

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Produkcia a selekcia transgenných líní lucerny (*Medicago sativa* L.) k štúdiu cytoskeletu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Soňa Škodová**
Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové
inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.**
Rok: 2024

Vyhlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s uvedením všetkých použitých zdrojov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce v súlade so zákonom č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že na moju diplomovú prácu sa vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....
Podpis študenta

Pod'akovanie

„V prvom rade sa chcem poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce pánovi prof. Mgr. Miroslavovi Ovečkovi, Ph.D. za vedenie mojej práce, cenné rady, venovaný čas a celkovú podporu. Taktiež by som sa rada poďakovala celému kolektívu katedry biotechnológií za pomoc a usmerňovanie pri práci a predovšetkým Mgr. Kateřině Hlaváčkové, Ph.D. za cenné praktické rady a podporu pri práci v laboratóriu. V neposlednom rade ďakujem pánovi prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc., ako vedúcemu katedry za umožnenie využívať kvalitné laboratórne vybavenie pri spracovávaní práce. Práca bola podporená grantami IGA (IGA_PrF_2023_015) „Vliv hladiny stresem-indukované mitogen-aktivované protein kinasy na odolnost vojtěšky seté proti oxidativnímu stresu“ zo Študentskej grantovej súťaže na Univerzite Palackého v Olomouci.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Soňa Škodová
Názov práce	Produkcja a selekcia transgénnych línií lucerny (<i>Medicago sativa</i> L.) k štúdiu cytoskeletu
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Cytoskelet rastlín je komplexná trojdimenzionálna sieť, ktorá je zložená z aktínových mikrofilamentov, mikrotubulov a asociovaných proteínov. Organizácia a dynamika cytoskeletu sa neustále mení, čo zohráva dôležitú úlohu v regulácii vývojových procesov a v reakciách rastlín na podnety z vonkajšieho prostredia, vrátane stresových faktorov. Na jeho štúdium sú často využívané fluorescenčné proteíny, ktorých fúzia s cytoskeletálnymi komponentami zabezpečuje kvalitnú vizualizáciu. Cieľom tejto diplomovej práce bola produkcia, selekcia a validácia transgénnych línií *Medicago sativa* s expresiou molekulárnych markerov pre vizualizáciu cytoskeletu a zmapovanie jeho zmien v organizácii a usporiadaní v reakcii na soľný stres. Transformácia bola vykonaná prostredníctvom baktérií *A. tumefaciens*, pričom celý proces regenerácie transgénnych rastlín aj ich selekcie bol zdokumentovaný. Dvojité línie obsahujúce oba fluorescenčné cytoskeletálne markery neboli dosiahnuté. U získaných transgénnych rastlín bol cytoskelet mikroskopicky zmapovaný v rôznych rastlinných častiach a v transgénnych líniách GFP-FABD2 a tagRFP-TUA6 bol sledovaný vplyv soli na cytoskelet. Pre stanovenie usporiadania a orientácie aktínových mikrofilamentov a mikrotubulov v bunkách transgénnych rastlín bola vykonaná kvalitatívna a kvantitatívna analýza pomocou dostupných programov. Výsledky práce naznačujú problematické získavanie transgénnych línií lucerny s dvomi cytoskeletálnymi markermi a tiež väčší vplyv soľného stresu na mikrotubuly v porovnaní s aktínovými mikrofilamentami.

Kľúčové slova	<i>Medicago sativa</i> , cytoskelet, aktín, mikrotubuly, fluorescenčné markery, soľný stres, GFP-FABD2, tagRFP-TUA6
Počet strán	85
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Soňa Škodová
Title	Production and selection of transgenic alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) lines for study of the cytoskeleton
Type of thesis	Master
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

The plant cytoskeleton is a complex three-dimensional network that is composed of actin microfilaments, microtubules, and associated proteins. The organization and dynamics of the cytoskeleton play an important role in the regulation of developmental processes and responses of plants to stimuli from the external environment, including stress factors. Florescent proteins, whose fusion with cytoskeletal components, are often used for their high-quality visualization. The aim of this thesis was the production, selection, and validation of *Medicago sativa* transgenic lines expressing molecular markers for cytoskeleton, for its visualization and mapping of alterations in the organization and arrangement in response to salt stress. The transformation was done through *A. tumefaciens* bacteria, where the whole process including selection was documented. Double lines containing both fluorescent cytoskeletal markers were not obtained. In the obtained transgenic transgenic lines GFP-FABD2 and tagRFP-TUA6, the cytoskeleton was microscopically mapped in different plant parts, and the effect of the salt on the cytoskeleton was studied. To determine the arrangement and orientation of actin microfilaments and microtubules in cells of transgenic plants, qualitative and quantitative analysis was performed using available software. The results of this work indicate the difficulty in obtaining transgenic alfalfa lines with two cytoskeletal markers and a stronger effect of salt stress on microtubules compared to actin microfilaments.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , cytoskeleton, actin, microtubules, fluorescent markers, salt stress, GFP-FABD2, tagRFP-TUA6
Number of pages	85
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Charakteristika druhu <i>Medicago sativa</i> L.	3
2.1.1 Modelový organizmus <i>Medicago truncatula</i> v porovnaní s <i>Medicago sativa</i> .	3
2.2 Metódy transgenózy <i>Medicago sativa</i> L.	5
2.2.1 Transformácia lucerny pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.2.2 Transformácia lucerny pomocou <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	7
2.2.3 Biolistika, bombardovanie časticami	8
2.2.4 Elektroporácia	9
2.2.5 Mikroinjekcia	9
2.3 Cytoskelet rastlín	11
2.3.1 Aktínové filamenty a s nimi asociované proteíny	11
2.3.1.1 Profilín.....	13
2.3.1.2 ADF/Kofilín	14
2.3.1.3 Gelsolin a Vilín	14
2.3.2 Usporiadanie aktínových filamentov v rastlinných bunkách	15
2.3.3 Mikrotubuly a s nimi asociované proteíny	15
2.3.3.1 Motorové MAP.....	17
2.3.3.2 Štruktúrne MAP	18
2.3.3.3 MAP asociované s plus koncom mikrotubulov.....	18
2.3.4 Usporiadanie mikrotubulov v rastlinných bunkách.....	19
2.3.3 Dynamika a signalizácia rastlinného cytoskeletu.....	20
2.3.4 Podiel cytoskeletu na vývojových a obranných procesoch lucerny	21
2.4 Prehľad molekulárnych markerov a zobrazovacích metód cytoskeletu	23

2.4.1 Fluorescenčné proteíny	23
2.4.2 Faloidín.....	25
2.4.3 Imunogold značenie	25
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Použité chemikálie	26
3.1.2 Roztoky a médiá.....	27
3.1.3 Použité prístroje.....	31
3.1.4 Software na spracovanie výsledkov	32
3.1.5 Rastlinný materiál.....	32
3.1.6 Bakteriálny materiál	32
3.2 Metódy.....	32
3.2.1 Príprava B5H média	32
3.2.2 Príprava B50 média	33
3.2.3 Príprava MMS média	33
3.2.4 Príprava MS média.....	34
3.2.5 Príprava tekutého MS média	34
3.2.6 Príprava tekutého MS média s prídavkom NaCl.....	34
3.2.7 Príprava tekutého LB média.....	34
3.2.8 Príprava tuhého LB média.....	35
3.2.9 Príprava SH média.....	35
3.2.10 Príprava kokultivačného média	35
3.2.11 Transformácia <i>Medicago sativa</i>	35
3.2.11.1 Príprava baktérií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.2.11.2 Sterilizácia listových explantátov <i>Medicago sativa</i>	36

3.2.11.3 Transformácia listových explantátov <i>Medicago sativa</i>	36
3.2.11.4 Regenerácia rastlín procesom somatickej embryogenézy	37
3.2.12 Tranzientná transformácia <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
3.2.12.1 Príprava bakteriálnych kultúr	37
3.2.12.2 Infiltrácia listov <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.2.12.3 Mikroskopická analýza tranzientnej transformácie <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.2.13 Príprava mikroskopických preparátov.....	38
3.2.14 Soľný stres.....	39
3.2.14 Colony PCR.....	39
3.2.15 Agarózová gélová elektroforéza.....	41
3.2.16 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza	41
3.2.16.1 Kvalitatívna analýza v programe CytoSpectre	41
3.2.16.2 Kvantitatívna analýza cytoskeletu.....	41
3.2.16.3 Štatistická analýza	42
4 VÝSLEDKY	43
4.1 Colony PCR.....	43
4.2 Tranzientná transformácia <i>N. benthamiana</i>	44
4.3 Stabilná transformácia listových explantátov rastlín <i>Medicago sativa</i>	46
4.3.1 Kultivácia <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
4.3.2 Transformácia listových explantátov <i>Medicago sativa</i>	47
4.3.3 Regenerácia transgénnych rastlín z listových explantátov <i>Medicago sativa</i> po transformácii <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
4.4 Mikroskopická selekcia transformovaných línii <i>Medicago sativa</i>	51
4.5 Mikroskopická analýza cytoskeletu v rôznych orgánoch a pletivách rastlín transgénnych línii <i>Medicago sativa</i>	53

4.6.1 Kvantitatívne vyhodnotenie cytoskeletu stanovením anizotropie	59
4.7 Soľný stres aplikovaný na korene transgénnych línií <i>Medicago sativa</i>	61
4.8.1 Analýza zmien v usporiadaní a organizácii cytoskeletu v reakcii na soľný stres	63
4.8 Soľný stres aplikovaný na listy tranzientne transformovaných rastlín <i>Nicotiana benthamiana</i>	66
5 DISKUSIA	69
6 ZÁVER	72
7 LITERATÚRA	74
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	82

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Vypracovanie rešerše zameranej na:

- charakteristiku lucerny ako modelového druhu pre genetickú modifikáciu, v porovnaní s druhom *Medicago truncatula* L.
- základné a pokročilé metódy transgenózy lucerny k získaniu geneticky modifikovaných línií
- cytoskelet rastlín, základná charakteristika a molekulárny princíp organizácie cytoskeletu, väzobné a s cytoskeletom-asociované proteíny, molekulárne princípy dynamiky a vzťah k signálnym procesom
- prehľad molekulárnych markerov a zobrazovacích metód k lokalizácii komponentov cytoskeletu a k štúdiu jeho dynamiky v rastlinách
- podiel cytoskeletu na regulácii vývojových procesov lucerny a reakciách na vonkajšie stresové podmienky

Praktická časť

- realizácia experimentov zameraných na transformáciu listových explantátov k indukcii transgénnych línií lucerny s produkciou molekulárnych markerov pre vizualizáciu mikrotubulov a aktinových filamentov
- selekcia a validácia transgénnych línií pomocou mikroskopických metód
- kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie usporiadania a organizácie mikrotubulov a aktínu v rôznych bunkách, pletivách a orgánoch lucerny a vyhodnotenie fenotypu transgénnych rastlín
- štúdium reakcií transgénnych rastlín voči soľnému stresu, so zámerom zmapovania zmien v usporiadaní a organizácii cytoskeletu v reakcii na vonkajšie abiotické faktory

1 ÚVOD

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je celosvetovo rozšírená, viacročná rastlina, ktorá sa radí do čeľade *Fabaceae*. Jej kultivovaný typ je autotetraploid s ôsmimi chromozómami a veľkosťou genómu 800-1000 Mb. Fenotypovo sa vyznačuje modro-fialovo sfarbenými kvetmi, rozsiahlou koreňovou sústavou, trojpočetnými listami so zúbkovým okrajom a mnohosemenným strukom (Hrabě, 2004). *Medicago sativa* má vďaka vysokému obsahu významných látok (napríklad esenciálne aminokyseliny, minerály, vitamíny, vláknina) a schopnosti symbiotického vzťahu s prospešnými symbiotickými baktériami veľký poľnohospodársky význam (Hadidi et al., 2023).

V porovnaní s jednoročnou, autogamnou strukovinou *Medicago truncatula*, ktorá má relatívne malý diploidný genóm, má *M. sativa* komplikovanejší genetický základ. Aj z tohto dôvodu je tak *Medicago truncatula* v súčasnosti využívaná ako modelový organizmus pri štúdiu strukovín (Kang et al., 2016; Nandety et al., 2023).

V súčasnosti sa mnoho výskumov zameriava na prípravu a štúdiu transgénnych rastlín. Využitie takýchto organizmov je všestranné a aplikácie nachádzajú v biofortifikácii, fytofarmácii, v štúdiu rezistencie rastlín na abiotické a biotické stresy, ale aj v štúdiu a rozvoji využitia transgénnych rastlín na produkciu rekombinantných proteínov a vakcín (Cherian & Oliveira, 2005; Burnett & Burnett, 2020; Malik & Maqbool, 2020; Ahmad et al., 2021). Príprava transgénnych rastlín spočíva vo využití procesu nazývanom transgenóza. Táto metodika zahŕňa viacero možných spôsobov. V prípade prípravy transgénnych rastlín *M. sativa* sa najčastejšie uplatňuje transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens* alebo *Agrobacterium rhizogenes*, bombardovanie časticami, mikroinjekcia alebo elektroporácia (Vlahova et al., 2005).

Rastlinné bunky majú dynamickú trojrozmernú sieť vzájomne prepojených zložiek nazývanú cytoskelet. Dva hlavné komponenty, z ktorých pozostáva rastlinný cytoskelet sú aktínové filamenty (AF) a mikrotubuly (MT), tvoriace dve odlišné siete. Rastlinný cytoskelet zohráva dôležitú úlohu v mnohých bunkových procesoch, ktoré sú nevyhnutné pre morfogénu, organogénu, rast a vývoj rastlín (Seagull & Gunning, 1989). Usporiadanie a dynamika aktínových vlákien a mikrotubulov je ovplyvnená typom bunky, asociovanými proteínmi, procesmi, ktorých sa zúčastňujú, ale aj externými faktormi. Tieto externé faktory zahŕňajú abiotické faktory ako teplota, chlad, osmotický stres, soľný stres, ťažké kovy,

ultrafialové žiarenie (UV) a taktiež aj biotické faktory, kde je rastlina ovplyvňovaná prospešnými (beneficiálnymi) organizmami ale aj patogénmi ako sú baktérie, huby, vírusy, hmyz (Song et al., 2019; Kaur et al., 2022).

Na štúdium štruktúry a dynamiky cytoskeletu sú využívané molekulárne markery. Radia sa tam fluorescenčné proteíny, falloidín, imunogold značenie, stableMARK ale aj protilátky. Vďaka týmto markerom je možné charakterizovať taktiež jeho význam v rôznych bunkových procesoch. Jedny z najviac rozšírených sú fluorescenčné proteíny, ktorých translačná fúzia s komponentmi cytoskeletu zabezpečuje jeho kvalitnú vizualizáciu. Je vyvinutých niekoľko variant fluorescenčných proteínov od modrých po červené („far-red“) s rôznymi kvantovými výťažkami, fluorescenciou a fotochemickými vlastnosťami (Sample et al., 2009; Stepanenko et al., 2013).

Diplomová práca sa zameriava na transformáciu listových explantátov k indukcii transgénnych línií lucerny s produkciou molekulárnych markerov pre vizualizáciu mikrotubulov a aktínových filamentov, ich selekciu a validáciu pomocou mikroskopických metód. Ďalej je vyhodnocované usporiadanie a organizácia aktínových filamentov a mikrotubulov v rôznych bunkách, pletivách a orgánoch lucerny, a taktiež fenotyp transgénnych rastlín pomocou kvalitatívnych a kvantitatívnych metód. Druhá časť práce je zacielená na štúdium reakcií transgénnych rastlín voči soľnému stresu, so zámerom zmapovania zmien v usporiadaní a organizácii cytoskeletu.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Charakteristika druhu *Medicago sativa* L.

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je viacročná rastlina patriaca do čeľade bôbovité (*Fabaceae*). Napriek tomu, že jej predpokladaný pôvod je v stredomorskej oblasti, v súčasnosti je celosvetovo rozšírená. Kultivovaný typ lucerny je autotetraploidná rastlina ($2n=4x=32$) s ôsmimi chromozómami a veľkosťou genómu 800-1000 Mb (Hawkins & Yu, 2018). Z fenotypového hľadiska je to rastlina charakteristická modro-fialovým sfarbením kvetov, rozsiahlou koreňovou sústavou, trojpočetnými listami so zúbkovým okrajom a mnohosemenným strukom (Hrabě, 2004). Lucerna je bohatá na významné látky, ako esenciálne aminokyseliny, minerály, vitamíny a vlákninu. Kombinácia týchto látok spoločne s vysokým množstvom obsiahnutých bielkovín, ktoré majú žiadúce vlastnosti ako udržiavanie tekutín a emulgovanie, podnecuje jej široké aplikácie v poľnohospodárstve v podobe krmiva pre dobytok, ako aj vhodného modelového organizmu pre výskumné účely. Pre vysoký obsah bielkovín by mohla nájsť uplatnenie aj v ľudskej strave prípadne ako liečivo pri niektorých ochoreniach. Avšak z dôvodu prítomnosti aj nežiadúcich vlastností, je tento spôsob využitia obmedzený (Hadidi et al., 2023).

2.1.1 Modelový organizmus *Medicago truncatula* v porovnaní s *Medicago sativa*

Medicago truncatula (*M. truncatula*) je jednoročná autogamná strukovina patriaca do rodu *Medicago* a čeľade *Fabaceae*. Pochádza z oblasti stredomoria a spoločne s oblasťami v Austrálii, sú dodnes jej komerčne dostupné odrody pestované striedavo s rôznymi obilninami. Z genetického hľadiska je to diploidná rastlina ($2n = 2x = 16$) s ôsmimi chromozómami a s veľkosťou genómu približne 430 Mb. Fenotyp je charakteristický žltými kvetmi, malými strukmi a trojpočetnými listami so zúbkovým okrajom, so striedavou veľkosťou zúbkov (Küster, 2013; Cui et al., 2022). V súčasnosti je *M. truncatula* využívaná najmä ako modelový organizmus pri štúdiu strukovín. Hlavnými dôvodmi je relatívne malý diploidný genóm, ktorý bol celý sekvenovaný, autogamia, pomerne krátky regeneračný cyklus, biparentálna dedičnosť či jednoduchosť aplikovateľnosti transformačných metód (Kang et al., 2016; Nandety et al., 2023). Na základe uvedených charakteristík a agronomického prínosu, je tento modelový organizmus využívaný najmä v odvetviach

funkčnej genetiky a analýzy symbiotickej fixácie dusíka, vývoja semien a tolerancie voči abiotickému stresu (Kang et al., 2016). *M. truncatula* je úzko príbuzná s mnohými strukovinami, napríklad s hrachom (*Pisum sativum*), cícerom (*Cicer arietinum*), bôbom (*Vicia faba*), vrátane lucerny siatej (*M. sativa*).

