tato metoda spočívá v infiltraci semenáčků, které byly předem asepticky seříznuty v apikálním meristému, suspenzí *Agrobacterium tumefaciens*. Seřízlé semenáčky jsou umístěny do zkumavky se suspenzí *A. tumefaciens*, nesoucí plazmid s požadovaným transgenem, sterilním bílým křemenným pískem, případně acetosyringonem. Celá směs ve zkumavce je třepána, případně je zároveň, pro maximalizaci infiltrované oblasti, vytvořeno vakuum (Weeks *et al.*, 2008). Poté jsou semenáčky umístěny svisle do kultivačního média pro vývoj rostlin. Po přibližně 14 dnech jsou rostliny stabilně transformované a je možné je přenést do půdy.

Transformované rostliny jsou schopné dobře produkovat semena T1 generace obsahující přenášenou T-DNA (Trieu *et al.*, 2000; Weeks *et al.*, 2008). S využitím dvou různých T-DNA je možné eliminovat integrovaný selekční gen. Jedna T-DNA obsahuje požadovaný transgen, zatímco druhá nese selekční markerový gen. Použitím indukovatelného rekombinačního systému dochází k segregaci genu zájmu od

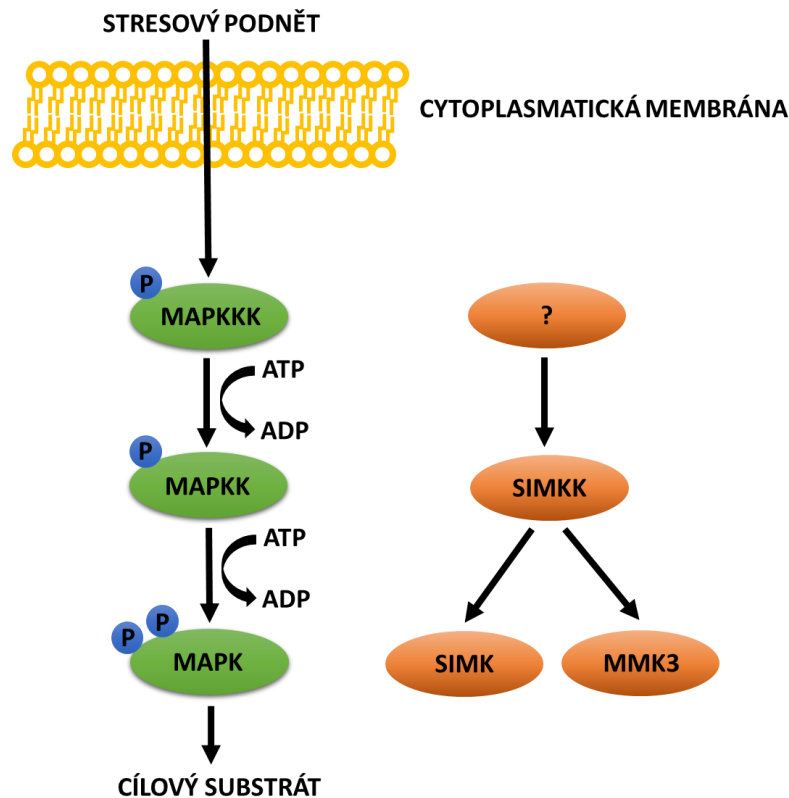
markerového genu (Zuo *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Weeks *et al.*, 2008). Tato metoda poskytuje možnost získat rostliny obsahující pouze požadovanou T-DNA asi v 29 % (Rommens *et al.*, 2004; Weeks *et al.*, 2008). Metoda bohužel není široce používána, protože je obtížné ji reprodukovat (Somers *et al.*, 2003; Bent 2006; Weeks *et al.*, 2008).

2.3 Mitogenem-aktivované proteinkinasy (MAPK)

2.3.1 Základní charakteristika MAPK

Signalizace prostřednictvím mitogenem-aktivovaných proteinkinasových (MAPK) kaskád je jednou z hlavních drah pro přenos signálu z vnějšího prostředí pro indukci buněčných odpovědí v eukaryotických buňkách (Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006; Komis a Šamaj, 2014). Mitogenem-aktivované proteinkinasy tvoří rozsáhlou rodinu serin/threonin kinas. MAPK dráha přenosu signálu se skládá ze tří hlavních komponent (Obr. 5; Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). Mitogenem-aktivované proteinkinasykinasykinasy (MAPKKK, MAP3K, MEKK), které aktivují duálně specifické mitogenem-aktivované proteinkinasykinasy (MAPKK, MAP2K, MEK, MKK) v serin/threonin- X_{3-5} -serin/threonin motivu. MAPKK následně aktivují mitogenem-aktivované proteinkinasy (MAPK, MPK) duální fosforylací threoninu a tyrosinu v T-E-Y nebo T-D-Y motivu (Fernandez-Pascual *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2010; Komis *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2011; Šamajová *et al.*, 2013a; Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018).

V genomu *Arabidopsis thaliana* se nachází 60 genů pro MAPKKK, 10 genů pro MAPKK a 20 genů pro MAPK (Ichimura *et al.*, 2002; Komis *et al.*, 2018). Integrita kaskád, jejich uspořádání a kompartmentalizace může být zprostředkována pomocí integračních (“scaffold”) proteinů, kotvicích a adaptorových proteinů (Whitmarsh a Davis, 1998; Bradwell *et al.*, 2001; Takekawa *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2011). Tyto kaskády mohou být aktivovány transmembránovými receptory (Lee *et al.*, 2012; Komis *et al.*, 2018), RLK (receptor-like kinasy, Hord *et al.*, 2008; Komis *et al.*, 2018), heterotrimerickými GTPasami (Guo *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015; Komis *et al.*, 2018) a jinými proteinkinasami (Kim *et al.*, 2015; Komis *et al.*, 2018).



Obr. 5 Schematické znázornění MAPK kaskády (zeleně) a příklad stresem indukované signální dráhy u *Medicago sativa* (oranžově). Upraveno podle Smékalová *et al.*, 2014.

Časově závislá deaktivace MAPK po signalizaci je způsobená duální specifitou MAPK fosfatasy (MKP; Teige *et al.*, 2004; Bartels *et al.*, 2010; Umbrasaitė *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2011; Komis *et al.*, 2018). Obecně jsou MAPK popisovány jako proteinkinasy, které jsou po aktivaci schopny dále aktivovat transkripční faktory, cytoskeletální proteiny, proteiny vezikulárního transportu a jiné kinasy (Cargnello a Roux, 2011; Komis *et al.*, 2011; Šamajová *et al.*, 2013a; Ovečka *et al.*, 2014), což může vést ke změnám v aktivaci exprese genů (Whitmarsh a Davis, 1998; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). MAPK hrají významnou roli v buněčné diferenciaci, dělení (Whitmarsh a Davis, 1998; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006; Komis *et al.*, 2011; Sasabe a Machida, 2012; Šamajová *et al.*, 2013a; Ovečka *et al.*, 2014) a odpovědím na biotické (Ligterink *et al.*, 1997; Kiegerl *et al.*, 2000; Zhang a Klessig, 2001; Asai *et al.*, 2002; Cardinale *et al.*, 2002; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006; Pitzschke *et al.*, 2009b; Rasmussen *et al.*, 2012; Ovečka *et al.*, 2014) a abiotické

stresové faktory, jako je chlad a sucho (Jonak *et al.*, 1996; Kiegerl *et al.*, 2000; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006), poranění (Seo *et al.*, 1995; Bögre *et al.*, 1997; Zhang a Klessig, 1998; Kiegerl *et al.*, 2000; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006), a zvýšená koncentrace soli (Rodriguez *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2011; Šamajová *et al.*, 2013a; Ovečka *et al.*, 2014).

2.3.2 Stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinas (SIMKK)

Kiegerl *et al.*, v roce 2000 popsali duálně specifickou mitogenem-aktivovanou proteinkinasukinasu SIMKK (stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinas) nacházející se v tolici vojtěšce (*Medicago sativa*). Test pomocí kvasinkového dvouhybridního systému potvrdil, že SIMKK protein specificky interaguje se SIMK (solným stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa) a aktivuje ji fosforylací residuí threoninu a tyrosinu v aktivační smyčce v podmínkách *in vitro* a *in vivo* (Obr. 5; Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2011; Ovečka *et al.*, 2014). SIMKK má velikost přibližně 42 kDa a vykazuje vysokou sekvenční homologii k MKK4 a MKK5 z *Arabidopsis thaliana* (Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Komis *et al.*, 2018).

Při růstu kořenových vlásků dochází k akumulaci SIMKK a pravděpodobně i k regulaci růstu kořenových vlásků (Berson *et al.*, 2014; Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018). Dále byla prokázána aktivace SIMKK, zprostředkovaná ionty mědi, ale zároveň nedocházelo k aktivaci po působení iontů kadmia (Gupta *et al.*, 2009; Jonak *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011). Na buněčné úrovni je SIMKK lokalizována v jádře a cytoplasmě, po působení solného stresu dochází k relokizaci SIMKK a SIMK do cytoplasmatických kompartmentů (Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018). Rostliny s nadexpresí SIMKK také vykazovaly vyšší citlivost vůči soli (Ovečka *et al.*, 2014).

2.3.3 Solným stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (SIMK)

V tolici vojtěšce (*Medicago sativa*) byla, po působení solného stresu, způsobeného 125 mM roztokem NaCl, objevena MAPK o přibližné velikosti 46 kDa, popsána původně jako MsK7 (Jonak *et al.*, 1993; Munnik *et al.*, 1999). Po působení hyperosmotického stresu

(750 mM roztoku NaCl) však došlo k aktivaci jiného proteinu o velikosti 38 kDa, a proto byl protein o velikosti 46 kDa přejmenován na solným stresem-indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (SIMK). K nejvyšším aktivitám SIMK docházelo mezi 8 a 16 minutami od aplikace solného roztoku. SIMK může být dále aktivována vlivem mechanického poranění (Bögre *et al.*, 1997; Cardinale *et al.*, 2000; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006), vlivem oxidativního stresu (Munnik *et al.*, 1999; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006), vysoké koncentrace těžkých kovů (Jonak *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011), působením prekurzoru ethylenu (aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina; Ouaked *et al.*, 2003; Jonak *et al.*, 2004) a po působení elicitorů bakterií a hub (Cardinale *et al.*, 2000; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006).

SIMK vykazuje velmi vysokou sekvenční homologii, s absolutní identitou v karboxyterminálním regionu, k MPK6 z *Arabidopsis thaliana* (Šamaj *et al.*, 2002; Bekešová *et al.*, 2015). Na buněčné úrovni je SIMK lokalizována v jádře a cytoplasmě. Po působení biotického nebo abiotického stresového faktoru dochází ke kompartmentalizaci a relokalizaci do cytoplasmy. V epidermálních a rhizodermálních buňkách se SIMK nachází především v jádře, ale během růstu kořenových vlásků dochází k relokalizaci SIMK do cytoplasmy prodlužující se špičky kořenového vlásku pomocí sítě aktinových mikrofilamentů. Depolymerizace aktinu, způsobená aplikací lantrunkulinu B, měla za následek relokalizaci SIMK do jádra. Naproti tomu stabilizace aktinu, způsobená aplikací jasplakinolidu, způsobila ko-lokalizaci SIMK a fragmentů aktinových vláken v cytoplasmě. Tyto výsledky naznačují, že SIMK má vliv na dynamiku aktinového cytoskeletu, a tedy i na růst kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Šamajová *et al.*, 2013b; Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018).

2.4 Reakce rostlin na abiotický stres

Jelikož rostliny nemohou aktivně opustit své stanoviště a uniknout před nepříznivými podmínkami neustále se měnícího vnějšího prostředí (Manik *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018), byly u nich vyvinuty receptory a signální dráhy, indukované touto environmentální zátěží. Abiotický stres je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím růst, rozmnožování a výnos rostlin (Sinha *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018). Receptory pro signalizaci abiotického

stresu reagují na změny ve vnějším prostředí, které zahrnují chlad, vysokou teplotu, zvýšenou koncentraci solí, těžkých kovů, poranění, sucho a UV záření (Sinha *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018). Jednotlivé signální dráhy pro různé druhy abiotického stresu se mohou překrývat, a tak jeden vnější podnět může aktivovat více drah. Signál je přenášen a amplifikován kaskádami mitogenem-aktivovaných proteinkinás (MAPK; Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Nejvýznamnějšími stresem indukovanými MAPK v *Arabidopsis* jsou MPK3, MPK4 a MPK6 (Colcombet a Hirt, 2008).

2.4.1 Teplotní stres

Změna teploty je jednou z nejčastějších stresových faktorů u rostlin, které pocházejí z mírného podnebného pásu (Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Rostliny se musí během celého svého životního cyklu vyrovnávat s měnícími se teplotními podmínkami, lišícími se od jejich optimálních teplotních podmínek. Výkyvy teplot mají vliv na fyziologii rostlin, regulaci metabolismu a zrání plodů, čímž mohou způsobovat ztráty na úrodě v zemědělství (Sinha *et al.*, 2011; Theocharis *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že teplotní výkyvy mění vlastnosti plasmatické membrány. Vysoká teplota způsobila zvýšenou fluiditu membrány, zatímco snížená teplota ji činila nepohyblivou a málo pružnou (Mittler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2003).

Při přechodném vystavení teplotním změnám, vyvolávajícím fyziologické reakce, při kterých dochází k aktivaci MAPK, dochází ke změnám v genové expresi (Huang *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2006). Aktivace MAPK může dále vyvolat změny, zahrnující stabilizaci plasmatické membrány (Sangwan *et al.*, 2002b; Smékalová *et al.*, 2014), aktivaci histidinkinás (Nongpiur *et al.*, 2012) a akumulaci vápenatých kationtů (Zhu *et al.*, 2013). Teplotní stres dále spouští aktivaci Ca²⁺-dependentních proteinkinás (CDPK; Ludwig *et al.*, 2004) a MAPK (Solanke a Sharma, 2008). Stres, způsobený chladem, také ovlivňuje různé post-transkripční modifikace, včetně sestříhu pre-mRNA, exportu mRNA z jádra a její degradaci (Chinnusamy *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007).

V *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že MPK4 a MPK6 jsou aktivovány stresem, způsobeným nízkou teplotou (Ichimura *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2004). Aktivita MPK4 dosahuje vrcholu při 60 minutách od začátku expozice chladem, zatímco aktivita MPK6 vrcholí už během 10 minut. MPK4 interaguje s N-terminální doménou MEKK1, zatímco

MKK1 interaguje s jeho C-terminální kinasovou doménou (Mizoguchi *et al.*, 1996; Ichimura *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 2011). Po reakci na sníženou teplotu byl také aktivován signální protein AtMKK2 (Mizoguchi *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2004). MEKK1 aktivuje MKK2 a jeho fosforylace vyvolává aktivaci MPK4 a MPK6 (Pitzschke *et al.*, 2009a; Teige *et al.*, 2004). U vojtěšky byla identifikována teplotním šokem aktivovaná MAPK (HAMK; Sangwan a Dhindsa, 2002).

2.4.2 Solný stres

Solný stres je nejčastěji způsobený zvýšenou koncentrací chloridu sodného v půdě, a je úzce spojen i s následným osmotickým stresem (Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Za toxicitou NaCl jsou primárně zodpovědné sodné kationty (Na^+), které jsou při koncentraci nad 50 mM pro většinu rostlin toxické (Munns a Tester, 2008). Na koncentraci NaCl v půdě má vliv odpařování a srážení vody, a také zvětrávání hornin (Mahajan a Tuteja, 2005). Vysoká koncentrace Na^+ může tedy mít velmi nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin, a tak snižovat výnos plodin v zemědělství (Yadav *et al.*, 2011). Rostliny se mohou proti zvýšené koncentraci soli bránit aktivním odstraněním sodných kationtů z buněk přes Na^+/H^+ antiportér SOS1 (salinity overly sensitive 1). Dále udržováním vysokých intracelulárních poměrů K^+/Na^+ kationtů pomocí HKT transportérů a transportem Na^+ kationtů prostřednictvím tonoplastového antiportéru NHX1 (Munns a Tester, 2008; Smékalová *et al.*, 2014).

V *Arabidopsis* byla prokázána akumulace mRNA MEKK1 v reakci na zasolení (Mizoguchi *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 2011) a mutanti *mekk1* vykazují výrazně lepší růst při zasolení než divý typ (Su *et al.*, 2007). Dvouhybridní analýza potvrdila proteinové interakce mezi MEKK1 a MKK2/MEK1, mezi MKK2/MEK1 a MPK4 a mezi MPK4 a MEKK1 (Ichimura *et al.*, 1998). Dále bylo prokázáno, že signály stresu, způsobené vysokou koncentrací soli, jsou přenášeny na dvě MAPK kaskády. Jednou z nich je kaskáda MPK4 (MEKK1-MEK1/MKK2-MPK4) a druhou kaskádou je MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000). Při solném stresu je součástí MAPK dráhy MEKK1 jako nadřazený (“upstream“) aktivátor MKK2 a podřazený (“downstream“) MPK4 a MPK6 (Teige *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011). Mutanti *Arabidopsis thaliana mkk2* vykazují zvýšenou citlivost k zasolení (Teige *et al.*, 2004; Smékalová *et al.*, 2014). MKP1 (MAPK fosfatasa 1) funguje jako

negativní regulátor signalizace stresu ze zasolení prostřednictvím MAPK (MPK6 a MPK4; Ulm *et al.*, 2002). Zároveň bylo prokázáno, že MKK9, která aktivuje MPK3 a MPK6 (Zhao a Guo, 2011), má negativní vliv na toleranci rostlin vůči zvýšené koncentraci soli, protože mutanti *mkk9* vykazují sníženou citlivost na zasolení (Xu *et al.*, 2008). MPK6 se uplatňuje především v ranných stádiích aktivního vylučování sodíku fosforylací SOS1 Na⁺/H⁺ antiportéru, čímž indukuje vylučování sodíku na úkor snížení pH v cytosolu (Yu *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014).

U tolice vojtěšky byla identifikována stresem indukovaná MAPK (SIMK) aktivována působením soli (Munnik *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2011). Dále byla, pomocí dvouhybridní analýzy, identifikována SIMKK (MAPKK) jako nadřazený (“upstream“) aktivátor SIMK. SIMKK specificky interaguje se SIMK a zvyšuje solí indukovanou aktivaci SIMK (Kiegerl *et al.*, 2000).

2.4.3 Stres ze sucha

Většina rostlin je vysoce citlivá na nedostatek vody (Maia *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014), a tak sucho patří mezi hlavní faktory životního prostředí, negativně ovlivňující výnosy plodin (Boyer, 1982; Mahajan a Tuteja, 2005; Sinha *et al.*, 2011). Je-li půdní vlhkost trvale nízká, dochází ke snížení příjmu vody kořenovou soustavou a rozvádění vody v pletivech rostlin. Změny vlhkosti půdy vyvolávají aktivaci různých mechanismů pro přizpůsobení a zmírnění škodlivých účinků sucha. Stres ze sucha také zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS; Reactive oxygen species; Choudhury *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2013), které jsou spojeny s uzavíráním průduchů, což má za následek snížení ztrát vody (Miura *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). Pokud tyto negativní podmínky vnějšího prostředí přetrvávají, dochází ke změnám genové exprese (Zhu, 2002; Li *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

Při odpovědi na stres ze sucha se uplatňují transkripční faktory (WRKY; Shen *et al.*, 2012) a signalizace prostřednictvím MAPK, které regulují suchem indukovanou transkripční aktivaci (Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Zavírání průduchů je regulováno MPK9 a MPK12, které pozitivně reagují na změny v hladině kyseliny abscisové (ABA) a jsou ve velké míře exprimovány právě ve svěracích buňkách průduchů (Jammes *et al.*, 2009). Další MAPK, která je aktivována stresem ze sucha je MPK6.

Aktivita MPK6 je indukována akumulací ROS (Yu *et al.*, 2010), ale nezávislá na zvýšené hladině kyseliny abscisové (ABA; Tsugama *et al.*, 2012; Smékalová *et al.*, 2014).

2.4.4 Oxidativní stres

Většina typů abiotických stresových faktorů, jako je vysoká teplota, chlad, sucho a salinita, způsobují produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), což vede v buňce k oxidativnímu stresu (Mittler, 2002; Suzuki *et al.*, 2012). Reaktivní formy kyslíku jsou ale zároveň běžné vedlejší produkty aerobního metabolismu (Suzuki *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Oxidativní stres je tedy termín používaný při přesáhnutí abnormální úrovně ROS, kam patří volné radikály (např. hydroxylový, kyselina dusičná, superoxidový) nebo neradikálové formy (např. peroxid vodíku). Nadměrná produkce ROS může vést k poškození specifických molekul s následným poškozením membrán buněk a pletiv (Gill a Tuteja, 2010). K utlumení ROS, tvořených metabolismem, buňka produkuje enzymy (katalasa, superoxid dismutasa), které zabráňují hromadění H₂O₂ (Gill a Tuteja, 2010; Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Zároveň však ROS hrají důležitou roli v buněčné signalizaci MAPK.

Reaktivní formy kyslíku způsobují aktivaci MPK3 a MPK6 u *Arabidopsis thaliana* (Kovtun *et al.*, 2000; Lumbreras *et al.*, 2010). Dále bylo prokázáno, že dochází k MKK5-zprostředkované zvýšené regulaci exprese superoxid dismutas, na úrovni transkripce, v odpovědi na tvorbu ROS. MKK5 přenáší signál jak na MPK6, tak na MPK3 (Miles *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2013). Dalším signálním proteinem, u něhož dochází k aktivaci vlivem oxidativního stresu, je MAPK fosfatasa 2 (MKP2), která defosforyluje MPK3 i MPK6, a tak zvyšuje toleranci buňky vůči oxidativnímu stresu (Lee a Ellis, 2007; Lumbreras *et al.*, 2010).

U tollice vojtěšky byla identifikována MAPKKK, OMTK1 (oxidativním stresem aktivovaná MAP3K1), která aktivuje, v reakci na zvýšenou koncentraci ROS, MAPK MMK3 (Kovtun *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2011).

2.4.5 Stres z poranění

Dalším z velmi častých faktorů, způsobující stres u rostlin, je mechanické poškození pletiv. Zranění mohou být způsobena bioticky, útokem býložravých živočichů, hmyzu a aktivitou

lidí, ale i abiotickými stresovými faktory, jako je chlad a vysoká teplota (Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Po poranění dochází u rostliny k percepci signálu a k následné expresi genů souvisejících s obranou, které se podílejí na hojení poškozených pletiv a obraně proti následnému napadení hmyzem nebo potenciální infekci patogenem (Lawton a Lamb, 1987; Sinha *et al.*, 2011). Po rozpoznání mechanického stresu dochází ke zvýšení hladiny ROS, zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} kationtů v cytosolu, produkci některých rostlinných hormonů a fosforylaci signálních proteinů (Takahashi *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Produkce ROS v reakci na poranění je spojena se signalizací Ca^{2+} kationtů, které přímo interagují s některými transkripčními faktory, čímž ovlivňují aktivitu některých MAPK ale i fosfatas (Das a Pandey, 2010; Smékalová *et al.*, 2014). Následně dochází k aktivaci exprese obranných genů.

V tabáku byla popsána první zraněním-indukovaná MAPK (WIPK; Seo *et al.*, 1995). Následně Ichimura *et al.*, (2000) popsali, že AtMPK4 a AtMPK6 se rychle aktivují po poranění. NtMPK4, homolog AtMPK4, byl spolu s SIPK aktivován zraněním v *Nicotiana tabacum* (Gomi *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2011). Ko-immunoprecipitační metodou byla odhalena interakce mezi MEKK1 a MKK1 po poranění rostliny, ale k žádné interakci mezi těmito proteiny nedošlo u kontrolních nezraněných rostlin (Hadiarto *et al.*, 2006; Smékalová *et al.*, 2014). Dále bylo prokázáno, že MEKK1 interagovala přímo s MPK4, MPK5 a MPK13 (Nakagami *et al.*, 2004; Smékalová *et al.*, 2014). Bogre *et al.*, 1997 prokázali, že zranění listů u vojtěšky vyvolalo aktivaci MMK4. Bekešová *et al.*, 2015 prokázali, že zranění listů u vojtěšky vyvolalo aktivaci SIMK.

2.4.6 Stres způsobený těžkými kovy

Ionty kovů jsou v nízkých koncentracích pro rostliny nezbytné, protože se podílejí na fyziologických a vývojových procesech. Mezi tyto ionty biogenních kovů patří měď (Cu), zinek (Zn), železo (Fe), kobalt (Co) a nikl (Ni). Vysoké koncentrace těžkých kovů jsou však toxické a negativně ovlivňují růst a vývoj rostlin (Sinha *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Kromě výše zmíněných zde patří také některé neesenciální kovy, jako je hliník (Al), kadmium (Cd) a olovo (Pb), které způsobují závažné poruchy fyziologických procesů rostlin (Illes *et al.*, 2006; Shanmugaraj *et al.*, 2013). Těžké kovy způsobují výkyvy v hladině a tvorbě ROS (Smeets *et al.*, 2009; Smékalová *et al.*, 2014). Zvýšená produkce

ROS ovlivňuje distribuci Ca^{2+} kationtů a aktivaci MAPK (Jonak *et al.*, 2004; Opendakker *et al.*, 2012).

Zvýšená koncentrace těžkých kovů vedla v rostlinách k aktivaci MAPK, především v rýži došlo k aktivaci OsMPK3, OsMPK4 a OsMKK4 (Huang a Huang, 2008; Rao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2004, 2007). V *Arabidopsis* způsobuje kadmium akumulaci ROS, a tím aktivaci MPK3, MPK4 a MPK6 (Liu *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014). Po vystavení rostlin vysoké koncentraci kadmia došlo ke zvýšené expresi transkripčních faktorů WRKY22; WRKY 25 (aktivován MPK4) a WRKY29 (Opendakker *et al.*, 2012; Smeets *et al.*, 2013).

V *Medicago sativa* došlo, při vystavení zvýšené koncentraci Cd a Cu, k aktivaci čtyř různých MAPK: SAMK, SIMK, MMK2 a MMK3 (Jonak *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011). Dále došlo v protoplastech tolice vojtěšky, vlivem měďnatých kationtů, k SIMKK zprostředkované aktivaci SIMK a SAMK, ale ne MMK2 a MMK3.

2.5 Fenotypový projev rostlin při interakci se symbiotickými hlízkovými bakteriemi

Kořeny rostlin jsou neustále vystaveny mnoha druhům půdních mikroorganismů. Buněčná stěna rhizodermálních buněk proto vytváří ochranou bariéru proti patogenním druhům. Aby však prospěšné symbiotické hlízkové bakterie mohly být v kontaktu s danou rostlinou, musí mezi oběma organismy proběhnout výměna signálů, které bakterii umožní vstup do rostliny skrz kořenové vlásky (Jones *et al.*, 2007).

2.5.1 Iniciační invaze kořenového systému rostlin

Bobovité rostliny nejprve produkují flavonoidní sloučeniny (deriváty 2-fenyl-1,4-benzopyronu), které se navážou k bakteriálním NodD transkripčním faktorům (Perret *et al.*, 2000; Barnett a Fisher, 2006), aktivují je, a tím indukují transkripci *nod* genů (Perret *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007). Peck *et al.*, v roce 2006 prokázali, že flavonoidy nehostitelských rostlin mohou u *Sinorhizobium meliloti* inhibovat transkripci *nod* genů, které kódují enzymy syntézy lipochitooligosacharidových Nod faktorů, produkovaných bakterií, a které u rostlin vyvolávají fenotypové změny (Dénarié *et al.*, 1996; Long *et al.*,

1996; Mylona *et al.*, 1995; Schultze a Kondorosi, 1998; Spaink, 1996; Timmers *et al.*, 1999; Oldroyd a Downie, 2004). Nod faktory se skládají z několika residuí β -1,4-*N*-acetyl-D-glukosaminů, jejichž počet je závislý na druhu půdní bakterie (Perret *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007). Nod faktor je navázán na extracelulární LysM doménu rostlinného receptoru s intracelulární kinasovou doménou, a poté dochází k přenosu signálů, které spouští v buňce řadu dějů (Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2010).

Jednou z prvních reakcí rostlin k daným Nod faktorům je zvýšení úrovně vnitrobuněčných Ca^{2+} kationtů v kořenovém vlásku, což vede k jejich oscilaci a změnám uspořádání cytoskeletu (de Ruijter *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 1999; Cardenas *et al.*, 2003; Sieberer *et al.*, 2005b). Přechodná fragmentace aktinu po působení Nod faktorů ze *Sinorhizobium meliloti* byla potvrzena v *Medicago sativa* (Allen *et al.*, 1994; Cardenas *et al.*, 1998; Timmers *et al.*, 1999), změny v konfiguraci aktinových vláknec u *Vicia sativa* a přeskupení mikrotubulů v primární kůře *Vicia hirsuta* (Bakhuizen, 1988, van Spronsen *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1999; Timmers *et al.*, 1999). Reorganizace cytoskeletu, regulovaná ROP GTPasami, způsobí stáčení při růstu kořenového vlásku kolem *Rhizobia*, které je zde zachyceno (Obr. 6; Kijne, 1992, Esseling *et al.*, 2003; Esseling a Emons, 2004; Gage, 2004; Sieberer *et al.*, 2005a; Vassileva *et al.*, 2005).