M. sativa je polymorfný druh s komplikovanou genetikou z dôvodu početnej repetitívnej DNA, a kvôli hybridizácii, polyploidii a domestikácii (Küster, 2013). Aj keď sa líši v mnohých fenotypových a genetických charakteristikách od *M. truncatula*, vďaka už vyššie uvedeným vlastnostiam poskytuje *M. truncatula* významné možnosti na rozšírenie súboru genomických nástrojov lucerny (Schnurr et al., 2007). V rámci rôznych štúdií boli vykonané experimenty, kde porovnávali *M. sativa* s *M. truncatula*. V stručnosti sú rozdiely najmä v oblasti využitia, veľkosti a komplexity genómu, genomických zdrojov, poľnohospodárskeho významu a symbiotickej fixácií dusíka. *M. sativa* je z poľnohospodárskeho hľadiska jedna z najvýznamnejších kŕmnych plodín, zatiaľ čo *M. truncatula* nie je pestovaná ako kŕmna plodina, ale viac využívaná vo výskumnej sfére. Vďaka tomu má *M. truncatula* dobre rozvinutý súbor genomických a proteomických zdrojov (Frugoli & Harris, 2001).

Z agronomického hľadiska sú dostupné štúdie, kde je ukázané, že stráviteľnosť bunkovej steny stonky *M. sativa* je nízka a na vyriešenie tohto problému je nutný ďalší výskum. Avšak kvôli zložitejším vlastnostiam lucerny a možným komplikáciám pri výskumných analýzach bola vytvorená štúdia, kde je porovnávaná stonka lucerny s *M. truncatula*, ktorá by mohla slúžiť ako modelový organizmus pre vývoj bunkovej steny lucerny. Bolo dokázané, že aj na rozdiely, ktoré boli pozorované v morfológií, v zložení a stráviteľnosti došlo k vzájomnému prekryvu týchto znakov, okrem obsahu bielkovín, ktorý bol vyšší u lucerny. Preto je teda možné a vhodné používať na štúdium modelový organizmus *M. truncatula* (Schnurr et al., 2007).

Porovnávacie štúdie boli realizované aj z oblasti efektivity fixácie dusíka. Bolo dokázané, že efektivita fixácie dusíka je u *M. truncatula* v porovnaní s *M. sativa* nízka aj keď koreňové hľúzy *M. truncatula* vyzerali normálne a dokonca dosahovali väčšiu veľkosť. Podľa dostupných informácií, viacero aspektov ako nízka schopnosť tvorby organických kyselín v hľúzach, a teda nedostatočné množstvo uhlíkového skeletu na asimiláciu dusíka, ale aj

obmedzený export dusíka z hlúčok sú dôsledkom nízkej efektivity (Sulieman & Schulze, 2010).

Ďalším dôležitým porovnaním týchto dvoch druhov je ich reakcia na vplyv environmentálnych stresových podmienok, ako napríklad sucha. V štúdií podľa Echeverria et al. (2021) je uvádzané, že *M. truncatula* v porovnaní s *M. sativa* vykazuje odlišné metabolické reakcie v koreňoch v reakcii na suchu. Kľúčovými zisteniami bolo napríklad to, že katabolizmus sacharózy zohrával dôležitú úlohu a sacharózová syntáza (SUS) a sacharózová invertáza (INV) boli analyzované v oboch druhoch. Pričom práve sacharózová syntáza bola identifikovaná ako primárny enzým degradujúci sacharózu v koreňoch a vplyv sucha vyvolal výrazný pokles jej aktivity, zatiaľ čo u INV došlo k malému zvýšeniu aktivity. Z pohľadu druhovo-špecifických reakcií bolo odhalené, že pri metabolických reakciách kľúčový enzým pentózovo-fosfátovej dráhy, glukózo-6-fosfát dehydrogenáza, vykazoval signifikantné rozdiely len v koreňoch *M. sativa*. Štúdiom rozdielných odpovedí na stresové faktory u rôznych rastlinných druhov je možné rozšíriť poznatky o komplexných regulačných mechanizmoch vrátane genetických a fyziologických, čo môže významne prispieť k chápaniu adaptačných mechanizmov a rozvoji stratégií na vývoj odolnejších plodín.

2.2 Metódy transgenózy *Medicago sativa* L.

Transgenóza je nástroj slúžiaci na zavádzanie cudzích génov do genómu hostiteľského organizmu. Transgénne rastliny sú teda charakterizované ako rastliny, ktoré sú geneticky modifikované pomocou rekombinantných technológií s expresiou exogénnych alebo modifikovanou expresiou endogénnych génov (Gunarathne et al., 2020). Využitie transgenózy a transgénnych organizmov sa môže považovať za všestranné. Uplatnenie si nachádza napríklad v biofortifikácii, fytoremediácii, v štúdiu rezistencie rastlín na abiotické a biotické stresy, ale aj v štúdiu a rozvoji využitia transgénnych rastlín na produkciu rekombinantných proteínov a vakcín (Cherian & Oliveira, 2005; Burnett & Burnett, 2020; Malik & Maqbool, 2020; Ahmad et al., 2021).

Na prípravu transgénnych rastlín lucerny sa dá využiť viacero spôsobov transgenózy. Najčastejším je transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) prípadne využitie baktérie *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*). Ďalšími účinnými

spôsobmi sú bombardovanie časticami, mikroinjekcia alebo elektroporácia (Vlahova et al., 2005).

2.2.1 Transformácia lucerny pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je gramnegatívna, fytopatogénna baktéria, vyskytujúca sa v pôdach. *A. tumefaciens* je schopná infekcia dvojkličnoslistových rastlín, u ktorých spôsobuje neoplastické nádorové ochorenie (neoplastic crown gall disease) (Yoneyama & Natsume, 2010). V sedemdesiatych rokoch 20. storočia bolo objavené tímom vedcov profesora Marca Van Montagu a profesora Jozefa Schella, že táto baktéria je schopná prenosu DNA do rastlín, čo viedlo k rozvoju využitia *A. tumefaciens* v biotechnologickej sfére (Heimann, 2018). Na základe tohto objavu bola *A. tumefaciens* určená za modelový organizmus, ktorý okrem využitia pri transformáciách slúži aj na štúdium bakteriálneho sekrécneho systému typu IV a horizontálneho transferu génov (Escobar & Dandekar, 2003).

Princíp transformácie sprostredkovanou *A. tumefaciens* spočíva v prenose definovaného segmentu DNA z tumor-indukujúceho (Ti) plazmidu do hostiteľského genómu. Molekulárna podstata prenosu a spracovania transferovej DNA (T-DNA) z Ti-plazmidu, je z veľkej časti ovplyvnená aktivitou génov virulencie (*vir*), ktoré nesie Ti-plazmid a bakteriálnych chromozomálnych génov (*chv*). Okrem toho sa neskorších štádií tohto procesu zúčastňuje aj mnoho ďalších proteínov (Gelvin, 2003). Pri transformácii sú používané rekombinantné typy *A. tumefaciens*, v ktorých je natívna T-DNA nahradzovaná génmi záujmu spoločne s reportérovými génmi, ktoré slúžia na identifikáciu a selekciu úspešne transformovaných organizmov (Tzfira & Citovsky, 2006). Samotný proces transformácie hostiteľských buniek pripraveným rekombinantným *A. tumefaciens* začína percepciou hostiteľských signálov pomocou dvojkomponentého senzového systému VrA/VrG, čo je nasledované indukciou virulentných génov. Jednovláknová T-DNA je za pomoci VirD2 a VirD1 vystrihnutá z T-oblasti Ti-plazmidu, za vzniku nukleoproteínového komplexu VirD2-T-DNA. Tento komplex spoločne s ostatnými efektorovými proteínmi, vrátane VirE2, VirF, VirD5 a VirE3 sú transportované pomocou T4SS na vonkajšiu stranu cytoplazmatickej membrány a sú endocytózou transportované do hostiteľskej bunky. Vo vnútri hostiteľskej bunky VirD2-T-DNA je obalovaná viacerými VirE2 molekulami a transportovaná do jadra s prispáním endoplazmatického retikula a siete aktínových filamentov (Guo et al., 2019).

V prípade využitia transformácie sprostredkovejanej *A. tumefaciens* v lucerne bola popísaná metóda stabilnej transformácie listových explantátov a *in planta* metóda transformácie semenáčikov (Obr.1A). Transformácia listových explantátov je vysoko efektívna a najčastejšie používaná metóda. Listové explantáty sú kokultivované s *A. tumefaciens*, a následne procesom somatickej embryogenézy je indukovaná tvorba embryogénnych kalusov, z nich somatických embryí, a následná regenerácia rastlín, ktoré obsahujú požadovaný gén. Pri tejto metóde sú dosiahnuté transformované rastliny obvykle v priebehu 9-14 týždňov po kokultivácii, ktoré prinesú semená približne po siedmych mesiacoch (Samac & Austin-Phillips, 2006). Pri druhej uvedenej metóde, sa semenáčky zrezané o apikálny meristém, vortexujú so suspenziou *A. tumefaciens* a sterilným pieskom. Následne sú rastliny kultivované na médiu pre vývoj semenáčikov a potom sú stabilne transformované semenáčky prenesené do pôdy pre ďalší rast a vývoj. Táto metóda ukazuje niekoľko výhod v podobe zníženia časovej náročnosti na zisk semien (cca 5 mesiacov), limitácia použitých materiálov a nákladov, aplikácia na komerčnú odrodu ale aj uľahčenie schvaľovacích procesov z dôvodu absencie selekčných markerov, a teda potreby ďalšieho výskumu na bezpečnosť týchto génov (J. T. Weeks et al., 2008).

2.2.2 Transformácia lucerney pomocou *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes (*A. rhizogenes*) je gramnegatívna pôdna baktéria, schopná infikovať rastliny a spôsobujúca ochorenie takzvaných chlpatých koreňov u niektorých druhov dvojkličnolistových rastlín. Pri tejto infekcii dochádza k prenosu T-DNA, ktorá obsahuje lokusy medzi oblasťami TR a LR bakteriálneho Ri (koreň indukujúceho) plazmidu do hostiteľského rastlinného genómu. V dôsledku toho dochádza k vývoju rýchlo rastúcich a rozvetvených adventívnych koreňov bez pridaných fytohormónov. Na rozdiel od neporušených koreňov sú v týchto často produkované sekundárne metabolity po dlhú dobu (Dubrovsky & Rost, 2003; Muranaka & Saito, 2010). Ako hostiteľské časti rastlín používané pre tvorbu transformovaných koreňov sú využívané stonky, zásobné orgány, hypokotyle semenáčikov, kľúčne listy a bunky odvodené od protoplastov (Golds et al., 1991).

Na transformáciu lucerney prostredníctvom *A. rhizogenes* sú používané dospelé 1-2 mesiace staré rastliny, ktorých stonky sú inokulované buď po narezaní alebo priamo pomocou hypodermickej striekačky. Následne vytvorené adventívne korene sú oddelené

a kultivované pre ďalší rast až po regeneráciu mladých rastlín pomocou somatickej embryogenézy z vytvorených transformovaných kalusov. Transformované rastliny sa vyznačujú vyvinutejším koreňovým systémom, modifikáciou listov a väčšou dĺžkou internódií, avšak reprodukčný aparát rastlín nie je ovplyvnený (Spanò et al., 1987). Ďalšou používanou možnosťou produkcie cudzích génov v *M. sativa* je infekcia klíčnych listov semenáčikov a indukcia „chlpatých koreňov“ na MS médiu. Táto možnosť je preukázaná u lucerny ako efektívnejšia v porovnaní s indukciou z fragmentov stonky (Lü et al., 2000).

2.2.3 Biolistika, bombardovanie časticami

Transformácia bombardovaním časticami, nazývaná aj biolistika, je metóda založená na priamom dodávaní DNA- alebo RNA-obalených častíc, do rastlinných buniek. Príprava týchto častíc vyžaduje premytie zlatých prípadne volfrámových častíc zmiešaných s plazmidovou DNA. Na naviazanie DNA na častice zlata a volfrámu sú využívané buď etanolové alebo CaCl_2 precipitačné metódy. Na ochranu proti degradáciám alebo prípadným zmenám v konformácii môže byť pridávaný spermidín (Finer et al., 2000). Tieto častice sú pomocou génového dela vo vákuu a pri hélíu, vysokou rýchlosťou strieľané na rastlinné pletivo. Po preniknutí častíc dovnútra bunky sa DNA buď tranzientne exprimuje alebo sa stabilne integruje do hostiteľského genómu (Bhatia & Bera, 2015; Baltes et al., 2017). Výhodami tejto metódy je možnosť transformácie buniek v rôznych typoch rastlinného pletiva, ako napríklad embryogénny kalus, embryá, meristém, ale aj v izolovaných organelách ako mitochondrie a chloroplasty. Taktiež nie je potreba binárnych vektorov, a táto metóda umožňuje kotransformáciu a integráciu veľkých DNA fragmentov. Avšak relatívne nízka efektivita, vysoké vstupné náklady a obsah komplexných inzertov náchylných na rekombináciu a umlčovanie sa ukazujú ako nevýhody biolistiky (Matsumoto & Gonsalves, 2012; Baltes et al., 2017).

Bombardovanie časticami môže byť využité aj ako jedna z alternatívnych metód transformácie lucerny (Obr.1B). Ako materiál sú využívané stopky z listov alebo peľ. Peľ má určité výhody, hlavne to, že je prirodzene produkovaný rastlinou vo veľkom množstve. Na transformáciu sú z tyčiniek kvetov odoberané peľové zrná, z ktorých je vytvorená suspenzia. Tá je následne bombardovaná časticami s obalenou DNA (Ramaiah & Skinner, 1997). V prípade použitia rastlinných pletív z listových stopiek, bombardovaných

volfrámovými časticami s obalenou DNA, efektívita nedosahuje vysokú úroveň. Nízky počet transformovaných rastlín touto metódou môže byť zapríčinený nízkym počtom získaných somatických embryí, čo je pravdepodobne dôsledok straty kapacity regenerácie kvôli stresu z bombardovania (Pereira & Erickson, 1995).

2.2.4 Elektroporácia

Elektroporácia je jednoduchý proces, pri ktorom pomocou externých elektrických impulzov dochádza k tvorbe pórov, čím sa zvýši permeabilita plazmatickej membrány buniek (Golberg & Rubinsky, 2013). U rastlinných buniek sa využíva hlavne na transformáciu protoplastov po odstránení bunkovej steny. Využíva sa najmä v procesoch rekombinantných technológií, zavádzania proteínov, metabolitov a malých molekúl do hostiteľských buniek (Potter, 1993). Ďalej je elektroporáciou možné študovať tranzientnú génovú expresiu, ale slúži aj na získavanie stabilne transformovaných jedincov (Terzaghi & Cashmore, 1997). Elektroporácia pri správnych podmienkach je reverzibilný proces, kedy po skončení elektrických impulzov dôjde k opätovnému uzavretiu pórov. Avšak použitie vysoko intenzívneho elektrického poľa môže viesť k nevratnému poškodeniu bunkovej membrány. Na základe tohto faktu, intenzita elektrického impulzu ale aj mnohé ďalšie faktory, ako počet a dĺžka impulzov, veľkosť buniek a celkový čas ovplyvňujú výslednú účinnosť elektroporácie (Tylewicz, 2020).

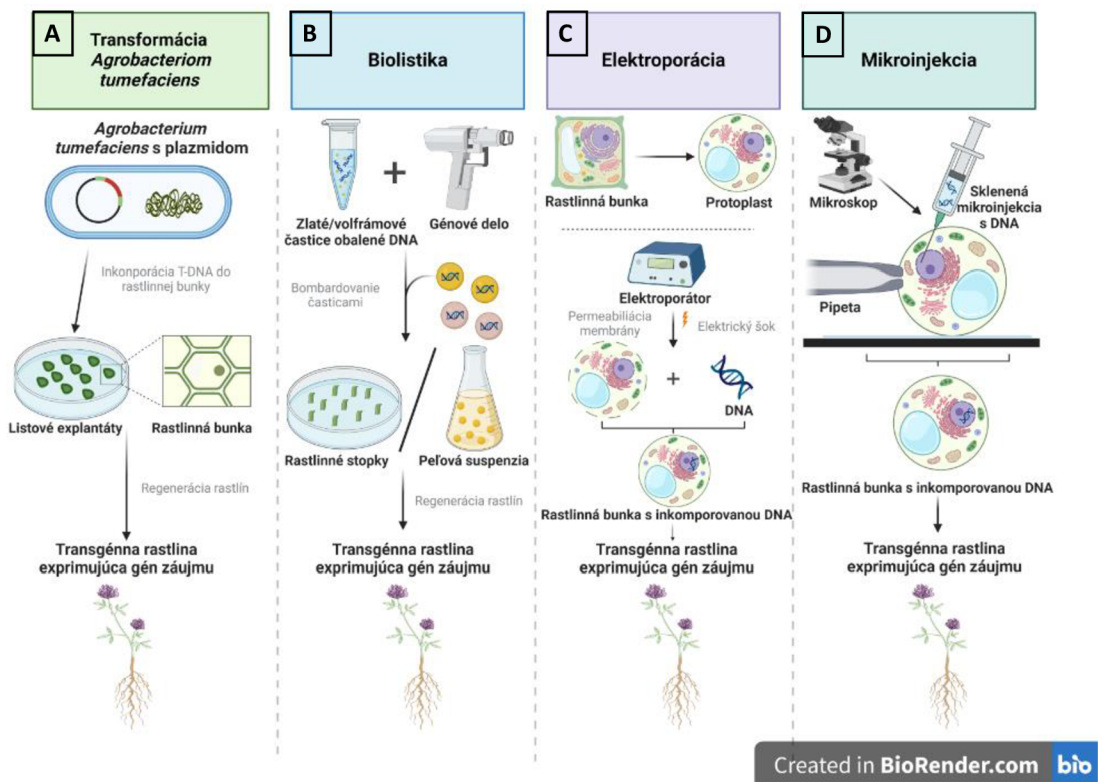
Tento biofyzikálny proces je využívaný aj na transformáciu *M. sativa* (Obr.1C). Aj keď nepatrí medzi najčastejšie využívané metódy, boli popísané protokoly transformácie protoplastov a peľových zŕn lucerny (Choudhary et al., 1990; Saunders et al., 1995).

2.2.5 Mikroinjekcia

Mikroinjekcia je efektívna technika, na priame zavádzanie DNA do cytoplazmy alebo jadra buniek. Táto mechanická technika využíva sklenenú mikrokapilárnu pipetu (sklenenú mikroinjekciu), polohovacie zariadenie, slúžiace na kontrolu pohybu mikropipety a mikroinjektor. Princíp metódy spočíva v zavádzaní tekutiny, obsahujúcej genetický materiál cez mikropipetu za využitia hydrostatického tlaku, pričom tento proces obvykle prebieha s použitím mikroskopu (Jinturkar et al., 2011). Precíznosť tejto techniky nachádza využitie aj mimo genetickej transformácie, napríklad v štúdiu rastlinných proteínov, funkčnej organizácie cytoplazmatických komponentov v živých bunkách, ale aj bunkovej

diferenciácie. Okrem precíznosti je možné uviesť aj mnohé výhody, podporujúce rôznorodé aplikácie. Jednou z najvýznamnejších výhod je zacielenie špecifických molekúl a supramolekulárnych štruktúr na konkrétnu bunku alebo jej kompartment. To sa využíva v analýze intracelulárnych a vnútrojaderných procesov, ako napríklad extrachromozómalná replikácia DNA. Taktiež účinnosť mikroinjekcie je výborná a niekedy až lepšia v porovnaní s ostatnými dostupnými transformačnými metódami (Miki et al., 1987).

Mikroinjekcia je ďalší z prístupov transformačných technológií využívaných u lucerny (Obr.1D). Podobne ako pri iných metódach, aj tu sú najčastejšie využívané protoplasty práve vďaka chýbajúcej bunkovej stene. S touto technológiou je možné študovať expresiu genetického materiálu už krátko po zavedení do rastliny, avšak je veľmi dôležité správne odlíšiť túto expresiu od zmien v expresii génov hostiteľskej bunky spojených s obnovou protoplastu (Reich et al., 1986).



Obrázok 1. Schéma zahŕňajúca metódy stabilnej transgenózy lucerny sietej: (A) transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens*, (B) Biolistika, transformácia bombardovaním časticami, (C) elektroporácia, (D) mikroinjekcia. Schéma vytvorená prostredníctvom BioRender.com

2.3 Cytoskelet rastlín

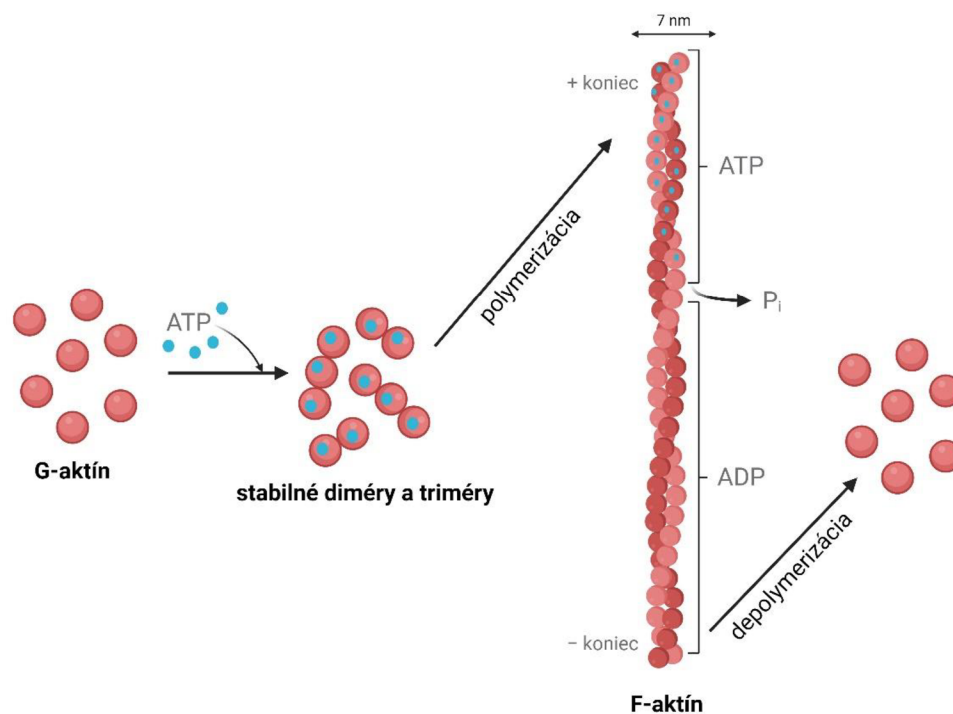
Rastlinné bunky majú dynamickú trojrozmernú sieť vzájomne prepojených zložiek nazývanú cytoskelet. Dva hlavné komponenty, z ktorých pozostáva rastlinný cytoskelet sú aktínové filameny (AF) a mikrotubuly (MT), tvoriace dve odlišné siete. Jednotlivé siete týchto komponentov môžu vykazovať svoju funkciu simultánne, ako napríklad pri cytoplazmatickom prúde alebo sekvenčne, čoho príkladom je správna činnosť vretienka a fragmoplastu pri bunkovom delení (Seagull & Gunning, 1989). Vo všeobecnosti rastlinný cytoskelet zohráva kľúčovú úlohu vo viacerých bunkových procesoch, ktoré sú nevyhnutné pre morfogézu, organogézu, rast a vývoj rastlín. Príkladmi týchto procesov je bunkové delenie, bunková expanzia či vnútrobunková organizácia, polarita a transport. Okrem spomínaných základných procesov boli rastliny počas evolúcie nútené vyvinúť aj mechanizmy, ktoré slúžia na obranu proti environmentálnym faktorom, kde sú radené abiotické aj biotické vplyvy (Kost et al., 1999; Takemoto & Hardham, 2004). Mnohé procesy, na ktorých sa podieľajú aktínové vlákna a mikrotubuly sú vykonávané s pomocou interagujúcich motorických proteínov, signálnych molekúl alebo prvkov podporujúcich štruktúru aktínových filamentov a mikrotubulov (Petrášek & Schwarzerová, 2009).

2.3.1 Aktínové filameny a s nimi asociované proteíny

Aktín je vysoko konzervovaný a najviac zastúpený proteín vo väčšine eukaryotických buniek, zúčastňujúci sa na väčšom počte proteínových interakcií, ako ktorýkoľvek iný známy proteín (Pollard, 2016). Aktín sa vyskytuje ako monomér, vo forme globulárneho štruktúrneho proteínu (G-aktín) zloženého z 375 alebo 374 aminokyselinových zvyškov a jeho molekulová hmotnosť je stanovená na 42 kDa. Tento monomér je tvorený 2 hlavnými doménami, kde každá pozostáva z dvoch subdomén. Medzi dvoma hlavnými doménami sú vytvorené dve veľké štrbiny, kde horná viaže nukleotid a spodná štrbina mení konformáciu v závislosti od stavu nukleotidu a predstavuje väzobné miesto pre väčšinu proteínov viažucich aktín (Dominguez & Holmes, 2011). Pri zvýšenej koncentrácii katiónov alebo po prídavku špecifických proteínov, môže dochádzať k medzimolekulovým interakciám týchto monomérnych foriem, čo vedie k vzniku vláknitej formy aktínu (F-aktín) (Glyakina & Galzitskaya, 2020). Vlákňitá forma aktínu, je pravotočivá štruktúra s priemerom 7 nm a s 13 – 14 podjednotkami na pol otáčky. Polymerizácia je často prepojená s hydrolýzou ATP a je

využívaná v mnohých bunkových procesoch vrátane bunkovej pohyblivosti a udržiavania tvaru a polarity buniek (Obr.2). Oneskorenie medzi ATP hydrolyzou a prídavkom podjednotky dáva aktívnym filamentom výraznú funkčnú polaritu (Volkman & Baluška, 1999). F-aktín je štruktúrne a funkčne asymetrický a často podlieha procesu tzv. „treadmilling“, kedy dochádza k sieťovej asociácii ATP-aktívných monomérov s ostatným koncom (C-koniec) a disociácii ADP-aktívných monomérov zo špicateho konca (K-koniec) (Dominguez, 2004).

Správna organizácia a dynamika aktívných štruktúr je prísne regulovaná aktín-viažucimi proteínmi. Je možné rozlíšiť dve hlavné skupiny aktín-viažucich proteínov, a to prvú skupinu zahŕňajúcu proteíny, ktoré menia skladanie, prípadne dynamiku aktívných podjednotiek alebo filamentov a druhú skupinu, kde patria proteíny, ktoré organizujú aktínové vlákna do štruktúr vyššieho rádu. Konkrétnymi členmi týchto proteínov sú napríklad monomér viažuce proteíny (profilín), „severing and dynamizing proteins“ (aktín depolymerizujúci faktor/kofilín - ADF/kofilín) a postranne viažuce sa proteíny (villin, gelsolin, fimbrin) (McCurdy et al., 2001; Higaki et al., 2007).



Obrázok 2. Schéma znázorňujúca štruktúru aktínových filamentov a ich polymerizáciu a depolymerizáciu. Schéma vytvorená prostredníctvom BioRender.com

2.3.1.1 Profilín

Profilín je malý aktín-viažúci proteín s molekulovou hmotnosťou 14-17 kDa, exprimovaný v eukaryotických bunkách. Aj napriek tomu, že rôzne izoformy profilínu sa líšia v obsahu aminokyselín v rozmedzí 100-131, jeho štruktúra v odlišných organizmoch vykazuje vysokú podobnosť. Štruktúra u väčšiny profilínov je tvorená štyrmi hélaxami a siedmimi beta skladanými listami (Krishnan & Moens, 2009). Profilíny zohrávajú dôležitú úlohu v proliferácii, diferenciácii, raste, motilite a cytokinéze buniek. Taktiež prispievajú k udržiavaniu bunkového aktínu v nepolymerizovanom stave a okrem toho predstavujú hlavný zdroj monomérov pri zostavovaní filamentov. Zabezpečuje to ich schopnosť katalyzácie výmeny ADP za ATP na aktíne a inhibícia nukleácie filamentov. Okrem toho aktínové monoméry viazané na aktín inhibujú nukleáciu a elongáciu na špicatých koncoch, ale môžu predlžovať ostnaté konce vlákien približne na rovnakej úrovni ako voľné aktínové monoméry. Ich afinita pre ATP-aktínové monoméry ($K_d = 0,1 \mu\text{M}$) a bunková koncentrácia

(50 – 100 μM), zapríčiňuje, že väčšina nepolymerizovaného aktínu v cytoplazme buniek sa viaže na profilín. Avšak vysoké koncentrácie voľného profilínu spomaľujú elongáciu a môžu podporiť disociáciu terminálnej pojednotky aktínových filamentov (Krishnan & Moens, 2009; Dominguez & Holmes, 2011; Pollard, 2016).

2.3.1.2 ADF/Kofilín

Aktín-depolymerizujúci faktor/kofilín, ako rodina proteínov, pozostáva z malých globuárnych proteínov viažucich G-aktín aj F-aktín s molekulovou hmotnosťou 13-19 kDa, exprimovaných v takmer všetkých doteraz preštudovaných eukaryotických bunkách (Tanaka et al., 2018; García-González & van Gelderen, 2021). Je to významná skupina proteínov podieľajúca sa na recyklácii aktínových monomérov, najmä na depolymerizácii aktínových vlákien, počas procesov zahŕňajúcich rýchlu remodeláciu cytoskeletu, napr. pri cytokinéze. V rámci tejto rodiny sa rozlišuje 11 ADF génov, ktoré sú rozdelené do dvoch podrodín, a to D-typ (ADF1-4, ADF6-8, ADF10-11) s depolymerizujúcou aktivitou a B-typ (ADF5 a ADF9), dôležitý pri tvorbe zväzkov (Dominguez & Holmes, 2011; Nan et al., 2017). Jednotlivé typy sa môžu líšiť najmä v počte aminokyselín (v rozmedzí 113-168 aminokyselín), avšak napriek tomu je dokázané, že zdieľajú významne konzervovanú časť molekuly. Hlavnou aktín- viažúcou štruktúrou ADF/kofilínov je dlhý alfa hélix, a väčšina z nich tiež obsahuje v blízkosti aminoterminálneho konca aspoň jeden jadrový lokalizačný signál (Maciver & Hussey, 2002).

2.3.1.3 Gelsolin a Vilín

Gelsolin patrí do rodiny aktín-viažucich sa proteínov, konkrétne do skupiny aktín- štiepiacich a aktín-pokrývajúcich (capping) proteínov. Rovnako ako profilín a ADF/kofilín, aj gelsolin sa vyskytuje v eukaryotických bunkách. Do tejto rodiny taktiež patrí vilín, advilín, supervilín, adseverín a capG. Gelsolin je multifunkčný proteín regulovaný Ca^{2+} , pozostávajúci zo šiestich opakovaní zo 120-150 aminokyselín (Krebs, 2004; Dominguez & Holmes, 2011).

Vilín je univerzálny aktín-viažúci proteín reagujúci na vápnik, ktorý je považovaný za hlavného regulátora dynamiky aktínu v rastlinách. Tento proteín je schopný modifikovať dynamiku aktínu depolymerizáciou, uzatváraním, oddeľovaním a zväzovaním aktínových filamentov. Podľa doterajších štúdií bolo ukázané, že VLN2, VLN3 a VLN4 sú iniciátory

remodelácie aktínu a jeho zväzkovania v epidermálnych bunkách koreňa (van der Honing et al., 2012; Zou et al., 2019; García-González & van Gelderen, 2021).

2.3.2 Usporiadanie aktínových filamentov v rastlinných bunkách

V bunkách sú aktínové vlákna organizované do dvoch typoch štruktúr takzvaného vyššieho rádu a to aktínových zväzkov, kde sú aktínové vlákna tesne usporiadané do paralelných zoskupení, a do trojrozmerných aktínových sietí, kde naopak sú aktínové vlákna voľne zosieťované do ortogonálnych zoskupení. Každá z týchto štruktúr má v bunke rôznu úlohu. Celá organizácia, zostavovanie do týchto štruktúr, ale aj prepájanie vlákien s inými bunkovými štruktúrami je regulované proteínmi asociovanými s aktínom (Cooper, 2000).

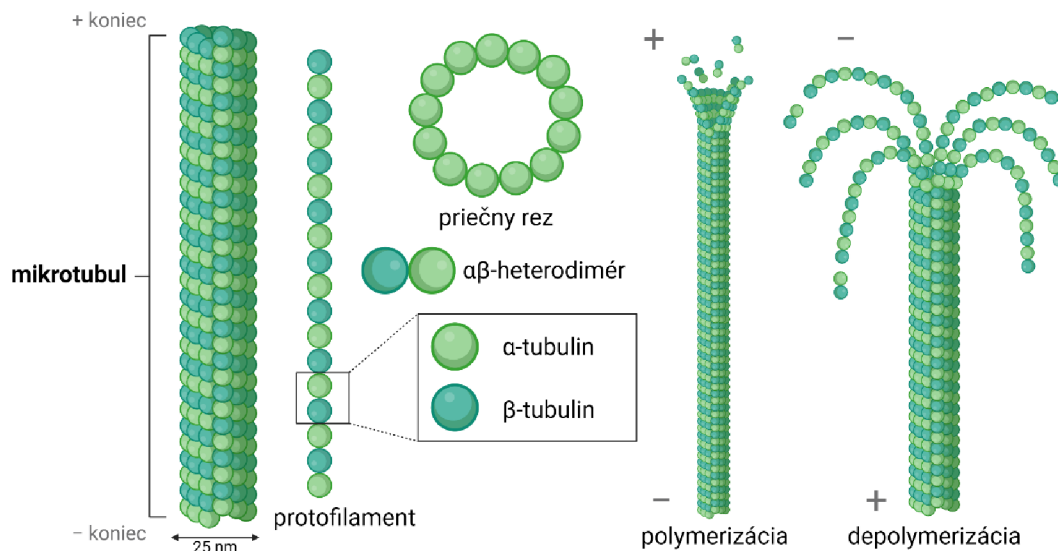
V bunkách v štádiu elongácie je usporiadanie aktínu vcelku náhodne organizované a primárne obklopujú jadro a zväčšujúcu sa vakuolu. V interfázových bunkách môžu byť pozorované najmä cytoplazmatické aktínové vlákna, ktoré obklopujú jadro, a kortikálne AF bez dominantnej orientácie. Je dokázané, že aktínové vlákna sú súčasťou aj rôznych mitotických štruktúrach, avšak väčšinou s nízkym obsahom. Vo fragmoplastoch sú charakteristické početné filameny so zvýšenou hustotou na bazálnej a apikálnej strane. Taktiež aj v bunkách koreňa nadobúdajú rôzne usporiadanie. Zatiaľ čo v periférnych bunkách čiapočky a v predlžujúcich sa koreňových vláskoch sú zväzky aktínu dobre pozorovateľné, v kolumele a na vrchole koreňových vláskov je výskyt aktínových filamentov nízky. Prítomnosť aktínu v epidermálnych bunkách je popisovaná ako náhodne usporiadaná hustá sieť jemných a hrubých aktínových zväzkov, obklopujúca chloroplasty. V bunkách hypokotylu a stopiek listov zasa prevažujú najmä hrubé pozdĺžne aktínové zväzky (Y.-S. Wang et al., 2008C. Thomas et al., 2009).

2.3.3 Mikrotubuly a s nimi asociované proteíny

Mikrotubuly sú duté proteínové vlákna, obsiahnuté vo všetkých eukaryotických bunkách s priemerom približne 24 nm a s variabilnou dĺžkou. Základnou zložkou mikrotubulov sú primárne heterodiméry proteínu tubulín. Skladá sa z dvoch podjednotiek α -tubulínu a β -tubulínu s molekulovou hmotnosťou odhadovanou približne na 50 kDa (Audenaert et al., 1989; Fosket & Morejohn, 1992). α -tubulín a β -tubulín sú flexibilné, globulárne proteíny, ktoré sa takmer identicky zhodujú v molekulárnej štruktúre a majú približne 40% zhodu

v aminokyselínovej sekvencii. Obe podjednotky sú tvorené z dvoch β - listov (cca 40%) obklopených α -helixom (cca 25%) a acidickým C-koncovým chvostom (Hashimoto, 2015). Interakciou heterodimérov tubulínu vznikajú lineárne protofilamenty s priemerom 4-5 nm. Najčastejšie je uvádzané, že mikrotubuly pozostávajú približne z 13 lineárnych protofilamentov, ktoré sú paralelne usporiadané a prepojené laterálnymi interakciami, čím vznikne dutá valcovitá štruktúra. Tento výsledný polymér má plusový rastúci koniec s exponovanými β -tubulínovými podjednotkami a mínusový pomaly rastúci koniec s exponovanými α -tubulínovými podjednotkami (Fosket & Morejohn, 1992; Goodson & Jonasson, 2018). Oba typy uvedených interakcií sú výsledkom hydrofóbných väzieb medzi tubulínovými podjednotkami. Pri rozpade mikrotubulov z plusového konca sú pozorované stabilné prstence a špirály skrútených jednotlivých protofilamentov, čo naznačuje, že laterálne interakcie medzi protofilamentami sú slabšie, ako interakcie medzi tubulínovými heterodimérmami v rámci protofilamentu (Sackett & Lippoldt, 1991; Hashimoto, 2015).