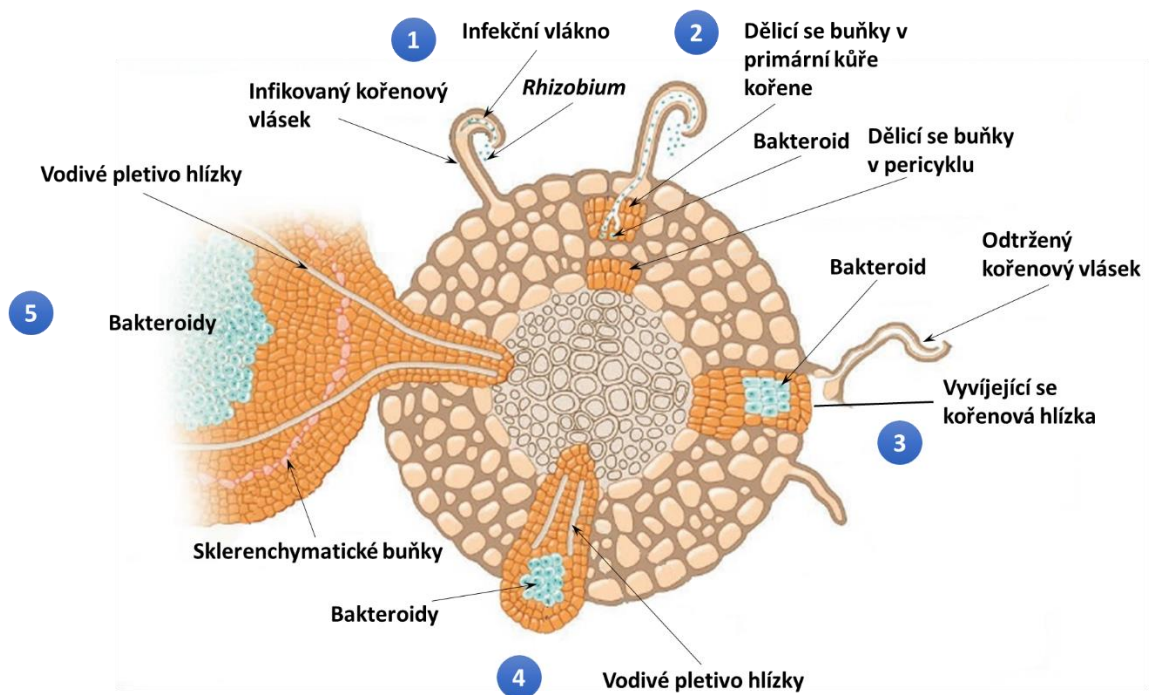
Následně dochází, vlivem změn v dynamice cytoskeletu, k agregaci cytoplasmy, relokalizaci jádra, endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu pro usnadnění transportu vezikul do místa proniknutí bakterií do kořenového vlásku (Ivanov *et al.*, 2010). Nod faktory zároveň, inhibicí transportu auxinu, stimulují buňky primární kůry kořene k mitose (Dudley *et al.*, 1987; Libbenga a Harkes, 1973; Yang *et al.*, 1994, Heidstra *et al.*, 1997; Foucher a Kondorosi, 2000; Wasson *et al.*, 2006). Tímto indukovaným dělením vznikají buňky, které později formují primordium hlízký (Foucher a Kondorosi, 2000).

2.5.2 Vývoj infekčního vlákna

Než může docházet k fixaci dusíku, musí dojít k transportu bakterií do buněk primární kůry kořene (Perret *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007). Aby hlízková bakterie byla schopna se přemístit z kolonizovaného kořenového vlásku do primární kůry kořene, vytváří infekční vlákno (Obr. 6). Účinkem Nod faktorů a bakteriálních exopolysacharidů (sukcinoglykan,

galaktoglukan, Glazebrook a Walker, 1989; Pellock *et al.*, 2000) dochází k reorganizaci buněčné polarity (van Brussel *et al.*, 1992; Timmers *et al.*, 1999) a k indukci tvorby plasmatické membrány a buněčné stěny v místě vrcholu nově se vyvíjející struktury (Brewin, 2004; Gage, 2004; Jones *et al.*, 2007). Pouze u bakterií, které se nacházejí v tomto vrcholu infekčního vlákna, dochází k dělení (Gage, 2002).

Během růstu infekčního vlákna dochází k relokalizaci jádra buňky kořenového vlásku, spojením vrcholu infekčního vlákna k jádru sítí mikrotubulů, které obklopují celé infekční vlákno (Timmers *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 2010). Jakmile vlákno proroste buňkou kořenového vlásku, bakterie indukují tvorbu infekčního vlákna do další buňky, dokud vlákno neproroste do buněk primární kůry kořene (Jones *et al.*, 2007). Po proniknutí do hlubších oblastí primární kůry kořene, dojde k vytvoření výběžku (kapky) cytoplasmy infekčního vlákna, které už není ohraničeno buněčnou stěnou, ale pouze cytoplasmatickou membránou (Ivanov *et al.*, 2010).



Obr. 6 Schéma vývoje kořenové hlízky. (1 - Tvorba infekčního vlákna, 2 - Tvorba primordia kořenové hlízky a vznik bakteroidů, 3 - Održení kořenového vlásku vlivem růstu hlízky, 4 - Tvorba vodivého pletiva, 5 - Vyvinutá kořenová hlíзка; Upraveno podle <https://www.liberaldictionary.com/wp-content/uploads/2018/12/root-nodule.jpg>).

2.5.3 Vývoj hlízky a výměna živin

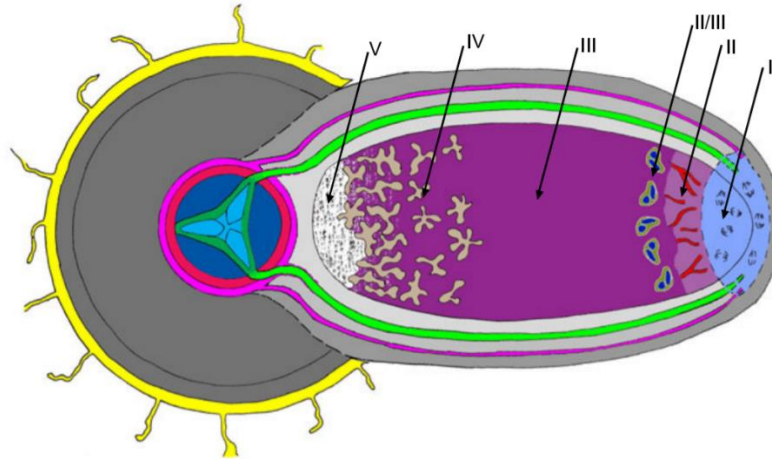
Bakterie se dostane do cytoplasmy buňky endocytosou (Jones *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2010; Leborgne-Castel a Bouhidel, 2014). Každá bakterie je obklopena cytoplasmatickou membránou hostitelské buňky a vytváří symbiosom (Brewin, 2004; Jones *et al.*, 2007). Symbiosom se může dále dělit, dokud nedojde k diferenciaci bakterie v dusík-fixující bakteroid, obklopený peribakteroidní membránou (Robertson a Lyttleton, 1984; Jones *et al.*, 2007). Bakteroidy se dále dělí a diferencují, čímž vzniká nedeterminované primordium hlízky (Obr. 6; Prell a Poole, 2006). Jde o meristematické pletivo s cévními svazky pro výživu orgánu (Obr. 7; Rose, 2008; Kouchi *et al.*, 2010).

Bakteroidy v primordiu zvyšují obsah své DNA a velikost buňky pro dosažení vyšší metabolické aktivity pro podporu fixace dusíku (Galitski *et al.*, 1999; Mergaert *et al.*, 2006). Uvnitř symbiosomu je udržována nízká hladina kyslíku pomocí, rostlinou vytvořeného, kyslík-vázajícího proteinu leghemoglobinu (Ott *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007). Dokončením diferenciaci bakteroidů dochází k expresi enzymů nitrogenasového komplexu, nezbytného pro fixaci dusíku (Fischer, 1994; Oldroyd 2007).

Nitrogenasový komplex se skládá z enzymu nitrogenasy, obsahující ionty železa, síry a molybdenu, a enzymu nitrátreduktasy, obsahující ionty železa a síry (Burgess a Lowe, 1996). Respirační aktivita bakteroidu poskytuje komplexu 16 molekul ATP a 8 elektronů, které jsou nutné k redukci 1 molekuly N_2 na 2 molekuly NH_4^+ (Poole a Allaway, 2000). Amonné kationty mohou být sekretovány do NH_4^+ kanálů peribakteroidní membrány, asimilovány a distribuovány rostlinou (de Bruijn *et al.*, 1989; Poole a Allaway, 2000; Ludwig *et al.*, 2003; Prell a Poole, 2006). Asimilace NH_4^+ rostlinnými buňkami probíhá skrz glutamin a asparagin syntetasy, kdy dochází v tvorbě glutaminu z kyseliny glutamové a NH_4^+ , asparaginu z kyseliny asparagové a NH_4^+ (Kahn *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2003; Barsch *et al.*, 2006). Pro fixaci dusíku je potřebná výměna produktů metabolismů rostlin a bakterií. Rostlina bakterii poskytuje substrát pro oxidativní fosforylaci (dikarboxylové kyseliny – malát, sukcinát; Ronson *et al.*, 1981; Poole a Allaway, 2000) a prvky, potřebné k tvorbě nitrogenasového komplexu (Dos Santos *et al.*, 2004).

Truchet *et al.*, v roce 1991 prokázal, že k vývoji hlízek může docházet i při absenci hlízkových bakterií, aplikací purifikovaných Nod faktorů. Kořenovou hlízku lze rozdělit do několika zón. Zóna I obsahuje meristematické buňky bez hlízkových bakterií. Následuje

centrální pletivo tvořené infekčními zónami symbiotickými: brzkou II a pozdní (fixační) III, oddělené interzónou II-III. Zóna IV je tvořena senescenčními buňkami, které postupem času vytvoří poslední saprofytickou zónu V (Obr. 7; Vasse *et al.*, 1990; Timmers *et al.*, 1999; Popp a Ott; 2011; Łotocka *et al.*, 2012).



Obr. 7 Rozdělení jednotlivých zón v průběhu růstu kořenové hlízky. I – meristematická zóna, II – brzká symbiotická zóna, II-III interzóna, III – pozdní (fixační) symbiotická zóna, IV – senescenční zóna, V – saprofytická zóna. (Upraveno podle Łotocka *et al.*, 2012).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

P 0.45 PVDF Blotting Membrane Amersham TM Hybond TM (GE Healthcare Life science), PVDC fólie (Sarogold), kádinky, odměrné válce, pinzety, nůžky, Pasteurovy pipety, filtrační papír, hliníková fólie, skleněné nádoby na membrány, hrubší a tenčí skla na gely, centrifugační kyvety, mikrozkušavky, celulosové ubrousky, magnetická míchadla, sterilní špičky, sterilní Petriho misky, černé igelitové obaly, parafilm, chirurgická páska, bakteriologický filtr s póry o velikosti 0,22 μm , stojan na zkumavky, Centrifugační mikrozkušavky, Amicon[®]Ultra – 0,5 ml centrifugační filtry Ultracel[®] – 10K, laboratorní jednorázové roušky, 96-jamková destička MicroAmp[®] Fast (Applied Biosystems), sterilní párátka

3.1.1 Použité chemikálie

1000x Gamborg's vitamin (Duchefa Biochemie)

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa Biochemie)

10x Reakční pufr pro DNasu I (s MgCl_2 , Thermo Scientific)

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

2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (Duchefa Biochemie)

2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin]ethansulfonová kyselina (HEPES, Duchefa Biochemie)

2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich)

4x Laemmli vzorkovací pufr (Bio-Rad)

6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific)

Aboslutní ethanol (Penta)

Acetát sodný (Sigma-Aldrich)

Adenin (Sigma-Aldrich)

Agarosa (Sigma-Aldrich)

Akrylamid/bis-akrylamid roztok 37,5:1 (40%, Bio-Rad)

Aktin Primery (Eurofins Genomics)
Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad)
BSA (hovězí sérový albumin; Sigma-Aldrich)
Clarity™ Western ECL Substrate: Luminol/enhancer solution a Peroxide solution (Bio-Rad)
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Sigma-Aldrich)
Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich)
DNasa I (Thermo Scientific)
dNTP mix (10 mM, Thermo Scientific)
Dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich)
DreamTaq DNA Polymerasa (Thermo Scientific)
Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)
Ethanol denaturovaný (96%, Lihovar Kojetín)
Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether) – N, N, N', N' tetraoctové kyseliny (EGTA, Sigma-Aldrich)
Fenol – chloroform – isoamylalkohol (25:24:1, Sigma-Aldrich)
Fenol (Sigma-Aldrich)
Fluorid sodný (Sigma-Aldrich)
Gamborg's B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Gellan gum powder (Alfa Aesar)
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)
Glycerol (Sigma-Aldrich)
Glycin (Sigma-Aldrich)
Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich)
Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich)
Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)
Chlornan sodný (Sigma-Aldrich)

Chloroform: isoamylalkohol (24:1, Sigma-Aldrich)
ImmoMix™ (Bioline)
Incidur (Ecolab)
Isopropanol (Sigma-Aldrich)
Kinetin (Duchefa Biochemie)
Kyselina boritá (Duchefa Biochemie)
Kyselina chlorovodíková (37%, Sigma-Aldrich)
LB broth (MO BIO laboratories)
Ledová kyselina octová (34%, Sigma-Aldrich)
L-Glutamin (Duchefa Biochemie)
L-glutathion (Sigma-Aldrich)
L-Prolin (Sigma-Aldrich)
L-Serin (Sigma-Aldrich)
MES (Duchefa Biochemie)
Methanol (Sigma-Aldrich)
Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics)
M-MLV Reverzní transkriptasa (Promega)
M-MLV RT 5x buffer (Promega)
Monohdrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich)
Monohdrát síranu zinečnatého (Sigma-Aldrich)
Monosulfát kanamycinu (Duchefa Biochemie)
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Myoinositol (Duchefa Biochemie)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich)
OligodT (100 μM, Promega)
Pentahdrát dihydrochlorid spectinomycinu (Duchefa Biochemie)
Pentahdrát síranu měďnatého (Duchefa Biochemie)
Peroxosíran amonný (Sigma-Aldrich)
PhosSTOP (Roche)
Phyto agar (Duchefa Biochemie)
Ponceau S (Sigma-Aldrich)

Precision Plus Protein TM Dual Color Standards (Bio-Rad)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x (Bio-Rad)
Rifampicin (Duchefa Biochemie)
RNAsin® inhibitor ribonukleas (Promega)
ROX Reference Dye (Invitrogen)
Sacharosa (Sigma-Aldrich)
Schenk & Hildebrant (100x) vitamin solution (Duchefa Biochemie)
Schenk & Hildebrant basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
SIMK Primery (Eurofins Genomics)
Sterilní destilovaná voda
SYBR™ Green I nucleic acid gel stain (Thermo Fisher Scientific)
Tikarcilin (Duchefa Biochemie)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)
Tween ® 20 (Sigma-Aldrich)
Voda (Sigma-Aldrich)
Vodovodní voda

3.1.2 Použité protilátky

Primární afinitně přečištěná králičí polyklonální protilátka anti-MMK3 (GenScript)
Primární afinitně izolovaná králičí polyklonální protilátka anti-AtMPK6 (Sigma-Aldrich)
Primární králičí anti-Phospo-p44/42 MAP kinase (thr202/tyr204) protilátka (Cell Signaling Technologies)
Primární myší monoklonální protilátka anti-Actin (Sigma-Aldrich)
Primární myší monoklonální protilátka anti-GFP (Sigma-Aldrich)
Sekundární kozí anti-myší protilátka s navázanou křenovou peroxidasou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)
Sekundární kozí anti-králičí protilátka s navázanou křenovou peroxidasou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)

3.1.3 Roztoky a média

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

- 1 ml chlornan sodný
- 50 μ l Tween
- Doplnit MiliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μ m

LB médium

- 25 g·l⁻¹ LB broth
- Upravit pH na 7,2, sterilizace autoklávem

SH médium

- 3,2 g·l⁻¹ Schenk and Hildebrandt basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 0,5 g·l⁻¹ MES
- Upravit pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování nechat vychladnout na přibližně 55 °C, poté přidat:
 - 10 ml·l⁻¹ 100X Schenk and Hildebrandt vitamin solution (1g/10 ml MiliQ H₂O)

B5H médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 0,5 g·l⁻¹ prolin
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Upravit pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

- Po autoklávování nechat vychladnout na přibližně 55 °C, poté přidat:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1 ml·l⁻¹ 2,4-D (1,0 mg·l⁻¹)
 - 1 ml·l⁻¹ kinetin (0.1 mg·l⁻¹)
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

Směs aminokyselin

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

Roztok 2,4-D (1,0 mg·ml⁻¹)

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

Roztok kinetinu (0,1 mg·ml⁻¹)

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

B50 médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 0,5 g·l⁻¹ prolin

- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Upravit pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování nechat vychladnout na přibližně 55 °C, poté přidat:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

MMS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 0,1 g·l⁻¹ myoinositol
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Upravit pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování nechat vychladnout na přibližně 55 °C, poté přidat:
 - 1 ml·l⁻¹ 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution

Pevné MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnit MiliQ H₂O
- Upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH, sterilizace autoklávem

Pevné ½ MS médium

- 2,15 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 10 g·l⁻¹ sacharosa
- 1 g MES
- Doplnit MiliQ H₂O
- Upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH, sterilizace autoklávem

Fähreovo médium bez dusíku

- 1 ml·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O (0,1232 g·ml⁻¹)
- 1 ml·l⁻¹ KH₂PO₄ (0,0953 g·ml⁻¹)
- 2 ml·l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O (0,0712 g·ml⁻¹)
- 2,5 ml·l⁻¹ Fe-EDTA
- 0,1 ml·l⁻¹ MnSO₄·H₂O (0,001g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O (0,0015g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ ZnSO₄·H₂O (0,0017g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ H₃BO₃ (0,001 g·ml⁻¹)
- 0,1 ml·l⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O (0,0011g·ml⁻¹)
- Upravit pH na 6,5
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování nechat vychladnout na přibližně 55 °C, poté přidat:
 - 0,1 ml·l⁻¹ CaCl₂ (0,11098g·ml⁻¹)

Roztok Fe-EDTA (10 ml)

- 0,056g FeSO₄·7H₂O
- 0,074 g Na₂EDTA
- Doplnit do 10 ml MiliQ H₂O
- Rozpustit za stálého míchání při 50 °C

Transfer pufr 10x (TB)

- 30 g·l⁻¹ Tris
- 144 g·l⁻¹ Glycin
- Doplnit MiliQ H₂O do 1 litru

Pracovní TB:

- 100 ml 10x TB
- 100 ml 100% methanolu
- 800 ml MiliQ H₂O

Tris buffered saline 10x (TBS) pufr

- 24,2 g·l⁻¹ Tris
- 87,8 g·l⁻¹ NaCl

- Doplnit MiliQ H₂O do 1 litru
- Upravit pH na 7,4 pomocí koncentrované HCL

TBS-T pufr

- 100 ml TBS
- 899 ml MiliQ H₂O
- 1 ml Tween 20

Running pufr (RB)

- 30 g·l⁻¹ Tris
- 144 g·l⁻¹ Glycin
- 10 g·l⁻¹ SDS
- Doplnit MiliQ H₂O do 1 litru

Pracovní RB:

- 100 ml RB
- 900 ml MiliQ H₂O

Ponceau S barvicí roztok

- 1 g Ponceau S
- 50 ml Kyselina octová
- 950 ml MiliQ H₂O

Extrakční pufr E (do 100 ml)

- 1,19 g HEPES, pH 7,5 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 38 mg EGTA
- 100 µl 1M MgCl₂
- 4 mg NaF
- 10 ml 10% glycerolu
- Doplnit MiliQ H₂O do 100 ml
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 µm
- Uchovávání při -20 °C

Extrakční pufr

- Těsně před použitím přidány inhibitory proteas a fosfatas (na 1 ml extrakčního pufu E)
- 1 μl 1M DTT ($0,154 \text{ g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
- 20 μl CompleteTM
- 100 μl PhoStopTM

0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (100 ml)

- 6 g Tris
- 60 ml MiliQ
- Upravit pH na 6,8 s 1M HCl
- Doplnit MiliQ do 100 ml

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

- 54,45 g Tris
- 150 ml MiliQ
- Upravit pH na 8,8 s 1M HCl
- Doplnit MiliQ do 300 ml

1% agarosový gel

- 10 g agarosa
- Doplnit MiliQ H₂O do 100 ml
- Rozpustit agarosu ve vodě pomocí mikrovlnné trouby
- 1 μl Midori Green Advance DNA stain

Štěpící směs s DNAsou (90 μl)

- 1 μl RNAsin
- 2 μl DNasa I
- 10 μl 10x buffer
- 77 μl H₂O

PCR mix (49 μl)

- 37,5 μl H₂O
- 5 μl 10x buffer
- 1 μl dNTP mix (10mM)

- 2,5 µl Forward primer (10µM)
- 2,5 µl Reverse primer (10µM)
- 0,25 µl Dream Taq polymerasa

2x SYBR mix (2 ml)

- 1 ml 2x Immomix
- 50 µl 25µM ROX
- 3,2 µl 100x SYBR Green
- 946,8 µl H₂O

Mix s primery (7,5 µl)

- 5 µl 2x SYBR mix
- 0,5 µl Forward primer (10µM)
- 0,5 µl Reverse primer (10µM)
- 1,5 µl H₂O

3.1.4 Použité přístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Aparatura na SDS-PAGE a Western blot (Bio-Rad)

Aparatura na výrobu gelů (Bio-Rad)

Automatické pipety (Eppendorf)

Binokulární fluorescenční stereomikroskop (Leica)

Box laminární Biohazard (Merci)

Centrifuga stolní chlazená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)

Dokumentační systém ChemiDoc™ MP (Bio-Rad)

Elektromagnetická míchačka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)

Fotoaparát Nikon 7000 (Nikon)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Hluboko mrazící box (Panasonic)

Chlazená centrifuga Allegra (Beckman Coulter)

Inkubátor s nastavitelnou teplotou (Mettler)

Laboratorní centrifuga na PCR mikrodestičky NF 400 (Nüve)

Laboratorní digestoř (M 1200, MERCI)

Laboratorní chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)
Laboratorní váhy S1502 (BEL Engineering)
Laserový mikroskop s rotujícím diskem (Zeiss)
Mikrocentrifuga s vortexem FVL-2400N (BioSan)
Mikrocentrifuga Spectrafuge™ 24D (Labnet)
Mikroobjemový spektrofotometr Nanodrop™ Lite (Thermo Scientific)
Mikrovlnná trouba MHE21 (HITACHI)
Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)
Napěťový a proudový zdroj Bio-Rad Power Pac™ Basic (Bio-Rad)
pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)
Spektrofotometer (Smart Spec™ plus, Bio-Rad)
Spektrofotometr Infinite M Nano (Tecan)
T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)
Termoblok Thermocell Cooling&Heating Block CHB-202 (Bioer)
Termocyklér kvantitativní – StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)
Třepačka Rocker Shaker MR - 12 (BioSan)
Třepačka s inkubací ES-20 (Biosan)
Vortex Genie - 2 (Scientific Industries)
Výrobek deionizované vody Simplicity water purification system (Millipore)
Zoomovací stereo mikroskop (Zeiss)

3.1.5 Software pro zpracování výsledků

ApE 2.0.49 A plasmid editor (M. Wayne Davis)
Excel 365 (Microsoft Office)
i-control 2.0™ Microplate Reader Software (Tecan)
ImageLab (Bio-Rad)
ImageJ (NIH)
Inkscape (0.92.3)
PowerPoint 365 (Microsoft Office)
StepOne v2.3 (Applied Biosystems)
Zen Blue version 2.3 (Zeiss)

3.1.6 Rostlinný materiál

Medicago sativa L. divoký typ, kultivar Regen-SY

Medicago sativa L. transgenní linie 35S::*FABD2-GFP*

Medicago sativa L. transgenní linie *SIMK RNAi*

Medicago sativa L. transgenní linie *SIMKK RNAi* v *FABD2-GFP* (označeno v práci jako *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*)

Arabidopsis thaliana L. transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující protein GFP (*35S::sGFP*)

Transgenní rostliny byly připraveny stabilní transformací listových explantátů z kontrolních dospělých rostlin *M. sativa* kultivaru Regen-SY nebo *FABD-GFP* pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Bekešová *et al.*, 2015). Transformované rostliny byly regenerovány procesem somatické embryogeneze. Kontrolní rostliny byly také regenerovány procesem somatické embryogeneze, ale s vynecháním kroku transformace. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu při teplotě 21 °C přes den a 18 °C přes noc. Při fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a relativní vlhkosti 60 % ve dne, 70 % v noci.

3.1.7 Bakteriální materiál

- *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101 nesoucí konstrukt:
 - pHellsgate12 SIMKi
 - pHellsgate12 SIMKKi
- *Sinorhizobium meliloti* kmen Sm2011

3.2 Metody

3.2.1 Příprava bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Ze zmrzlého glycerolového roztoku s bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101, s příslušnými vektory bylo odebráno sterilní špičkou 30 µl a přeneseno i se špičkou do 10 ml LB média se selekčními antibiotiky (spectinomycin – 100 µg·ml⁻¹, rifampicin - 100 µg·ml⁻¹) v 50ml kyvetě. Sterilní LB médium se selekčními antibiotiky bylo použito jako blank. Suspenze byla ponechána v inkubátoru ve tmě, přibližně 24 hodin

při 180 otáčkách za minutu a teplotě 28 °C, do dosažení optické hustoty bakterií při 600 nm (OD_{600}) mezi 0,8 – 1,5. Optická hustota při 600 nm byla kontrolována na spektrofotometru. Poté byly buňky separovány od média centrifugací při 3000 g po dobu 5 minut, při laboratorní teplotě a supernatant byl odlit do odpadu. Bakteriální buňky byly resuspendovány v čistém LB médiu pro dosažení optické hustoty $OD_{600} = 0,7$.

3.2.2 Sterilizace listů

Listy (trojlístky) byly odebrány z větví nekvetoucích rostlin tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*), buď kultivaru Regen-SY nebo transgenní linie *FABD2-GFP*, mezi druhou a pátou uzlinou. Zdravé zelené listy byly vloženy do 50ml kyvety s vodou z vodovodního řádu o laboratorní teplotě. Pokud byly odebrány listy z rostlin pěstovaných v květináči, byly listy sterilizovány v 70% ethanolu po dobu 10 sekund. Pokud byly odebrány listy z rostlin pěstovaných *in vitro*, byly listy vloženy do 0,1% roztoku Tween v MiliQ vodě po dobu 5 minut. V druhém kroku sterilizace byly listy přeneseny do 50ml kyvety s 1% chlornanem sodným v MiliQ vodě s 0,05% Tween. Následně byly listy pětkrát promyty sterilní vodou, a poté položeny na sterilní filtrační papír. Listy byly přibližně v polovině rozřezány skalpelem a ihned vloženy do 12 ml SH média v 50ml kyvetě.

3.2.3 Transformace listových explantátů vojtěšky

K explantátům v SH médiu v 50ml kyvetě byly přidány 3 ml kultury *Agrobacterium tumefaciens*. Explantáty s bakteriální kulturou byly dobře promíchány, a poté ponechány 30 minut v klidu ve tmě. Následně byly explantáty přeneseny na sterilní filtrační papír pro odstranění přebytečného média. Inokulované listové explantáty byly přeneseny na Petriho misky s B5H médiem, které byly zalepeny páskou a přeneseny do fytotronu. Zde byly misky překryty jednou vrstvou filtračního papíru pro snížení intenzity světla. Petriho misky s explantáty a bakteriemi byly kultivovány při 24 °C, fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a při intenzitě světla přibližně $30 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Sedm dní po inokulaci byly explantáty odděleny od bakteriální kultury a přeneseny do 50ml kyvety se sterilní vodou. Listové explantáty byly pětkrát promyty.

3.2.4 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze

Promyté listové explantáty byly položeny na sterilní filtrační papír pro odstranění přebytečné vody, a poté přeneseny na B5H médium se selekčními antibiotiky (ticarcilin - $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kanamycin - $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Petriho misky byly kultivovány při $24 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a intenzitě světla $60\text{-}80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu třech týdnů pro indukci kalogeneze. Vyvinuté kalusy byly přeneseny na B50 médium se selekčními antibiotiky po dobu třech týdnů pro vývoj embryí, která byla následně přenesena na MMS médium se selekčními antibiotiky, po dobu přibližně třech týdnů pro vývin kořenové části embryí. Zakořenělá embrya a mladé rostlinky byly přeneseny na MS médium pro dokončení vývinu celé rostliny a udržování rostliny *in vitro*. Poté byly samostatné rostliny číselně označeny. Vzrostlé rostliny byly následně přesazeny do půdy. Rostliny v půdě byly kultivovány při $21 \text{ }^\circ\text{C}$ ve dne a $19 \text{ }^\circ\text{C}$ v noci, fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a intenzitě světla $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.5 Povrchová sterilizace a výsev semen *Arabidopsis thaliana* pMAT

Semena *Arabidopsis thaliana* pMAT byla vložena do jedné mikrozkušavky a byla sterilizována v laminárním boxu. K semenům byl pipetou přidán 1 ml 70% ethanolu a po dobu 2 minut byla směs mírně protřepávána. Poté byla mikrozkušavka ponechána v klidu, aby semena klesla ke dnu mikrozkušavky a ethanol byl odsát pipetou. Následně byl do mikrozkušavky pipetou přidán 1 ml 1% chlornanu sodného a po dobu 8 minut byla směs mírně protřepávána. Poté byla mikrozkušavka ponechána v klidu, aby semena klesla ke dnu mikrozkušavky a chlornan sodný byl odsát pipetou. Po sterilizaci byla semena 3x promyta sterilní MiliQ vodou, a poté vysypána na sterilní filtrační papír pro odstranění přebytečné vody. Následně byla semena přenesena sterilním párátkem na povrch $\frac{1}{2}$ MS média ve sterilních Petriho miskách. Misky byly ponechány v horizontální poloze v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ přes noc. Druhý den byly misky se semeny přeneseny do fytotronu a položeny do vertikální polohy. Rostliny byly kultivovány při teplotě $24 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a intenzitě světla $60\text{-}80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu dvou týdnů.

3.2.6 Odběr vzorků

Z každé zdravé rostliny po transformaci bylo odebíráno do dvou označených a v ledu vychlazených mikrozkušavek 5-8 listů. Z transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana pMAT* byly zvlášť odebrány kořeny a zvlášť nadzemní části. Pro testování kinasové aktivity po působení bakterie *Sinorhizobium meliloti* byly odebírány kořeny *M. sativa SIMK RNAi*, před aplikací bakterie (suchá kontrola), a dále po aplikaci suspenze *Sinorhizobium meliloti*, a pouze ty kořeny, které byly v kontaktu s půdní bakterií. Mikrozkušavky s odebranými vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy do mrazničky na -80 °C.

3.2.7 Homogenizace vzorků

Rostlinný materiál byl vysypán do třecí misky a rozdrčen na jemný prášek pomocí tloučku a tekutého dusíku. Třecí miska a tlouček byly před samotnou homogenizací vychlazeny v mrazáku na -20 °C. Prášek byl přenesen do předem vychlazené a popsané mikrozkušavky, která byla ihned vložena do tekutého dusíku. Po homogenizaci daného vzorku byly použité nástroje očištěny 96% ethanolem.

3.2.8 Extrakce proteinů

Homogenizované vzorky v mikrozkušavkách byly vloženy do ledu. K vzorkům byl přidán extrakční pufr, který byl připraven podle protokolu. Do extrakčního pufru bylo přidáno redukční činidlo DTT, inhibitor proteas cOmplete™ a inhibitor fosfatas PhosSTOP™. Homogenáty jednotlivých vzorků byly předem odváženy na analytických vahách, a poté k nim bylo přidáno dané množství extrakčního pufru v poměru, kdy do 1 g homogenátu byl přidán 1 ml extrakčního pufru. Vzniklá směs byla promíchána na vortexu a ponechána 30 minut extrahovat. Následně byly vzorky v mikrozkušavkách vloženy do předchlazené centrifugy na 20 minut při 13 000 g a 4 °C. Poté byl supernatant přenesen pipetou se sterilní špičkou do přečišťovací kolonky, která byla vložena do označené 2ml centrifugační mikrozkušavky. Přečišťovací kolonka zakoncentrovala vzorek. Mikrozkušavky se supernatanty v kolonkách byly poté vloženy do centrifugy na 10 minutu při 14 000 g a 4 °C. Poté byly kolonky vloženy do čistých centrifugačních mikrozkušavek obráceně a znovu vloženy do centrifugy na 2 minuty při 1000 g a 4 °C. Supernatant byl přenesen do popsané 0,6ml mikrozkušavky a uložen do ledu.

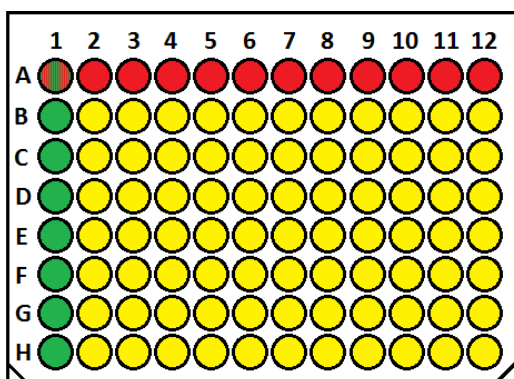
3.2.9 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena metodou podle Bradforda (Bradford, 1976). Pro měření absorbance byl použit mikrodestičkový spektrofotometr. Nejprve byl připraven 1% roztok bovinního sérového albuminu (BSA) pro následné vytvoření kalibrační křivky, kdy do 1 ml extrakčního pufru bylo přidáno 10 mg BSA. Do sedmi v ledu uložených 0,6ml mikrozkuvek byl připraven roztok společně s extrakčním pufrům podle tabulky 1.

Tab. 1 Příprava roztoku albuminu (BSA) se zvyšující se koncentrací.

Obsah proteinu (μg)	Blank (0 μg)	0,5 μg	1 μg	1,5 μg	2 μg	2,5 μg	3 μg
Roztok BSA (μl)	0	5	10	15	20	25	30
Extrakční pufr (μl)	100	95	90	85	80	75	70

Pro měření byla využita čistá destička s 96 jamkami. Všechny jamky, ve kterých bylo provedeno měření, byly nejprve naplněny pipetou 239 μl MiliQ vodou, poté byl do jamek pipetou přenesen 1 μl vzorku nebo roztoku BSA. Nakonec bylo přidáno 60 μl činidla Protein Assay Reagent Concentrate 5x, které obsahuje Coomassie Brilliant Blue G-250. Vzorky byly nanášeny vždy minimálně ve třech opakováních (Obr. 8). Nakonec byly všechny jamky důkladně promíchány pipetou se sterilní špičkou a ponechány při pokojové teplotě 10 minut reagovat. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 595 nm za pomoci softwaru i-control 2.0TM. Koncentrace proteinů byla vypočítána z rovnice lineární regrese kalibrační křivky.



Obr. 8 Mikrotitrační destička pro měření koncentrace proteinů. Jamky 1-12 A (červené) byly použity pro napipetování 1 μl roztoku BSA ve vzrůstající koncentraci, jamky 1 A-H (zelené) byly použity jako blank (1 μl extrakčního pufru), žluté jamky byly použity k nanesení vzorků.

3.2.10 Příprava vzorků pro nanesení na gel

Ze zjištěné koncentrace proteinů v extraktech bylo ze vzorků odebráno dané množství extraktu a k němu přidáno dané množství čistého extrakčního pufru, aby byla koncentrace ve všech vzorcích stejná. K těmto vzorkům byl v digestoři přidán nanášecí pufr v poměru 3:1. Nanášecí pufr byl připraven smícháním 4x Laemmlli pufru a 2-merkptoethanolu v poměru 4:1. Vzniklá směs byla promíchána na vortexu a vložena do termoboxu v digestoři na 95 °C po dobu 7 minut. Poté byly vzorky aplikovány na již připravený gel.

3.2.11 Výroba polyakrylamidových gelů

Před samotnou výrobou polyakrylamidových gelů byly jednotlivé skla očištěna 70% ethanolem a sestaveny do aparatury. Mezi skla v aparatuře byla stříčkou nanесena vrstva destilované vody až po okraj skla. Hladina vody byla pozorována po dobu 5 minut, pro kontrolu těsnění aparatury. Následně byla voda odlita a prostor mezi skly vysušen plynným dusíkem. Nejdříve byl v digestoři vytvořen dělicí gel smícháním 40% roztoku akrylamidu/bis (37,5:1), 1,5M Tris pufru, SDS a MiliQ vody v kyvetě (Tab. 2). Poté byl do směsi přidán TEMED a nakonec APS, protože zahajují polymeraci gelu. Mírným vířením byl obsah kyvety promíchán tak, aby nedocházelo inkorporaci vzduchu do směsi roztoku, protože gel polymerizuje v anaerobním prostředí. Roztok byl nanесen Pasteurovou pipetou mezi skla, přibližně 0,5 – 1 cm pod spodní část zubů hřebenu. Dělicí gel byl následně převrstven isopropanolem, pro ustálení vodorovné hladiny a vytvoření anaerobního prostředí k zajištění správné polymerizace. Gel byl ponechán polymerizovat 45 minut. Poté byl odstraněn všechn isopropanol a prostor důkladně promyt destilovanou vodou. Podle protokolu byl vytvořen a nanесen zaostřovací gel, do kterého byl vložen plastový hřeben. Zaostřovací gel byl ponechán polymerizovat 30 minut.

Tab. 2 Příprava 10% polyakrylamidového gelu.

Separační gel (5 ml)		Zaostřovací gel (2 ml)	
12%	objem [ml]	4%	objem [ml]
40% roztok akrylamid/bis (37,5:1)	1,250	40% roztok akrylamid/bis (37,5:1)	0,200
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,250	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,504
10% SDS	0,050	10% SDS	0,020
MiliQ	2,425	MiliQ	1,272
TEMED	0,0025	TEMED	0,002
APS 10%	0,025	APS 10%	0,010

3.2.12 Výroba Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů

Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gely byly připravovány především pro kontrolu nanesení stejného množství proteinů. Aparatura pro výrobu gelů byla připravena stejně jako v kapitole 3.2.10. Následně byly připraveny roztoky pro dělicí i zaostřovací gel (Tab. 3). Mírným vířením byl obsah kyvety promíchán. Roztok byl nanesen Pasteurovou pipetou mezi skla, přibližně 0,5 – 1 cm pod spodní část zubů hřebenu. Bezprostředně po nanesení roztoku pro dělicí gel byl nanesen i roztok pro zaostřovací gel. Oba gely se od sebe, na základě rozdílné hustoty, separovaly a celý gel byl ponechán polymerizovat přibližně 30 minut.

Tab. 3 Příprava 10% Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů.

Separační gel (6 ml)		Zaostřovací gel (2 ml)	
12%	objem [ml]	4%	objem [ml]
Roztok dělicího gelu A	3	Roztok zaostřovacího gelu A	1
Roztok dělicího gelu B	3	Roztok zaostřovacího gelu B	1
TEMED	0,003	TEMED	0,002
APS 10%	0,03	APS 10%	0,01

3.2.13 Gelová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného

Před samotnou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného byla připravena vana pro elektroforetickou aparaturu s vloženým gelem. Dále byla aparatura naplněna po okraj připraveným running pufrem, kterým byla naplněna i vana. Z

gelu byl opatrně vytažen hřeben a jamky byly naplněny puřrem. Do první jamky gelu bylo napipetováno 5 μ l proteinového standardu. Do ostatních jamek bylo napipetováno 20 μ l vzorku. Po nanesení všech vzorků byla aparatura připojena ke zdroji elektrického proudu na 100 V na 10 minut, a poté na 180 V přibližně na 60 minut, v závislosti na molekulové hmotnosti hledaných proteinů. SIMK má molekulovou hmotnost přibližně 46 kDa (Sinha *et al.*, 2011), SIMKK 42 kDa (Kiegerl *et al.*, 2000), MMK3 44 kDa (Bögre *et al.*, 1999) a fúzní protein FABD2-GFP přibližně 68 kDa (Voigt *et al.*, 2004).

3.2.14 Přenos proteinů na membránu

Po dokončení separace proteinů, byly proteiny z polyakrylamidového gelu přeneseny na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Nejprve byla aparatura pro proteinový přenos vložena do prázdné elektroforetické vany. Následně byla vyříznuta membrána o velikosti 9x8,5 cm. Poté byl připraven transfer puřr, zvlářt s methanolem a zvlářt bez methanolu. Gel byl opatrně vložen do transfer puřru bez methanolu, kde se ekvilibroval po dobu minimálně 10 minut. Do transfer puřru s methanolem byly na 10 minut vloženy dvě plastové houby a čtyři silnější filtrační papíry.

Membrána byla aktivována ponořením do 100% methanolu po dobu 30 sekund, a poté ponechána inkubovat 10 minut v čistém transfer puřru s methanolem. Po inkubaci všech komponent byla sestavena celá kazeta, určená pro přenos proteinů, skládající se z plastové kazety, položené černou stranou dolů = negativní pól, zvlhčené plastové houby a dvou zvlhčených silnějších filtračních papírů. Na ně byl položen gel, otočený horní stranou dolů, a na něj membrána. Za pomoci plastového válečku byly odstraněny vzduchové bubliny mezi filtračními papíry a gelem, a mezi gelem a membránou. Na membránu byly položeny dva zvlhčené silnější filtrační papíry a bubliny byly znovu odstraněny plastovým válečkem. Na filtrační papíry byla položena plastová houba a kazeta byla přiklopena druhou průhlednou stranou a zajiřtěna proti otevření.

Kompletní kazeta byla vložena do aparatury, určené pro přenos proteinů, v elektroforetické vaně. K aparatuře byl vložen chladicí box a celá vana byla naplněna transfer puřrem s methanolem. Vana byla uložena do lednice a zapojena do zdroje napětí na 100 V po dobu 10 minut, poté přes noc na 16 V a nakonec na 100 V po dobu 30 minut pro dokončení přenosu. Po přenosu byla membrána položena na čistý filtrační papír a

ponechána zcela uschnout. Následně byla ponořena do 100% methanolu pro lepší fixaci přenesených proteinů na membránu. Nakonec byla membrána barvena 1 minutu v 0,1% roztoku Ponceau S v 5% kyselině octové pro kontrolu přenosu proteinů na membránu a přibližně jednotné koncentrace proteinů. Poté byla membrána promyta a odbarvena třepáním membrány na třepačce ve skleněné nádobě s destilovanou vodou po dobu 10 minut, a následně 3x10 minut v TBS-T pufru. Při použití Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů, byly tyto gely hned po elektroforéze nasnímány v dokumentačním přístroji Bio-Rad ChemiDoc™ MP a programu Image lab pro kontrolu nanesení jednotné koncentrace proteinů.

3.2.15 Blokování nespecifických vazeb a aplikace protilátek

Po promytí byly membrány vloženy do blokovacího roztoku pro zabránění pozdějšímu nespecifickému navázání protilátky. Jako blokovací roztok byl použit roztok 4% BSA a 4% odtučněné mléko (Blotting-Grade Blocker) v 1% TBS-T. Pokud byla jako první protilátka použita fosfospecifická protilátka, byl použit roztok 6% BSA v 1% TBS-T, protože tato protilátka se váže i na kasein, obsažený v mléce. Membrány byly ponechány v lednici v blokovacím roztoku přes noc na třepačce při mírném pohybu třepání. Poté následovalo promývání 2x5 minut v 1% TBS-T na třepačce při rychlém pohybu třepání. Následovala aplikace primární protilátky a její inkubace na třepačce při pomalém pohybu třepání.

Doba inkubace závisela na použité primární protilátce. Fosfospecifická protilátka byla ředěna 1:1000 v 5% BSA v 1% TBS-T a inkubovala se v chladničce při 4°C přes noc. Protilátka proti MMK3 byla ředěna 1:5000 v 3% odtučněném mléku (Blotting-Grade Blocker) v 1% TBS-T a inkubovala se v chladničce při 4°C přes noc. Protilátka proti MPK6 byla ředěna 1:15000 v 1% BSA v 1% TBS-T a inkubovala se 2 hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka proti GFP byla ředěna 1:1000 v 1% BSA v 1% TBS-T a inkubovala se 1 hodinu při laboratorní teplotě. Protilátka proti aktinu byla ředěna 1:5000 v 1% BSA v 1% TBS-T a inkubovala se 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly membrány promyty 6x10 minut v 1% TBS-T na třepačce při rychlém pohybu třepání. Následně byla na membrány aplikována sekundární protilátka, konjugovaná s křenovou peroxidasou, při pomalém pohybu třepání. Sekundární protilátka byla ředěna 1:5000 v

1% BSA v 1% TBS-T 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Nakonec byly membrány promyty 6x10 minut v 1% TBS-T na třepačce při pomalém pohybu třepání.

3.2.16 Detekce proteinů

Detekce protilátek, navázaných na proteiny zájmu, byla provedena inkubací membrán s vyvolávacím roztokem. Elektro-chemiluminiscenční činidlo (ECL) bylo připraveno, podle pokynů výrobce, smícháním roztoku luminolu s roztokem peroxidu vodíku. Ihned po smíchání obou roztoků byl výsledný roztok uchováván ve tmě, protože je velmi citlivý na UV záření a byl připravován vždy čerstvý a bezprostředně před detekcí. Membrána byla položena na prázdnou čtverhrannou Petriho misku a ECL roztok byl nanesen Pasteurovou pipetou na celý povrch membrány, která byla vložena na třepačku při rychlém pohybu třepání po dobu dvou minut. Poté byla membrána z misky vyjmuta a položena na povrch skleněné desky do dokumentačního přístroje Bio-Rad ChemiDoc™ MP pro následné snímání.

3.2.17 Odstranění navázaných protilátek z membrán

Pokud bylo potřeba použít membrány pro detekci jiných proteinů, navázáním jiných primárních protilátek, bylo nutné rozrušit vazbu předešlých protilátek. Membrány byly mezitím uchovávány v lednici při 4 °C v 1% TBS-T pufru. Vazby mezi proteiny a protilátkami byly odstraněny promýváním membrán v 0,5M NaOH 3x10 minut, dále promýváním membrány v MiliQ vodě 2x10 minut, a nakonec promýváním v 1% TBS-T 3x15 minut. Nakonec byly membrány uloženy do lednice v čistém 1% TBS-T nebo byly membrány vloženy do blokovacího roztoku pro opakovanou imunodetekci s dalšími protilátkami.

3.2.18 Vyhodnocování imunoblotové analýzy

Ke snímání membrán byl použit dokumentační přístroj Bio-Rad ChemiDoc™ MP. Poloha a intenzita pásů byla vyhodnocována v programu Image lab.

3.2.19 Izolace RNA a gDNA fenolovou extrakcí

Pro izolaci RNA bylo vytvořeno 5 sad mikrozkuvek o rozdílném obsahu. Odebraný homogenizovaný zmražený materiál byl vložen do první sady mikrozkuvek

s 500 μ l RNA extrakčního pufru a 500 μ l fenolu. Směs v první sadě mikrozkuavek byla řádně promíchána pomocí vortexu, a poté centrifugována 10 minut při 13 000 g a laboratorní teplotě. Následně byl supernatant přenesen do druhé sady mikrozkuavek s 500 μ l směsi fenol – chloroform - isoamylalkohol. Druhá sada mikrozkuavek byla protřepána a centrifugována 8 minut při 13 000 g a laboratorní teplotě. Supernatant z druhé sady mikrozkuavek byl přenesen do třetí sady mikrozkuavek s 500 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol (24:1).

Směs ve třetí sadě mikrozkuavek byla opět protřepána a centrifugována 6 minut při 13000 g a laboratorní teplotě. Čtvrtá sada obsahovala, stejně jako třetí sada, směs 500 μ l chloroform : isoamylalkohol (24:1). Po přenesení supernatantu do čtvrté sady a protřepáním se směs centrifugovala 4 minuty při 13 000 g a pokojové teplotě. Třetí a čtvrtá sada se směsí chloroform : isoamylalkohol (24:1) slouží k odstranění zbylého fenolu. Pátá sada mikrozkuavek obsahovala směs 1 ml absolutního ethanolu a 48 μ l 3M roztoku octanu sodného (pH 4,8). Mikrozkuavky se směsí byly předem vychlazené v mrazáku na -89 °C. Po přenesení supernatantu do směsi v páté sadě mikrozkuavek, byly mikrozkuavky vloženy do mrazáku na -89 °C přes noc pro precipitaci.

3.2.20 Aplikace DNasy

Druhý den byly vzorky vytaženy z mrazáku a centrifugovány 40 minut při 13 000 g a 4 °C. Většina supernatantu byla odlita do odpadu, zbylý supernatant byl odebrán pipetou s tenkou špičkou. Mikrozkuavka se sedimentem byla ponechána 40 minut na ledu pro odpaření zbylého ethanolu. Poté bylo do mikrozkuavek přidáno 20 μ l H₂O. Směs byla řádně protřepána na vortexu a ponechána v klidu 30 minut při 4 °C. Ze směsi bylo odebráno 10 μ l do nových sterilních mikrozkuavek pro následnou aplikaci DNasy. Koncentrace nukleových kyselin byla měřena pomocí přístroje nanodrop. Poté byla provedena gelová elektroforéza pro kontrolu přítomnosti nukleových kyselin na 1% agarosovém gelu. Nejdříve byla na parafilm nanесena směs 4 μ l H₂O, 1 μ l barviva 6x LD a 1 μ l vzorku. Směs byla promíchána pipetou a nanесena do jamky gelu. Zdroj elektroforetické aparatury byl zapojen na 120 V po dobu 40 minut. Snímání gelu probíhalo vždy po 20 minutách. Následně bylo k 10 μ l vzorku přidáno podle protokolu 90 μ l štěpící směsi s DNasou. Směs byla promíchána pipetou, a poté vložena do inkubátoru

na 37 °C po dobu 2 hodin. Po štěpení byla provedena gelová elektroforéza pro kontrolu účinnosti štěpení. K 10 µl vzorku na parafilmu byly přidány 2 µl barviva 6x LD. Zdroj elektroforetické aparatury byl zapojen na 120 V po dobu 40 minut.

3.2.21 Izolace RNA fenolovou extrakcí

Pro fenolovou extrakci bylo znovu vytvořeno 5 sad v mikrozkuvkách o rozdílném obsahu. Ke vzorkům bylo přidáno 400 µl H₂O a 500 µl fenolu. Směs v první sadě mikrozkuvek byla řádně protřepána, a poté centrifugována 10 minut při 13 000 g a laboratorní teplotě. Následně byl supernatant přenesen do druhé sady mikrozkuvek s 500 µl směsi fenol – chloroform - isoamylalkohol. Druhá sada mikrozkuvek byla protřepána a centrifugována 8 minut při 13 000 g a laboratorní teplotě. Supernatant z druhé sady mikrozkuvek byl přenesen do třetí sady mikrozkuvek s 500 µl směsi chloroform : isoamylalkohol (24:1).

Směs ve třetí sadě mikrozkuvek byla opět protřepána a centrifugována 6 minut při 13 000 g a laboratorní teplotě. Čtvrtá sada obsahovala, stejně jako třetí sada, směs 500 µl chloroform : isoamylalkohol (24:1). Po přenesení supernatantu do čtvrté sady a protřepáním se směs centrifugovala 4 minuty při 13 000 g a pokojové teplotě. Třetí a čtvrtá sada se směsí chloroform : isoamylalkohol (24:1) slouží k odstranění zbylého fenolu. Pátá sada mikrozkuvek obsahovala směs 1 ml absolutního ethanolu a 48 µl 3M roztoku octanu sodného (pH 4,8). Mikrozkuvky se směsí byly předem vychlazené v mrazáku na -89 °C. Po přenesení supernatantu do směsi v páté sadě mikrozkuvek byly mikrozkuvky vloženy do mrazáku na -89 °C přes noc pro precipitaci RNA.

3.2.22 Reverzní transkripce

Druhý den byla směs centrifugována 40 minut při 13 000 g a 4 °C. Většina supernatantu byla odlita do odpadu. Zbylý supernatant byl odebrán pipetou s tenkou špičkou. Mikrozkuvka se sedimentem byla ponechána 40 minut na ledu pro odpaření zbylého ethanolu. Poté bylo do mikrozkuvek přidáno 20 µl H₂O. Směs byla řádně protřepána na vortexu a ponechána v klidu 30 minut při 4 °C. Ze směsi bylo odebráno 10 µl do nových sterilních mikrozkuvek. Koncentrace RNA byla měřena pomocí přístroje nanodrop. Poté byla provedena gelová elektroforéza pro kontrolu přítomnosti RNA a absence gDNA

na 1% agarosovém gelu. Nejdříve byla na parafilm nanášena směs 4 μl H_2O , 1 μl barviva 6x LD a 1 μl vzorku. Směs byla promíchána pipetou a nanášena do jamky gelu. Zdroj elektroforetické aparatury byl zapojen na 120 V po dobu 40 minut.

Následně byl proveden přepis RNA do komplementární DNA reverzní transkripcí. Nejprve bylo nutné ze všech vzorků vytvořit směs obsahující vzorek a H_2O do objemu 11 μl , aby koncentrace RNA byla $700 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Dále byla vytvořena směs 2 μl 10mM dNTP a 1 μl 100 μM oligodT¹. Směs byla vložena do termocykleru na 65 °C po dobu 5 minut pro navázání primerů. Poté byla směs ponechána přibližně 1 minutu na ledu. Následně byla ke směsi přidána další směs, obsahující 1 μl reverzní transkriptasy, 1 μl RNAsinu a 4 μl M-MLV 5x pufu². Směs byla vložena do termocykleru na 42 °C po dobu 50 minut pro DNA polymerizaci.

Pro inaktivaci reverzní transkriptasy byla směs ponechána v termocykleru na 70 °C po dobu 15 minut. Poté bylo k 20 μl vzorku cDNA přidáno 60 μl H_2O a směs byla řádně promíchána na vortexu. Do čistých mikrozkušavek bylo rozpipetováno 49 μl PCR mixu s danými primery (pro *SIMK* nebo *SIMKK* a *ACTIN* – jako referenční gen) a následně byl přidán 1 μl vzorku. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru nastaveného na první denaturaci 3 minuty při 95 °C, následně 40 cyklů sestávajících se z denaturace při 95 °C po dobu 30 sekund, navázání primerů při 60 °C po dobu 30 sekund a polymerizace řetězce při 72 °C po dobu 1 minuty. Syntéza byla zakončena nastavením termocykleru na 72 °C po dobu 15 minut pro inaktivaci enzymu.

¹ Vynásobeno počtem vzorků.

² Vynásobeno počtem vzorků.

3.2.23 Primer Efficiency

Po PCR byla provedena gelová elektroforéza. K 10 μl vzorku na parafilmu byly přidány 2 μl barviva 6x LD a výsledná směs byla promíchána pipetou. Zdroj elektroforetické aparatury byl zapojen na 120 V po dobu 40 minut. Poté byl proveden test efektivity navázání primerů. Nejprve bylo nutné z cDNA kontrolního vzorku vytvořit ředící sadu podle vzoru:

1x (10 μl cDNA + 490 μl H₂O)

2x (250 μl 1x + 250 μl H₂O)

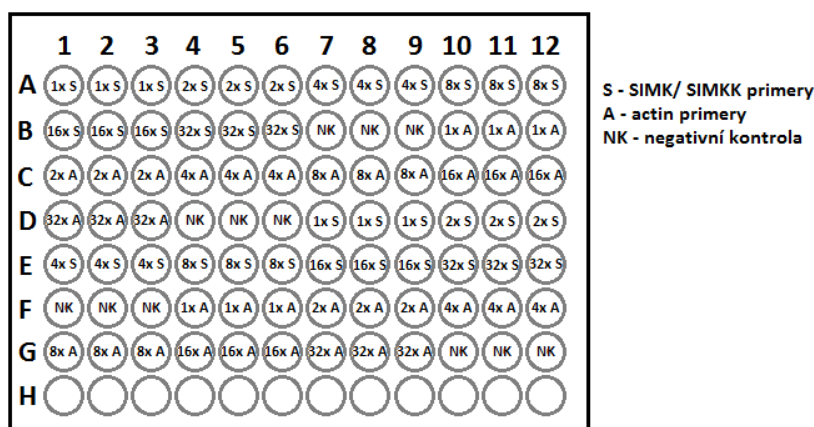
4x (250 μl 2x + 250 μl H₂O)

8x (250 μl 4x + 250 μl H₂O)

16x (250 μl 8x + 250 μl H₂O)

32x (250 μl 16x + 250 μl H₂O)

Jednotlivé sady byly naneseny na 96 jamkovou PCR destičku (minimálně ve třech opakováních (Obr. 9). Následně byly podle protokolu vytvořeny mixy s primery. Mix byl vždy napipetován na dno jamky destičky a na okraj jamek bylo napipetováno 2,5 μl cDNA (jako negativní kontrola byla použita H₂O). Poté byla destička překryta folií a vložena na 3 sekundy do centrifugy. Následně byla destička vložena do kvantitativního termocykleru StepOnePlus™ Real Time PCR System od Applied Biosystems™.



Obr. 9 Schéma rozložení vzorků v PCR destičce (96 jamek).

3.2.24 Kvantitativní PCR

Po pozitivní kontrole efektivit primérů byla cDNA 50x naředěna. Následně byly podle protokolu vytvořeny mixy s primery (pro *SIMK* nebo *SIMKK*, a pro *ACTIN* jako referenční gen). Mixy byly vždy napipetovány na dno jamky destičky. Na okraj jamek bylo napipetováno 2,5 μ l cDNA, vždy ve třech opakováních (jako negativní kontrola byla použita H₂O). Destička byla překryta folií a vložena na 3 sekundy do centrifugy pro PCR destičky. Následně byla destička vložena do kvantitativního termocykleru StepOnePlus™ Real Time PCR System od Applied Biosystems™, celkově ve třech opakováních.

3.2.25 Statistické vyhodnocení

Vyhodnocení výsledků relativní genové exprese bylo provedeno pomocí software StepOne v2.3 metodou $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$. Naměřené výsledky byly vztaženy k příslušným hodnotám referenčního genu (*ACTIN*). Výsledné hodnoty relativní exprese mRNA byly následně vloženy do grafu, ve kterém byly porovnávány výsledky pro jednotlivé rostliny s relativní odchylkou.

3.2.26 Příprava kultury *Sinorhizobium meliloti*

Ze zmrzlého glycerolového roztoku s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, kmen Sm2011, bylo odebráno sterilní špičkou 30 μ l kultury a přeneseno i se špičkou do 10 ml LB média v 50ml kyvetě. Sterilní LB médium bylo použito jako blank. Suspenze byla ponechána v inkubátoru ve tmě, přibližně 48 hodin při 180 otáčkách za minutu a teplotě 28 °C, do dosažení optické hustoty při 600 nm (OD₆₀₀) mezi 0,8 – 1,5. Optická hustota při 600 nm byla kontrolována na spektrofotometru.

Poté byly buňky separovány od média centrifugací při 3000 g po dobu 5 minut, při laboratorní teplotě a supernatant byl odlit do odpadu. Bakteriální buňky byly resuspendovány v čistém Fährerově médiu s přidavkem dusíku pro dosažení optické hustoty OD₆₀₀ = 0,5.

3.2.27 Mikroskopická analýza struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu

Na podložní skla bylo napipetováno 30 μ l tekutého ½ MS média. Do média na podložní sklo byl položen list (abaxiální stranou nahoru). List byl překryt krycím sklíčkem a mezi

skla bylo přidáno tekuté ½ MS médium, případně odebráno nadbytečné médium. Pro mikroskopování byly použity listy kontrolních rostlin *M. sativa* Regen-SY, *M. sativa* linie *FABD2-GFP* a transgenní linie *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (rostlina 18). Snímky mikroskopických preparátů byly pořízeny pomocí laserového mikroskopu s rotujícím diskem.