Veľmi dôležitou súčasťou mikrotubulového cytoskeletu v bunkách rastlín sú proteíny označované ako MAP - Proteíny asociované s mikrotubulmi. MAP je skupina rôznorodých proteínov, ktoré sú súčasťou bunkového cytoskeletu a ktoré interagujú s mikrotubulmi prostredníctvom MT- viažucej domény. Okrem toho, že je táto doména kľúčová pre prepojenie MAP s mikrotubulami, toto prepojenie taktiež umožňuje moduláciu dynamiky a organizáciu mikrotubulov, ako aj zabezpečenie funkčných a štruktúrnych interakcií mikrotubulov s inými štruktúrami (Kaloriti et al., 2007; Krtková et al., 2016). Aktivita MAP závisí na ich väzbe k mikrotubulom. Na základe toho je možné ich rozdeliť do troch skupín, na motorové proteíny (kinezín), štruktúrne (štiepiace) proteíny (MAP65, katanín) a proteíny asociované s plus koncom mikrotubulov (CLASP, EB1) (Krtková et al., 2016; Novák et al., 2016).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Obrázok 3. Schéma znázorňujúca štruktúru mikrotubulov a ukážku ich polymerizácie a depolymerizácie. Schéma vytvorená prostredníctvom BioRender.com

2.3.3.1 Motorové MAP

Motorové typy MAP sú proteíny dôležité pri procesoch ako pohyb, transport vezikúl a organel, delenie buniek, udržiavanie tvaru a mechanická integrita. Patria sem napríklad kinezíny (Ali & Yang, 2020). Kinezíny premieňajú chemickú energiu na mechanickú silu a vďaka tomu sú schopné ťahať bunkový „náklad“ pozdĺž mikrotubulu, presúvať mikrotubuly alebo reguláciou dynamiky mikrotubulov prestavovať mikrotubulárny cytoskelet v bunke. Rozlišujeme rôzne druhy kinezínov s jedinečnými mechano-chemickými vlastnosťami. Všetky druhy majú síce rovnaké štrukturálne motívy, avšak sa líšia v ich aminokyselinových zvyškoch (Gilbert & Sardar, 2012). Štruktúrne sú zložené z vysoko konzervovanej ATPázovej domény na N-terminálnom konci, ktorá zabezpečuje mechano-chemickú aktivitu založenú na mikrotubuloch, ďalej obsahujú C-terminálny koniec, ktorý je považovaný za doménu zodpovednú za uchytenie „nákladu“ (napr. vezikuly, organely)

a nakoniec v strednej časti je dlhá doména so stočenou špirálou, dôležitá pre proteín-proteín interakcie (Mazumdar & Misteli, 2005).

2.3.3.2 Štruktúrne MAP

Štruktúrne MAP, označované aj ako štiepiace proteíny, majú úlohu v organizácii mikrotubulov, pretože sú schopné ich štiepiť, zväzkovať a viazať. Do tejto skupiny sa radia napríklad MAP65 alebo katanín (Krtková et al., 2016). Rastlinné MAP65 sú podľa dostupných zdrojov lokalizované vo fragmoplaste, kortikálnych MT, mitotickom vretienku ale, ako bolo preukázané, môžu byť asociované aj s mitochondriami. Okrem lokalizácie sa jednotliví členovia líšia aj v prípade aktivity a funkcie (Caillaud et al., 2008). Katanín ako štiepiaci proteín v rastlinách je dobre preskúmaný. Je to heterodimerický proteín, ktorý na vnútorné štiepenie mikrotubulov využíva energiu z hydrolýzy ATP (Burk et al., 2007). Vo vyšších rastlinách sa podieľa na mnohých vývojových procesoch, ako bunkové delenie, predlžovanie buniek a morfogéza (Luptovčiak et al., 2017).

2.3.3.3 MAP asociované s plus koncom mikrotubulov

MAP asociované s plus-koncom mikrotubulov prostredníctvom ich väzby a interakcií práve na plus rastúcom konci ovplyvňujú dynamiku mikrotubulov. Celkovo je to rôznorodá skupina proteínov, ktoré sa okrem regulácie dynamiky vyznačujú aj sprostredkovaním interakcií medzi mikrotubulmi a vnútrobunkovými komponentami, ako sú bunkový kortex, organely a kinetochór. Patria sem napríklad proteíny asociované s cytoplazmatickým linkerom (CLASP), End binding1 (EB1) proteíny a SPIRAL1 (SPR1) (Kaloriti et al., 2007; Krtková et al., 2016; Novák et al., 2016). Proteíny EB1 sa viažu na formíny a pôsobia na stabilizáciu mikrotubulov a migráciu buniek. Taktiež bolo dokázané, že majú vplyv na kortikálne zväzky mikrotubulov a aj na vývoj rastlín, napríklad pri raste koreňa (Molines et al., 2018). SPR1 je rastlinný špecifický proteín pozostávajúci z opakujúceho sa motívu na každom konci, ktorý je oddelený flexibilným linkerom. Tento proteín kolokalizuje s kortikálnymi MT a je dôležitý pri kontrole expanzie buniek a na udržanie anizotropie rastu v predlžujúcich sa bunkách (Nakajima et al., 2004). Posledným z uvedených príkladov tejto skupiny proteínov je CLASP. Tento proteín je zahrnutý vo viacerých bunkových mechanizmoch, no najmä v expanzii buniek, delení a prepájaní plusových koncov mikrotubulov s kortexom buniek (Ambrose et al., 2007).

2.3.4 Usporiadanie mikrotubulov v rastlinných bunkách

Mikroskopická analýza a zobrazovanie živých buniek prispela k rozvoju štúdie usporiadania mikrotubulov v rastlinných bunkách. Usporiadanie mikrotubulov v deliacich sa bunkách je veľmi dynamické. Počas určitej fázy bunkového cyklu vykazujú jedno z piatich typov usporiadania, a to kortikálne usporiadanie, preprofázny zväzok, mitotické vretienko, fragmoplast a radiálne usporiadanie. Jednotlivé typy sa v priebehu bunkového cyklu môžu meniť a sú nahradené iným typom (Fosket & Morejohn, 1992).

Bunky v elongačnej fáze, ktoré nepodliehajú deleniu, sú charakteristické kortikálnym usporiadaním mikrotubulov. Toto usporiadanie je lokalizované v tesnej blízkosti plazmatickej membrány, ku ktorej sú laterálne pripojené. Usporiadanie je špirálovité a ich prevažná orientácia je v pravom uhle k smeru elongácie. Avšak v bunkách so zložitým tvarom (napr. bunky epidermy listov), sú usporiadané v komplexnejších vzoroch. Taktiež ich narušenie má vplyv na usporiadanie a následnú stratu polaritu bunkového predlžovania (Paradez et al., 2006; Elliott & Shaw, 2018).

Preprofázny zväzok (preprophase band – PPB) je významná intracelulárna štruktúra, ktorá sa vytvára pred začiatkom mitózy v bunke. Skladá sa z prstenca usporiadaných mikrotubulov, a mikrofilamentov lemujúcich jadro, a je uložený v kortikálnej cytoplazme. Mikrotubuly a mikrofilamenty sú husto koncentrované a navzájom paralelné. PPB je prítomný v deliacich sa bunkách počas predprofázy a na začiatku profázy. Nahrádza tak kortikálne mikrotubuly a zaniká v prometáfaze pri tvorbe mitotického vretienka (Fosket, 1994; Yabuuchi et al., 2015).

Mitotické vretienko je štruktúra, ktorá je súčasťou mitotického aparátu. Skladá sa z komplexného, vysoko organizovaného súboru MT a z AF, ktorého súčasťou sú aj kinetochorové mikrotubuly. Tie vznikajú počas bunkového delenia v centrozóme polymerizáciou mikrotubulov z alfa a beta tubulínu a ako už bolo skôr uvedené, nahrádzajú preprofázny zväzok. Najhlavnejšou funkciou mitotického vretienka je segregácia a transport chromozómov do dvoch dcérskych jadier počas mitózy (Hubbs et al., 2013; Seagull, 2016).

Po zániku mitotického vretienka sa v neskej telofáze tvorí štruktúra nazývaná fragmoplast, podieľajúca sa na tvorbe bunkovej platničky, ktorá oddelí dcérske bunky. Táto štruktúra sa skladá z dvoch setov antiparalelných mikrotubulov s opačnou polaritou, ktoré sú orientované kolmo k deliacej rovine. Tieto dve sady sa centrifugálne rozširujú smerom

k periférii bunky. Ich mínusové konce sú blízko pólom, zatiaľ čo plusové konce sa prekrývajú v ekvatoriálnej rovine. Táto bipolárna štruktúra mikrotubulov podporuje jednosmerný transport Golgiho vezikúl smerom k plusovým koncom v strednej zóne, kde dochádza k fúzii vezikúl. Niektoré polárne mikrotubuly mitotického vretienka môžu byť opäť zapojené do tvorby fragmoplastu a spoločne s polymerizáciou ďalších mikrotubulov tak vytvoria jeho kompaktné usporiadanie (Fosket, 1994; Motta & Schnittger, 2021; Smertenko et al., 2018).

Ďalšou z možností usporiadania mikrotubulov v bunkách je radiálne usporiadanie. Tento typ je charakteristický pre bunky s centrálnym umiestneným jadrom, ktoré sa buď pripravujú na delenie, alebo majú ukončenú cytokinézu. Mikrotubuly pri tomto usporiadaní vychádzajú z jadrového obalu, prípadne z cytoplazmy, ktorá je v bezprostrednej blízkosti jadrového obalu a smerujú do okolitej cytoplazmy (Flanders et al., 1990; Fosket & Morejohn, 1992).

2.3.3 Dynamika a signalizácia rastlinného cytoskeletu

Dynamika rastlinného cytoskeletu zahŕňa nepretržitú a rýchlu zmenu usporiadania aktínových filamentov a mikrotubulov v reakcii na rôzne podnety a signály. Dynamika aktínových vlákien sa prejavuje procesmi ako sú polymerizácia, depolymerizácia, Spontánne oscilácie, reorganizácia aktínových sietí ale aj dynamikou kortikálnych sietí. Polymerizácia a depolymerizácia aktínových filamentov je dôležitá pre správny tvar a motilitu buniek a môže byť vyvolaná vnútornými ale aj vonkajšími faktormi (Carlsson, 2010; Blanchoin et al., 2014). Po externe indukovanej polymerizácii a následnej depolymerizácii často nasleduje proces takzvanej spontánnej oscilácie periférie bunky. Tieto oscilácie pravdepodobne súvisia so silou, ktorou pôsobí na bunkovú membránu polymerizácia aktínových filamentov a tento proces môže mať význam pri štúdiu vplyvu extracelulárneho prostredia (Carlsson, 2010). Mnohé štúdie ukazujú, že vplyvom rôznych environmentálnych stresov na rastlinu dochádza k reorganizácii aktínového cytoskeletu, ktorá je potrebná na odolnosť rastlín voči týmto vplyvom. Príkladmi týchto stresových faktorov spôsobujúcich reorganizáciu sú napríklad mikrobiálne patogény (B. Wang et al., 2023).

Na druhú stranu dynamika mikrotubulov zahŕňa procesy dynamickej nestability, rastu a nukleácie, reorganizácie počas mitózy a skladania a rozkladania mikrotubulov. Avšak hlavným z nich je dynamická nestabilita čo je proces, pri ktorom mikrotubuly podliehajú nepretržitej výmene medzi fázami rastu a skrakovania. Tento proces je regulovaný viacerými

faktormi, avšak hlavným je rýchlosť GTP hydrolyzy. Pri raste dochádza k pridávaniu dimérov GTP-tubulínu na koniec mikrotubulu a stochastickej hydrolyzácii na GDP-tubulín, čím sa vytvorí stabilizačná GTP-čiapka, po jej zaniknutí dôjde k rýchlemu skráteniu, označovanému ako katastrofa. Ak sa skracovanie rýchlo zmení späť na rast, tak nastane tzv. záchrana mikrotubulu (Bowne-Anderson et al., 2013).

Cytoskelet zohráva dôležitú rolu aj pri signalizácii rastlín. Môže ovplyvňovať signalizáciu nepriamo, napríklad reguláciou vnútrobunkového pohybu vezikúl, avšak mnohé štúdie a databázy naznačujú interakcie cytoskeletálnych proteínov s kinázami, fosfatázami a ďalšími signálnymi komponentami, čím sa poukazuje na početné sieťové prepojenie medzi nimi. Cytoskelet spoločne so súvisiacimi proteínmi je teda súčasťou rôznych signalizačných kaskád, ktoré sú vyvolané najmä ako reakcia na environmentálne vplyvy, ako napríklad obrana proti biotickým a abiotickým faktorom. Vplyvom týchto faktorov dochádza k remodelácii rastlinného cytoskeletu, čo má zásadný význam pri vytváraní štrukturálnych reakcií, napríklad pri tvorbe apoplastickej bariéry na zastavenie prieniku patogénov. Taktiež koordinuje tvorbu mikrodoménových imunitných komplexov, pohyb a agregáciu organel, transport obranných zlúčenín a dynamiku receptorov rozpoznávajúcich vzory (PRR) pri reakcii na infekciu patogénmi. V rámci imunity rastlín sa podieľa aj na spätnej regulácii produkcie reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a spúšťa signalizáciu kyseliny salicylovej (SA) (Takemoto & Hardham, 2004; Moujaber & Stochaj, 2020; J. Wang et al., 2022).

2.3.4 Podiel cytoskeletu na vývojových a obranných procesoch lucerny

Vývoj rastlín je dennodenne ovplyvňovaný rôznymi externými faktormi. Zaraďujú sa sem abiotické faktory ako teplota, chlad, osmotický stres, soľný stres, ťažké kovy, ultrafialové žiarenie (UV) a taktiež aj biotické faktory, kde je rastlina ovplyvňovaná prospešnými (beneficiálnymi) organizmami ale aj patogénmi ako sú baktérie, huby, vírusy, hmyz a podobne. Keďže rastliny, sú nemobilné eukaryotické organizmy, v priebehu evolúcie došlo k vývoju morfológických a fyziologických obranných mechanizmov, s cieľom sa brániť a adaptovať na meniace sa podmienky, a tak čo najviac zvýšiť svoje šance na prežitie. Do týchto mechanizmov sú okrem biochemických a metabolických zložiek zahrnuté aj rôzne bunkové štruktúry, ktorých podiel na daných procesoch je neustále skúmaný. Jednou z dôležitých skúmaných bunkových štruktúr je aj cytoskelet, ktorý podlieha reorganizácii

a zmenám dynamiky pod vplyvom vyššie uvedených faktorov (Song et al., 2019; Kaur et al., 2022).

Cytoskelet lucerny je ako aj u iných vyšších rastlín tvorený primárne aktínovými filamentami a mikrotubulmi. Z hľadiska poľnohospodárskeho významu lucerny, najmä z dôvodu jej schopnosti interakcie s prospešnými symbiotickými baktériami, je hlavným cieľom výskumov zameraných na cytoskelet jeho analýza v nodulačných procesoch a v reakciách na stresové faktory. Aktínový aj mikrotubulový cytoskelet zohráva kľúčovú úlohu pri interakciách so symbiotickými baktériami, ktoré spôsobujú noduláciu. Aktínové filameny prispievajú k dynamickým procesom nevyhnutných pri nodulácii. Ich usporiadanie sa v koreňových vláskoch, ktoré sú najdôležitejším orgánom pre noduláciu, mení v závislosti na fáze vývoja a priebehu infekcie. Významným faktorom je aj mikrotubulárny cytoskelet, ktorý je dôležitý pre udržanie bunkovej štruktúry. Jeho reorganizácia je spojená už so skorými štádiami infekcie a je závislá od rizóbií. Celková organizácia je v prípade symbiózy dosť špecifická a líši sa v jednotlivých vývojových štádiách v súvislosti s typom buniek a pletív (Timmers et al., 1998; Takemoto & Hardham, 2004; Hlaváčková et al., 2023).

Samotný vývoj ale aj produkcia lucerny je obmedzovaná zmenami teploty, ale aj zasolením pôd. Rôzne kultivary môžu nadobúdať odlišnú úroveň tolerancie voči týmto stresovým faktorom, a preto je to záujmom mnohých štúdií. Napríklad vplyv chladu a tepla je spojený so štrukturálnymi zmenami v plazmatickej membráne, ktorá prenáša signál prostredníctvom cytoskeletu, tokov Ca^{2+} a cyklín dependentých proteín kináz (CDPK), čím sa aktivujú rôzne kaskády mitogén aktivovaných proteín kináz (MAPK) (Song et al., 2019). Iným príkladom je soľný stres. Pôdy obsahujú rôznu koncentráciu viacerých solí, ako NaCl, Na_2SO_4 , MgSO_4 , CaSO_4 , MgCl_2 , KCl a Na_2CO_3 . Každá z nich prispieva k stresu zo soli, ale najrozšírenejšou soľou je NaCl (Xiong et al., 2017). Podľa dostupných štúdií je lucerna tolerantná na mierne zasolenie pôd, ak je elektrická vodivosť 2,0 dS/m (1280 ppm) a prah osmotického potenciálu pôdy 1,5 baru (1 bar = 0,987 atm) pri poľnej vodnej kapacite. Avšak vysoké koncentrácie solí výrazne obmedzujú rast a znižujú úrodnosť. Soľný stres má okrem iného dopad na celkovú fyziológiu a metabolizmus rastlín, čo zahŕňa zmeny v enzýmovej aktivite, osmotickej rovnováhe, iónovej homeostáze, prenose signálov a relatívnej expresii génov. Tolerancia voči soli je tiež prepojená s modifikáciou morfológických znakov, ako sú

zmeny v stavbe a raste rastlín, zmeny v hrúbke listovej kutikuly, regulácia prieduchov, klíčenie či rýchlosť fotosyntézy (Li et al., 2014; Quan et al., 2016; Xiong et al., 2017).

2.4 Prehľad molekulárnych markerov a zobrazovacích metód cytoskeletu

Molekulárny marker je možné definovať ako fragment sekvencie DNA spojený s genómom, ktorý sa využíva ako nástroj na identifikáciu konkrétnej sekvencie DNA alebo aj na vizualizáciu konkrétnych štruktúr a kompartmentov v bunkách (W. Liu et al., 2012). Molekulárne markery sa využívajú aj pri štúdiu cytoskeletu. Medzi takéto markery sa radia fluorescenčné proteíny, falloidín, imunogold značenie, stableMARK ale aj protilátky. Tieto markery umožňujú študovať štruktúru a dynamiku cytoskeletu v bunkách, a tak je možné charakterizovať jeho význam v rôznych bunkových procesoch.

2.4.1 Fluorescenčné proteíny

Fluorescenčné proteíny sú molekuly, využívané v oblastiach bunkovej biológie, biochémie a biotechnológie, ako prôby na štúdium úrovne expzie proteínov a ich lokalizácie, dynamiky a interakcií, ale aj ako biosenzory na skúmanie enzýmových aktivít a koncentrácie metabolitov (Niu & Guo, 2017). Sú účinným nástrojom aj pri biologickom zobrazovaní jednotlivých molekúl, neporušených organel, živých buniek a aj celých organizmov. V súčasnosti je vyvinutých mnoho variant fluorescenčných proteínov od modrých po „far-red“ s rôznymi kvantovými výťažkami, fluorescenciou a fotochemickými vlastnosťami. Z hľadiska štruktúry všetky tieto proteíny obsahujú β -barelovú štruktúru, vo vnútri ktorej je uložený chromofór. Niektoré varianty majú menej ako 25% aminokyselinovú podobnosť s proteínmi divokého typu. Zmenené aminokyseliny sa podieľajú na množstve vylepšených funkcií, ako napríklad syntéza chromofóru, úprava spektroskopických vlastností fluorescenčných proteínov ale aj ich štruktúrálnej stability. Vo všeobecnosti je dokázané, že existencia a vlastnosti jedinečného chromofóru fluorescenčného proteínu závisia od β -barelu a okolitej proteínovej matrice. Schopnosť fluorescencie ale aj celkovo spektrálna škála týchto proteínov je taktiež determinovaná β -barelovou kostrou a chemickou štruktúrou chromofóru. Je možné to popísať systémom π -konjugovaných elektrónov, pričom čím je tento systém rozšírenejší tým je emisia viac posunutá do červenej oblasti. Chromofór sa tvorí samočinne bez účasti kofaktorov a enzymatických zložiek z vnútorného tripeptidu (Ser65-Tyr66-Gly67)

prostredníctvom reakcií zahrňajúcich cyklizáciu, dehydratáciu, oxidáciu a prípadne aj hydrolýzu (Sample et al., 2009; Stepanenko et al., 2013).

Jedným z najpoužívanejších fluorescenčných proteínov a zároveň prvým, ktorý bol mutačnou analýzou upravovaný, je zelený fluorescenčný proteín (GFP) pochádzajúci z bioluminiscentnej medúzy *Aequorea victoria*. GFP je tvorený 238 aminokyselinami a jeho veľkosť je stanovená na 26,9 kDa. Proteín má kryštalovú štruktúru a je zložený z β -barelu, ktorý má valcovitý tvar a pozostáva z 11 reťazcov β -listu na vonkajšej strane a s α -héliom na vnútornej strane. GFP je využívaný ako reportérový gén pri štúdií génovej expresie, proteínovej lokalizácii a proteín-proteínových interakciách (Yang et al., 1996; Tsien, 1998). Počas štúdií GFP bolo vytvorených niekoľko modifikácií, ktoré mali prispieť k efektívnosti jeho využívania. Takýmito modifikáciami je napríklad úprava pôvodných dvoch excitačných pík s vlnovými dĺžkami 395 a 475 nm na jeden excitačný pík s vlnovou dĺžkou 488 nm, ktorý je vo viditeľnom rozsahu modrého svetla. Ďalšou modifikáciou bol vývoj nových variantov tohto proteínu pre rôznorodejšie využitie. V dnešnej dobe rozlišujeme zelenú (EGFP), cyánovú (ECFP) a žltú (EYFP) variantu (E. Liu et al., 2011).

Využitie fluorescenčných proteínov je značne rozšírené aj pri analýze cytoskeletu v bunkách. Fúzia týchto proteínov s cytoskeletálnymi komponentami zabezpečuje kvalitnú vizualizáciu štruktúr ale aj dynamiky. V prípade aktínu je ako štandard pre vizualizáciu aktínových filamentov využívaná fúzia fluorescenčných proteínov s tzv. aktín viažúcou doménou č. 2 proteínu Fimbrínu (FABD2). Avšak je nutné využívať promótor s nízkou alebo miernou úrovňou expresie z dôvodu, že vysoká expresia reportéra GFP-FABD2-GFP má inhibičné účinky na rast buniek a orgánov (Ketelaar et al., 2004; Colin et al., 2022). Podobne aj v prípade mikrotubulového cytoskeletu je vizualizácia založená na konjugácii fluoroforu s mikrotubulárnym proteínom. Typickými reportérmi používanými na vizualizáciu je mikrotubulová väzbová doména (MBD) ale aj priame označenie podjednotiek tubulínu alfa 6 (TUA6) a beta 6 (TUB6) fluorescenčným proteínom. MBD a uvedené TUA podjednotky môžu byť fúzované s rôznymi fluorescenčnými proteínmi, čo sa uplatňuje pri analýze organizácie a dynamiky mikrotubulov. Avšak pri využití tohto typu vizualizácie by mala byť kontrolovaná úroveň expresie, pretože podľa dostupných výskumov je zrejmé, že vysoká expresia v prípade použitia MBD môže mať vplyv na polymerizáciu, nukleáciu, zväzkovanie a stabilizáciu mikrotubulov, ale aj na samotný vývoj, pričom hrozia vývojové

defekty. V prípade použitia podjednotiek TUA6 a TUB6, sa môžu vyskytnúť problémy s kvantifikáciou v dôsledku, že fluorescenčný signál sa javí viac cytoplazmatický. Avšak v porovnaní s reportérmi založenými na MBD, markery TUA6 a TUB6 vykazujú menej vedľajších účinkov na vývojový fenotyp. Okrem týchto markerov, ktoré sa využívajú na vizualizáciu celých mikrotubulov je taktiež možné použiť markery na vizualizáciu len určitých subdomén mikrotubulov (Ueda et al., 1999; Fache et al., 2010; Colin et al., 2022).

2.4.2 Faloidín

Jednou z možností značenia cytoskeletu pre jeho následnú vizualizáciu je aj cyklický peptid faloidín a jeho fluorescenčné deriváty. Patrí do skupiny falotoxínov, zložených zo siedmych podobných peptidových kruhov, izolovaných z muchotrávky zelenej (*Amanita phalloides*) (Pollard et al., 2017). Faloidín sa prednostne viaže na F-aktín a pôsobí na stabilizáciu aktínu, čím zabraňuje jeho depolymerizácii (Fujino et al., 2010). Fluorescenčná forma faloidínu je aplikovaná do rastlinných buniek obvykle mikroinjekčne, kde dôjde k okamžitému naviazaniu na aktín. Avšak vo všeobecnosti nie je až tak často využívaný primárne z dôvodu problémov s prenikaním cez cytoplazmatickú membránu a inhibičnej funkcie, keďže faloidín inhibuje migráciu chromozómov a vytvára abnormálne deliace roviny (Seagull & Gunning, 1989; Schmit & Lambert, 1990).

2.4.3 Imunogold značenie

Imunogold značenie je technika podobná imunofluorescenčným technikám. Imunogold značenie, ako už vychádza z názvu, využíva imunoreaktívne proteíny konjugované so zlatom na označenie špecifických bunkových komponentov, ktoré sú predmetom záujmu. Táto technika je využívaná na identifikáciu a lokalizáciu proteínov, antigénov, ale aj iných makromolekúl a poskytuje možnosť vizualizácie týchto štruktúr pomocou elektrónového mikroskopu na ultraštrukturálnej úrovni. Imunogold technika je využívaná aj pri vizualizácii štruktúr a usporiadania cytoskeletu. Obvykle sú vzorky najskôr fixované napríklad glutaraldehydom a následne je aplikovaná primárna protilátka. Po nej nasleduje sekundárna protilátka konjugovaná s koloidným zlatom. Toto značenie v spojení s elektrónovou mikroskopiou umožňuje vizualizáciu s väčšou presnosťou a špecifickosťou v porovnaní s inými svetelnými technikami (De Mey et al., 1982; Golberg & Rubinsky, 2013; Svitkina, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

Autoklávová indikátorová páska, bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 μm , filtračný papier, forma na prípravu gélu, hliníková fólia, chirurgická páska, kadičky, magnetické miešadlá, mikroskúmavky, nožnice, odmerné valce, Pasteurove pipety, parafilm, pinzety, skalpel, skúmavky typu Falkon, sterilné Petriho misky okrúhle, sterilné Petriho misky hranaté, sterilné špičky

3.1.1 Použité chemikálie

1000x Gamborg's vitamin solution (Duchefa Biochemie)

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa biochemie)

2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (Duchefa Biochemie)

Adenín (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma Aldrich)

Dusičnan amónny (Biochemica)

Dusičnan draselný (Sigma Aldrich)

Ethanol 96% (Tereos TTD)

Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma Aldrich)

Chlorid draselný (Sigma Aldrich)

Kinetin (Duchefa Biochemie)

L-glutamin (Duchefa Biochemie)

L-glutathion (Sigma- Aldrich)

MilliQ voda

Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Myo-inositol (Duchefa Biochemie)

Phire Hot Start II DNA Polymeráza

5x Phire reakčný pufor

Prolin (Sigma Aldrich)

Sacharóza (Sigma Aldrich)

Síran draselný (Sigma Aldrich)

Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Sigma Aldrich)

Tetrahydrát síranu manganatého

Thiamin hydrochlorid (Sigma Aldrich)

Tikarcilin (Duchefa Biochemie)

Tween ® 20 (Sigma-Aldrich)

Vodovodná voda

3.1.2 Roztoky a médiá

Sterilizačný roztok (100 ml)

1 ml chlórnan sodný

50 µl Tween

Doplniť MilliQ H₂O do 100 ml. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 µm.

Roztok 2,4-D

Rozpustiť 10 mg 2,4-D v 50 µl etanolu, prídanie 800 µl H₂O a 150 µl 1M NaOH, zvertexovať a doplniť do 10 ml H₂O. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 µm. Skladovanie pri teplote -20°C.

Roztok kinetínu

Rozpustiť 1 mg kinetínu v 20 µl 1M NaOH, zvertexovať, doplniť do 10 ml H₂O. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 µm. Skladovanie pri teplote -20°C.

Zmes aminokyselín

6,65 g glutamín

0,83 g serín

0,004 g adenín

0,083 g L-glatatión

Doplniť MilliQ H₂O do 250 ml. Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí s veľkosťou 0,22 μm. Skladovanie pri teplote 4°C.

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 · 7 H₂O

0,5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychladíť na cca 55 °C a cez bakteriologický filter pridať:

30 ml.l⁻¹ zmes Aminokyselín

1 mg.l⁻¹ 2,4-D

0,1 mg.l⁻¹ kinetín

1 ml.l⁻¹ 1000x Gamborg's vitamin

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 · 7 H₂O

0,5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplniť MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychladíť na cca 55 °C a cez bakteriologický filter pridať:

30 ml.l⁻¹ zmes Aminokyselín

1 ml.l⁻¹ Gamborg's vitamin

MMS médium

4,3 g.l⁻¹ MS basal salt mixture

0,1 g.l⁻¹ myo-inositol

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplnenie MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu. Po sterilizácii vychladnutie na cca 55 °C a pridať:

1 ml.l⁻¹ 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution

MS médium

4,3 g.l⁻¹ MS basal salt mixture

0,1 g.l⁻¹ myo-inositol

30 g.l⁻¹ sacharóza

4,5 g.l⁻¹ Gellan gum

Doplnenie MilliQ H₂O, úprava pH na 5,7. Sterilizácia pomocou autoklávu.

Tekuté LB médium

25 g.l⁻¹ LB broth

Doplnenie MilliQ H₂O. Sterilizácia pomocou autoklávu

Tuhé LB médium

40 g.l⁻¹ LB broth s agarom

Doplnenie MilliQ H₂O. Sterilizácia pomocou autoklávu.

SH médium

3,2 g.l⁻¹ Schenk and Hildebrant basal salt mixture

30 g.l⁻¹ sacharóza

0,5 g.l⁻¹ MES

Kokultivačné médium

10 mM MES (pH 5,6)

150 µM acetosyringon

10 mM MgCl₂

Doplnenie MilliQ H₂O.

Soľný roztok – 300 mM NaCl

0,876 g NaCl

50 ml tekutého MS média

50x Tris-acetátový pufor (TAE)

121 g Tris báza

28,55 ml kyselina octová

50 ml EDTA

421, 45 ml MilliQ H₂O

Upravenie pH na 7,8.

1x TAE

20 ml 50x TAE

1980 ml MilliQ H₂O

1% Agarózový gél

1 g Agarosa

100 ml TAE pufor

1 µl Midori Green

3.1.3 Použité prístroje

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)

Automatické pipety

Autokláv (Stervap, MMM Group)

Elektromagnetická miešačka IKA combimag REO (Drehzahl Electronic)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Konfokálný laserový skenovací mikroskop (CLSM; LSM 710, Axio Imager Z2, Carl Zeiss Germany)

Laboratorne váhy S1 502 (BEL Engineering)

Chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)

Mikrocentrifúga Microfuge16 (Beckman Coulter)

Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)

PCR cycler T100 Thermal Cyclers (BioRad)

pH meter PC 2700 (Eutech Instruments)

Skener (Image Scanner III)

Stereomikroskop Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss)

Sterilný laminárny box (Merci)

Výrobník deionizovanej vody Simplicity water purification system (Millipore)

3.1.4 Software na spracovanie výsledkov

CytoSpectre

ImageJ

Microsoft Office 365

GraphPad Prism

ZEN 2.3 SP1 – black edition (Carl Zeiss)

ZEN 3.5 – blue edition (Carl Zeiss)

Image Lab 4.0.1.

3.1.5 Rastlinný materiál

Rastliny *M. sativa*:

- tagRFP-TUA6
- GFP-FABD2
- RSY
- tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2
- GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6

Rastliny *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*)

3.1.6 Bakteriálny materiál

Agrobacterium tumefaciens nesúci konštrukty:

- 35S::tagRFP:TUA6
- 35S::GFP:FABD2

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava B5H média

Do 1000 ml kadičky bolo pridaných 850 ml MilliQ vody a za stáleho miešania na magnetickej miešačke pomocou magnetického miešadla boli pridané Gamborg's basal salt mixture, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Následne bol pridaný prolín, sacharóza, Gellan gum a objem bol doplnený na 1000 ml MilliQ vodou. Po premiešaní všetkých zložiek bolo pH upravené na 5,7 pomocou 1 M a 0,1 M KOH. Médium bolo rozliate do 1000 ml sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo médium ochladené na približne 60°C a do takto vychladeného média bola v laminárnom boxe (flowbox), za sterilných podmienok pridaná zmes aminokyselín, hormóny (2,4-D a kinetín), 1000x Gamborg's vitamin a antibiotikum Tikarcilín ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na prevenciu proti bakteriálnym infekciám. Uvedené zložky pridávané až po sterilizácii v autokláve boli vopred prefiltrované cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm . 500 ml média so všetkými zložkami bolo rozliate po 25 ml do 20 sterilných okrúhlych Petriho misiek. Ak médium nebolo okamžite použité, bolo sterilne skladované v chladničke pri teplote 4°C.

3.2.2 Príprava B50 média

V 1000 ml kadičke bolo do 850 ml MilliQ vody pridané Gamborg's basal salt mixture, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Po pár minútach miešania bol pridaný prolín, sacharóza, Gellan gum a objem bol doplnený do 1000 ml MilliQ vodou. pH média bolo pomocou 1M a 0,1 M KOH upravené na hodnotu 5,7. Pripravené médium bolo rozliate do 1000 ml sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo vychladené na cca 60 °C a za sterilných podmienok v laminárnom boxe bol pridaný 1000x Gamborg's vitamin, zmes aminokyselín a Tikarcilín ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ktoré boli vopred prefiltrované cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm . Médium bolo rozliate po 25 ml do sterilných okrúhlych Petriho misiek a skladované pre ďalšie použitie v chladničke pri teplote 4°C.

3.2.3 Príprava MMS média

Do 1000 ml kadičky bolo pridaných 850 ml MilliQ vody, MS basalt salt mixture, myo-inositol, sacharóza a následne Gellan gum, za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Objem bol doplnený MilliQ vodou na 1000 ml a pH upravené na 5,7 pomocou 1M a 0,1 M KOH. Následne bolo médium rozliate po 500 ml do 1000 ml sklenených fliaš a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii a ochladení média na cca 55°C bolo do média v sterilných

podmienkach v laminárnom boxe pridané 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution a Tikarcilín ($500 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Pripravené médium bolo rozlievané do sterilných hranatých Petriho misiek po 50 ml a skladované pri teplote 4°C v chladničke pre ďalšie použitie.

3.2.4 Príprava MS média

V 1000 ml kadičke bolo zmiešaných 850 ml MilliQ vody za stáleho miešania na magnetickej miešačke spolu s MS basalt salt mixture, sacharózou a Gellan gum. Následne bol objem doplnený na 1000 ml a po rozmiešaní všetky zložiek bolo pH upravené pomocou 1M a 0,1 M KOH na hodnotu 5,7. Médium bolo rozliate do dvoch 1000 ml sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo vychladené na cca 55°C a v sterilných podmienkach v laminárnom boxe doplnené o antibiotikum Tikarcilín ($500 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Pripravené médium bolo rozliate do hranatých sterilných Petriho misiek po 50 ml. Médium bolo skladované v chladničke pri teplote 4°C .

3.2.5 Príprava tekutého MS média

Do 600 ml kadičky bolo pridaných približne 400 ml MilliQ vody a za stáleho miešania pomocou magnetického miešadla boli pridané MS basal salt mixture a sacharóza. Následne bol objem doplnený pomocou odmerného valca MilliQ vodou na objem 500 ml a pH bolo upravené na hodnotu 5,7 pomocou 1M a 0,1 M KOH. Pripravené médium bolo naliate do sklenenej fľaše s objemom 1000 ml a sterilizované v autokláve. Po sterilizácii bolo skladované vo fľaši v chladničke pri teplote 4°C .

3.2.6 Príprava tekutého MS média s prídavkom NaCl

Z vopred pripraveného tekutého MS podľa kapitoly 3.2.5, bolo odobraných 50 mililitrov do skúmavky typu falkon. Bola vypočítaná navážka NaCl na výslednú koncentráciu $300 \text{mmol}.\text{l}^{-1}$, ktorá bola pridaná do 50 ml tekutého MS média. Následne to bolo premiešané pomocou vortexu. Pripravený solný roztok bol skladovaný v chladničke pri teplote 4°C .

3.2.7 Príprava tekutého LB média

Do kadičky s 500 ml MilliQ vody bolo za stáleho miešania na magnetickej miešačke pridané zodpovedajúce množstvo LB broth. Po premiešaní bolo pH upravené na hodnotu 7,2 pomocou 1M a 0,1 M KOH. Takto pripravené médium bolo v 1000 ml sklenenej fľaši

sterilizované v autokláve a následne ponechané na stole na ochladnutie a nakoniec uskladnené v chladničke pri 4°C na ďalšie použitie.

3.2.8 Príprava tuhého LB média

V kadičke s objemom 600 ml bolo pridaných 500 ml MilliQ vody a za stáleho miešania na magnetickej miešačke bolo pridaných 20 g LB broth s agarom. Takto pripravené médium bolo preliate do sklenenej fľaše a sterilizované v autokláve. Po ochladnutí na približne 60°C bolo rozliate po 25 ml do okrúhlych sterilných Petriho misiek vo flowboxe. Na ďalšie použitie bolo skladované v chladničke pri 4°C.

3.2.9 Príprava SH média

V 600 ml kadičke bolo zmiešaných na magnetickej miešačke 400 ml MilliQ vody, s navážkami na 500 ml, Schenk and Hildebrant basal salt mixture, sacharóza a MES. Po premiešaní bol za pomoci odmerného valca doplnený objem MilliQ vodou na 500 ml. pH bolo upravené na 5,7 pomocou 1M KOH. Médium so správnym pH bolo v 1000 ml sklenenej fľaši autokláované. Po sterilizácii sa nechalo vychladnúť na približne 55°C a v sterilných podmienkach sa pridalo 1000X Schenk and Hildebrant vitamin solution. Hotové médium bolo skladované v chladničke pri 4°C.

3.2.10 Príprava kokultivačného média

Boli pripravené zásobné roztoky 100 mM MES s pH 5,6, 100 mM MgCl₂ a 150 mM acetosyringon, ktoré boli sterilizované vo flowboxe pomocou bakteriologického filtra pórní s veľkosťou 0,22 µm. Z jednotlivých roztokov bolo odobrané vypočítané množstvo do falkon skúmavky a následne bol objem doplnený na 50 ml sterilnou MilliQ vodou. Takto pripravené médium bolo následne používané pri tranzientnej transformácii listov tabaku.