3.2.28 Aplikace *Sinorhizobium meliloti*

Kultura *Sinorhizobium meliloti* byla aplikována na kořenový systém 14 dní starých kontrolních rostlin *Medicago sativa* kultivaru Regen-SY a rostlin *Medicago sativa SIMK RNAi* (rostlina 5), rozmnožených procesem somatické embryogeneze. Na Petriho miskách s Fähreovým médiem bez obsahu dusíku se nacházely vždy tři rostliny, na jejichž kořeny byla pipetou nanесena kultura (5 ml) v tekutém Fähreově médiu bez obsahu dusíku o optické hustotě při 600 nm (OD₆₀₀) 0,5. Petriho misky byly vloženy na třepačku a po dobu inkubace ponechány při mírné rychlosti třepání.

Pro test aktivace mitogenem aktivovaných proteinkinas byly provedeny odběry kořenů, které byly v kontaktu s kulturou, před aplikací (suchá kontrola), 20 minut po aplikaci a 60 minut po aplikaci kultury. Jako mokrá kontrola bylo použito čisté tekuté Fähreovo médium bez obsahu dusíku.

3.2.29 Měření délky kořenových vlásků *Medicago sativa SIMK RNAi*

Pro měření délky kořenových vlásků bylo vybráno 15 kontrolních rostlin *Medicago sativa* kultivaru Regen-SY a 15 transgenních rostlin *Medicago sativa SIMK RNAi* (somatickou embryogenezi rozmnožená rostlina 5) starých 14 dní. Kořenové vlásky byly snímány pomocí zoomovacího stereomikroskopu. Pro měření byly vybírány zdravé kořenové vlásky, které už dosáhly svojí konečnou délku u takových kořenů, které rostly na povrchu média. Délka kořenových vlásků byla měřena v programu ImageJ.

4. VÝSLEDKY

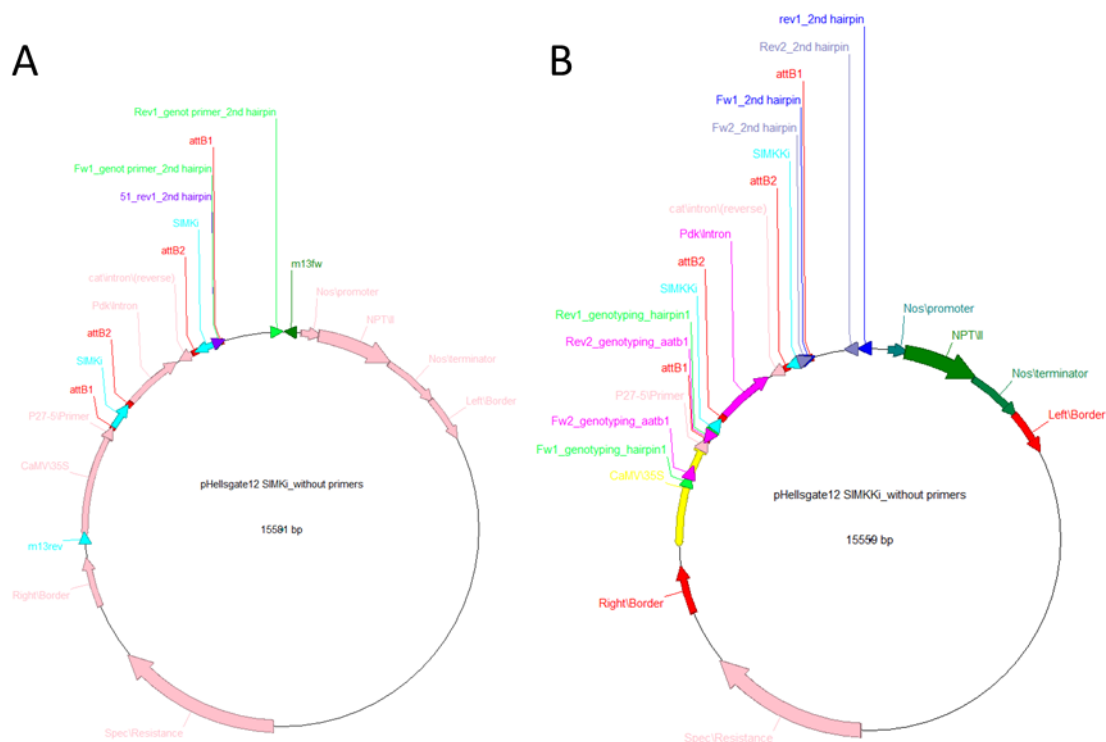
Výsledky dosažené v průběhu experimentální části této diplomové práce jsou uvedeny v této kapitole a jsou rozděleny do dvou hlavních částí. První část představuje kultivaci *Agrobacterium tumefaciens* pro cílenou transformaci listových explantátů rostlin tolice vojtěšky (*Medicago sativa*) s cílem získání a regenerace stabilních transgenních linií se sníženou expresí mitogenem-aktivovaných proteinkinás (MAPK), kvalitativní a kvantitativní determinaci změn v úrovni exprese a produkce proteinů vybraných MAPK v transgenních rostlinách, a pro selekci transgenních rostlin s nejnižší expresí vybraných MAPK.

V druhé části byla vybraná linie *Medicago sativa SIMK RNAi* s nejnižší produkcí proteinu SIMK, která byla rozmnožena procesem somatické embryogeneze. Dále byla provedena částečná charakteristika fenotypových změn rostlin transgenních linií *SIMK RNAi* se sníženou expresí a produkcí proteinu SIMK, měřením délky kořenových vlásků a aplikací symbiotických půdních bakterií *Sinorhizobium meliloti*. Následně proběhla mikroskopická analýza vybrané linie *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* s nejnižší expresí a produkcí proteinu SIMKK.

4.1 Transformace listových explantátů tolice vojtěšky (*Medicago sativa*) kokultivací s *Agrobacterium tumefaciens*

4.1.1 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens*

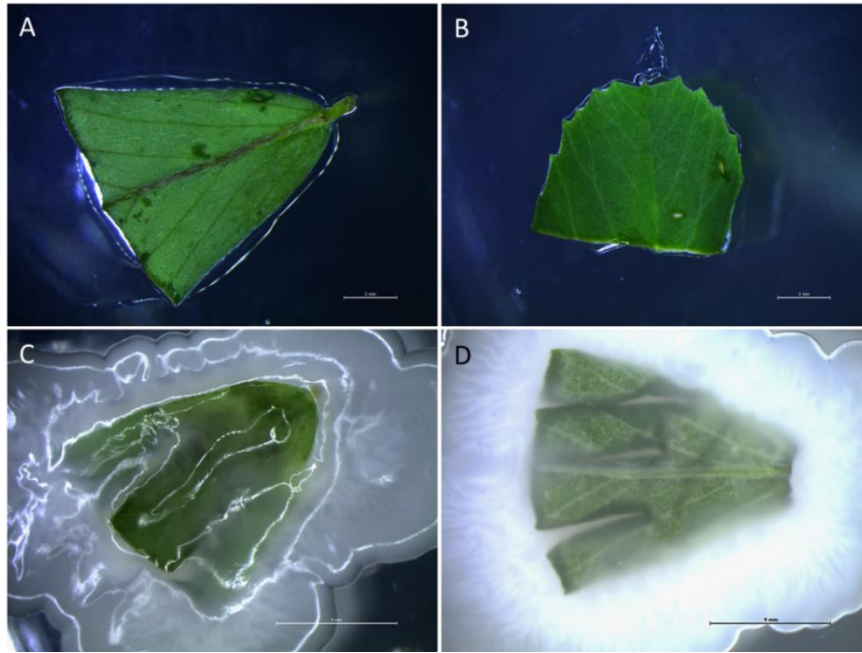
Bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101 s vektory pHellsgate12 SIMKi (Obr. 10A), nebo pHellsgate12 SIMKKi (Obr. 10B), určené pro cílenou transformaci vojtěšky, byly odebrány ze zmrzlého glycerolového roztoku a přeneseny do LB média se selekčními antibiotiky (spectinomycin – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, rifampicin - 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v 50ml kyvetě. Suspenze byla ponechána v inkubátoru ve tmě, přibližně 24 hodin při 180 otáčkách za minutu a teplotě 28 °C, do dosažení optické hustoty (OD_{600}) mezi 0,8 – 1,5. Po separování buněk bakterií od média centrifugací, byl supernatant odlit do odpadu a bakteriální buňky byly resuspendovány v čistém LB médiu pro dosažení optické hustoty $\text{OD}_{600} = 0,7$.



Obr. 10 Vektorové mapy pHellsgate12 SIMKi (A) a pHellsgate12 SIMKKi (B) *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101.

4.1.2 Transformace listových explantátů tolce vojtěšky (*Medicago sativa*)

Předem vysterilizované listové segmenty *M. sativa* Regen-SY nebo stabilní expresní linie *FABD2-GFP* byly inokulovány kulturou *Agrobacterium tumefaciens* s příslušnými vektory, promíchány a ponechány půl hodiny v klidu ve tmě. Poté byly explantáty přeneseny na Petriho misky s B5H médiem (Obr. 11A, B). Petriho misky byly přeneseny do fytotronu a překryty filtračním papírem pro snížení intenzity světla. Explantáty s bakteriemi byly kokultivovány při 24 °C, fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a při intenzitě světla přibližně $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sedm dní po inokulaci (Obr. 11C, D) byly explantáty odděleny od bakteriální kultury a promyty sterilní destilovanou vodou. Proces kokultivace byl dokumentován pomocí binokulárního fluorescenčního stereomikroskopu.



Obr. 11 Transformace listových explantátů *M. sativa*. Explantáty *M. sativa* na B5H médiu 1. den kokultivace (A, B; měřítko – 2 mm). Explantáty na B5H médiu 7. den kokultivace (C, D; měřítko – 5 mm).

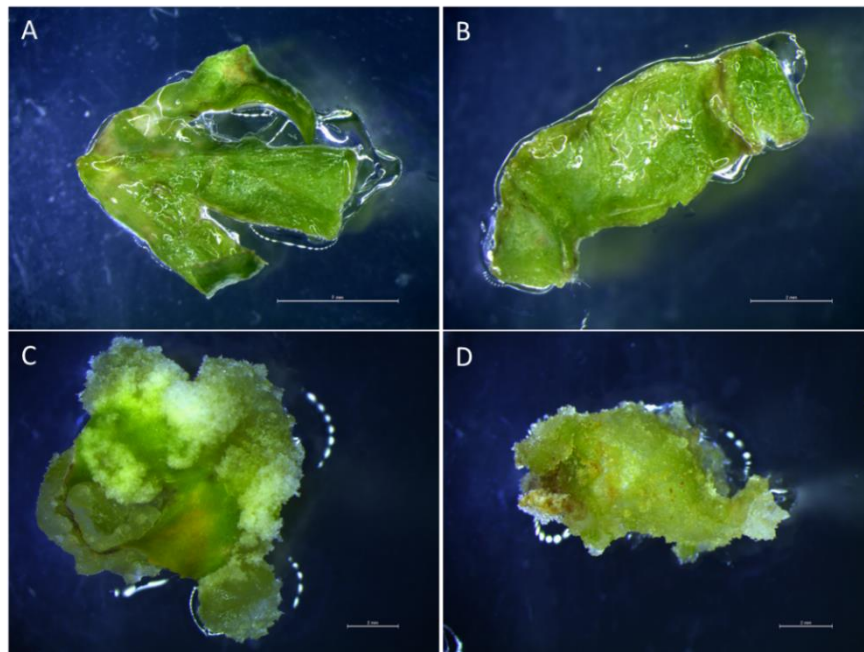
4.1.3. Regenerace rostlin somatickou embryogenezí

Promyté listové explantáty byly zbaveny přebytečné vody a přeneseny na sterilní B5H médium se selekčními antibiotiky (Obr. 12A, B; ticarcilin - $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kanamycin - $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). B5H médium s obsahem rostlinných hormonů auxinu a cytokininu indukovalo kalogenezi somatických buněk explantátů (Obr. 12C, D, 13 a 14). Po třech týdnech byly vyvinuté kalusy přeneseny na B50 médium se selekčními antibiotiky, ale bez obsahu hormonů. Snížená koncentrace hormonů v kalusu indukovala, v průběhu třech týdnů, tvorbu somatických embryí (Obr. 15A, B a 16).

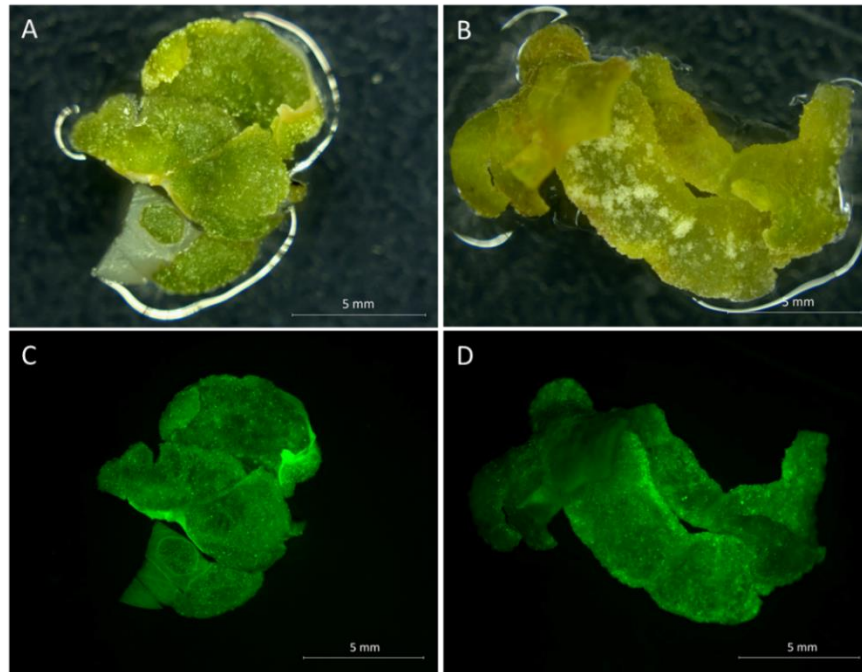
Zelená embrya srdcovitého (Obr. 15 C, D) a torpédovitého stádia (Obr. 17, 18) byla jednotlivě přenesena na MMS médium se selekčními antibiotiky, pro vývin embryí (Obr. 19, 20). Bledě zelená a bílá embrya pocházejí z buněk, které unikly transformačnímu procesu (Obr. 16A, B a 18A, B). V průběhu selekce však nedocházelo k dokončení jejich vývinu. Takto uniklá bílá embrya po transformaci expresní linie *M. sativa FABD2-GFP* vektorem pro SIMKK RNAi zároveň vykazovala velmi silnou expresi fúzního proteinu

FABD2-GFP (Obr. 16E, F a 18E, F) a těchto bílých embryí se v případě této transformace nacházelo nejvíce (Obr. 16A, B a 18A, B).

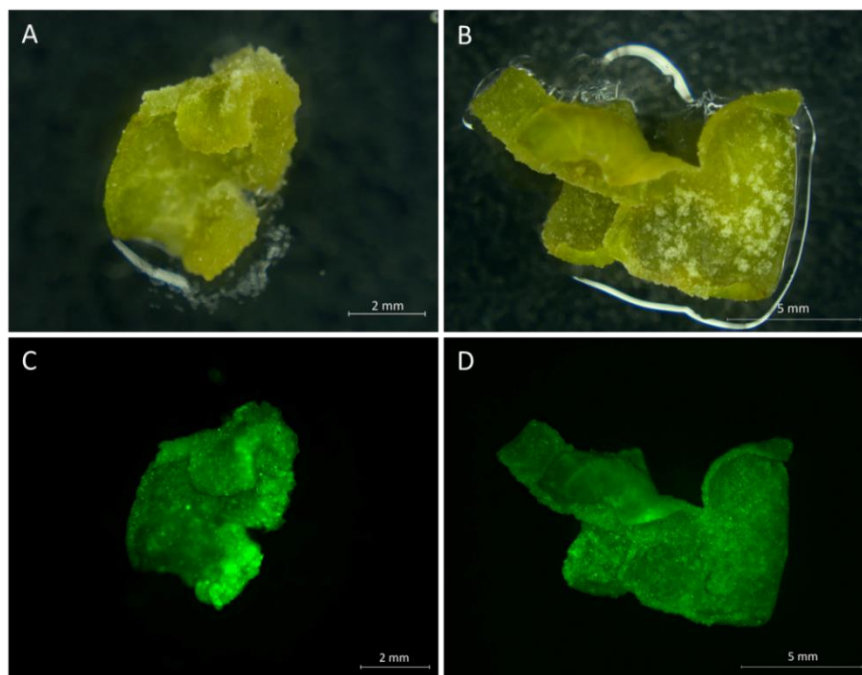
Následně byla klíčící embrya přenesena na MS medium bez selekčních antibiotik pro dokončení vývinu celé rostliny a udržování rostliny *in vitro* (Obr. 21). Vzrostlé rostliny byly následně přesazeny do půdy. Rostliny v půdě byly kultivovány při 21 °C ve dne a 19 °C v noci, fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a intenzitě světla 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Proces regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze byl dokumentován pomocí binokulárního fluorescenčního stereomikroskopu a zoomovacího stereomikroskopu.



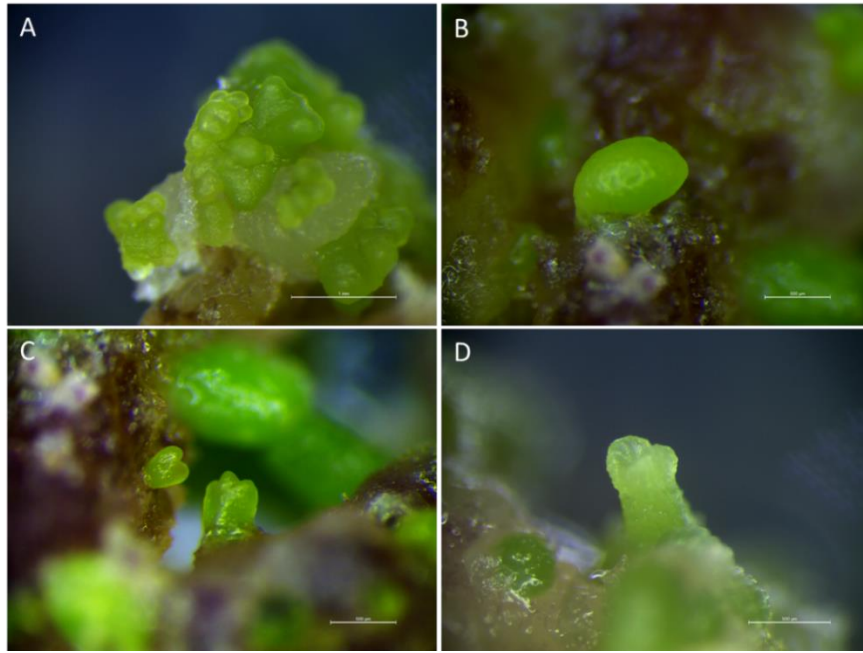
Obr. 12 Počátek somatické embryogeneze listových explantátů *M. sativa SIMK RNAi*. Explantáty na B5H médiu po odmytí kultury *A. tumefaciens* (A, B). Indukce kalusu na B5H médiu po 3 týdnech kultivace (C, D). Měřítko – 2 mm.



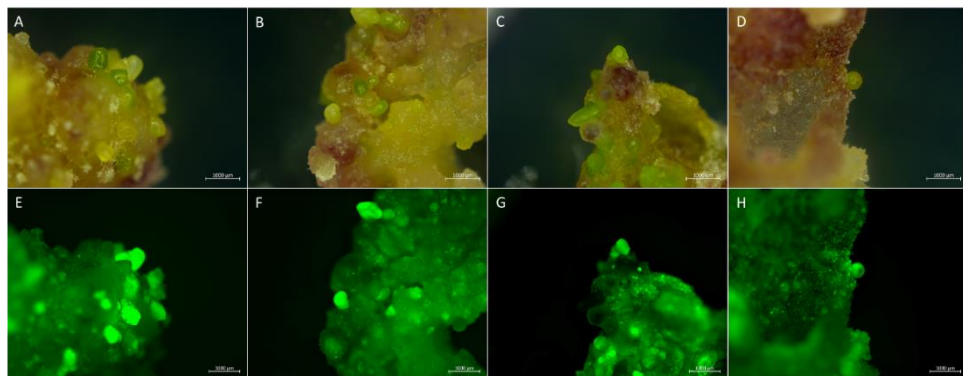
Obr. 13 Produkce kalusu na listech kontrolních rostlin *M. sativa FABD2-GFP* na B5H médiu po 3 týdnech kultivace. A, B – kalusy pod bílým světlem; C, D – kalusy pod modrým světlem (excitace 488 nm). Měřítko – 5 mm.



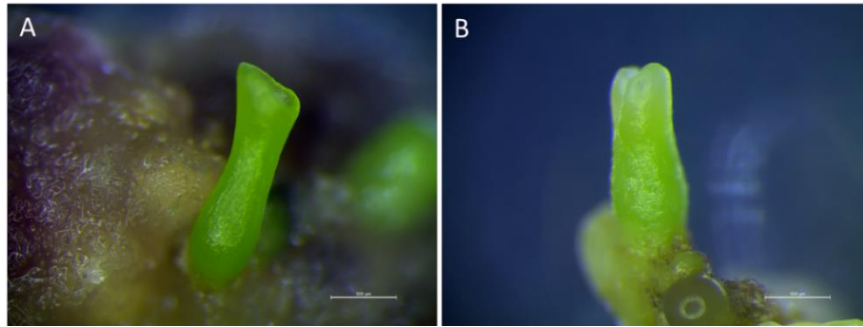
Obr. 14 Produkce kalusu na listech *M. sativa SIMKK RNAi FABD2-GFP* na B5H médiu po 3 týdnech kultivace. A, B – kalusy pod bílým světlem; C, D – kalusy pod modrým světlem (excitace 488 nm). Měřítko – 5 mm.



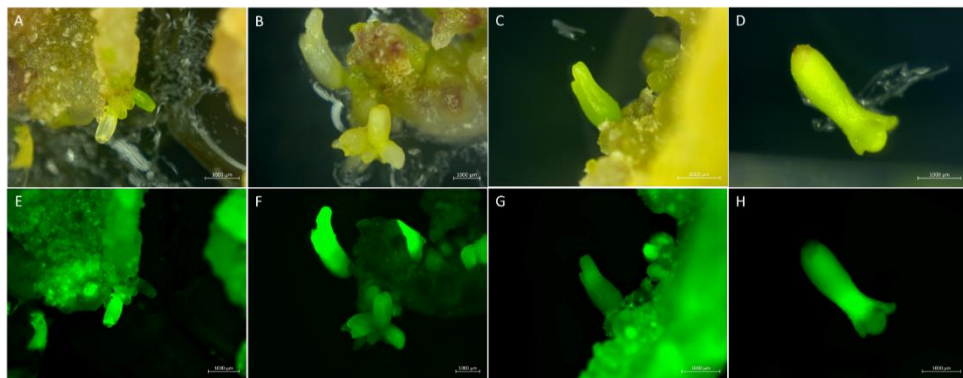
Obr. 15 Tvorba somatických embryí *M. sativa SIMK RNAi* z kalusů na B50 médiu. Globulární (A, B; měřítko – 1 mm u A; měřítko – 500 μm u B) a srdcovitá stadia somatických embryí (C, D; měřítko – 500 μm).



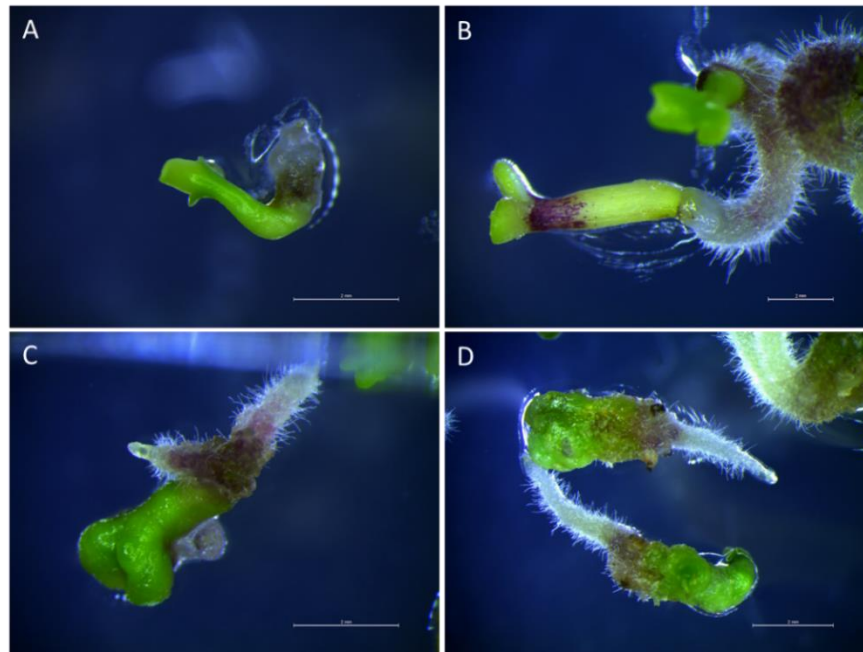
Obr. 16 Embrya v globulárním stadiu na kalusech *M. sativa SIMKK RNAi FABD2-GFP* na B50 médiu. A, B, C, D – kalusy a embrya pod bílým světlem; E, F, G, H – kalusy a embrya pod modrým světlem (excitace 488 nm) Měřítka – 1000 μm .



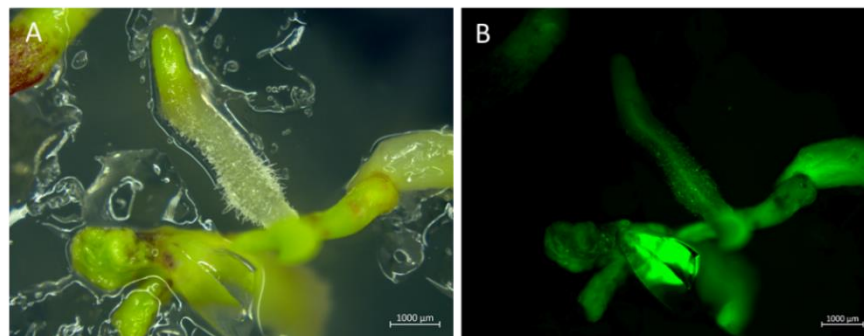
Obr. 17 Vývin torpédovitých stádií u somatických embryí *M. sativa* *SIMK RNAi* z kalusů na B50 médiu (A, B). Měřítko – 500 μ m.



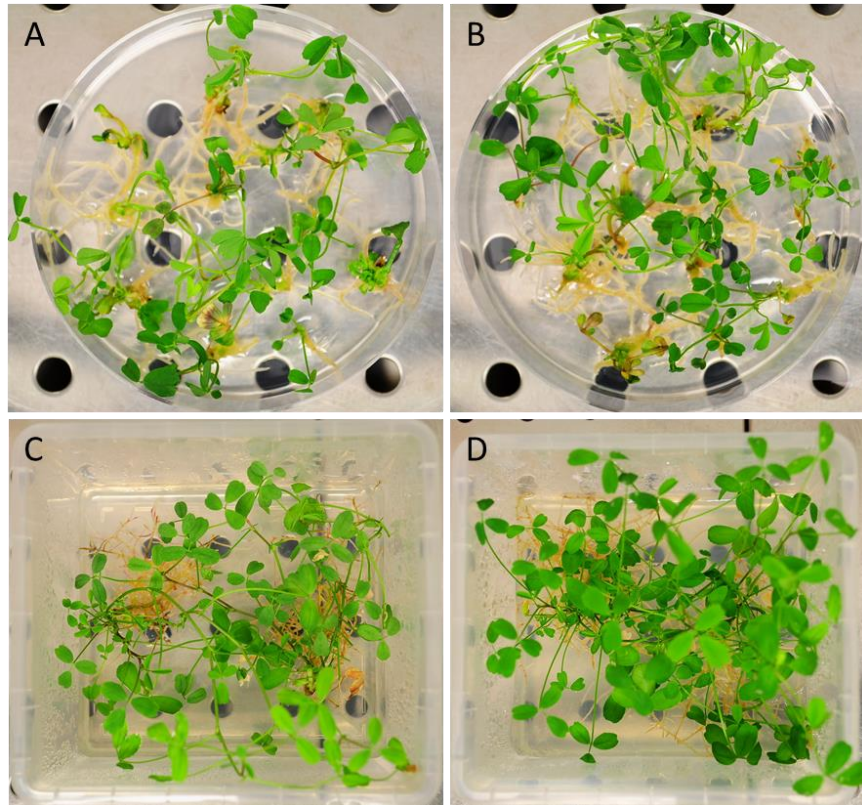
Obr. 18 Somatická embrya v torpédovitém stadiu na kalusech *M. sativa* *SIMKK RNAi* *FABD2-GFP* na B50 médiu. A, B, C, D – kalusy a embrya pod bílým světlem; E, F, G, H – kalusy a embrya pod modrým světlem (excitace 488 nm). Měřítko – 1000 μ m.



Obr. 19 Vývoj kořenů ze somatických embryí *M. sativa* *SIMK RNAi* na MMS médiu. Měřítka – 2 mm.



Obr. 20 Vývoj kořenů ze somatických embryí *M. sativa* *SIMKK RNAi* *FABD2-GFP* na MMS médiu. A - embrya pod bílým světlem; B - embrya pod modrým světlem (excitace 488 nm). Měřítka – 1000 μ m.



Obr. 21 *In vitro* kultivace rostlin *M. sativa* SIMK RNAi na MS médiu v Petriho miskách (A, B) a plastových boxech (C, D).

4.2 Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v úrovni exprese a produkce proteinů vybraných MAPK v transgenních rostlinách

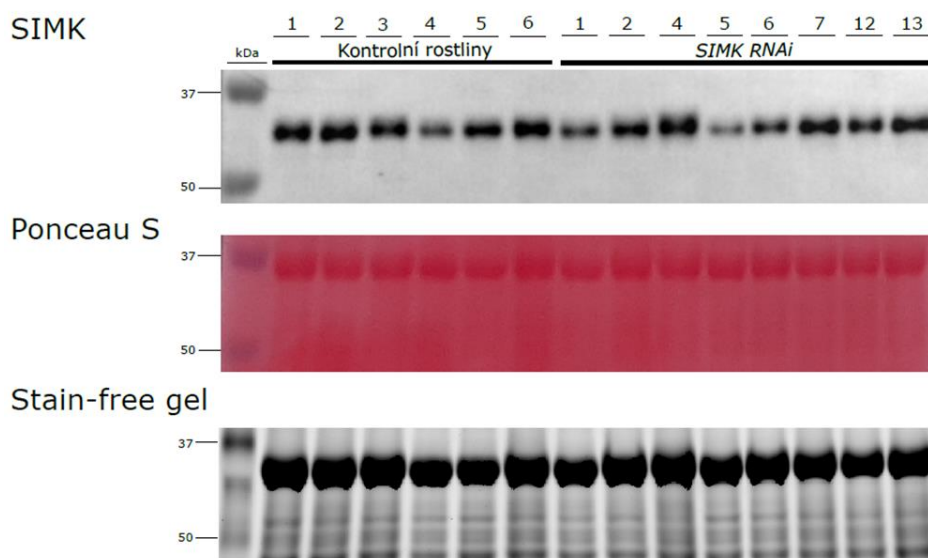
Rostliny *M. sativa* kultivaru Regen-SY, po transformaci *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt pro SIMK RNAi/SIMKK RNAi, které měly dostatek biologického materiálu pro odběr, byly vybrány pro determinaci změn v úrovni exprese genu pro *SIMK/SIMKK* a k detekci relativního množství proteinu SIMK a MMK3, jelikož je tento protein také součástí signalizační kaskády a jehož nadřazeným aktivátorem je SIMKK (Cardinale *et al.*, 2002).

4.2.1 Imunoblotová analýza transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*

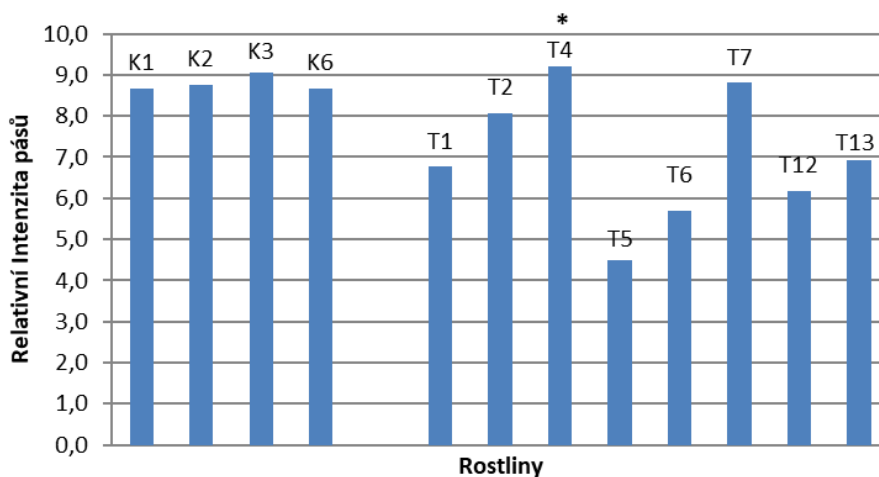
Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v úrovni produkce proteinů SIMK byla provedena imunoblotovou analýzou vzorků listů 17 transgenních rostlin *SIMK RNAi* (rostliny nesly označení 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 18, 27, 29, 30, 31, 33). Jako kontrolní rostliny byly použity rostliny *M. sativa* kultivar Regen-SY, množeny pomocí somatické embryogeneze. Pro kontrolu vlivu somaklonální variability na výsledky imunoblotu bylo na začátku experimentu použito 7 kontrolních rostlin (rostliny nesly označení 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16). Ukázalo se, že kontrolní rostliny *M. sativa* kultivar Regen-SY vykazují minimální vliv somaklonální variability na produkci proteinu SIMK (Obr. 22 a 23). Ze snímků membrán s navázanou protilátkou anti-MPK6, kterou lze použít díky velmi vysoké homologii se SIMK (Bekešová *et al.*, 2015), byl vytvořen graf závislosti relativní intenzity pásů u konkrétní rostliny (Obr. 23). Z výsledků vyplývá, že nejnížší produkci proteinu SIMK vykazovaly transgenní rostliny *SIMK RNAi* (vzestupně): 5, 6, 12, 1, 13, 2 a 7 (Obr. 22 a 23). Avšak u kontrolní rostliny 4 bylo nanášeno menší množství proteinů na gel a u transgenní rostliny 4 bylo nanášeno větší množství proteinů na gel (Obr. 22 – Ponceau S, Stain-free gel).

Proto byla imunoblotová analýza znovu provedena s optimalizovanou koncentrací proteinů se třemi kontrolními rostlinami a transgenními rostlinami 5, 12, 13, 4 a dalšími sedmi transgenními rostlinami *SIMK RNAi*, které nebyly součástí minulé analýzy (11, 18, 27, 29, 30, 31, 33; Obr. 24). Nejnížší produkci proteinu SIMK vykazovaly transgenní rostliny *SIMK RNAi*: 5, 29, 30, 31 a 33 (Obr. 24 a 25). U transgenních rostlin *SIMK RNAi*

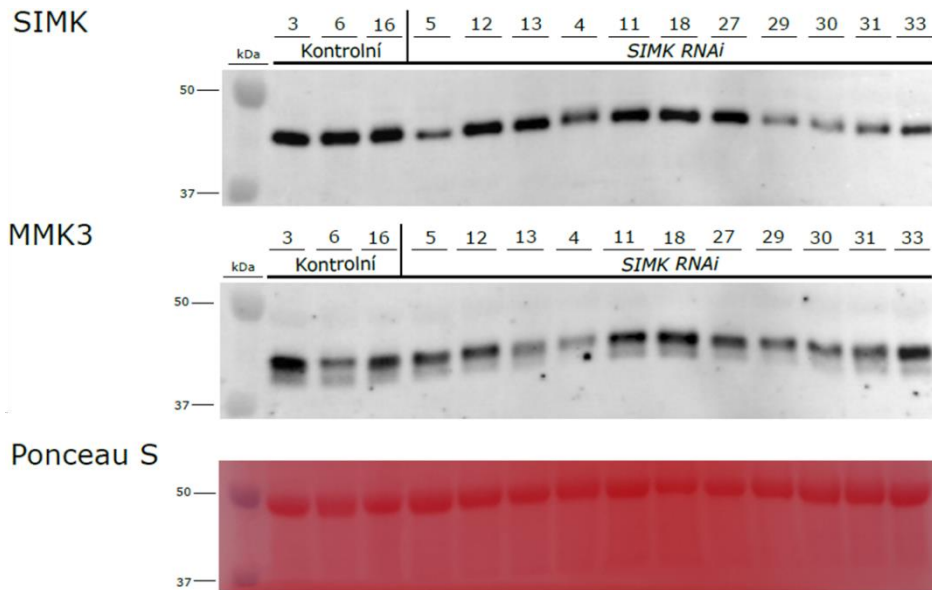
5, 29, 30, 31 a 33 také docházelo k mírnému zvýšení produkce proteinu MMK3 oproti snížené produkci SIMK (Obr. 25).



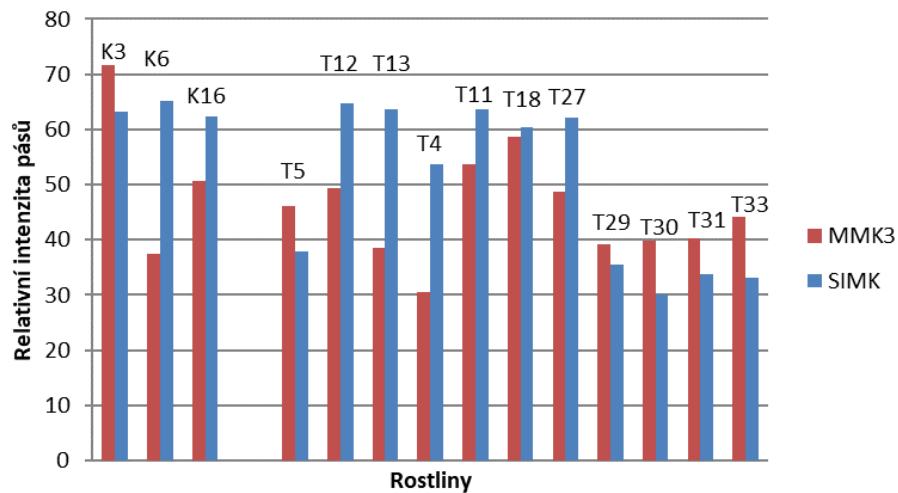
Obr. 22 Detekce produkce proteinu SIMK u vzorků z listů kontrolních (1, 2, 3, 4, 5, 6) a transgenních *SIMK RNAi* (1, 2, 4, 5, 6, 7, 12, 13) rostlin *M. sativa* kultivaru Regen-SY rostoucích *in vitro*. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce proteinu SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenní rostliny 5. Snímek membrány nabarvené Ponceau S a snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



Obr. 23 Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenní rostliny 5. U transgenní rostliny 4 bylo nanášeno větší množství proteinů na gel (hvězdička). K – kontrolní rostliny *Medicago sativa* kultivar Regen-SY; T – transgenní rostliny *M. sativa SIMK RNAi*.



Obr. 24 Detekce produkce proteinu SIMK u vzorků z listů kontrolních (3, 6, 16) a transgenních *SIMK RNAi* (5, 12, 13, 4, 11, 18, 27, 29, 30, 31, 33) rostlin *M. sativa* kultivaru Regen-SY rostoucích *in vitro*. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce proteinu SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenních rostlin 30, 33, 31, 29 a 5. U těchto transgenních rostlin byla zároveň detekovatelná zvýšená produkce proteinu MMK3 oproti proteinu SIMK. Snímek membrány nabarvené Ponceau S a snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



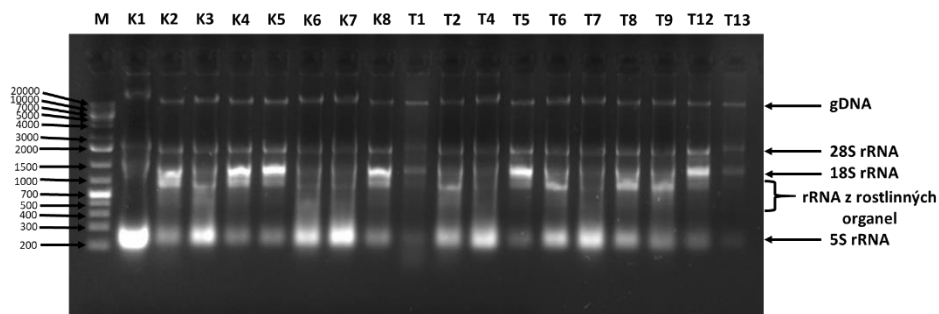
Obr. 25 Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce SIMK (modrá) a MMK3 (červená). K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenních rostlin 30, 33, 31, 29 a 5. U těchto transgenních rostlin byla zároveň detekovatelná zvýšená produkce proteinu MMK3 oproti proteinu SIMK. K – kontrolní rostliny *Medicago sativa* kultivar Regen-SY; T – transgenní rostliny *M. sativa SIMK RNAi*.

4.2.2 Semikvantitativní PCR analýza v reálném čase transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*

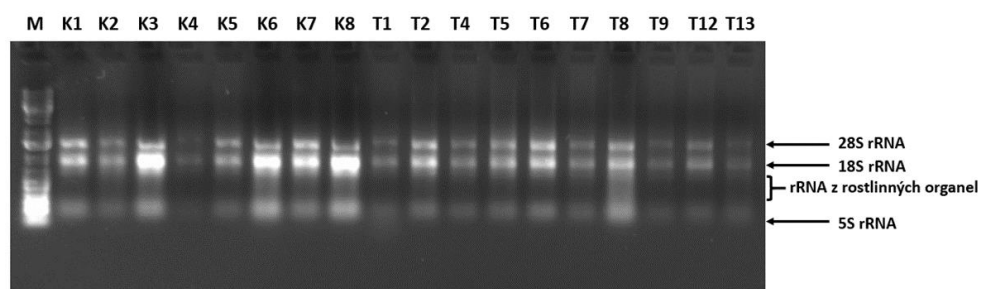
Semikvantitativní determinace změn v úrovni exprese *SIMK* byla provedena metodou semikvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase ze vzorků listů 10 transgenních rostlin *Medicago sativa SIMK RNAi* (rostliny 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13). Jako kontrolní rostliny byly použity rostliny *M. sativa* kultivar Regen-SY, množeny pomocí somatické embryogeneze.

Nejprve byla provedena fenolová extrakce nukleových kyselin (Obr. 26), které byly následně podrobeny působení DNasy a druhé fenolové extrakci (Obr. 27). Ze snímku gelu je patrné, že po působení DNasy, zmizel pás, který velikostí odpovídá gDNA (Obr. 27). Na vzorky byla poté aplikována reverzní transkriptasa pro převedení mRNA do komplementární DNA (cDNA), která byla následně amplifikována (Obr. 28). Nakonec proběhla samotná analýza semikvantitativní PCR (qPCR; Obr. 29).

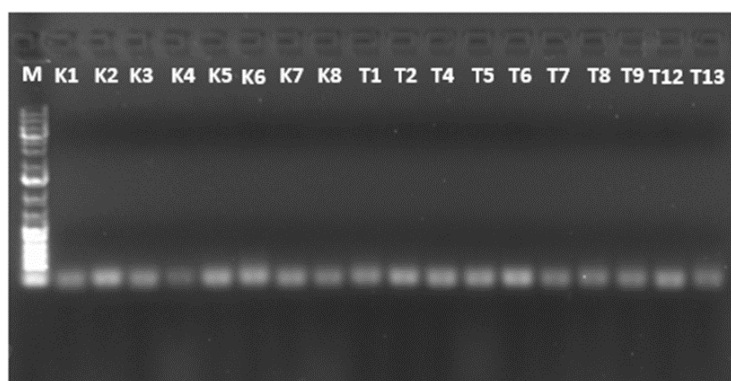
Z výsledků qPCR byl vytvořen graf závislosti relativní úrovně mRNA transkriptu pro *SIMK* u konkrétní rostliny (Obr. 29). Z vyhodnocení výsledků vyplývá, že nejnižší relativní úrovně mRNA transkriptu pro *SIMK* vykazovaly transgenní rostliny (vzestupně): 9, 5, 13, 12, 4, 2, 1, 8, 7 a 6 (Obr. 29).



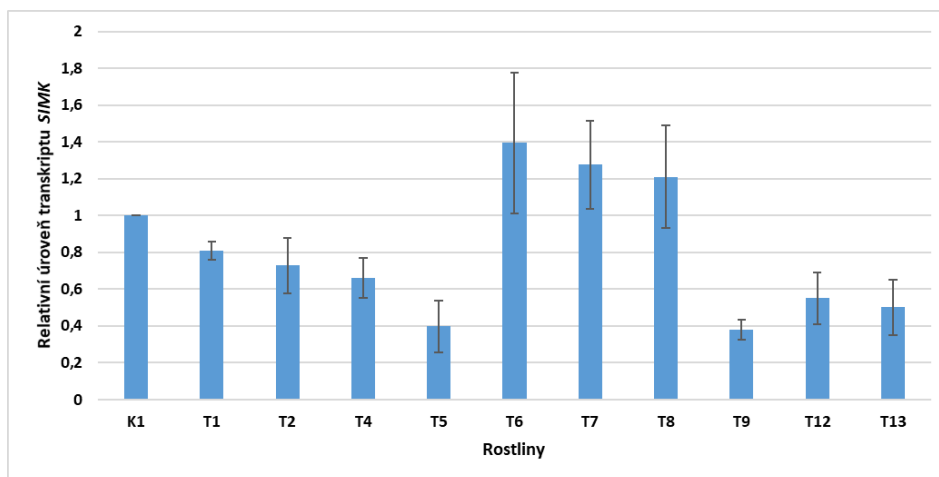
Obr. 26 Snímek gelu po první fenolové extrakci vzorků listů kontrolních rostlin *Medicago sativa* (K) a transgenních rostlin (T) *Medicago sativa SIMK RNAi*. M - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



Obr. 27 Snímek gelu po aplikaci DNasy a druhé fenolové extrakci vzorků z listů kontrolních (K) a transgenních rostlin (T) *Medicago sativa* *SIMK RNAi*. M - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



Obr. 28 Snímek gelu po reverzní transkripci a amplifikaci *SIMK* (100 bp) u vzorků z listů kontrolních (K) a transgenních rostlin (T) *Medicago sativa* *SIMK RNAi*. M - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



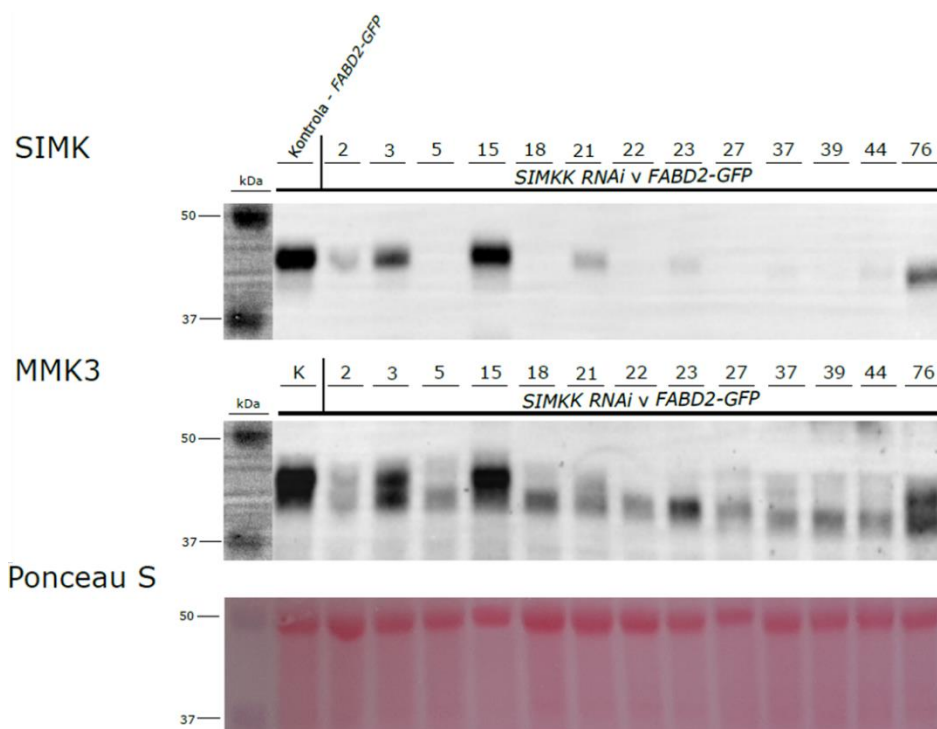
Obr. 29 Relativní exprese *SIMK* v transgenních liniích *M. sativa SIMK RNAi*. Semikvantitativní vyhodnocení relativní úrovně transkriptu *SIMK*. K nejnižší úrovni exprese *SIMK* docházelo u transgenní rostliny 9 a 5. K – kontrolní rostliny *Medicago sativa* kultivar Regen-SY; T - transgenní rostliny *Medicago sativa SIMK RNAi*.

V průběhu experimentální části této diplomové práce bylo také zjištěno, že u rostlin pěstovaných *in vitro*, a které vykazovaly nejnižší expresi a produkci proteinu *SIMK*, dochází velmi brzy k opadávání listů a zastavená růstu nadzemní části (*SIMK RNAi* 9, 30, 31, 33, 29, atd.). Proto byla, pro další část experimentů, vybrána, a ihned rozmnožena somatickou embryogenezí, transgenní rostlina *SIMK RNAi* 5.

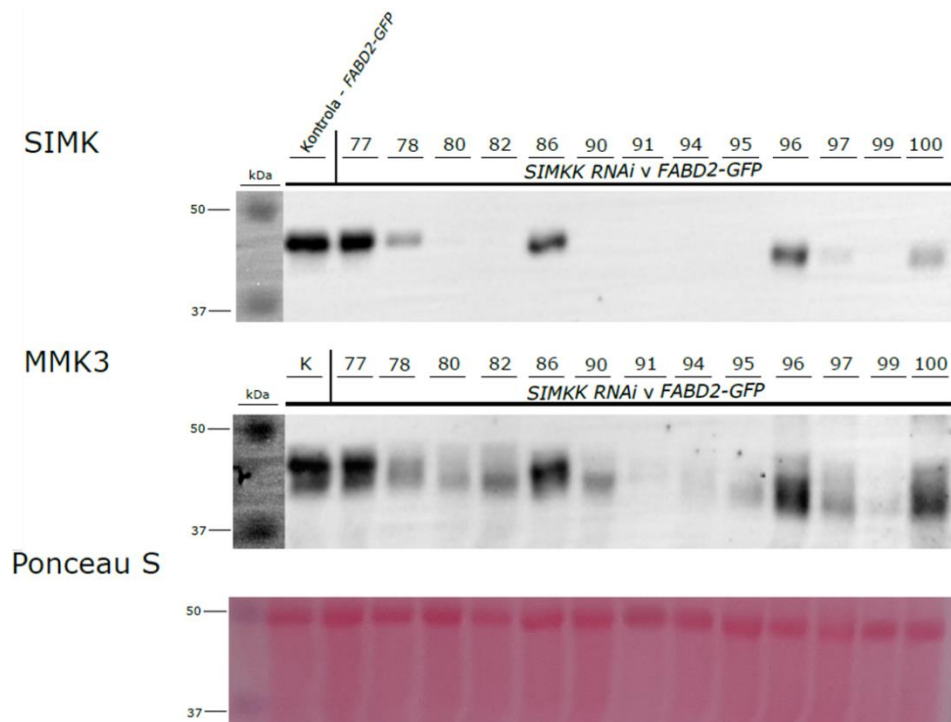
4.2.3 Imunoblotová analýza *Medicago sativa* SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}

Kvalitativní a kvantitativní determinace změn v úrovni produkce proteinů byla provedena imunoblotovou analýzou vzorků listů 26 transgenních rostlin *SIMKK*^{RNAi FABD2-GFP} (rostliny nesly označení 2, 3, 5, 15, 18, 21, 22, 23, 27, 37, 39, 44, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 90, 91, 94, 95, 96, 97, 99, 100; Obr. 30, 31). Jako kontrolní rostliny byly použity rostliny *M. sativa* *FABD2-GFP*, množené pomocí somatické embryogeneze.

Z výsledků vyplývá, že nejnižší produkci proteinu SIMK vykazovaly transgenní rostliny: 5, 18, 22, 27, 37, 39, 80, 82, 90, 91, 94, 95 a 99 (Obr. 30, 31, 32). U transgenních rostlin 2, 21, 23, 44, 78, 97 a 100 došlo také k částečnému snížení produkce SIMK a zbylé transgenní rostliny vykazovaly produkci proteinu SIMK porovnatelnou s kontrolními rostlinami, nebo jen málo sníženou produkci SIMK (Obr. 30, 31, 32).



Obr. 30 Detekce produkce proteinu SIMK u vzorků z listů kontrolní rostliny *M. sativa* *FABD2-GFP* a transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK*^{RNAi FABD2-GFP} (2, 3, 5, 15, 18, 21, 22, 23, 27, 37, 39, 44, 76) rostoucích *in vitro*. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce proteinu SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenních rostlin 5, 18, 22, 27, 37 a 39. Snímek membrány nabarvené Ponceau S slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



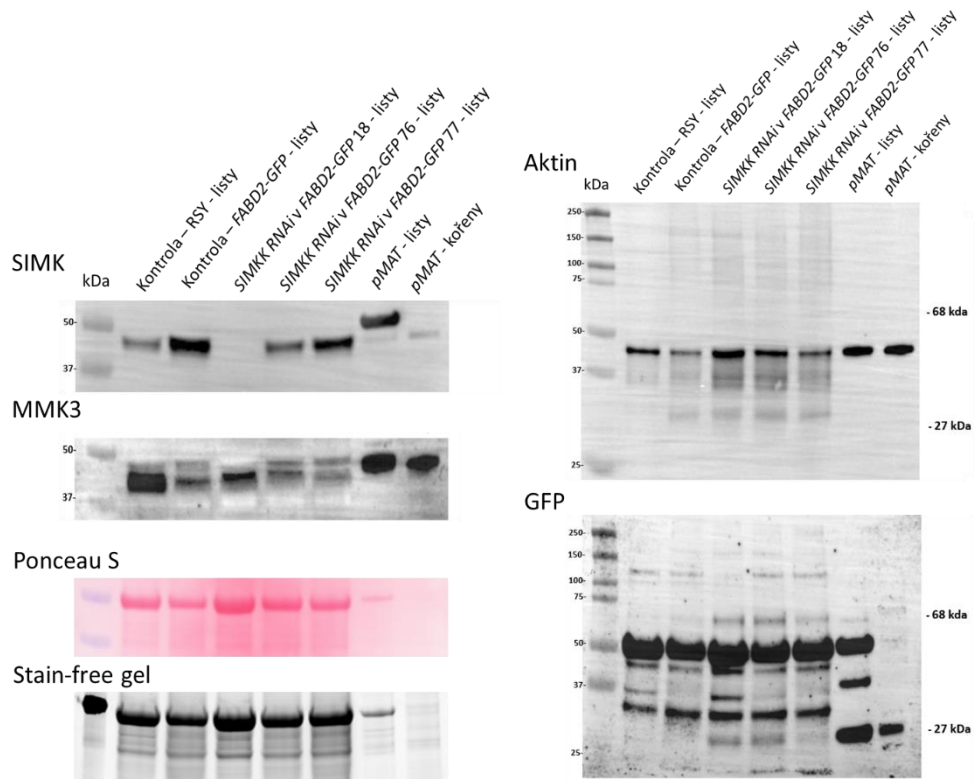
Obr. 31 Detekce produkce proteinu SIMK u vzorků z listů kontrolní rostliny *M. sativa FABD2-GFP* a transgenních rostlin *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (77, 78, 80, 82, 86, 90, 91, 94, 95, 96, 97, 99, 100) rostoucích *in vitro*. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce proteinu SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenních rostlin 80, 82, 90, 91, 94, 95 a 99. Snímek membrány nabarvené Ponceau S slouží pro kontrolu nanesení proteinů.

Kvůli pozdějším masivním kontaminacím, které zapříčinily vyhynutí téměř všech kontrolních a transgenních rostlin, zůstala pouze jedna kontrolní rostlina *M. sativa FABD2-GFP* a tři transgenní rostliny *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (18, 76 a 77).

Následně byla provedena imunoblotová analýza na přítomnost fúzního proteinu FABD2-GFP, o molekulové hmotnosti přibližně 68 kDa, ze vzorků listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivaru Regen-SY (negativní kontrola), *M. sativa FABD2-GFP*, transgenních rostlin *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (18, 76 a 77) a vzorků listů a kořenů *Arabidopsis thaliana* transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující GFP (pozitivní kontrola; Obr. 32).

Z výsledků analýzy imunoblotu a použití protilátky proti GFP vyplývá, že k expresi fúzního proteinu FABD2-GFP docházelo u kontrolní rostliny *M. sativa FABD2-GFP* a transgenních rostlin *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (18, 76 a 77; Obr. 32). Výsledky imunoblotu s protilátkou proti GFP však byly velmi slabě detekovatelné a protilátka opakovaně

vykazovala velkou nespecifitu. Zároveň bohužel nedocházelo ke stejnému výsledku po aplikaci protilátky proti aktinu (Obr. 32).



Obr. 32 Detekce produkce proteinů u vzorků z listů kontrolní rostliny *M. sativa* kultivaru Regensy (RSY), *M. sativa FABD2-GFP*, transgenních rostlin *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (18, 76 a 77) a vzorků z listů a kořenů *Arabidopsis thaliana* transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující GFP, rostoucích *in vitro*. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenní rostliny 18. Velikost fúzního proteinu FABD2-GFP je přibližně 68 kDa. Snímek membrány nabarvené Ponceau S a snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.

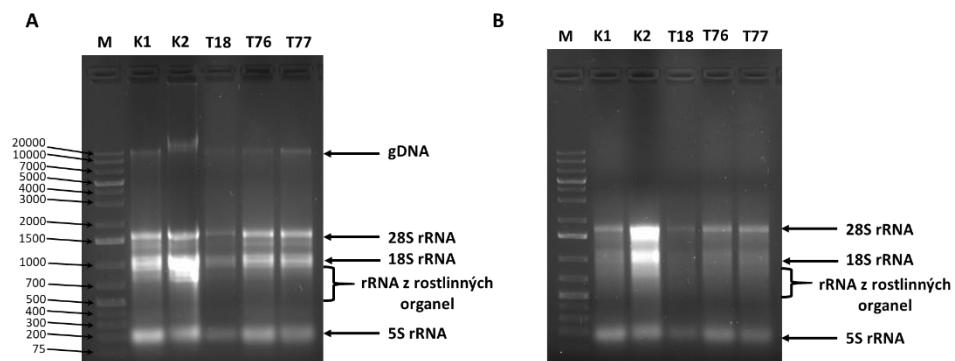
4.2.4 Semikvantitativní PCR analýza v reálném čase transgenních rostlin

M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}

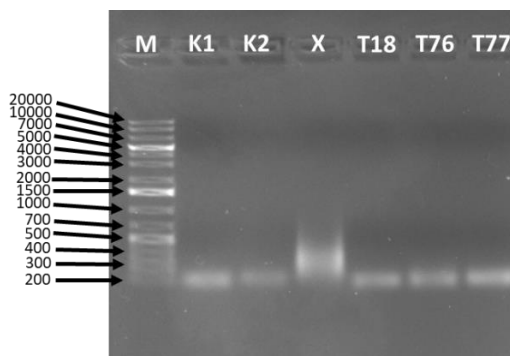
Semikvantitativní determinace změn v úrovni exprese *SIMKK* byla provedena metodou semikvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase ze vzorků listů 3 transgenních rostlin *SIMKK RNAi* v *FABD2-GFP* (číselně 18, 76 a 77). Jako kontrolní rostliny byly použity rostliny *M. sativa FABD2-GFP*, množené pomocí somatické embryogeneze.