3.2.11 Transformácia *Medicago sativa*

Na transformáciu boli zvolené dve línie *M. sativa*, GFP-FABD2 línia a tagRFP-TUA6 línia, ktoré boli pestované vo fytotrone v *in vivo* podmienkach.

3.2.11.1 Príprava baktérií *Agrobacterium tumefaciens*

Glycerolový roztok s baktériami *Agrobacterium tumefaciens*, kmeň GV3101 s príslušnými vektormi je skladovaný v mrazničke pri teplote – 80°C. Za sterilných podmienok bolo z tohto

roztoku sterilnou špičkou odobraných 30 μ l a prenesených aj so špičkou do 50 ml skúmavky typu Falcon s 10 ml LB média so selekčnými antibiotikami. 5 ml sterilného LB média bez antibiotík bolo odložené a použité neskôr ako blank. Suspenzia bola ponechaná v inkubátore v tme, približne 24 hodín pri teplote 28°C a 180 otáčkach za minútu. Po 24 hodinách bola kontrolovaná optická hustota za pomoci spektrofotometra. Po dosiahnutí optickej hustoty baktérií pri 600 nm (OD_{600}) medzi 0,8-1,5 boli bunky centrifugáciou pri 3000 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote separované od média. Po separácii bol supernatant odliaty do odpadu a bakteriálne bunky boli resuspendované v čistom LB médiu pre dosiahnutie optickej hustoty $OD_{600} = 0,7$.

3.2.11.2 Sterilizácia listových explantátov *Medicago sativa*

Na transformáciu boli použité rastliny dvoch línií *M. sativa*, rastúce v *in vivo* podmienkach vi fytotrone. Z vrchnej časti rastlín boli odobraté zdravé mladé listy, do skúmavky typu Falcon (50 ml), ktorá bola naplnená nesterilnou vodou. Po odobratí rastlinného materiálu, boli listy sterilizované v laminárnom boxe najskôr vo Falcon skúmavke so 70% etanolom po dobu približne 10 sekúnd. Následne boli listy pomocou sterilnej pinzety presunuté do Falcon skúmavky so sterilným roztokom Tweenu na dobu 1 minúty. Posledným krokom sterilizácie bolo presunutie listov do sterilizačného roztoku (1% hypochlorid sodný + 0,05% tween), v ktorom boli pretrepávané 1,5 minúty. Po sterilizácii boli listy trikrát prepláchnuté v sterilnej MilliQ vode.

3.2.11.3 Transformácia listových explantátov *Medicago sativa*

Na transformáciu boli použité pripravené sterilné listy, ktoré sa pomocou skalpelu rozrezali na polovicu a vložili sa do 12 ml SH média v 50 ml Falcon skúmavke. Do skúmavky s SH médiom a listovými explantátmi boli pridané 3 ml kultúry *Agrobacterium tumefaciens*. Explantáty spoločne s bakteriálnou kultúrou boli dobre premiešané a potom nechané v pokoji a tme po dobu 30 minút. Následne boli explantáty prenesené na sterilný filtračný papier pre odstránenie nadbytočného média. Inokulované listy boli prenesené na okrúhle Petriho misky s B5H médiom. Pripravené misky s explantátmi boli ponechané na kultiváciu vo fytotrone, kde boli z dôvodu zníženia intenzity svetla, prekryté jednou vrstvou filtračného papiera. Kultivácia prebiehala 7 dní pri 24°C, fotoperióde 16 hodín svetlo, 8 hodín tma a pri intenzite

svetla približne $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po kultivácií boli explantáty premyté na odstránenie bakteriálnej kultúry v sterilnej vode.

3.2.11.4 Regenerácia rastlín procesom somatickej embryogenézy

Z premytých listových explantátov bola odstránená prebytočná voda pomocou sterilného filtračného papiera a následne boli prenesené na Petriho misky s B5H médiom so selekčnými antibiotikami. Petriho misky s explantátmi boli kultivované vo fytotrone pri 24°C , fotoperióde 16 hodín svetlo, 8 hodín tma a pri intenzite svetla približne $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu troch týždňov. Po indukciu kalogenézy boli dobre vyvinuté kalusy prenesené na B50 médium so selekčnými antibiotikami, na vývoj embryí, ktoré boli v torpédovitom štádiu prenesené na hranaté Petriho misky s MMS médiom. Po vyvinutí koreňa boli mladé rastlinky prenesené na hranaté Petriho misky s MS médiom pre dokončenie vývoja. Následne boli označené a udržiavané v *in vitro* podmienkach na MS médiu.

3.2.12 Tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*

Na tranzientnú transformáciu boli využívané približne mesiac staré rastliny *Nicotiana benthamiana* s dobre vyvinutými listami. Jedna rastlina bola transformovaná konštruktom *35S::GFP::FABD2* a druhá konštruktom *35S::tagRFP:TUA6*. Celý postup je rozdelený do dvoch dní, počas ktorých boli pripravované transformované rastliny a ďalšie dva dni bola vykonaná mikroskopická analýza.

3.2.12.1 Príprava bakteriálnych kultúr

Celý postup práce bol vykonávaný v sterilnom flowboxe. Do vopred označených falkon skúmaviek s objemom 50 ml bolo pridaných 10 ml pripraveného LB média, spoločne so selekčnými antibiotikami (výsledná koncentrácia antibiotík: rifampicin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, kanamycin $25 \mu\text{g}/\text{ml}$) a $20 \mu\text{l}$ glycerolového inokula *A. tumefaciens* s príslušnými konštruktmami. Glycerolové inokulum bolo uskladňované v mrazničke pri teplote -80°C . Pred použitím sa nechalo rozmraziť na ľade a následne bolo opäť vrátené do mrazničky po zvortexovaní a zmrazení v tekutom dusíku. Skúmavky s LB médiom a baktériami boli umiestnené na trepačke a kultivované cez noc pri 28°C , 180 RPM. Časť LB média s antibiotikami bola kultivovaná bez baktérií a slúžila ako negatívna kontrola a následne ako blank v ďalšom postupe.

3.2.12.2 Infiltrácia listov *Nicotiana benthamiana*

Rastliny *N. benthamiana* boli prenesené z fytotronu a zaliate vodou dve hodiny pred transformáciou, aby došlo k otvoreniu prieduchov na spodnej strane listov. V bakteriálnych kultúrach, ktoré boli cez noc kultivované, bola zmeraná optická hustota pri vlnovej dĺžke 600 nm (OD_{600}) a ako blank bolo použitých 0,5 ml LB média s antibiotikami. Po nameraní absorbančie v rozsahu 0,5-1,5 bolo zo skúmaviek vypočítané množstvo kultúry, ktoré bolo odobrané a scentrifugované podľa vzorca: $(x \cdot OD_p) / OD_n$, kde x je objem kokultivačného média, ktoré chceme použiť (2 ml), OD_p je požadované OD s hodnotou 0,5 a OD_n je namerané OD. Centrifugácia prebehla pri 4000 x g, 10 min, pri 4°C. Supernatant bol odliaty a vzniknutý pelet bol rozsuspendovaný v 2 ml kokultivačného média. Následne bola bakteriálna suspenzia inkubovaná 2 hodiny v tme, pri pokojovej teplote (RT).

Po inkubácii bola bakteriálna suspenzia infiltrovaná do listov *N. benthamiana*. Suspenzia bola nasatá do injekčnej striekačky, ktorá bola priložená k spodnej strane listu a pomaly pri slabom tlaku bola suspenzia vtlačovaná do listu. Ako negatívna kontrola bolo rovnako aplikované čisté kokultivačné médium. Následne bola infiltrovaná plocha listu označená fixkou a listy farebnou páskou na rozlíšenie. Po infiltrácii a označení boli rastliny prikryté čiernym igelitovým sáčkom a ukryté na temné miesto v laboratóriu. Na druhý deň boli rastliny prenesené do fytotronu.

3.2.12.3 Mikroskopická analýza tranzientnej transformácie *Nicotiana benthamiana*

Po 48 hodinách boli z listov vystrihnuté infiltrované plochy a z nich boli pripravené preparáty s použitím podložného skla, krycieho skla a vody. Preparáty boli pozorované pomocou konfokálneho laserovacieho skenovacieho mikroskopu LSM710 (Carl Zeiss) s využitím objektívu Plan-Apochromat 20x/0,8 NA, s fluorescenčnou excitáciou pomocou laseru 488 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 500-560 nm a laseru 561 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 582-656 nm. Mikroskopická analýza bola zopakovaná rovnako po 72 hodinách od infiltrácie.

3.2.13 Príprava mikroskopických preparátov

Mikroskopické preparáty z rastlín *M. sativa* boli pripravované za sterilných podmienok v laminárnom boxe z *in vitro* línií. Na dlhšie okraje podložného skla boli nalepené prúžky

obojsstrannej pásky a uprostred medzi pásky bolo nanosených pomocou pipety približne 150 µl tekutého MS média. Následne bola z rastliny odrezaná časť koreňa, listu alebo stonky, ktorá bola prenesená do média a prikrytá opatrne krycím sklíčkom. Na takto pripravených preparátoch bola vykonaná mikroskopická analýza s využitím primárne objektívu Plan-Achromat 20x/0,8 NA a následne objektívu Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27 s fluorescenčnou excitáciou pomocou laseru 488 nm a detekciou fluorescence v rozmedzí 500-560 nm a laseru 561 nm a detekciou fluorescence v rozmedzí 582-656 nm.

3.2.14 Soľný stres

Z rastlín jednotlivých línií boli odrezané nové korene, ktoré boli položené na pripravené podložné sklíčka s tekutým MS médiom a prikryté krycím sklíčkom. Takto pripravené preparáty boli najskôr nasnímané pomocou konfokálneho mikroskopu s využitím objektívu Plan-Achromat 20x/0,8 NA M27 s fluorescenčnou excitáciou pomocou laseru 488 nm a detekciou fluorescence v rozmedzí 500-560 nm a laseru 561 nm a detekciou fluorescence v rozmedzí 582-656 nm. Následne bol perfúziou aplikovaný soľný roztok (300 mM NaCl) priamo na preparát v mikroskope. Po aplikácii bola sledovaná plazmolýza buniek v koreni v meristematickej až elongačnej zóne po dobu 30 minút v intervaloch 10 minút. Po 40 minútach bol nasnímaný detail buniek za pomoci objektívu Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27 s rovnakou fluorescenčnou excitáciou, ako pri predchádzajúcom objektíve.

3.2.14 Colony PCR

Colony PCR (polymerázová reťazová reakcia) je metóda na rýchly skrining kolónií kvasiniek alebo baktérií, ktoré rástli na selektívnych médiách po ich transformácii. Touto metódou je možné overiť prítomnosť požadovaného konštruktú alebo amplifikovať časť konštruktú. V tejto práci colony PCR metóda slúžila práve na overenie prítomnosti dvoch konštruktov (*35S::GFP::FABD2*, *35S::tagRFP:TUA6*) v baktériách *A. tumefaciens*. Baktérie boli kultivované na tuhom LB médiu so selekčnými antibiotikami po dobu 48 hodín. Z narastených kolónií bolo náhodne zvolených niekoľko, ktoré boli prenesené pomocou plastovej sterilnej pipetovej špičky do 10 µl PCR vody. Následne bola pripravená reakčná PCR zmes podľa tabuľky č. 1. Na amplifikáciu boli použité priame a spätné primery uvedené v tabuľke č. 3. Pomocou automatickej pipety bolo do PCR skúmaviek napipetovaných 9 µl reakčnej zmesi a 1 µl vzorky z transformovaných kolónií. PCR reakcia prebiehala v PCR

termocykleri s nastavením podľa tabuľky č. 2. Výsledný PCR produkt bol overený prostredníctvom DNA agarózovej elektroforézy.

Tab. 1: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre Phire Hot Start II DNA polymerázu

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	4,6 µl
5x Phire reakčný pufor	2 µl
Priamy primer	1 µl
Spätný primer	1 µl
Phire Hot Start II DNA Polymeráza	0,2
10 mM dNTP	0,2
Celkový objem reakcie	9 µl

Tab. 2: Teplotný program Colony PCR s použitím Phire Hot Start II DNA polymerázy

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Vstupná Denaturácia	98°C	5 min	1
Denaturácia	98°C	5 s	
Nasadenie primerov	72°C/61,7°C	5 s	40
Elongácia	72°C	15 s	
Finálna elongácia	72°C	1 min	1
Schladenie	4°C	∞	

Tab. 3: Použité primery pre amplifikáciu požadovaných úsekov DNA.

Názov primeru	5'-3' sekvencia
tagRFP70008-FN	AAGAAGACTTCATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC
tagRFP70008-RN	TTGAAGACAACATTCTTGTGCCCCAGTTTGCTAG
GFPfw1complemSeqReGFP1f	GAT GCC ACC TAC GGC AAG
GFPprev2complemSeqFwGFP1	GGG TGT TCT GCT GGT AGT G

3.2.15 Agarózová gélová elektroforéza

Agarózová gélová elektroforéza je metóda používaná na rozlíšenie fragmentov DNA na základe ich molekulovej hmotnosti. Je dané, že menšie fragmenty migrujú v géle rýchlejšie oproti väčším. Na agarózovú gélovú elektroforézu bol využívaný 1% agarózový gél s 15 jamkami. Do jednotlivých jamiek bolo nanesených 10 µl PCR produktu a do prvej 10 µl DNA ladderu. Elektroforéza prebiehala po dobu 30 minút pri 400 mA a 100 V. Po 30 minútach bol gél vyvolaný.

3.2.16 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza

Na kvalitatívnu analýzu orientácie mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov v rôznych rastlinných orgánoch, ale aj na analýzu zmien ich orientácie vplyvom stresu bol použitý program CytoSpectre. Kvantitatívna analýza bola vykonaná použitím programu ImageJ pomocou makra FibrilTool, podľa publikácie Boudaoud et al. (2014). Následne bola kvantitatívna analýza štatisticky vyhodnotená v programoch GraphPad Prism a Microsoft Excel.

3.2.16.1 Kvalitatívna analýza v programe CytoSpectre

CytoSpectre je plne automatizovaný nástroj, ktorý umožňuje kvantifikovať orientáciu štruktúr na mikroskopických snímkach. Tento program je založený na spektrálnej analýze a Fourierovej transformácii (Kartasalo et al., 2015). Z nasnímaných mikroskopických snímok, pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu, objektívom Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27 boli pripravené výrezy samostatných buniek, ktoré boli orientované tak, aby bolo usporiadanie cytoskeletálnych komponentov vyhodnocované vždy vzhľadom k najdlhšej osi danej bunky. Táto úprava bola aplikovaná pred analýzou vo všetkých zahrnutých aktínových aj mikrotubulových transgénnych líniách. Výsledky analýzy tohto programu sú zobrazované ako kruhové grafy.

3.2.16.2 Kvantitatívna analýza cytoskeletu

V rámci kvantitatívnej analýzy bol hodnotený stupeň usporiadania mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov meraním anizotropie, ktorá porovnáva výskyt dominantných mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov vzhľadom na orientáciu hlavnej osi bunky. Numerický výsledok anizotropie nadobúda hodnoty od 0 (úplná izotropia – rovnomerné

rozloženie bez prevládajúcej orientácie) po 1 (dokonalá anizotropia – determinované usporiadanie podľa jednej orientácie). Na túto analýzu bolo použité makro FibrilTool v programe ImageJ. Vo vybraných bunkách boli pomocou nástroja Polygon zvolené oblasti záujmu (ROI), tak aby sa vynechali okraje buniek, kde často býva signál saturovaný. Následne sa v tejto oblasti použil priamo nástroj FibrilTool, ktorý stanovil numerickú hodnotu anizotropie. Tieto hodnoty boli prevedené do grafov v programe Microsoft Excel.

3.2.16.3 Štatistická analýza

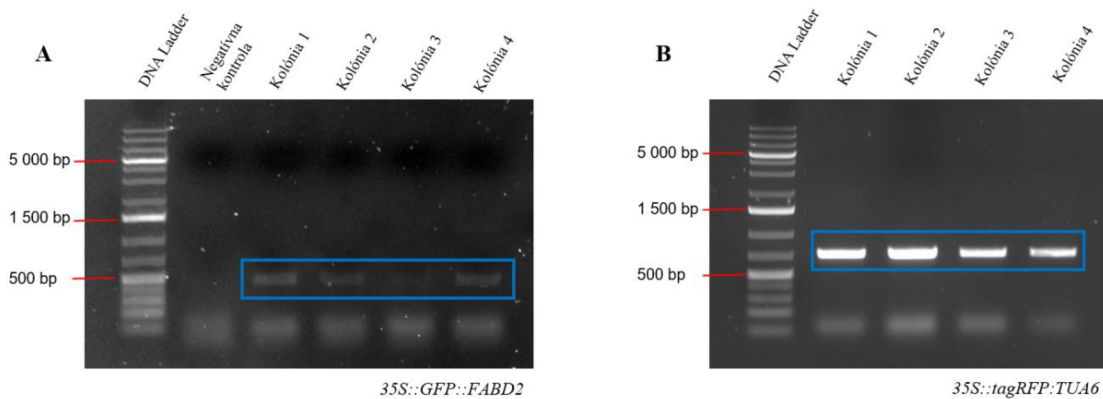
Po kvantitatívnej analýze stupňa usporiadania mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov meraním anizotropie boli získané údaje z programu ImageJ štatisticky vyhodnotené pomocou programu GraphPad Prism. V tomto programe bol zvolený One-way ANOVA test a Tukey's multiple comparisons test ($P < 0,05$), pričom boli vždy porovnávané všetky sledované skupiny medzi sebou. Po prevedení uvedených testov boli získané číselné hodnoty, ktoré určovali štatistickú preukaznosť. Štatisticky významné rozdiely boli zaznačené do vopred pripravených grafov v programe Microsoft Excel pomocou malých písmen. V prípade, že rozdiel medzi jednotlivými skupinami nebol štatisticky významný, v grafe je to označené rovnakými písmenami.

4 VÝSLEDKY

Táto kapitola je zameraná na vyhodnotenie výsledkov dosiahnutých v rámci experimentálnej časti diplomovej práce. V prvej časti kapitoly sú uvedené výsledky z analýzy používaných konštruktov pomocou metódy Colony PCR, overenie týchto konštruktov tranzientnou transformáciou rastlín *N. benthamiana*, v druhej časti je popísaná príprava transgénnych línií rastlín *M. sativa* procesom stabilnej transformácie a ich mikroskopická analýza. Tretia časť sa venuje vplyvu abiotického faktora, konkrétne soľného stresu, na cytoskelet rastlín *M. sativa* a *N. benthamiana*.

4.1 Colony PCR

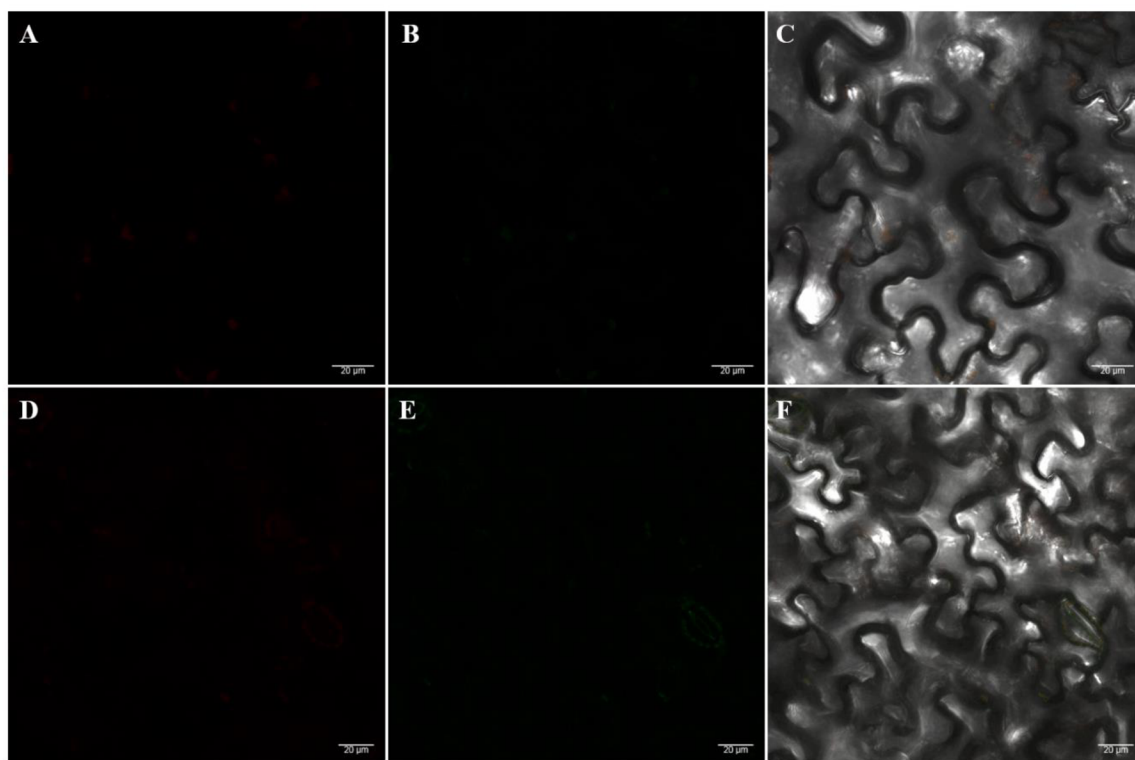
Colony PCR metóda úspešne overila prítomnosť *35S::GFP::FABD2*, *35S::tagRFP:TUA6* konštruktov v baktériách *A. tumefaciens* používaných na ďalšiu tranzientnú transformáciu *Nicotiana benthamiana* a stabilnú transformáciu transgénnych línií *M. sativa*. Výsledný PCR produkt tejto analýzy bol overený prostredníctvom DNA agarózovej elektroforézy (Obr. 4).



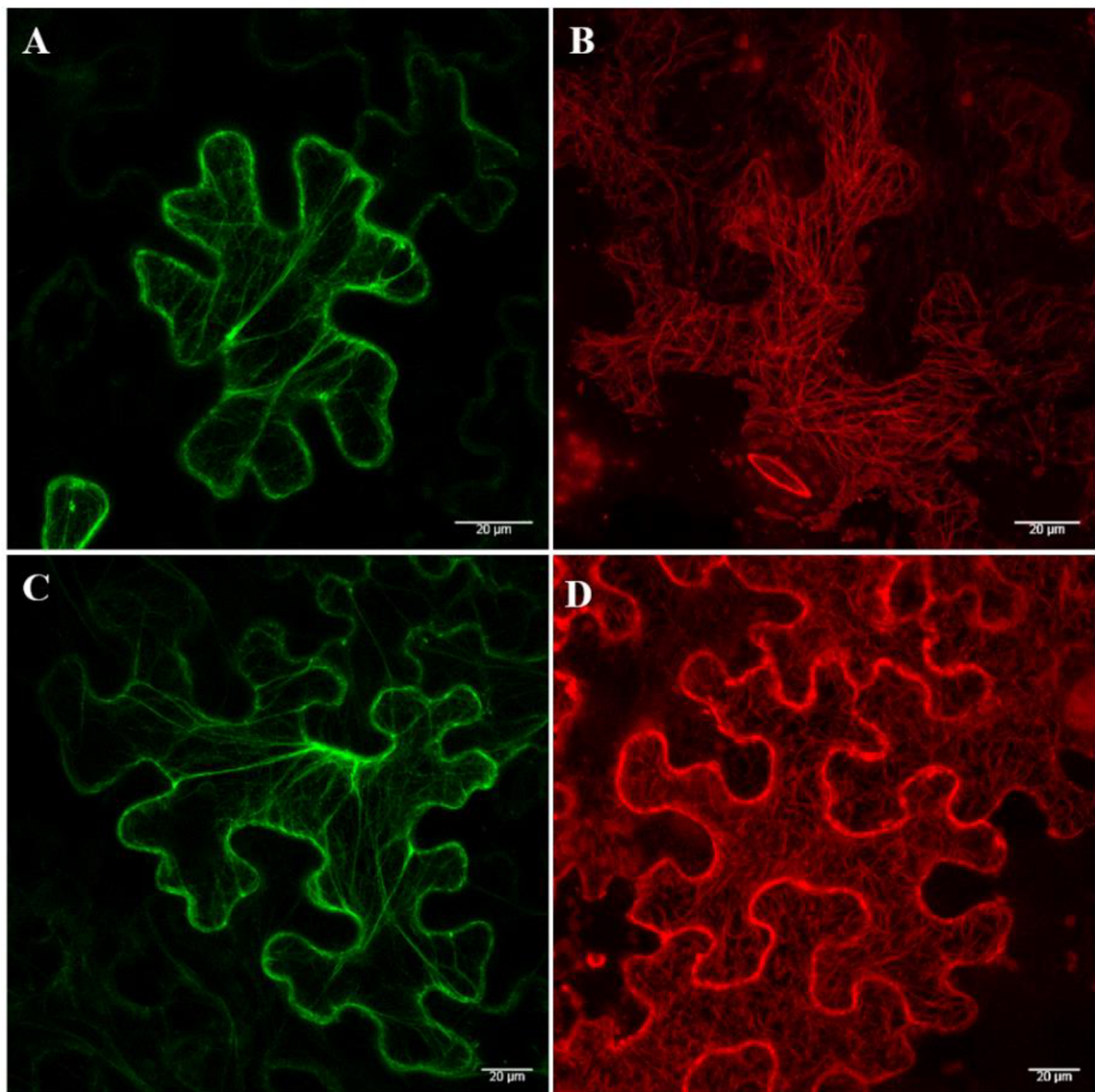
Obrázok 4. Analýza overenia prítomnosti konštruktov *35S::GFP::FABD2*, *35S::tagRFP:TUA6* metódou Colony PCR. (A) *35S::GFP::FABD2*, (B) *35S::tagRFP:TUA6*. Modrý rámik zobrazuje značky jednotlivých konštruktov na 1% agarózovom gély.

4.2 Tranzientná transformácia *N. benthamiana*

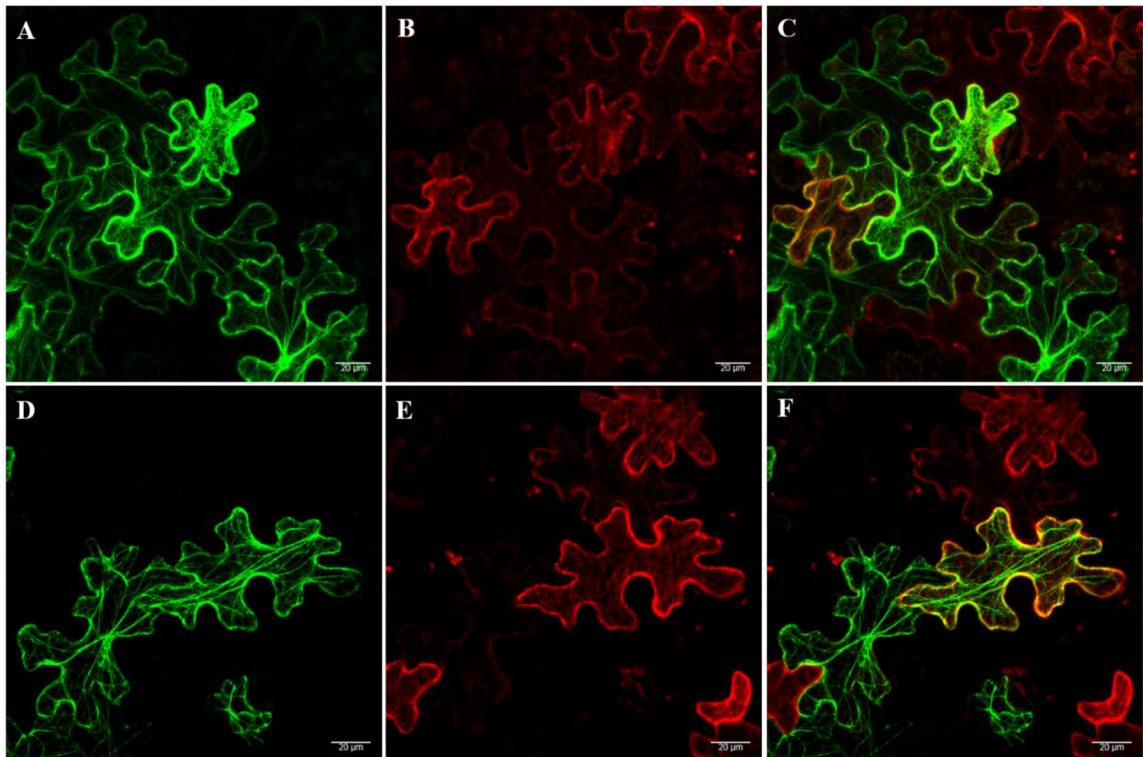
Na overenie používaných konštruktov (*35S::GFP::FABD2*, *35S::tagRFP::TUA6*) bola prevedená tranzientná transformácia *N. benthamiana*. Ako negatívna kontrola slúžili listy, ktoré boli infiltrované čistým kokultivačným médiom. Tieto listy, ako sa očakávalo, nevykazovali pri mikroskopickej analýze fluorescenčný signál ani v jednom z dvoch sledovaných fluorescenčných kanálov (Obr. 5). Ďalej boli listy transformované najskôr konštruktami samostatne, kde boli už po 48 hodinách viditeľné epidermálne bunky s expresiou jednotlivých konštruktov (Obr. 6). Následne boli listy ďalšej rastliny infiltrované kokultivačným médiom, obsahujúcim oba konštrukty súčasne (Obr. 7). Opäť bola úspešnosť tranzientnej transformácie aj v tomto prípade mikroskopicky potvrdená už po 48 hodinách od infiltrácie. Boli pozorované epidermálne bunky, ktoré obsahovali iba jeden z konštruktov, ale aj bunky, ktoré niesli obidva konštrukty.



Obrázok 5. Negatívna kontrola tranzientnej transformácie listov *Nicotiana benthamiana*. (A-C) 48 hodín po infiltrácii čistým kokultivačným médiom, (D-F) 72 hodín po infiltrácii čistým kokultivačným médiom. (A,D) fluorescenčný kanál pre tagRFP, (B,E) fluorescenčný kanál pre GFP, (C,F) prechádzajúce svetlo. Mierka 20 µm.



Obrázok 6. Mikroskopická analýza tranzientnej transformácie listov *Nicotiana benthamiana* konštruktmi samostatne. (A) 48 hodín po infiltrácii kokultivačným médiom s konštruktom *35S::GFP::FABD2*, (B) 48 hodín po infiltrácii kokultivačným médiom s konštruktom *35S::tagRFP::TUA6*. (C) 72 hodín po infiltrácii kokultivačným médiom s konštruktom *35S::GFP::FABD2*, (D) 72 hodín po infiltrácii kokultivačným médiom s konštruktom *35S::tagRFP::TUA6*. (A,C) fluorescenčný kanál pre GFP, (B,D) fluorescenčný kanál pre tagRFP. Mierka 20 µm.



Obrázok 7. Mikroskopická analýza tranzientnej transformácie listov *Nicotiana benthamiana* oboma konštruktami súčasne. (A-C) 48 hodín po infiltrácii kokultivačným médiom s konštruktami *35S::tagRFP:TUA6* a *35S::GFP::FABD2*, (D-F) 72 hodín po infiltrácii kokultivačným médiom s konštruktami *35S::tagRFP:TUA6* a *35S::GFP::FABD2*. (A,D) fluorescenčný kanál pre GFP, (B,E) fluorescenčný kanál pre tagRFP, (C,F) prekryv oboch fluorescenčných kanálov. Mierka 20 µm.

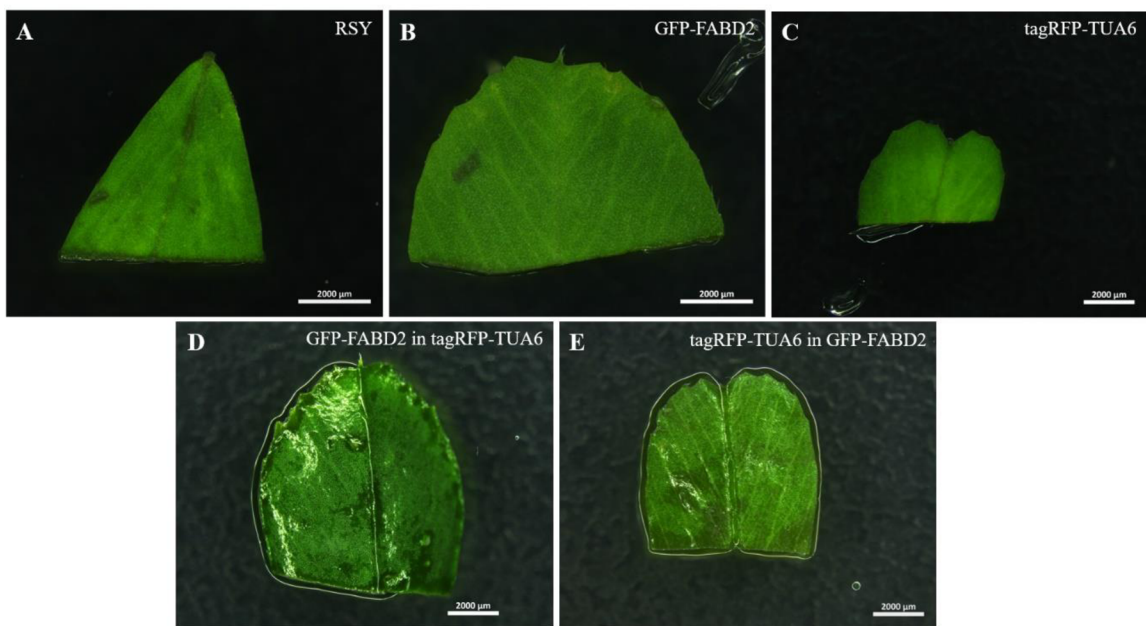
4.3 Stabilná transformácia listových explantátov rastlín *Medicago sativa*

4.3.1 Kultivácia *Agrobacterium tumefaciens*

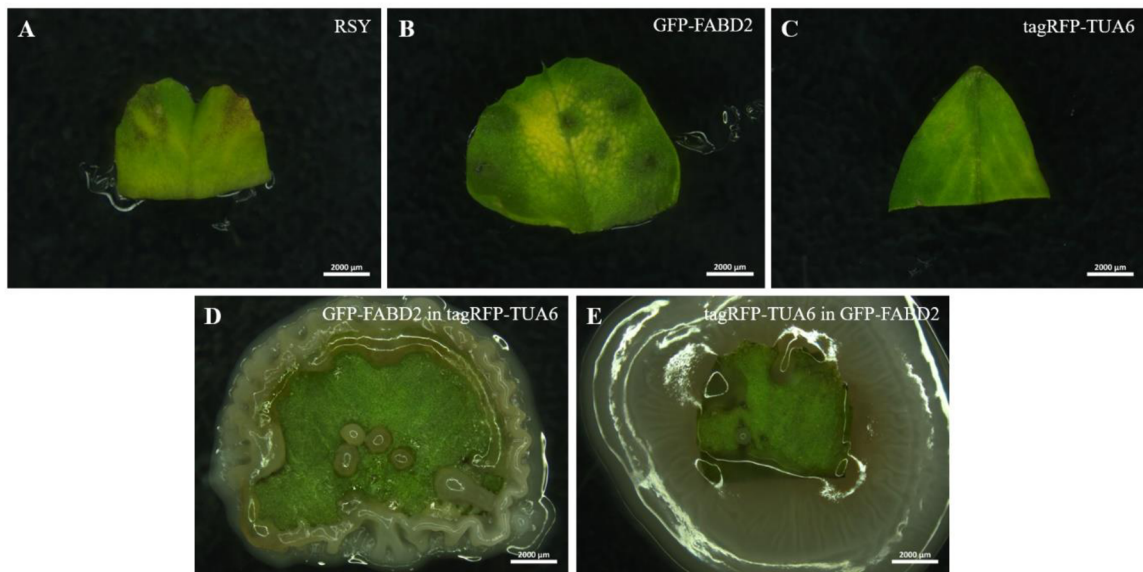
Z glycerolového roztoku s baktériami *Agrobacterium tumefaciens*, kmeň GV3101 s príslušnými vektormi (*35S::tagRFP:TUA6* a *35S::GFP::FABD2*) bolo odoberaté množstvo 30 µl a prenesené do tekutého LB média s obsahom selekčných antibiotík v 50 ml skúmavke typu Falcon. Bakteriálna suspenzia bola kultivovaná v inkubátore v tme približne 24 hodín pri teplote 28°C a 180 otáčkach za minútu. Po 24 hodinách a dosiahnutí optickej hustoty (OD_{600}) medzi 0,8-1,5 boli bunky separované od média centrifugáciou a vzniknutý supernatant odliaty do odpadu. Bakteriálne bunky boli resuspendované v čistom LB pre dosiahnutie optickej hustoty $OD_{600} = 0,7$.

4.3.2 Transformácia listových explantátov *Medicago sativa*

Z rastlín *M. sativa* transgénnych línií GFP-FABD2 a tagRFP-TUA6 rastúcich v *in vivo* podmienkach boli odobraté listy, ktoré boli sterilizované. Sterilné listové explantáty boli inokulované kultúrou *A. tumefaciens* s príslušným vektorom a ponechané 30 minút v tme. Po následnom osušení listových explantátov na sterilnom filtračnom papieri boli prenesené na Petriho misky s B5H médiom a ponechané sedem dní vo fytotrone prekryté filtračným papierom (Obr. 8 A-E). Listové explantáty na Petriho miskách boli sedem dní po inokulácii premyté od bakteriálnej kultúry v sterilnej MilliQ vode a prenesené na nové B5H médium (Obr. 9 A-E). Na kontrolu procesu transformácie slúžili listové explantáty z kultivaru Regen-SY (netransgénna kontrola, RSY), a z tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2 (kontrolné jednoduché transgénne línie), kde listové explantáty boli prenesené po sterilizácii na B5H médium a kultivované za rovnakých podmienok. Celý proces bol dokumentovaný pomocou Zoom stereomikroskopu.