Nejprve byla provedena fenolová extrakce nukleových kyselin (Obr. 33A), které byly následně podrobeny působení DNasy a druhé fenolové extrakci (Obr. 33B). Ze snímku gelu je patrné, že po působení DNasy, zmizel pás, který velikostí odpovídá gDNA (Obr. 33B). Na vzorky byla poté aplikována reverzní transkriptasa pro převedení mRNA do komplementární DNA (cDNA), která byla následně amplifikována (Obr. 34). Nakonec proběhla samotná analýza semikvantitativní PCR (qPCR; Obr. 34).

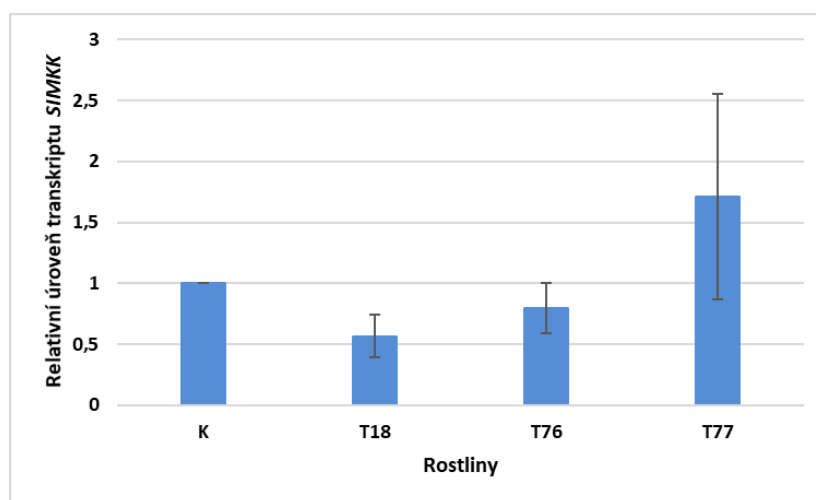
Z výsledků qPCR byl vytvořen graf závislosti relativní úrovně mRNA transkriptu pro *SIMKK* u konkrétní rostliny (Obr. 35). Z výsledků vyplývá, že nejnižší relativní úrovně mRNA transkriptu pro *SIMKK* vykazovaly transgenní rostliny (vzestupně): 18, 76 a 77 (Obr. 35).



Obr. 33 Snímek gelu po první fenolové extrakci (A) a snímek gelu po aplikaci DNasy a druhé fenolové extrakci (B) vzorků listů kontrolních (K) a transgenních rostlin (T) *Medicago sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*. M - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



Obr. 34 Snímek gelu po reverzní transkripci a amplifikaci *SIMKK* u vzorků z listů kontrolních (K) a transgenních rostlin (T) *Medicago sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*. M - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. X – chybný vzorek.

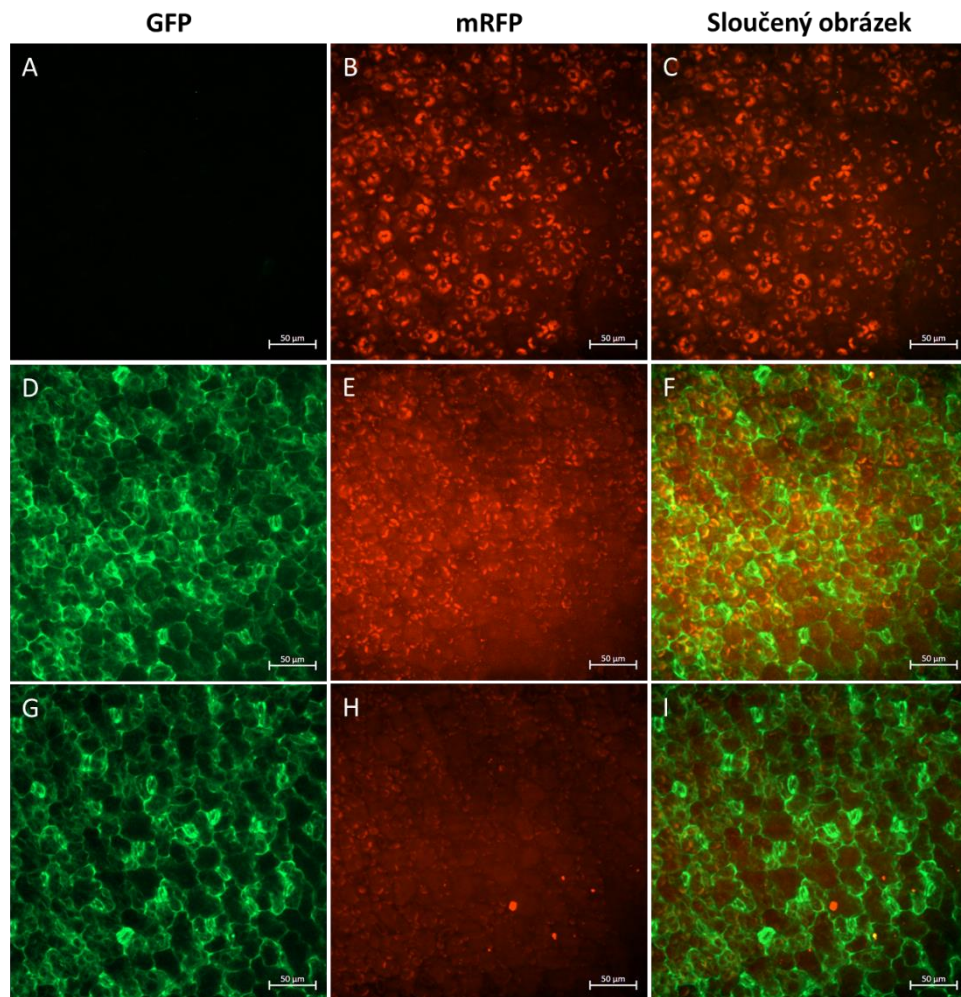


Obr. 35 Relativní úroveň exprese *SIMKK* v transgenních liniích *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*. Semikvantitativní vyhodnocení relativní úrovně transkriptu *SIMKK*. K – nejnižší úrovni exprese *SIMKK* docházelo u transgenní rostliny 18. K – kontrolní rostlina *Medicago sativa FABD2-GFP*; T – transgenní rostliny *Medicago sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*.

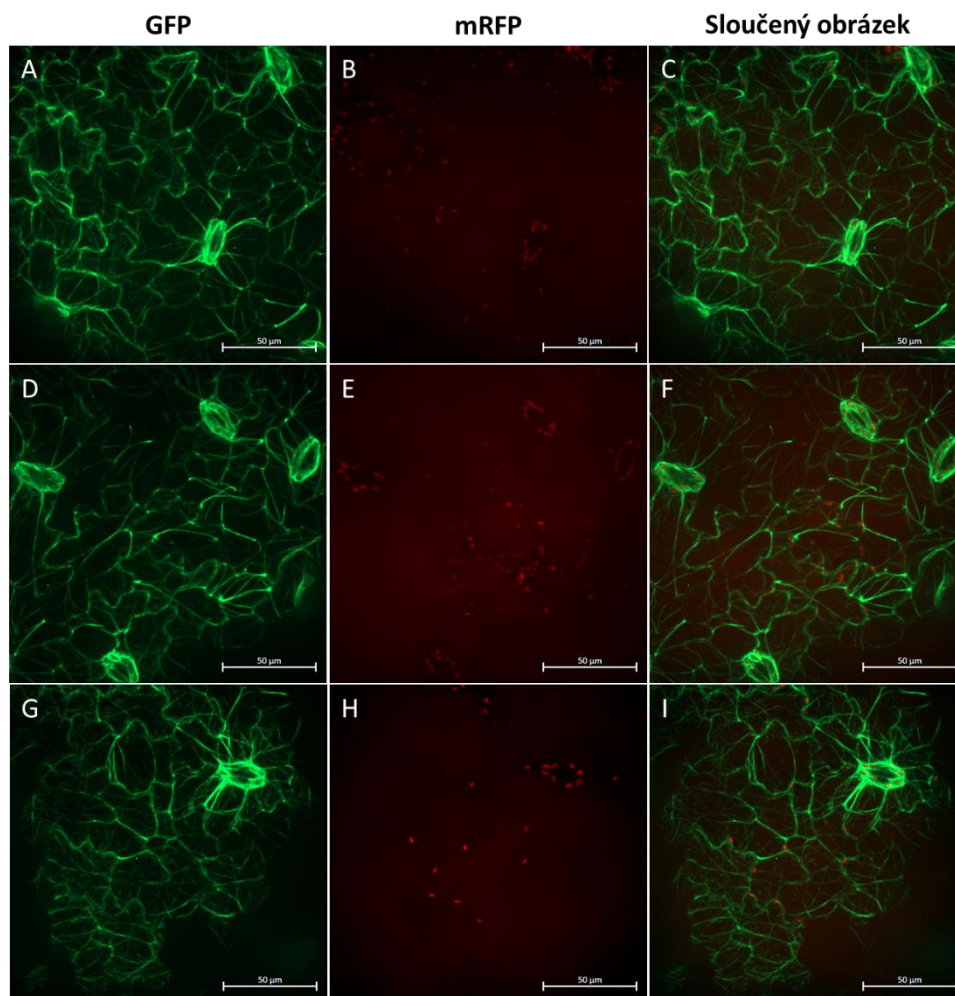
4.3 Mikroskopická analýza aktinového cytoskeletu rostlin *M. sativa* *SIMKK RNAi* ^{FABD2-GFP}

Pro dokumentaci struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu byly použity tři rostliny: kontrolní rostlina *M. sativa* Regen-SY, *M. sativa* linie *FABD2-GFP*, stabilně exprimující fúzní protein FABD2-GFP (fúze N-terminálního konce GFP k C-terminálnímu konci AtFim1, zahrnující druhou aktin-vázající doménu; Voigt *et al.*, 2004) a transgenní linii *M. sativa* *SIMKK RNAi* ^{FABD2-GFP} (rostlina 18; Obr. 36). Připravené preparáty byly sledovány pomocí laserového mikroskopu s rotujícím diskem. Byl použit laser pro detekci GFP (excitace 488 nm, emisní filtr BP 525/50). Pro detekci autofluorescence chloroplastů byl použit laser pro detekci mRFP; excitace 561 nm, emisní filtr BP 629/62).

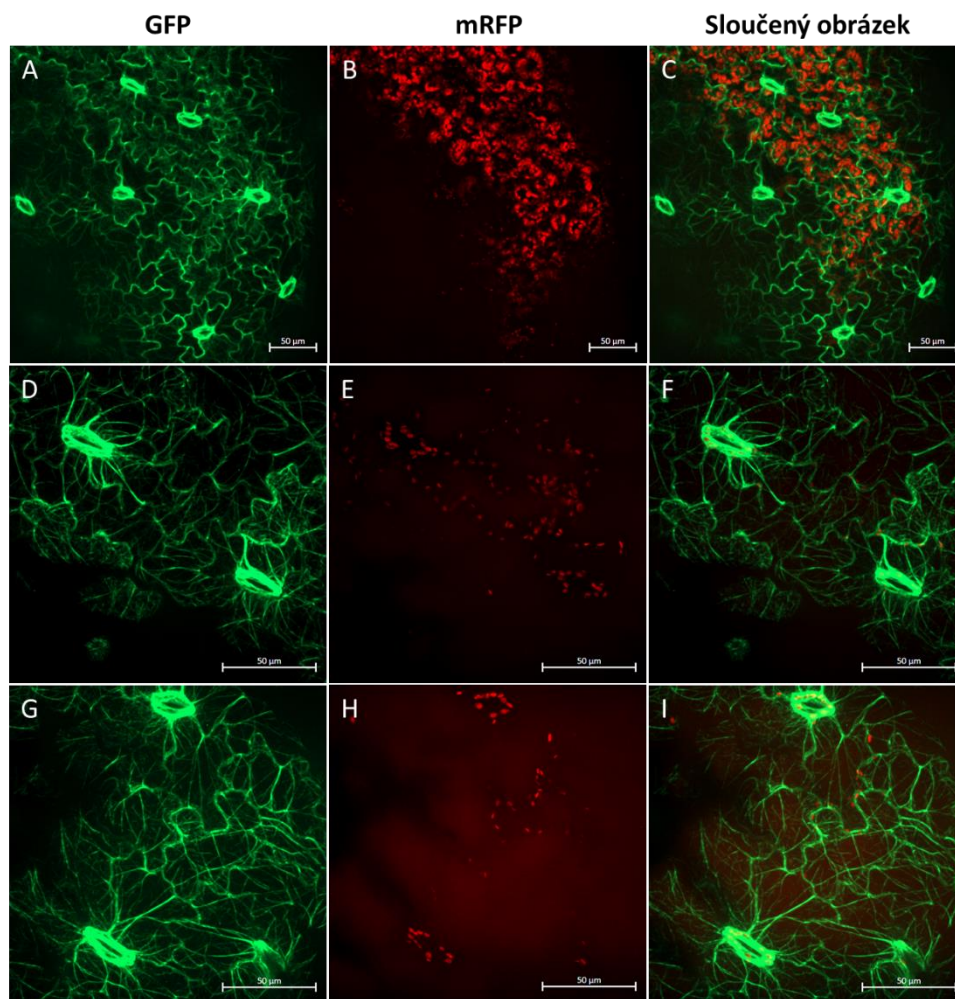
Mikroskopickou analýzou rostlin *SIMKK RNAi* ^{FABD2-GFP} byla zdokumentována struktura a uspořádání aktinového cytoskeletu (Obr. 38). Avšak nebyl pozorován žádný rozdíl ve struktuře a uspořádání aktinového cytoskeletu mezi rostlinami *M. sativa* linie *FABD2-GFP* a transgenní linii *M. sativa* *SIMKK RNAi* ^{FABD2-GFP} (rostlina 18, Obr. 37, 38).



Obr. 36 Celkový přehled jednotlivých vzorků pro pozorování struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu rostlin: *M. sativa* Regen-SY (A - C), *M. sativa* linie *FABD2-GFP* (D - E) a transgenní linie *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (rostlina 18; G - H). Zelená fluorescence *FABD2-GFP* (A, D, G), mRFP – autofluorescence chloroplastů (B, E, H) a překryv obou kanálů (C, F, I). Měřítko: 50 μm .



Obr. 37 Pozorování struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu *M. sativa* linie *FABD2-GFP*. Zelená fluorescence *FABD2-GFP* (A, D, G), mRFP – autofluorescence chloroplastů (B, E, H) a překryv obou kanálů (C, F, I). Měřítko: 50 μm .

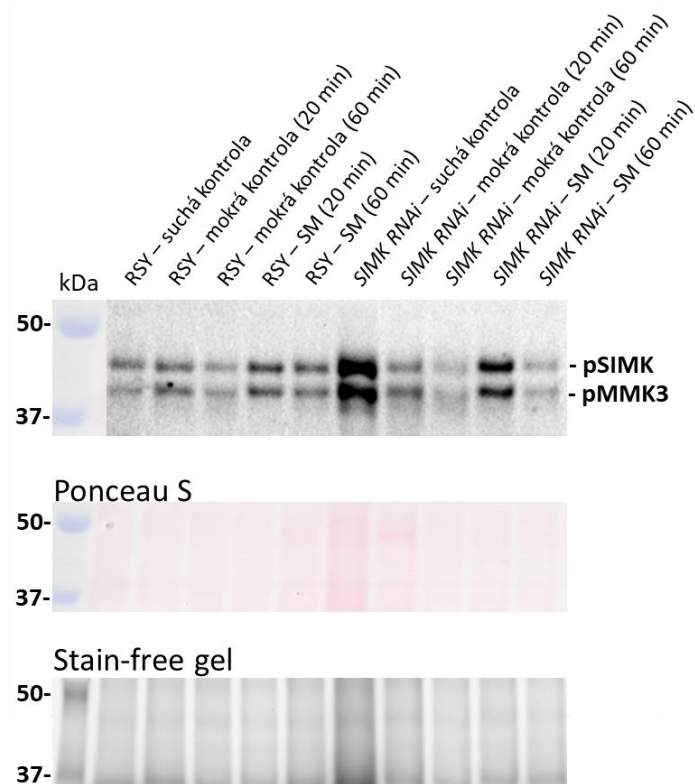


Obr. 38 Pozorování struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu transgenní linie *M. sativa* *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* (rostlina 18). Zelená fluorescence FABD2-GFP (A, D, G), mRFP – autofluorescence chloroplastů (B, E, H) a překryv obou kanálů (C, F, I). Měřítko: 50 μ m.

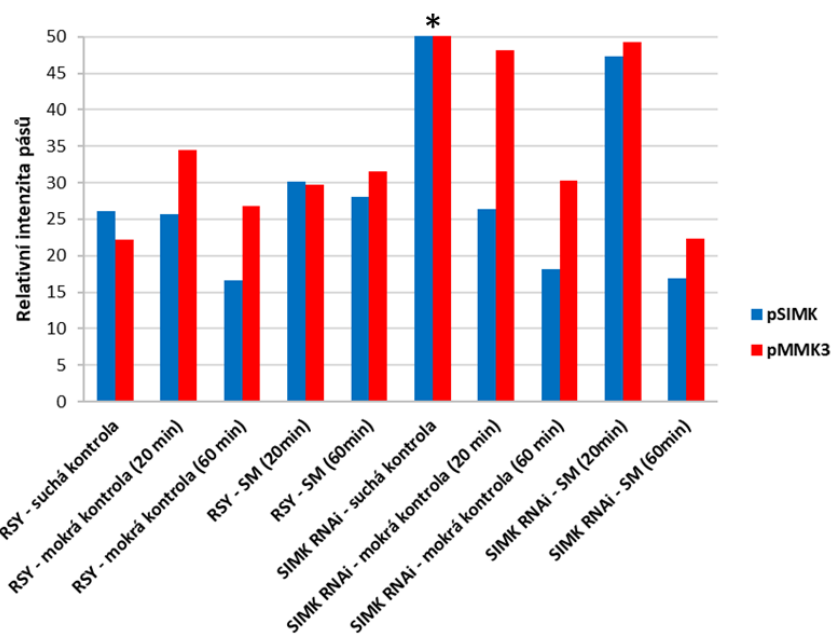
4.4 Aplikace symbiotických bakterií *Sinorhizobium meliloti* na *SIMK RNAi* linii 5

Kvantitativní determinace změn v produkci proteinů a aktivitě fosforylovaných MAPK ve vzorcích z kořenů kontrolních a transgenních *SIMK RNAi* (5) rostlin *Medicago sativa* po aplikaci půdní bakterie *Sinorhizobium meliloti*, byla analyzována metodou imunoblot s použitím fosfospecifické anti-pTEpY protilátky (pERK). Půdní bakterie byla aplikována na kořeny kontrolních a transgenních rostlin a ponechána při mírném třepání po dobu 1 hodiny. Vzorky kořenů, které byly v kontaktu se suspenzí půdních bakterií, byly odebírány před aplikací (suchá kontrola), 20 minut a 60 minut po aplikaci suspenze půdní bakterie *S. meliloti* v tekutém Föhreově médiu bez dusíku (Obr. 39, 40). Jako mokrá kontrola bylo použito čisté Föhreovo medium bez obsahu dusíku. Snímek membrány nabarvené Ponceau S a snímek stain-free gelu sloužily jako kontrola nanesení stejné koncentrace proteinů (Obr. 39). U vzorku *SIMK RNAi* (suchá kontrola) bylo nanášeno větší množství proteinů na gel (Obr. 39, 40).

Ze snímků membrán s navázanou fosfospecifickou protilátkou vyplývá, že k největší aktivaci SIMK po působení půdní bakterie dochází u rostlin *SIMK RNAi* po 20 minutách od aplikace *Sinorhizobium meliloti* (Obr. 39, 40). U kontrolních rostlin došlo k méně výraznému zvýšení aktivity SIMK (46 kDa) po aplikaci *Sinorhizobium meliloti* (Obr. 40). Z výsledků je také patrné, že u rostlin *SIMK RNAi* dochází vlivem aplikace půdní bakterie, ale i Föhreova média bez dusíku, k zvýšené aktivaci MMK3 (44 kDa) oproti kontrolním rostlinám (Obr. 40).



Obr. 39 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky ze vzorků z kořenů kontrolních a transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*, na které byla aplikována půdní bakterie *S. meliloti* po dobu 60 minut. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Jsou vidět dva pruhy, z nichž horní svou velikostí odpovídá fosforylované SIMK a spodní fosforylované MMK3. K největší aktivaci MAPK docházelo při 20 minutách po aplikaci *S. meliloti*.



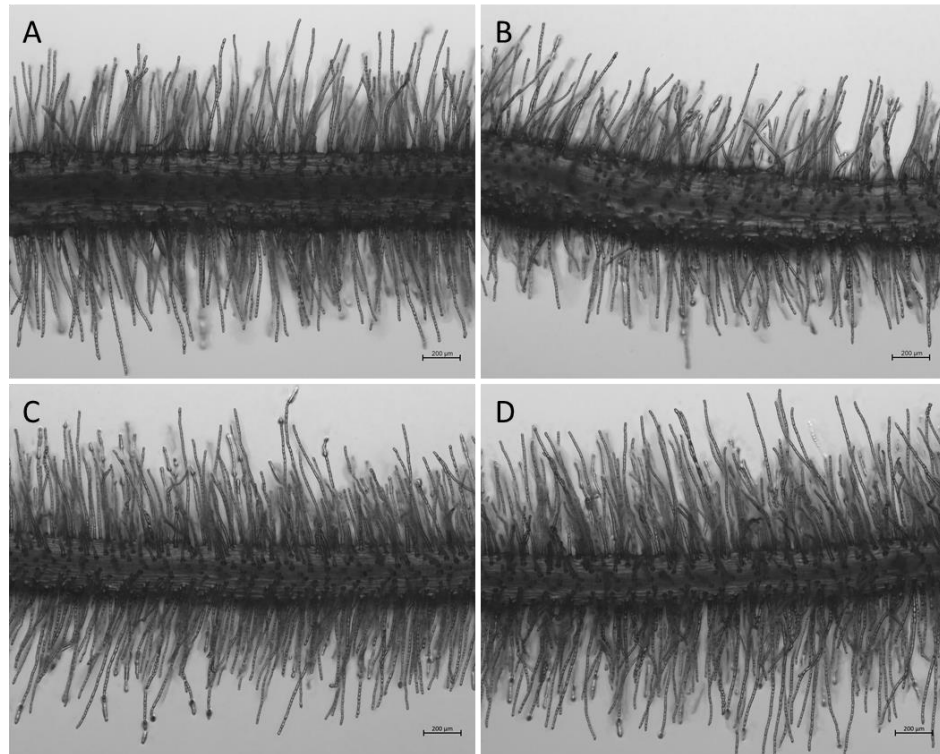
Obr. 40 Závislost relativní intenzity pásů na čase. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fosforylované SIMK (modrá) a MMK3 (červená) pomocí fosfospecifické protilátky ze vzorků z kořenů kontrolních a transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*, na které byla aplikována půdní bakterie *S. meliloti* (SM) po dobu 60 minut. K největší aktivaci MAPK docházelo při 20 minutách po aplikaci *S. meliloti*. Hvězdičkou je označen vzorek, ve kterém byla nanášena větší koncentrace proteinů na gel.

4.5 Měření délky kořenových vlásků kontrolních a *SIMK RNAi* rostlin

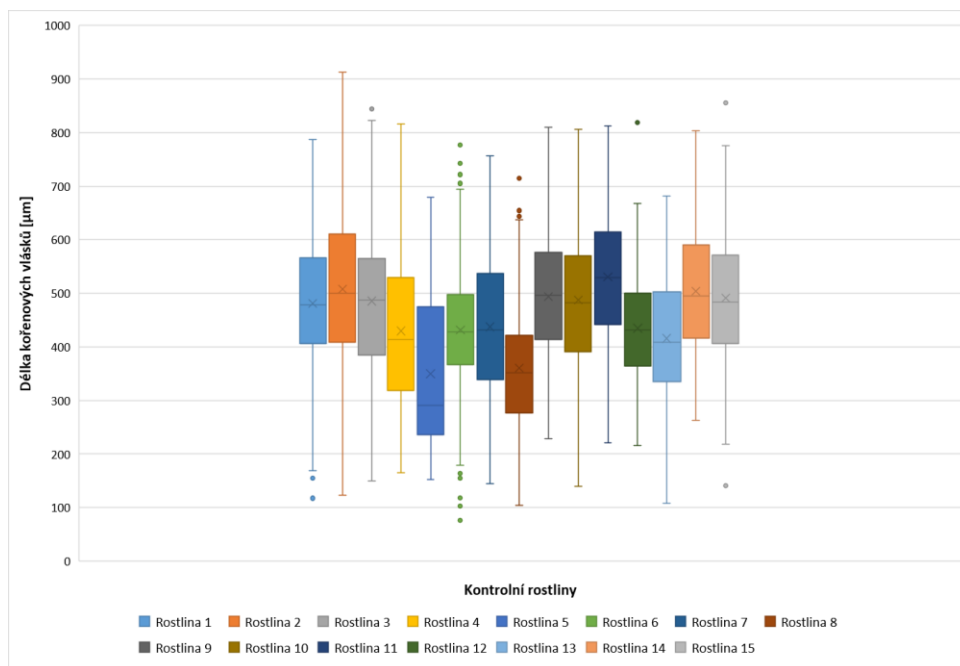
Pro determinaci fenotypu transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* bylo provedeno měření délky kořenových vlásků. Pro experiment bylo vybráno 15 kontrolních rostlin Regen-SY a 15 transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* starých 14 dní (Obr. 41, 42, 43). Kořenové vlásky byly snímány pomocí zoomovacího stereomikroskopu (Obr. 41). Pro měření byly vybírány jen zdravé kořenové vlásky, které už dosáhly své konečné délky u takových kořenů, které rostly na povrchu média (Obr. 41). Délka kořenových vlásků byla měřena v programu ImageJ.

Na kořenech kontrolních rostlin *M. sativa* byla změřena délka 5215 kořenových vlásků a na kořenech transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* byla měřena délka 3821 kořenových vlásků. Průměrná délka kořenových vlásků kontrolních rostlin *M. sativa* byla 467,279 μm (Obr. 44). Průměrná délka kořenových vlásků transgenních rostlin

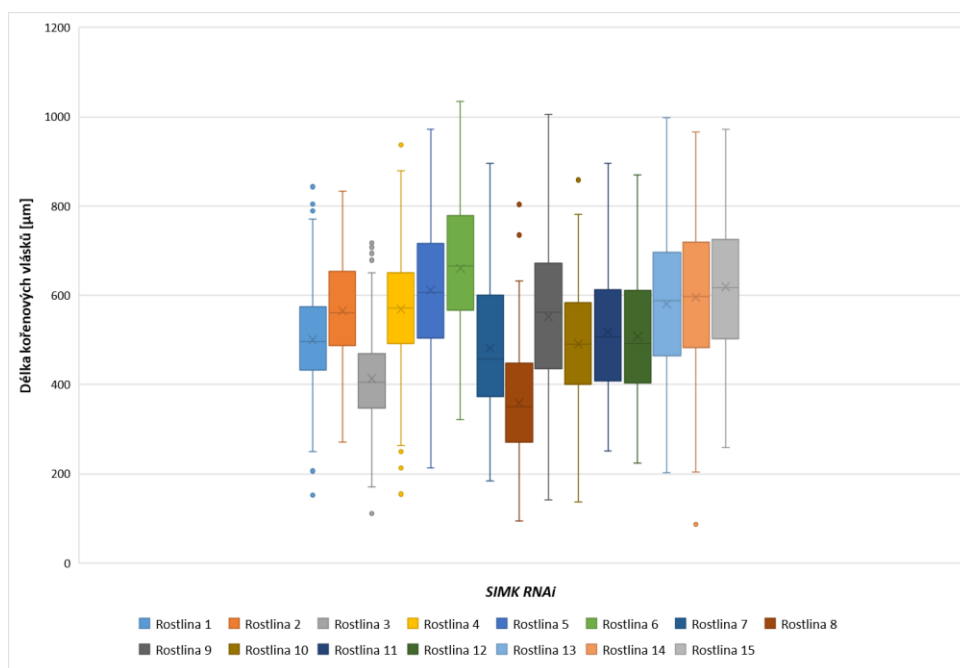
M. sativa SIMK RNAi byla 536,454 μm (Obr. 44). Z výsledků vyplývá, že transgenní rostliny *M. sativa SIMK RNAi* mají v průměru přibližně o 69 μm delší kořenové vlásky než kontrolní rostliny *M. sativa*.



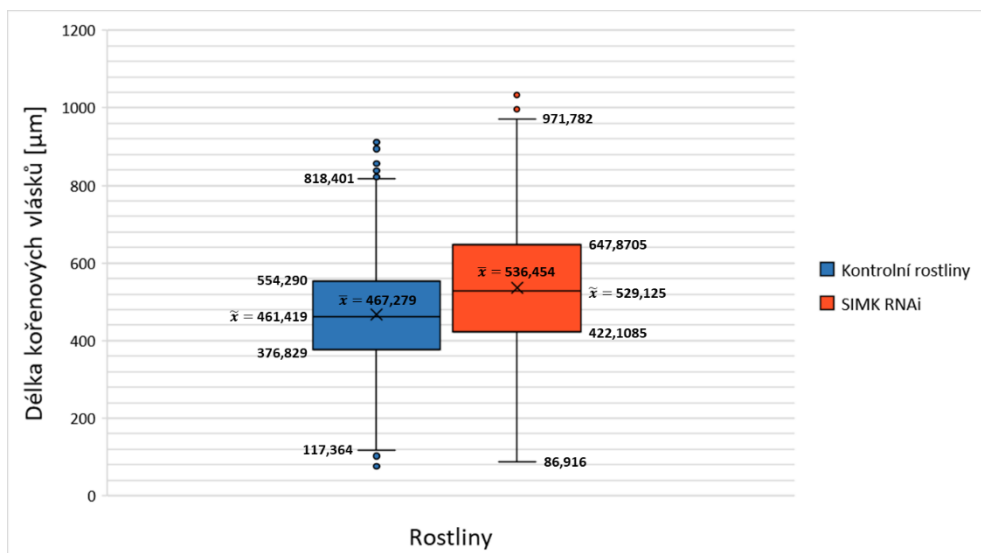
Obr. 41 Fenotyp kořenových vlásků kontrolních (A, B) a transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* (C, D) starých 14 dní. Měřítko – 200 μm .



Obr. 42 Délka kořenových vlásků kontrolních rostlin *M. sativa* starých 14 dní.



Obr. 43 Délka kořenových vlásků transgenních rostlin *M. sativa* SIMK RNAi starých 14 dní.



Obr. 44 Délka kořenových vlásků kontrolních (modře) a transgenních rostlin *M. sativa* SIMK RNAi (oranžově) starých 14 dní. Průměrná délka kořenových vlásků kontrolních rostlin *M. sativa* byla 467,279 μm . Průměrná délka kořenových vlásků transgenních rostlin *M. sativa* SIMK RNAi byla 536,454 μm .

5. DISKUZE

Stresem indukovaná MAPK v *M. sativa* (SIMK) může být aktivována solným stresem (Kiegerl *et al.*, 2000), vlivem mechanického poranění (Bögre *et al.*, 1997; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006), oxidativního stresu (Munnik *et al.*, 1999), vysoké koncentrace těžkých kovů (Jonak *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011), působením ethylenu (Ouaked *et al.*, 2003; Jonak *et al.*, 2004) a po působení elicitorů bakterií a hub (Cardinale *et al.*, 2000; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). SIMK vykazuje velmi vysokou sekvenční homologii k AtMPK6 (Bekešová *et al.*, 2015).

Při semikvantitativní analýze produkce proteinů SIMK a MMK3 bylo zjištěno, že transgenní rostliny *M. sativa SIMK RNAi* s nejnižší úrovní produkce SIMK vykazují částečně zvýšenou produkci proteinu MMK3. To může být způsobeno nutností transgenní rostliny *SIMK RNAi* využít jinou MAPK při přenosu signálu ze SIMKK na méně abundantní SIMK, jelikož MMK3 je také součástí signalizační kaskády, jejímž nadřazeným aktivátorem je SIMKK (Cardinale *et al.*, 2002). Tento předpoklad bude ale nutné ještě ověřit. Bude také nutné optimalizovat metodický postup, především blokovácí roztok pro membrány, pufr, ve kterém je protilátka aplikována a samotnou dobu aplikace protilátky proti MMK3, která se často navazovala nespecificky (Obr. 30, 31 a 32).

Po aplikaci symbiotické půdní bakterie *Sinorhizobium meliloti* docházelo k nejvyšší aktivaci SIMK po 20 minutách jak u kontrolních, tak u transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*. Zajímavé je, že u transgenních rostlin, u nichž byla snížena exprese SIMK procesem RNA interference, docházelo ve větší míře k aktivaci SIMK než u kontrolních rostlin. Naproti tomu po aplikaci solného stresu docházelo u transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* k nižší úrovni aktivace SIMK než u kontrolních rostlin *M. sativa* (Urbiš, 2018). U tohoto experimentu byla bohužel, z důvodu karanténních opatření v souvislosti s pandemií Covid-19, provedena pouze tři technická opakování, bez biologického opakování. Pro potvrzení nebo vyvrácení výsledků bude tudíž nutné tyto experimenty opakovat.

Jelikož je AtMPK6 zapojena do mnoha dějů, jako je dělení buněk (Müller *et al.*, 2010), vývoj kořenů a regulace růstu kořenového meristému (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et*

al., 2014; Li *et al.*, 2017), regulace genové exprese (Gaudet *et al.*, 2011) i senescence listů (Zhou *et al.*, 2009), mohla by snížená produkce proteinu SIMK u transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* vysvětlit příčinu zastavení růstu nadzemních částí (listů a stonků), ale pokračování růstu kořenů *in vitro* u těch transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi*, které vykazovaly nejvyšší míru snížení produkce SIMK. Jediná rostlina *M. sativa SIMK RNAi*, kterou se podařilo pro následující experiment měření délky kořenových vlásků zachránit a rozmnožit, byla rostlina č. 5. Jak se později ukázalo, mateřská rostlina *M. sativa SIMK RNAi* 5 i somatictí kloni, z ní odvození, vykazovali stejný fenotyp a do několika měsíců došlo k zastavení růstu nadzemní části, a proto byla rostlina č. 5 dále rozmnožována jen somatickou embryogenezí.

V buňce je SIMK lokalizována v jádře a cytoplasmě. Po působení stresového faktoru dochází k transportu do cytoplasmy a ke specifické kompartmentalizaci (Ovečka *et al.*, 2014). Při růstu kořenových vlásků dochází k relokizaci SIMK z jádra do cytoplasmy prodlužující se špičky kořenového vlásku pomocí sítě aktinových mikrofilamentů (Šamaj *et al.*, 2002). SIMK má vliv na dynamiku aktinového cytoskeletu, a tedy i na růst kořenových vlásků. Inhibicí MAPK aktivity dochází ke změnám v distribuci aktinu a SIMK, způsobující inhibici růstu kořenových vlásků a změnu jejich morfologie (Šamaj *et al.*, 2002; Šamajová *et al.*, 2013b; Ovečka *et al.*, 2014; Komis *et al.*, 2018). U transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* docházelo k prodlužování kořenových vlásků oproti kontrolním rostlinám (Obr. 44).

Z tohoto důvodu byly v průběhu experimentální části práce transformovány rostliny *M. sativa FABD2-GFP* také pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt pro SIMK RNAi. Bohužel u vyprodukovaných transgenních rostlin nebyly z důvodu karanténních opatření dokončeny analýzy pro determinaci míry snížení exprese a produkce proteinů, a proto nejsou součástí této diplomové práce. Další experiment s transgenními rostlinami *M. sativa SIMK RNAi*, který byl naplánován, ale nedošlo k jeho uskutečnění, byl experiment na tvorbu hlízek po dobu 20 dní od aplikace *S. meliloti*. U rostlin *M. sativa SIMK RNAi* docházelo, oproti kontrolním rostlinám, k velmi nízké efektivitě tvorby hlízek (Kovalčíková, 2017).

SIMKK, která patří mezi MAPKK, vykazuje vysokou sekvenční homologii k MKK4 a MKK5 z *Arabidopsis thaliana* (Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Komis *et al.*,

2018). Kvasinkovým dvouhybridním systémem bylo prokázáno, že SIMKK protein interaguje se SIMK a fosforyluje SIMK po působení solného stresu (Obr. 5; Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2011; Ovečka *et al.*, 2014). U transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* tak docházelo k nižší produkci SIMK oproti kontrolním rostlinám. Zároveň docházelo u těchto transgenních rostlin k mírnému zvýšení produkce MMK3. Při aplikaci protilátky proti GFP, došlo k jejímu navázání na protein o velikosti přibližně 68 kDa, který koresponduje s fúzním proteinem FABD2-GFP, pás byl ale velmi slabý a protilátka byla navázána i nespecificky, a proto byl navržen experiment pro otestování několika protilátek proti proteinu GFP od různých výrobců. K experimentu byly využity vzorky kořenů z rostlin: *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, *A. thaliana pMAT*, *A. thaliana FABD2-GFP* a *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*, ale tento test nebyl kvůli karanténním opatřením dokončen. Bohužel se nepodařilo prokázat ani žádný rozdíl v dynamice a struktuře aktinového cytoskeletu mezi kontrolními rostlinami a *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* linií 18, pomocí laserového mikroskopu s rotujícím diskem.

6. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována rešerše zaměřená na transgenozu rostlin, se speciálním zaměřením na tolici vojtěšku, reakce a odpovědi rostlin na stres, způsobený abiotickými stresovými faktory, význam MAPK signálních proteinů při přenosu signálů v buňce, se speciálním zaměřením na SIMK a SIMKK, a souhrn poznatků o fenotypových projevech rostlin při interakci se symbiotickými hlízkovými bakteriemi.

V praktické části byla provedena transformace listových explantátů tolíce vojtěšky (*M. sativa*) kultivaru Regen-SY, prostřednictvím kultury *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí konstrukt pro potlačení exprese SIMK procesem RNA interference, a explantátů rostlin *M. sativa* se značenou aktin-vázající doménou 2 fimbrinu z *A. thaliana* pomocí GFP (*FABD2-GFP*), prostřednictvím kultury *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí konstrukt pro potlačení exprese SIMKK procesem RNA interference, s cílem regenerace stabilních transgenních linií se sníženou expresí daných MAPK procesem somatické embryogeneze. Snížená úroveň exprese a produkce proteinů SIMK a SIMKK byla ověřena kvalitativně a semikvantitativně metodami imunoblot a RT-qPCR pro selekci rostlin s nejnižší úrovní produkce daných MAPK.

Pro dokumentaci struktury a uspořádání aktinového cytoskeletu byly preparáty sledovány pomocí laserového mikroskopu s rotujícím diskem. Mikroskopickou analýzou rostlin *SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}* byla zdokumentována struktura a uspořádání aktinového cytoskeletu, ale nebyl pozorován žádný významný rozdíl ve struktuře a uspořádání aktinového cytoskeletu mezi kontrolními rostlinami *M. sativa* linie *FABD2-GFP* a transgenní linií *M. sativa SIMKK RNAi^{FABD2-GFP}*.

Aplikací půdní hlízkové bakterie *Sinorhizobium meliloti* na transgenní rostliny *SIMK RNAi* byla, metodou imunoblot a použitím fosfospecifické protilátky, pozorována zvýšená aktivace proteinů SIMK a MMK3 po 20 minutách.

Pro determinaci fenotypu transgenních rostlin *M. sativa SIMK RNAi* bylo provedeno měření délky kořenových vlásků a z výsledků bylo zjištěno, že transgenní rostliny *M. sativa SIMK RNAi* mají v průměru přibližně o 69 μm delší kořenové vlásky než kontrolní rostliny *M. sativa* kultivaru Regen-SY.

7. SEZNAM LITERATURY

- Abhishek, A., Kumari, R., Karjagi, C.G., Kumar, P., Kumar, B., Dass, S., Kumar R.S., Ramteke P.W. (2014): Tissue culture independent *Agrobacterium tumefaciens* mediated in planta transformation method for tropical maize (*Zea mays*. L). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. **86**, 375–384.
- Akiyoshi D., Klee H., Amasino R., Nester E., Gordon M. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 5994-5998.
- Albright, L.M., Huala, E., Ausubel, F.M. (1989): Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annual Review of Genetics*. **23**, 311-336.
- Alkuddsi, Y.A., Patil, S.S., Manjula, S.M., Pranesh, K.J., Patil, B.C. (2014): Standarizing in planta *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation protocol to develop new events by transforming *G. hirsutum* cotton based on *CryIAc-CryIEc* genes. *American Journal of Life Sciences*. **4**, 190-199.
- Allen, N. S., Bennet, M. N., Cox, D. N., Shipley, A., Ehrhardt, D. W., Long, S. R. (1994): Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{++} and H^{+} currents and on cytoskeletal behavior, In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. (Downie, J.A., Osbourn, A.E., ed. Daniels, M. J.), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 107-113.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. **415**, 977–983.
- Asano, Y., Otsuki, Y., Ugaki, M. (1991): Electroporation-mediated and silicon carbide whisker-mediated DNA delivery in *Agrosris alba* L. (Redtop). *Plant Science*. **9**, 247-252.
- Austin, S., Bingham, E.T. (1997): The potential use of transgenic alfalfa as a bioreactor for the production of industrial enzymes. In: *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. (McKersie, B.D., Brown, D.C.W., ed.), CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 409–427.
- Austin, S., Bingham, E.T., Mathews, D.E., Shahan, M.N., Will, J., Burgess, R.R. (1995): Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica*. **85**, 381–393.
- Austin, S., Ziegelhoffer, T. (2001): The production of value-added proteins in transgenic alfalfa. In: *Molecular Breeding of Forage Crops*. (Spangenburg, G., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 285–301.
- Austin-Phillips, S., Burgess, R., Ziegelhoffer, T., German, T.L. (Wisconsin Alumni Research Foundation): *Transgenic plants as an alternative source of lignocellulosic degrading enzymes*. US 5981835, A1, 11. 9. 1999a, 20 stran.
- Austin-Phillips, S., Koegel, R., Straub, R., Cook, M. (Wisconsin Alumni Research Foundation): *Animal feed compositions containing phytase derived from transgenic alfalfa and methods of use thereof*. US 5900525, A2, 5. 4. 1999b, 13 stran.
- Baker, C.J., Mock, N.M., Whitaker, B.D., Roberts, D.P., Rice, C.P., Deahl, K.L., Aver'yanov A.A. (2005): Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **328**, 130–136.
- Bakhuizen, R. (1988): *The plant cytoskeleton in the Rhizobium-legume symbiosis*. Ph.D. thesis. Leiden University, Nizozemsko.
- Barampuram, S., Zhang, Z.J. (2011): Recent advances in plant transformation. *Methods in Molecular Biology*. **701**, 1–35.

- Barbulova, A., Iancheva, A., Zhiponova, M., Vlahova, M., Atanassov, A. (2002): Establishment of embryogenic potential of economically important bulgarian alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. **16**, 55-63.
- Bardwell, A.J., Flatauer, L.J., Matsukuma, K., Thorner, J., Bardwell, L. (2001): A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 10374-10386.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F. (2006): Global gene expression in the *rhizobial*-legume symbiosis. *Symbiosis*. **42**, 1-24.
- Barsch, A., Carvalho, H.G., Cullimore, J.V., Niehaus, K. (2006): GC-MS based metabolite profiling implies three interdependent ways of ammonium assimilation in *Medicago truncatula* root nodules. *Journal of Biotechnology*. **127**, 79-83.
- Bartels, S., González Besteiro, M.A., Lang, D., Ulm, R. (2010): Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science*. **15**, 322-329.
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vypelová, P., Ovečka, M., Luptovciak, I., Illés, P., Kuchařová, A., Šamaj, J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-TagTM in various plants. *Frontiers in Plant Science*. **6**, 336.
- Berson, T., von Wangenheim, D., Takáč, T., Šamajová, O., Rosero, A., Ovečka, M., Komis, G., Stelzer, E.H., Šamaj, J. (2014): Trans-Golgi network localized small GTPase RabA1d is involved in cell plate formation and oscillatory root hair growth. *BMC Plant Biology*. **14**, 252.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*. **12**, 8711-8721.
- Bingham, E.T. (1991): Registration of alfalfa hybrid Regen-SY germplasm for tissue culture and transformation research. *Crop Science*. **31**, 1098.
- Blondon F., Marie D., Brown S., Kondorosi, A. (1994): Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*. **37**, 264-270.
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pallaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H., Heberle-Bors, E., (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell*. **11**, 101-114.
- Bogre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1997): Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase Pathway. *Plant Cell*. **9**, 75-83.
- Bolton, G.W., Nester, E.W., Gordon, M.P. (1986): Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science*. **232**, 983-985.
- Bouton J. H. (2012): Breeding lucerne for persistence. *Crop & Pasture Science* **63**, 95-106
- Boyer, J.S. (1982): Plant productivity and environment. *Science*. **218**, 443-448.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
- Brederode, F.T., Linthorst, H.J., Bol, J.F. (1991): Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology*. **17**, 1117-1125.
- Brewin, N.J. (2004): Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **23**, 293-316.
- Brown, D., Atanassov, A. (1985): Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ*. **4**, 111-222.
- Burgess, B.K., Lowe, D.J. (1996): Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chemical Reviews*. **96**, 2983-3012.
- Bytebier, B., Deboeck, F., DeGrave, H., van Montagu, M., Hernalsteens, J-P. (1987): T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA, **84**, 5345-5349.

- Cardenas, L., Thomas-Oates, J.E., Nava, N., López-Lara, I.M., Hepler, P.K., Quinto, C. (2003): The role of nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16**, 326–334.
- Cardenas, L., Vidali, L., Dominguez, J., Perez, H., Sanchez, F., Hepler, P. K. Quinto, C. (1998): Rearrangements of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiology*. **116**, 871–877.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., Hirt, H. (2000): Differential Activation of Four Specific MAPK Pathways by Distinct Elicitors. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(47), 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.
- Cargnello, M., Roux, P.P. (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **75**, 50–83.
- Cebadera, E., Camara, M. (2007): Plants as biofactories: Edible vaccines production. *Journal of Biotechnology*. **131**, 43–47.
- Citovsky, V., De Vos, G., Zambryski, P. (1988): A novel single stranded DNA binding protein, encoded by the virE locus, is produced following activation of the *A. tumefaciens* T-DNA transfer process. *Science*. **240**, 501–504.
- Citovsky, V., Wong, M.L., Zambryski, P. (1989) Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 1193–1197.
- Clark, A.J., Harold, G., Yull F.E. (1997): Mammalian cDNA and prokaryotic reporter sequences silence adjacent transgenes in transgenic mice. *Nucleic Acids Research*. **25**, 1009–1014.
- Clough, S.J., Bent, A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. **16**, 735–743.
- Crossway, A., Oakes, J.W., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., Shewmaker, C.K. (1986): Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics*. **202**, 179–185.
- D'Halluin, K., Bonne, E., Bossut, M., De Beuckeleer, M., Leemans, J. (1992): Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell*. **4**, 1495–1505.
- Das, A. (1988): *Agrobacterium tumefaciens* virE operon encodes a single-stranded DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**, 2909–2913.
- Das, R., Pandey, G.K. (2010): Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Current Genomics*. **11**, 2–13.
- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B., Lowe, K.C. (2005): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*. **23**, 131–171.
- de Bruijn, F.J., Rossbach, S., Schneider, M., Ratet, P., Messmer, S., Szeto, W.W., Ausubel, F.M., Schell, J. (1989): *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*, **171**, 1673–1682.
- de Ruijter, N.C.A., Bisseling, T., Emons, A.M.C. (1999): *Rhizobium* Nod factors induce an increase in subapical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **12**, 829–832.
- Deasey, M.C, Matthysse, A.G. (1984): Interactions of wild-type and a cellulose-minus mutant of *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco mesophyll and tobacco tissue culture cells. *Phytopathology*. **74**, 991–994.
- Dekeyser, R.A., Claes, B., De Rycke, R., Habets, M.E., Van Montagu, M.C., Caplan, A.B. (1990): Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell*. **2**, 591–602.

- Dénarié, J., Debelle, F., Promé, J.-C. (1996): *Rhizobium* lipochitoooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. **65**, 503-535.
- Deshayes, A., Herrera-Estrella, L., Caboche, M. (1985): Liposome mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *EMBO Journal*. **4**, 2731-2737.
- Dos Santos, P.C., Smith, A.D., Frazzon, J., Cash, V.L., Johnson, M.K., Dean, D.R. (2004): Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 19705-19711.
- Doty, S.L., Yu, M.C., Lundin, J.I., Heath, J.D., Nester, E.W. (1996): Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **178**, 961-970.
- Dunahay, T.G. (1993): Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *BioTechniques*. **15**, 452-460.
- Durenberger, F., Cramer, A., Hohn, B., Koukolikova-Nicola, Z. (1989): Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 9154-9158.
- Dye, F., Berthelot, K., Griffon, B., Delay, D., Delmotte, F.M. (1997): Alkylsyringonoides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Biochimie*. **79**, 3-6.
- Esseling, J.J., Emons, A.M. (2004): Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. *Journal of Microscopy*. **214**, 104-113.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F.G., Emons, A.M. (2003): Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiology*. **132**, 1982-1988.
- Fennell, A., Hauptmann, R. (1992): Electroporation and PEG delivery of DNA into maize microspores. *Plant Cell Reports*. **11**, 567-570.
- Fernandez-Pascual, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Boscá, L., Hirt, H., Golvano, M. P. (2006): Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *Journal of Experimental Botany*. **57**, 2735-2742.
- Filichkin, S.A., Gelvin, S.B. (1993): Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. *Molecular Microbiology*. **8**, 915-926.
- Fischer, H.M. (1994): Genetic regulation of nitrogen fixation in *rhizobia*. *Microbiological Reviews*. **58**, 352-386.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R.M. (2004): Plant based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*. **7**, 152-158.
- Foucher, F., Kondorosi, E. (2000): Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology*. **43**, 773-786.
- Frame, B.R., Drayton, P.R., Bagnall, S.V., Lewnau, C.J., Bullock, W.P., Wilson, H.M., Dunwell, J.M., Thompson, J.A., Wang, K. (1994): Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant Journal*. **6**, 941-948.
- Gad, A.E., Rosenberg, N., Altman, A. (1990): Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiologia Plantarum*. **79**, 177-183.
- Gage, D.J. (2002): Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. **184**, 7042-7046.
- Gage, D.J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**, 280-300.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S., Fink, G.R. (1999): Ploidy regulation of gene expression. *Science*. **285**, 251-254.

- Gaudet, P., Livstone, M.S., Lewis, S.E., Thomas, P.D. (2011): Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*. **12**(5), 449–462.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. **48**, 909-930.
- Glazebrook, J., Walker, G.C. (1989): A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell*. **56**, 661–672.
- Gomi, K., Ogawa, D., Katou, S., Kamada, H., Nakajima, N., Saji, H., Soyano, T., Sasabe, M., Machida, Y., Mitsuhara, I., Ohashi, Y., Seo, S. (2005): A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant Cell Physiology*. **46**, 1902-1914.
- Gordon-Kamm, W., Dilkes, B., Lowe, K., Hoerster, G., Sun, X., Ross, M., Church, L., Bunde, Ch., Farrell, J., Hill, P., Maddock, S., Snyder, J., Sykes, L., Li, Z., Woo, Y., Bidney, D., Larkins, B.A. (2002): Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**, 11975–11980.
- Gould, J., Devery, M., Hasegawa, O., Ulian, E.C., Peterson, G., Smith, R.H. (1991): Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiology*. **95**, 426–434.
- Graves, A. C.F., Goldman, S.L. (1986): The transformation of *Zea mays* seedlings with *A. tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*. **7**, 43–50.
- Griesbach, R.J. (1987) Chromosome-mediated transformation via microinjection. *Plant Science*. **50**, 69-77.
- Grimsley, N., Hohn, T., Davies, J.W., Hohn, B. (1987): *Agrobacterium* mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature*. **325**, 177–179.
- Guo, J., Wang, S., Wang, J., Huang, W.D., Liang, J., Chen, J.G. (2009): Dissection of the relationship between RACK1 and heterotrimeric G-proteins in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. **50**, 1681–1694.
- Gupta, M., Sharma, P., Sarin, N.B., Sinha, A.K. (2009): Differential response of arsenic stress in two varieties of *Brassica juncea* L. *Chemosphere*. **74**, 1201-1208.
- Hadiarto, T., Nanmori, T., Matsuoka, D., Iwasaki, T., Sato, K., Fukami, Y., Azuma, T., Yasuda, T. (2006): Activation of *Arabidopsis* MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1–AtMEK1 pathway by wounding. *Planta*. **223**, 708–713.
- Hansen, G., Chilton, M.D. (1996): “Agrolistic“ transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**,14978–14983.
- Harrison, J., Pou de Crescenzo, M.A., Sene, O., Hirel, B. (2003): Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*? *Plant Physiology*. **133**, 253–262.
- Heidstra, R., Yang, W.C., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, A.M., van Kammen, A., Bisseling, T. (1997): Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*–legume interaction. *Development*. **124**, 1781–1787.
- Herrera-Estrella, A., Chen, Z-M., Van Montagu, M., Wang, I.C. (1988): VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA-protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules. *EMBO Journal*. **7**, 4055-4062.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*. **6**, 271-282.

- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R. A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature*. **303**, 179-180.
- Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M. (1994): The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology*. **32**, 157-79.
- Hord, C.L., Sun, Y.J., Pillitteri, L.J., Torii, K.U., Wang, H., Zhang, S., Ma, H. (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant*. **1**, 645–658.
- Howard, E., Citovsky, V. (1990): The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. *BioEssays*. **12**, 103–108.
- Howard, E.A., Winsor, B.A., De Vos, G., Zambryski, P. (1989): Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand-protein complex: tight association of VirD2 with the 5' ends of T-strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 4017-21.
- Huang, G.T., Ma, S.L., Bai, L.P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J. Zhong, M., Guo, Z.F. (2012): Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*. **39**, 969–987.
- Huang, S., Gilbertson, L.A., Adams, T.H., Malloy, K.P., Reisenbigler, E.K., Birr, D.H., Snyder, M., Zhang, Q., Luethy, M. (2004): Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Research*. **13**, 451–461.
- Huang, T.L., Huang, H.J. (2008): ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. *Chemosphere*. **71**, 1377–1385.
- Hunold, R., Bronner, R., Hahne, G. (1994): Early event in microprojectile bombardment, cell viability and particle location. *Plant Journal*. **5**, 593–604.
- Hwang, H.H., Yu, M., Lai, E.M. (2017): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*. **15**, 0186
- Cheng, M., Lowe, B.A., Spencer, T.M., Ye, X., Armstrong, C. L. (2004): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. **40**, 31–45.
- Cheng, Z., Li, J.F., Niu, Y., Zhang, X.C., Woody, O.Z., Xiong, Y., Djonović, S., Millet, Y., Bush, J., McConkey, B.J., Sheen, J., Ausubel, F.M. (2015): Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature*. **521**, 213–216.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. (2007): Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*. **12**, 444–451.
- Choi, G.J. (1997): Silicon carbide fibers from copolymers of commercial polycarbosilane and silazane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **3**, 223-228.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S.K. (2013): Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. **8**, e23681.
- Christie, P.J. (1997): *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in *Eubacteria*. *Journal of Bacteriology*. **179**, 3085-3094.
- Christie, P.J., Ward, J.E., Winans, S.C., Nester, E.W. (1988): The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *Journal of Bacteriology*. **170**, 2659-2667.
- Chumakov, M.I., Rozhok, N.A., Velikov, V.A., Tyrnov, V.S., Volokhina, I.V. (2006): *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments. *Genetika*. **42**, 1083–1088.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., Shinozaki, K. (1998): Isolation of ATMEKK1 (a MAP Kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **253**, 532-543.

- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal*. **24**, 655-665.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends in Plant Science*. **7**, 301-308.
- Illes, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluska, F., Ovecka, M. (2006): Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*. **57**, 4201-13.
- Ingelbrecht, I.L., Herman, L.M., Dekeyser, R.A., Van Montagu, M.C., Depicker, A.G. (1989): Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell*. **1**, 671-680.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S.H., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. (1996): High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*. **14**, 745-750.
- Ivanov, S., Fedorova, E., Bisseling, T. (2010): Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Current Opinion in Plant Biology*. **13**, 372-377.
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., Leonhardt, N., Ellis, B.E., Murata, Y., Kwak, J.M. (2009): MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 20520-20525.
- Jin, S., Song, Y-N., Deng, W-Y., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1993): The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology*. **175**, 6830-6835.
- Jin, T., Chang, Q., Li, W., Yin, D., Li, Z., Wang, D., Liu, B., Liu, L. (2010): Stressinducible expression of *GmDREB1* conferred salt tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Tissue Organ*. **100**, 219-227.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1996): Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 11274-11279.
- Jonak, C., Nakagami, H., Hirt, H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology*. **136**, 3276-3283.
- Jonak, C., Pay, A., Bogre, L., Hirt, H., Heberle-Bors, E. (1993): The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organspecific manner. *The Plant Journal*. **3**, 611-617.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C. (2007): How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*. **5**, 619-633.
- Jones-Villeneuve, E., Huang, B., Prudhome, I., Bird, S., Kemble, R., Hattori, J., Miki, B. (1995): Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **40**, 97-100.
- Kaeppler, H., Gu, W., Somers, D.A., Rines, H.W., Cockburn, A.F. (1990): Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports*. **9**, 415-418.

- Kaeppler, H., Somers, D.A., Rines, H.W., Cockburn, A.F. (1992): Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theoretical and Applied Genetics*. **84**, 560-566.
- Kahn, M.L., McDermott, T.R., Udvardi, M.K. (1998): Legume Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. In: *The Rhizobiaceae*. (Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J., eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 461-485.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, I., Hirt, H., Meskiene, I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell*. **12**, 2247-2258.
- Kim, T.W., Michniewicz, M., Bergmann, D.C., Wang, Z.Y. (2012): Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature*. **482**, 419-422.
- Klöti, A., Iglesias, V.A., Wünn, J., Burkhardt, P.K., Datta, S.K., Potrykus, I. (1993): Gene transfer by electroporation into intact scutellum cells of wheat embryos. *Plant Cell Reports*. **12**, 671-675.
- Knusen, S., Müller, M. (1991): Transformation of the developing endosperm by particle bombardment. *Planta*. **185**, 330-336.
- Komis, G., Illés, P., Beck, M., Šamaj, J. (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. **14**, 650-657.
- Komis, G., Šamaj, J. (2014): Plant MAP Kinases. Methods and Protocols., Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-1-4939-0921-6, 266 stran.
- Komis, G., Šamajová, O., Ovecka, M., Šamaj, J. (2018): Cell and developmental biology of plant mitogen-activated protein kinases. *Annual Review of Plant Biology*. **69**, 237-265.
- Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., Kawaguchi, M. (2010): How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiology*. **51**, 1381-1397.
- Kovalčíková Z. (2017): Podíl mitogen-aktivovaných proteinkináz (MAPK) na signalizaci biotických interakcí u vojtěšky. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 2940-2945.
- Koziel, G.M., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M. Evola, S.V. (1993): Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*. **1**, 194-200.
- Lawton, M.A., Lamb, C.J. (1987): Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular and Cellular Biology*. **7**, 335-341.
- Leborgne-Castel, N., Bouhidel, K. (2014): Plasma membrane protein trafficking in plant-microbe interactions: a plant cell point of view. *Frontiers in Plant Science*. **5**, 735.
- Lee, H.K., Cho, S.K., Son, O., Xu, Z., Hwang, I., Kim, W.T. (2009): Drought stress-induced RmalH1, a RING membrane anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*.; **21**, 622-641.
- Lee, J.S., Ellis, B.E. (2007): *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry*. **282**, 25020-25029.
- Lee, J.S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, M.M., McAbee, J.M., Sarikaya, M., Tamerler, C., Torii, K.U. (2012): Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes & Development*. **26**, 126-136.

- Lee, K., Dudley, M.W., Hess, K.M., Lynn, D.G., Joerger, R.D., Binns, A.N. (1992): Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes: identification of phenol binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**, 8666-8670.
- Lee, Y-W., Jin, S., Sim, W-S., Nester, E.W. (1995): Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 12245-12249.
- Lessard, P.A., Kulaveerasingam, H., York, G.M., Strong, A., Sinskey, A.J. (2002): Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering*. **4**, 67-79.
- Li, K., Yang, F.B., Zhang, G.Z., Song, S.F., Li, Y., Ren, D.T., Miao, Y.C., Song, C.P. (2017): AIK1, A mitogen-activated protein kinase, modulates abscisic acid responses through the MKK5-MPK6 kinase cascade. *Plant Physiology*. **173**, 1391–1408.
- Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H., Zhu, J.K. (2008): The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*. **20**, 2238-2251.
- liberaldictionary.com: <https://www.liberaldictionary.com/wp-content/uploads/2018/12/root-nodule.jpg> (22.4. 2020)
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D. (1997): Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*. **276**, 2054–2057.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., Geurts, R. (2003): LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, **302**, 630-633.
- Lindsey, K. Jones, M.G.K. (1987): Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugar beet. *Plant Molecular Biology*. **10**, 43-52.
- Liu, X.M., Kim, K.E., Kim, K.C., Nguyen, X.C., Han, H.J., Jung, M.S., Kim, H.S., Kim, S.H., Park, H.C., Yun, D.J., Chung, W.S. (2010): Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry*. **71**, 614–8
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A., Poole, P.S. (2003): Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Nature*. **422**, 722–726.
- Long, S. R. (1996): *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell*. **8**, 1885-1898.
- Lörz, H., Paszkowski, J., Dierks-Ventling, C., Potrykus, I. (1981): Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. *Physiologia Plantarum*. **53**, 385-391.
- Łotocka, B., Kopcińska, J., Skalniak, M. (2012): Review article: The meristem in indeterminate root nodules of *Faboideae*. *Symbiosis*. **58**, 63–72.
- Ludwig, A.A., Romeis, T., Jones, J.D. (2004): CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*. **55**, 181–188.
- Lumbreras, V., Vilela, B., Irar, S., Solé, M., Capellades, M., Valls, M., Coca, M., Pagès, M. (2010): MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *Plant Journal*. **63**, 1017-1030.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003): A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*. **425**, 637-640.
- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **444**, 139–158.
- Maia, J., Dekkers, B.J., Provart, N.J., Ligterink, W., Hilhorst, H.W. (2011): The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS One*. **6**, e29123.
- Manik, S.M.; Shi, S.; Mao, J.; Dong, L.; Su, Y.; Wang, Q.; Liu, H. (2015): The calcium sensor CBL-CIPK is involved in plant's response to abiotic stresses. *International Journal of Genomics*. **4**, 1-10.

- Matthysse, A.G. (1983): Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Journal of Bacteriology*. **154**, 906–915.
- Matthysse, A.G. (1986): Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Critical Reviews in Microbiology*. **13**, 281–307.
- Matthysse, A.G. (1987): Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **169**, 313–323.
- Matthysse, A.G. (1995): Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **177**, 1069–1075.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V., Gurlitz, R.H.G. (1981): Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *Journal of Bacteriology*. **145**, 583–595.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V., Gurlitz, R.H.G. (1982): Binding of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot protoplasts. *Physiological Plant Pathology*. **20**, 27–33.
- Matthysse, A.G., Thomas, D.L., White, A.R. (1995): Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **177**, 1076–1081.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J., Matzke, J.M. (1989): Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO Journal*. **8**, 643–649.
- McLean, B.G., Greene, E.A., Zambryski, P.C. (1994): Mutants of *Agrobacterium* VirA that activate the vir gene expression in the absence of the inducer acetosyringone. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 2645–2651.
- Melchers, L.S., Regensburg-Tuink, A.J.A., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J.J. (1989): Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Molecular Microbiology*. **3**, 969–977.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2006): Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 5230–5235.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Ellis, B.E. (2009): Suppression of MKK5 reduces ozone-induced signal transmission to both MPK3 and MPK6 and confers increased ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*. **4**, 687–692.
- Miller, D.D., de Ruijter, N.C. A., Bisseling, T., Emons, A.M.C. (1999): The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochitoooligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal*. **17**, 141–154.
- Miller, M., Tagliani, L., Wang, N., Berka, B., Bidney, D. (2002): High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Research*. **11**, 381–396.
- Mishra, N.S., Tuteja, R., Tuteja, N. (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **452**, 55–68.
- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. **7**, 405–410.
- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P. (2012): How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*. **37**, 118–125.
- Miura, K., Okamoto, H., Okuma, E., Shiba, H., Kamada, H., Hasegawa, P.M., Murata, Y. (2013): SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. **73**, 91–104.
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki, K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal

- protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 765-769.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Yoshida, R., Shinozaki, K. (2000): MAP kinase cascades in *Arabidopsis*: their roles in stress and hormone responses. In: *Results and Problems in Cell Differentiation: MAP Kinases in Plant Signal Transduction*. (Hirt, H., ed.), Heidelberg, Springer, 29-38.
- Morikawa H., Yamada Y. (1985): Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant Cell Physiology*. **26**, 229-236.
- Morris, J.W., Morris, R.O. (1990): Identification of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene inducer from the pinaceous gymnosperm *Pseudotsuga menziesii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**, 3614-3618.
- Müller, J., Beck, M., Mettbach, U., Komis, G., Hause, G., Menzel, D., Šamaj, J. (2010): *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal*. **61**, 234–248.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I.I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., Hirt, H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant Journal*. **20**, 381-388.
- Munns, R., Tester, M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. **59**, 651–681.
- Murashige, T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**, 473-497.
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling T. (1995): Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*. **7**, 869-885.
- Mysore, K.S., Nam J, Gelvin, S.B. (2000): An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 948–953.
- Nakagami, H., Kiegerl, S., Hirt, H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 26959–26966.
- Newell, C.A. (2000): Plant transformation technology. Developments and applications. *Molecular Biotechnology*. **16**, 53–65.
- Nofouzi, F., Çağrı Oğuz, M., Khabbazi, S.D., Ergül, A. (2019): Improvement of the in vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Medicago sativa* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. **43**, 96-104
- Nongpiur, R., Soni, P., Karan, R., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A. (2012): Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signaling & Behavior*. **7**, 1230-1237.
- Oldroyd, G.E., Downie, J.A. (2004): Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **5**, 566–576.
- Oldroyd, G.E.D. (2007): Nodules and hormones. *Science*. **315**, 52-53.
- Opdenakker, K., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012): Mitogen-activated protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. **13**, 7828–7853.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., Udvardi, M.K. (2005): Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*. **15**, 531–535.
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., Hirt, H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO Journal*. **22**, 1282–1288.

- Ovečka, M., Takáč, T., Komis, G., Vadovič, P., Bekešová, S., Doskočilová, A., Smékalová, V., Luptovčiak, I., Samajová, O., Schweighofer, A., Meskiene, I., Jonak, C., Křenek, P., Lichtscheidl, I., Škultéty, L., Hirt, H., Šamaj, J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. **65** (9), 2335-2350.
- Parrott, A., Durham, E., Bailey, A. (1995): Somatic embryogenesis of leguems. In: *Biotcclmology in Agriculture and Forestry, Somatic Embryoigenesis and Synthetic Seeds II*, (Y.P.S. Bajaj, Ed.), SprigerVerlag, Berlin, Vol. 31, 199-227.
- Pathirana, S., Samac, D.A., Roeven, R., Vance, C.P., Gantt, S.J. (1997): Analyses of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expression in alfalfa. *Plant Journal*. **12**, 293–304.
- Peck, M.C., Fisher, R.F., Long, S.R. (2006): Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. **188**, 5417–5427.
- Pellock, B.J., Cheng, H.P., Walker, G.C. (2000): Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology*. **182**, 4310-4318.
- Pereira, L.F., Erickson, L. (1995): Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*. **14**, 290-293.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**, 180–201.
- Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., Hirt, H. (2009a): A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular Plant*. **2**, 120–137.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H. (2009b): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*. **12**, 421–426.
- Poole, P., Allaway, D. (2000): Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Advances in Microbial Physiology*. **43**, 117–163.
- Popp, C., Ott, T. (2011): Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. **14**, 458–467.
- Prell, J., Poole, P. (2006): Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*. **14**, 161–168.
- Ramaiah, S.M., Skinner, D.Z. (1997): Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science*. **73**, 674-682.
- Randuška D., Šomšák L., Háberová I. (1986): Barevný atlas rostlin. 3. Vydání (2. čes. opr. vyd.). Obzor: Bratislava. ISBN 65-010-86, 640 stran.
- Rao, K.P., Vani, G., Kumar, K., Wankhede, D.P., Misra, M., Gupta, M., Sinha, A.K. (2011): Arsenic stress activates MAP kinase in rice roots and leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **506**, 73–82.
- Rasmussen, M.W., Roux, M., Petersen, M., Mundy, J. (2012): MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science*. **3**, 169.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*. **9**, 308-345.
- Robertson, J.G., Lyttleton, P. (1984): Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *Journal of Cell Science*. **69**, 147–157.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., Mundy, J. (2010): Mitogenactivated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **61**, 621-649.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. Willmitzer, L. (1989): Both developmental and metabolic signals activate the promoter of class I patatin gene. *EMBO Journal*. **8**, 23-29.
- Rommens, C.M., Humara, J.M., Ye, J., Yan, H., Richael, C., Zhang, L., Perry, R., Swords, K. (2004): Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiology*. **135**, 421–431.

- Ronson, C.W., Lyttleton, P., Robertson, J.G. (1981): C(4)-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **78**, 4284–4288.
- Rose, R.J. (2008): *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Functional Plant Biology*. **35**, 253-264.
- Samac, D.A., Austin-Phillips, S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In: *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology* (Wang, K., Ed.), Totowa, New Jersey, Springer, Vol. 343, 301–311.
- Samac, D.A., Dornbusch M., Tesfaye, M., Purev, S., Temple, S. J. (2004): A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*. **13**, 349–361.
- Samac, D.A., Smigocki, A.C. (2003): Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*). *Phytopathology*. **93**, 799–804.
- Samac, D.A., Temple, S.J. (2004): Development and utilization of transformation in *Medicago* species. In: *Genetically Modified Crops: Their Development, Uses, and Risks* (Liang, G. H., Skinner, D. Z., eds.), Haworth Press, New York, 165–202.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., Allen, N. (1987): Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. *Journal Particulate Science and Technology*. **5**, 27-37.
- Sangwan, V., Dhindsa, R.S. (2002): In vivo and in vitro activation of temperature-responsive plant map kinases. *FEBS Letters*, **531**, 561–564.
- Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R.S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal*. **31**, 629-638.
- Saruul, P., Sreinc, F., Somers, D.A., Samac, D.A. (2002): Production of a biodegradable plastic polymer, poly- β -hydroxybutyrate, in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Crop Science*. **42**, 919–927.
- Sasabe, M., Machida, Y. (2012): Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton*. **69**, 913–918.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., Ohashi, Y. (1995): Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science*. **270**, 1988-1992.
- Shanmugaraj, B.M., Chandra, H.M., Srinivasan, B., Ramalingam, S. (2013): Cadmium induced physio-biochemical and molecular response in *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*. **15**, 206–218.
- Sheikholeslam, S.N., Weeks, D.P. (1987): Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*. **8**, 291-298.
- Shen, H., Liu, C., Zhang, Y., Meng, X., Zhou, X., Chu, C., Wang, X. (2012): OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*. **80**, 241-253.
- Sheng, J., Citovsky, V. (1996): *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *Plant Cell*. **8**, 1699-1710.
- Shi, L., Twary, S.N., Yoshioka, H., Gregerson, R.G, Miller, S.S, Samac, D.A., Gantt, J.S., Unkefer, P.J., Vance, C.P. (1997): Nitrogen assimilation in alfalfa: Isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark adapted leaves. *Plant Cell*. **9**, 1339–1356.
- Shurvinton, C.E., Hodges, L., Ream, W. (1992): A nuclear localization signal and the C-terminal omega sequence in the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 endonuclease are important for tumor formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**, 11837–11841.

- Schauer, T. (2007): Svět rostlin: 1150 květin, trav, travin, stromů a keřů střední Evropy. 1. Vydání. Rebo: Čestlice, 2007. ISBN 978-80-7234-711-7, 496 stran.
- Scheiffele, P., Pansegrau, W., Lanka, E. (1995): Initiation of *Agrobacterium* T-DNA processing. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 1269–1276.
- Schultze, M., Kondorosi, A. (1998): Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*. **32**, 33-57.
- Sieberer, B.J., Ketelaar, T., Esseling, J.J., Emons, A.M. (2005a): Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist*. **167**, 711–719.
- Sieberer, B.J., Timmers, A.C., Emons, A.M. (2005b): Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **18**, 1195–1204.
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., Tuteja, N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. **6**, 196-203.
- Smeets, K., Opdenakker, K., Remans, T., Forzani, C., Hirt, H., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2013): The role of the kinase OXI1 in cadmium- and copper-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*. **36**, 1228–1238.
- Smeets, K., Opdenakker, K., Remans, T., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., Semane, B., Horemans, N., Guisez, Y., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2009): Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *Journal of Plant Physiology*. **166**, 1982–1992.
- Smékalová, V., Doskočilová, A., Komis, G., Šamaj, J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances*. **32**, 2-11.
- Solanke, A.U., Sharma, A.K. (2008): Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. **14**, 69–79.
- Song, Y-N., Shibuta, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U. (1990): Hydroxyacetosyringone is the major virulence gene activating factor in *Belladonna* hairy root cultures, and inositol enhances its activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **38**, 2063-2065.
- Songstad, D.D., Somers, D.A., Griesbach, R.J. (1995): Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. **40**, 1-15.
- Sorokin, A.P., Ke, X., Chen, D., Elliott, M.C. (2000): Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Science*. **156**, 227–233.
- Spaink, H. P. (1996): Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **15**, 559-582.
- Spencer, P.A., Towers, G.H.N. (1988): Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry*. **27**, 2781-2785.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. **318**, 624-629.
- Stachel, S.E., Nester, E.W., Zambryski, P.C. (1986): A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **83**, 379-383.
- Stachel, S.E., Zambryski, P.C. (1986): virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell*. **46**, 325-333.
- Su, J., Xu, J., Zhang, S. (2015): RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends in Plant Science*. **20**, 405–407.
- Su, S.H., Suarez-Rodriguez, M.C., Krysan, P. (2007): Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations *mekk1* and *mpk4* suggests signaling pathway complexity. *FEBS Letters*. **581**, 3171–3177.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*. **35**, 259–270.

- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., Mittler, R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. **14**, 691–699.
- Šamaj, J., Ovečka, M., Hlavačka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., Baluska, F., Hirt, H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip-growth. *EMBO Journal*. **21**, 3296–3306.
- Šamajová, O., Komis, G., Šamaj, J. (2013a): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science*. **18**, 140–148.
- Šamajová, O., Plíhal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., Šamaj, J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118–128.
- Tabe, L.M., Wardley-Richardson, T., Ceriotti, A., Aryan, A., McNabb, W., Moore, A., Higgins, T.J. (1995): A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. *Journal of Animal Science*. **73**, 2752-2759.
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., Shinozaki, K. (2011): Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*. **41**, 649–60.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., Saito, H. (2005): Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Molecular Cell*. **18**, 295-306.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., Hirt, H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*. **15**, 141-152.
- Terzaghi, W.B., Cashmore, A.R. (1997): Plant cell transfection by electroporation. *Methods in Molecular Biology*. **62**, 453–462.
- Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P., Samac, D.A. (2001): Over-expression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiology*. **127**, 1836–1844.
- Theocharis, A., Clement, C., Barka, E.A. (2012): Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. **235**, 1091–1105.
- Timmers, A.C.J., Auriac, M.C., Truchet, G. (1999): Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium–Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*. **126**, 3617-3628.
- Tohidfar, M., Zare, N., Jouzani, G.S., Eftekhari, S.M. (2012): *Agrobacterium* mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic *cry3a* gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Plant Cell Tissue Organ*. **113**, 227-235.
- Trepp, G.B., van de Mortel, M., Yoshioka, H., Miller, S.S., Samac, D.A., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1999): NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules: Genetic regulation and cellular expression. *Plant Physiology*. **119**, 817–828.
- Trieu, A.T., Burleigh, S.H., Kardailsky, I.V., Maldonado-Mendoza, I.E., Versaw, W.K., Blaylock, L.A., Shin, H., Chiou, T.J., Katagi, H., Drewbre, G.R., Weigel, D., Harrison, M.J. (2000): Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal*. **22**, 531–541.
- Trinh, T.H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamate, K., Bauer, P., Kondorosi, A. (1998): Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. **17**, 345–355.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.-C., Dénarié, J. (1991): Sulfated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*. **351**, 670-673.

- Tsugama, D., Liu, S., Takano, T. (2012): Drought-induced activation and rehydration-induced inactivation of MPK6 in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **426**, 626–629.
- Turk, S.C., van Lange, R.P., Regensburg-Tuink, T.J.G., Hooykaas, R.J.J. (1994): Localizatum of the VirA domain involved in acetosyringone-mediated vir gene induction in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*. **25**, 899-907.
- Tzfira, T., Citovsky, V. (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**. 147-154.
- Tzfira, T., Vaidya, M., Citovsky, V. (2004): Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature*. **431**, 87-92.
- Ullah, A.H., Sethumadhavan, K., Mullaney, E.J., Ziegelhoffer, T., Austin-Phillips, S. (2002): Cloned and expressed fungal phyA gene in alfalfa produces a stable phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **290**, 1343–1348.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., Paszowski, J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO Journal*. **21**, 6483-6493.
- Umbrasaitė, J., Schweighofer, A., Kazanavičiūtė, V., Magyar, Z., Ayatollahi, Z., Unterwurzacher, V., Choopayak, C., Boniecka, J., Murray, J.A., Bogre, L., Meskiene, I. (2010): MAPKphosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in *Arabidopsis*. *PLoS one*. **5** (12), e15357.
- Urbiš, P. (2018): Test rezistence transgenních rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) vůči abiotickému stresu. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.
- Usami, S., Okamoto, S., Takebe, I., Machida, Y. (1988): Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression is present in monocotyledonous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**, 3748-3752.
- Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., Van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W. (1992): Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*. **257**, 70-72.
- Van Eck, J.M., Blowers, A.D., Earle, E.D. (1995): Stable transformation of tomato cell cultures after bombardment with plasmid and YAC DNA. *Plant Cell Reports*. **14**, 299–304.
- Van Spronsen, P.C., Van Brussel, A.A.N., Kijne, J.W. (1995): Nod factors produced by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* induce ethylene-related changes in root cortical cells of *Vicia sativa* ssp. *nigra*. *European Journal of Cell Biology*. **68**, 463-469.
- van Wordragen, M.F., Dons, H.J.M. (1992): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Molecular Biology Reporter*. **10**, 12–36.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., Truchet, G. (1990): Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*. **172**, 4295-4306.
- Vassileva, V.N., Kouchi, H., Ridge, R.W. (2005): Microtubule dynamics in living root hairs: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals. *Plant Cell*. **17**, 1777–1787.
- Vega, J.M., Yu, W., Kennon, A., Chen, X., Zhang, Z. (2008): Improvement of *Agrobacterium* mediated transformation in Hi-maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reports*. **27**, 297–305.
- Vladimir, S., Gilbertson, L., Aday, P., Duncan, D. (2006): *Agrobacterium* mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Reports*. **25**, 320–328.
- Voigt, B., Timmers, A. C., Šamaj, J., Müller, J., Baluška, F., Menzel, D. (2005): GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Eur. Journal of Cell Biology*. **84**, 595–608.
- Wang, J., Ding, H., Zhang, A., Ma, F., Cao, J., Jiang, M. (2010): A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. *Journal of Integrative Plant Biology*. **52**, 442–452

- Wang, K. (2006): *Agrobacterium* Protocols, Second Edition, Volume 1, Methods in molecular biology; 343, *Humana Press Inc.*, ISBN 1-58829-536-2, 508 stran.
- Wang, K., Drayton, P., Frame, B., Dunwell, J., Thompson, J.A. (1995) Whisker-mediated plant transformation: an alternative technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. **31**, 101-104.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. **218**, 1–14.
- Ward, E.R., Barnes, W.M. (1988): VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science*. **242**, 927-930.
- Wasson, A.P., Pellerone, F.I., Mathesius, U. (2006): Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by *rhizobia*. *Plant Cell*. **18**, 1617–1629.
- Weeks, J.T., Ye, J., Rommens, C.M. (2008): Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*. **17**, 587-597.
- Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences*. **23**, 481-485.
- Winans, S.C. (1991): An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Molecular Microbiology*. **5**, 2345-2350.
- Xing, Y., Cao, Q., Zhang, Q., Qin, L., Jia, W., Zhang, J. (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. **54**, 1217–1227.
- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., Ren, D. (2008): Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 26996–7006.
- Yacoubi, R., Job, C., Belghazi, M., Chaibi, W., Job, D., (2011): Toward Characterizing Seed Vigor in Alfalfa Through Proteomic Analysis of Germination and Priming. *Journal of Proteome Research*. **10**, 3891–3903.
- Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., Hayat, S. (2011): Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology*. **32**, 667–685.
- Yadava, P., Abhishek, A., Singh, R., Singh, I., Kaul, T., Pattanayak, A., Agrawal, P.K. (2017): Advances in maize transformation technologies and development of transgenic maize. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 1949.
- Yang, L., Kajiura, H., Suzuki, K., Hirose, S., Fujiyama, K., Takaiwa, F. 2008: Generation of a transgenic rice seed-based edible vaccine against house dust mite allergy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **365**, 334-339.
- Yao, Y., Liu, X., Li, Z., Ma, X., Rennenberg, H., Wang, X., Li, H. (2013): Drought-induced HO accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves. *Planta*. **238**, 217–227.
- Ye, Y., Li, Z., Xing, D. (2013): Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. *Plant, Cell & Environment*. **36**, 1–15.
- Yeh, C.M., Hsiao, L.J., Huang, H.J. (2004): Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant and Cell Physiology*. **45**, 1306–1312.
- Yeh, C.M., Chien, P.S., Huang, H.J. (2007): Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany*. **58**, 659–671.
- Yoshioka, H., Gregerson, R.G., Samac, D.A., Hoevens, K.C.M., Trepp, G., Gantt, J.S., Vance, C.P. (1999): Aspartate aminotransferase in alfalfa nodules: localization of mRNA during effective and ineffective nodule development and promoter analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **12**, 263–274.

- Young, C., Nester, E.W. (1988): Association of the virD2 protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **170**, 3367-3374.
- Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., Zhang, W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. **188**, 762–773.
- Zaltsman, A., Krichevsky, A., Kozlovsky, S.V., Yasmin, F., Citovsky, V. (2010a): Plant defense pathways subverted by *Agrobacterium* for genetic transformation. *Plant Signaling & Behavior*. **5**, 1245-1248.
- Zaltsman, A., Krichevsky, A., Loyter, A., Citovsky, V. (2010b): *Agrobacterium* induces expression of a host F-Box protein required for tumorigenicity. *Cell Host & Microbe*. **7**, 197-209.
- Zambryski P., (1997): Genetic manipulation of plants. In: *Exploring Genetic Mechanisms*. (Singer, M., Berg, P., eds.), University Science Books, Sausalito, California, 597-655.
- Zhang, H., Huang, Q.M., Su, J. (2010): Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Agricultural Sciences in China*. **9**, 170-178.
- Zhang, S., Klessig, D.F. (1998): The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 7225–7230.
- Zhang, S., Klessig, D.F. (2001): MAPK cascades in plant defence signalling. *Trends in Plant Science*. **6**, 520–527.
- Zhang, W., Wang, T. (2015): Enhanced salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) by *rstB* gene transformation. *Plant Science*. **234**, 110-118.
- Zhang-Hua, H., Jin-Qing, C., Guan-Ting, W., Wei, J., Chun-Xiu, L., Rui-Zhi, H., Fu-Lin, W., Zhi-Hong, L., Xiao-Yun, C. (2005): Highly efficient transformation and plant regeneration of tall fescue mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. **31**, 149-159.
- Zhao, Q., Guo, H.W. (2011): Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular Plant*. **4**, 626–634.
- Zhao, Z.Y., Gu, W., Cai, T., Tagliani, L.A., Hondred, D., Bond, D., Krell, S., Rudert, M.L., Bruce, W.B., Pierce, D.A. (1998): Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. **72**, 34–37.
- Zhou, C., Cai, Z., Guo, Y., Gan, S. (2009): An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology*. **150**, 167–177.
- Zhou, X.F., Jin, Y.H., Yoo, C.Y., Lin, X.L., Kim, W.Y., Yun, D.J., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Jin, J.B. (2013): CYCLIN H;1 regulates drought stress responses and blue light-induced stomatal opening by inhibiting ROS accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **162**, 1030-1041.
- Zhu, J., Dong, C.H., Zhu, J.K. (2007): Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**, 290–295.
- Zhu, J.K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **53**, 247-273.
- Zhu, X., Feng, Y., Liang, G., Liu, N., Zhu, J.K. (2013): Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca²⁺ dynamics in *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant*. **6**, 444–455.
- Ziegelhoffer, T.J., Will, J., Austin-Phillips, S. (1999): Expression of bacterial cellulase genes in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Molecular Breeding*. **5**, 309–318.
- Zuo, J.R., Niu, Q.W., Moller, S.G., Chua, N.H. (2001): Chemical regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology*. **19**, 157–161.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper O., Zambryski P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal*. **23**, 11-28.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová (z angl. abscisic acid)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
bp	pár bází (z angl. base pair)
BSA	hovězí (bovinní) sérový albumin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (z angl. complementary deoxyribonucleic acid)
dH₂O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty
DTT	dithiotreitol
ECL	elektro-chemiluminiscenční substrát
EDTA	kyselina 2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diyldinitrilo)tetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová
FABD2-GFP	fúzní protein – fúze N-terminálního konce GFP k C-terminálnímu konci AtFim1, zahrnující druhou aktin-vázající doménu (z angl. actin-binding domain 2)
gDNA	genomová deoxyribonukleová kyselina (z angl. genomic deoxyribonucleic acid)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
HAMK	tepelným šokem aktivovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (z angl. heat shock-activated MAPK)
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin]ethansulfonová
HKT	z angl. high-affinity potassium transporter
LB	médium pro kultivaci bakterií (z angl. Lysogeny broth)

LD	z angl. loading dye
LysM	doména (z angl. lysine motif)
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L ssp.
MAP2K	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasa
MAP3K	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasa
MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAPKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasa
MAPKKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasa
MEKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasa
MiliQ H₂O	purifikovaná voda technologií společnosti Millipore Corporation
MKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasa
MKP	MAPK fosfatasa
MMK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa z <i>Medicago sativa</i>
M-MLV	virus myši leukémie (z angl. moloney murine leukemia virus)
MPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
mRFP	červený fluorescenční protein monomer (z angl. red fluorescent protein monomer)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MS	Murashige and Skoog médium
NHX1	antiportér (z angl. sodium/hydrogen exchanger 1)
Nod	faktor nodulace
Obr.	obrázek
OD₆₀₀	optická hustota při 600 nm
OMTK1	z angl. oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1
P	fosfát
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol

pERK	fosfospecifická anti-pTEpY protilátka
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
pMAT	linie <i>A. thaliana</i> stabilně exprimující protein GFP
pTEpY	duální fosforylace Thr/Glu/Tyr regionu
PVDF	polyvinylidendifluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
RB	elektrodový pufr (z angl. running buffer)
RLK	receptorová kinasa (z angl. receptor-like kinase)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
RT	reverzní transkriptasa
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SAMK	stresem aktivovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasa
SDS	dodecylsírán sodný
SH	Schenk and Hildebrant médium
SIMK	solným stresem indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasa
SIMKK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasakinasa
SIPK	z angl. salicylic acid-induced protein kinase
SOS1	antiportér (z angl. salt overly sensitive 1)
T1	první generace po transformačním procesu
Tab.	tabulka
TBS-T	Tris-HCl solný pufr s přídavkem Tween 20 (z angl. tris buffered saline + Tween 20)
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina (z angl. transfer deoxyribonucleic acid)
T-D-Y	motiv threonin-asparagin-tyrozin

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
T-E-Y	motiv threonin-kyselina glutamová-tyrozin
Ti	tumor indukující (z angl. tumor inducing)
UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
VIP	z angl. VirE2 interacting protein
Vir	faktory virulence
WRKY	transkripční faktory (název odvozen od sekvence heptapeptidu WRKYGQK N-terminálního konce TF)