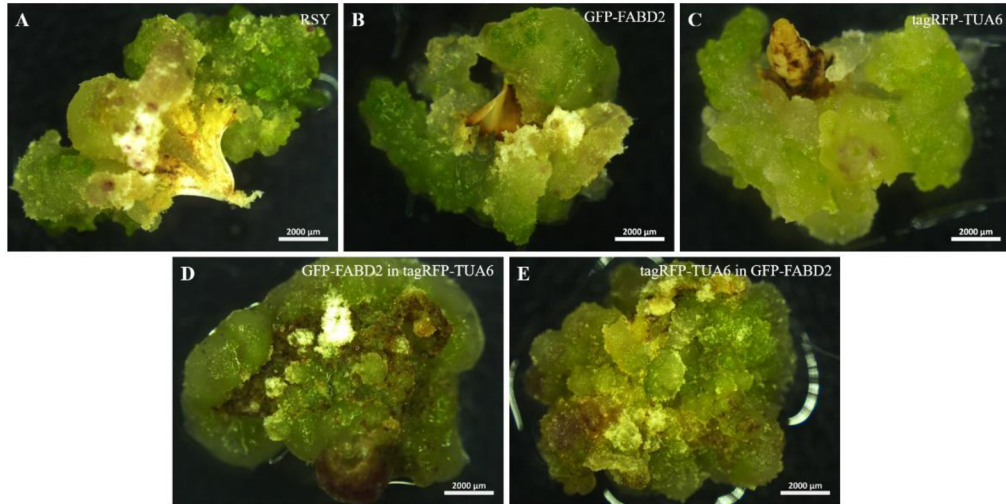
Obrázok 8. Transformácia listových explantátov rastlín *Medicago sativa* – listové explantáty 1. deň inokulácie kultúrou *Agrobacterium tumefaciens*. (A) kontrolná línia Regen-SY (RSY), (B) transgénna línia GFP-FABD2, (C) transgénna línia tagRFP-TUA6, (D) transgénna línia tagRFP-TUA6 transformovaná konštruktom *35S::GFP::FABD2*. (E) transgénna línia GFP-FABD2 transformovaná konštruktom *35S::tagRFP:TUA6*. Mierka 2000 µm.



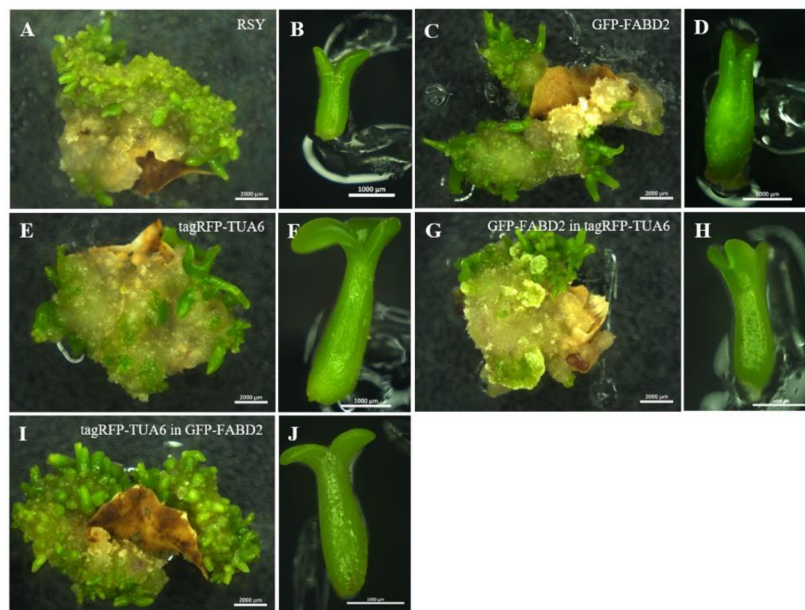
Obrázok 9. Transformácia listových explantátov rastlín *Medicago sativa* – listové explantáty 7 dní po inokulácii kultúrou *Agrobacterium tumefaciens*. (A) kontrolná línia Regen-SY (RSY), (B) transgénná línia GFP-FABD2, (C) transgénná línia tagRFP-TUA6, (D) transgénná línia tagRFP-TUA6 transformovaná konštruktom *35S::GFP::FABD2*, (E) transgénná línia GFP-FABD2 transformovaná konštruktom *35S::tagRFP:TUA6* Mierka 2000 µm.

4.3.3 Regenerácia transgénnych rastlín z listových explantátov *Medicago sativa* po transformácii *Agrobacterium tumefaciens*

Po približne troch týždňoch od kultivácie listových explantátov na B5H médiu bola indukovaná kalogenéza u všetkých línií. Vytvorené kalusy boli presunuté na Petriho misky s B50 médiom, na vývoj somatických embryí (Obr. 10). Po ďalších troch týždňoch bola pozorovaná tvorba somatických embryí, ktoré boli v torpédovitom štádiu vývoja presunuté na hranaté Petriho misky s MMS médiom (Obr. 11). Po iniciácii vývoja nadzemnej a koreňovej časti zo somatických embryí, boli mladé rastlinky presunuté na hranaté Petriho misky s MS médiom pre dokončenie vývoja a následný rast a udržiavanie týchto vyvinutých rastlín v *in vitro* podmienkach (Obr. 12). Proces kalogenézy a somatickej embryogenézy bol zaznamenaný pomocou Zoom stereomikroskopu a vyvinuté mladé rastlinky na MS médiu boli dokumentované pomocou Skenera (Image Scanner III) a Zoom stereomikroskopu.



Obrázok 10. Kalogenéza transgénnych línií *Medicago sativa* – kalusy približne 3 týždne po inokulácii kultúrou *Agrobacterium tumefaciens*. (A) kontrolná línia Regen-SY (RSY), (B) transgénna línia GFP-FABD2, (C) transgénna línia tagRFP-TUA6, (D) transgénna línia tagRFP-TUA6 transformovaná konštruktom 35S::GFP::FABD2 (E) transgénna línia GFP-FABD2 transformovaná konštruktom 35S::tagRFP:TUA6 Mierka 2000 µm.



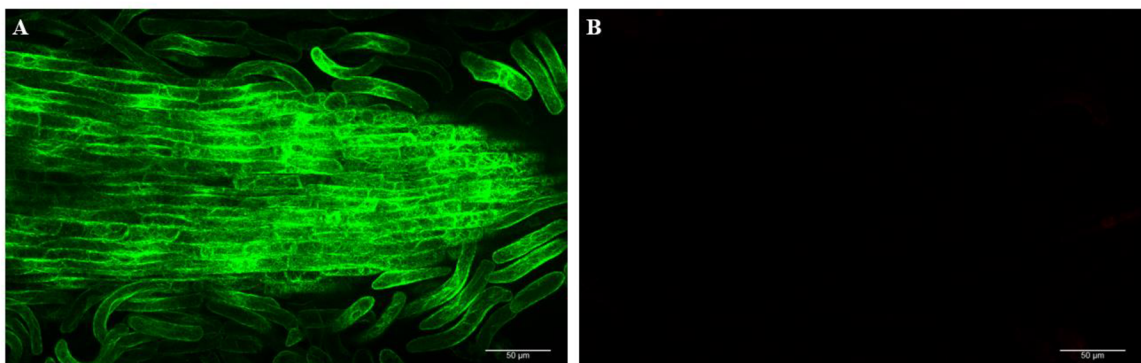
Obrázok 11. Embryogénne kalusy a somatické embryá línií *Medicago sativa*. (A,B) kontrolná línia Regen-SY (RSY), (C,D) transgénna línia GFP-FABD2, (E,F) transgénna línia tagRFP-TUA6, (G,H) transgénna línia tagRFP-TUA6 transformovaná konštruktom 35S::GFP::FABD2 (I,J) transgénna línia GFP-FABD2 transformovaná konštruktom 35S::tagRFP:TUA6 (A,C,E,G,I) Mierka 2000 µm, (B,D,F,H,J) mierka 1000 µm.



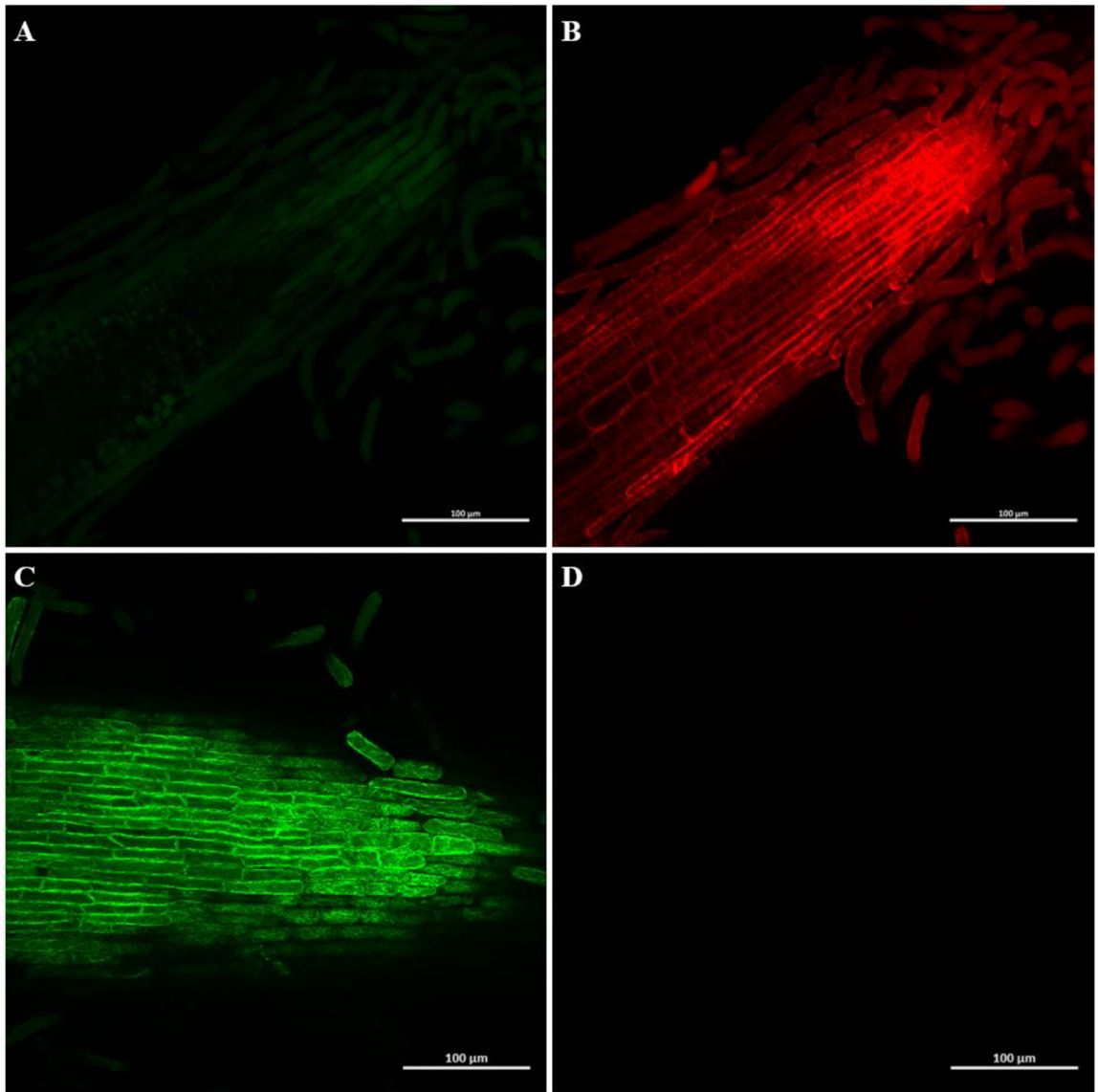
Obrázok 12. Mladé rastlinky línií *Medicago sativa* po regenerácii somatickou embryogenézou na MS médiu. (A) transgénna línia tagRFP-TUA6, (B) transgénna línia GFP-FABD2, (C) transgénna línia tagRFP-TUA6 transformovaná konštruktom 35S::*GFP::FABD2* (D) transgénna línia GFP-FABD2 transformovaná konštruktom 35::*tagRFP:TUA6*. Mierka 2 cm.

4.4 Mikroskopická selekcia transformovaných línií *Medicago sativa*

Mladé rastlinky boli ponechané po transformácii a následnej regenerácii procesom somatickej embryogenézy v *in vitro* podmienkach na MS médiu. Tieto rastliny boli selektované pomocou mikroskopickej analýzy s využitím konfokálneho mikroskopu s objektívom Plan-Achromat 20x/0,8 NA M27 s fluorescenčnou excitáciou pomocou laseru 488 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 500-560 nm a laseru 561 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 582-656 nm. Z transgéennej línie tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2, kde bol do transgéennej línie GFP-FABD2 transformovaný konštrukt *35S::tagRFP:TUA6* bolo získaných 34 regenerovaných rastlín. V týchto rastlinách nedošlo vôbec k expresii vloženého konštruktú a pri mikroskopickej analýze vykazovali len prítomnosť GFP-FABD2, ktorý bol produkovaný konštruktom *35S::GFP::FABD2*. Prejavil sa teda len pôvodný konštrukt materskej transgéennej rastliny (Obr. 13). V prípade druhej dvojitej transgéennej línie GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 bolo získaných 24 regenerovaných rastlín. Z týchto rastlín vykazovali 4 prítomnosť tagRFP-TUA6 ako dôkaz expresie pôvodného konštruktú *35S::tagRFP:TUA6* materskej transgéennej rastliny, čo sa prejavilo špecifickým červeným signálom označujúcim mikrotubuly (Obr. 14B). Avšak vo fluorescenčnom kanáli pre GFP bol pozorovaný len nešpecifický signál (Obr. 14A). Vo zvyšných 20 rastlinách pri mikroskopickej selekcii boli viditeľné zeleno značené aktínové filamenty čo potvrdzuje prítomnosť GFP-FABD2 a teda expresie vneseného konštruktú *35S::GFP::FABD2* (Obr. 14C), avšak vo fluorescenčnom kanáli pre tagRFP nebol pozorovaný žiaden signál (Obr. 14D). Ani jedna z rastlín nevykazovala prítomnosť oboch konštruktov súčasne.



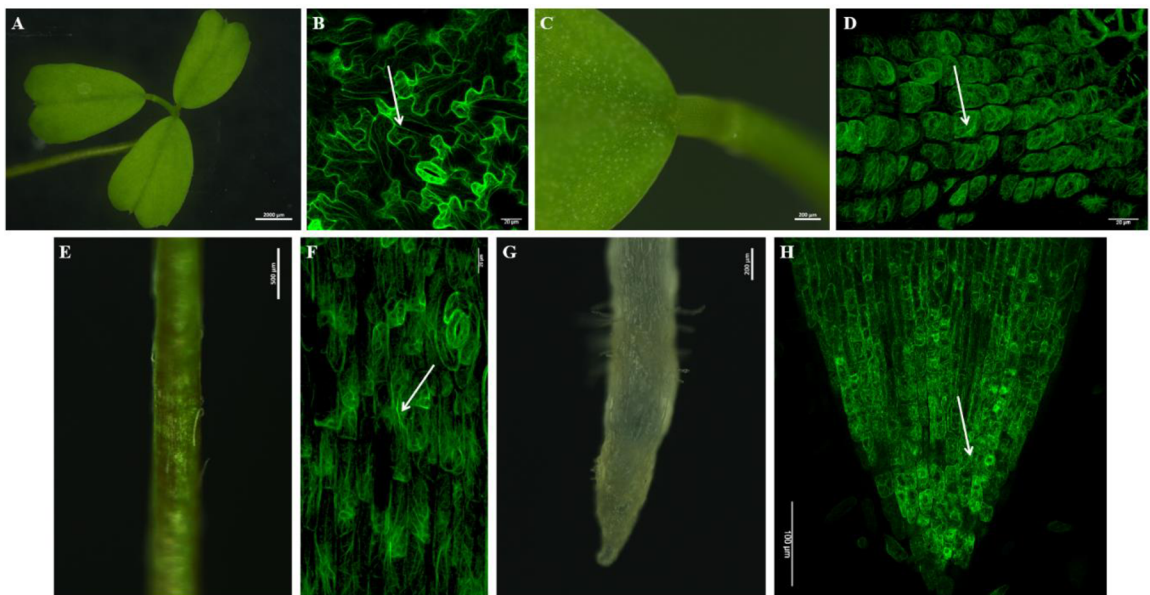
Obrázok 13. Mikroskopická selekcia transgéennej línie tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2. (A) Koreňová špička, fluorescenčný kanál pre GFP, (B) fluorescenčný kanál pre tagRFP. Mierka 50 µm.



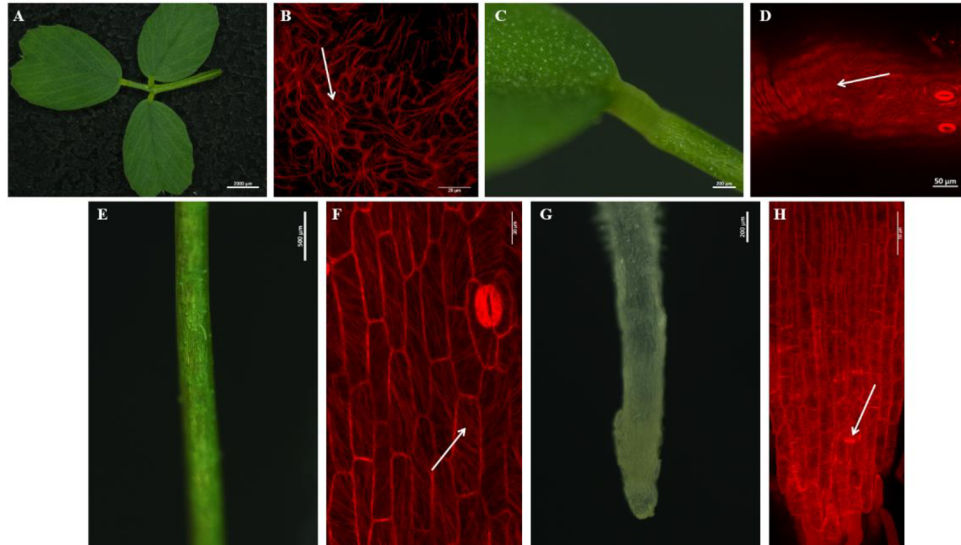
Obrázok 14. Mikroskopická selekcia transgéennej línie GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6. (A) koreňová špička, fluorescenčný kanál pre GFP, a (B) fluorescenčný kanál pre tagRFP. (C) Koreňová špička, fluorescenčný kanál pre GFP a (D) fluorescenčný kanál pre tagRFP. Mierka 100 µm.

4.5 Mikroskopická analýza cytoskeletu v rôznych orgánoch a pletivách rastlín transgénnych línií *Medicago sativa*

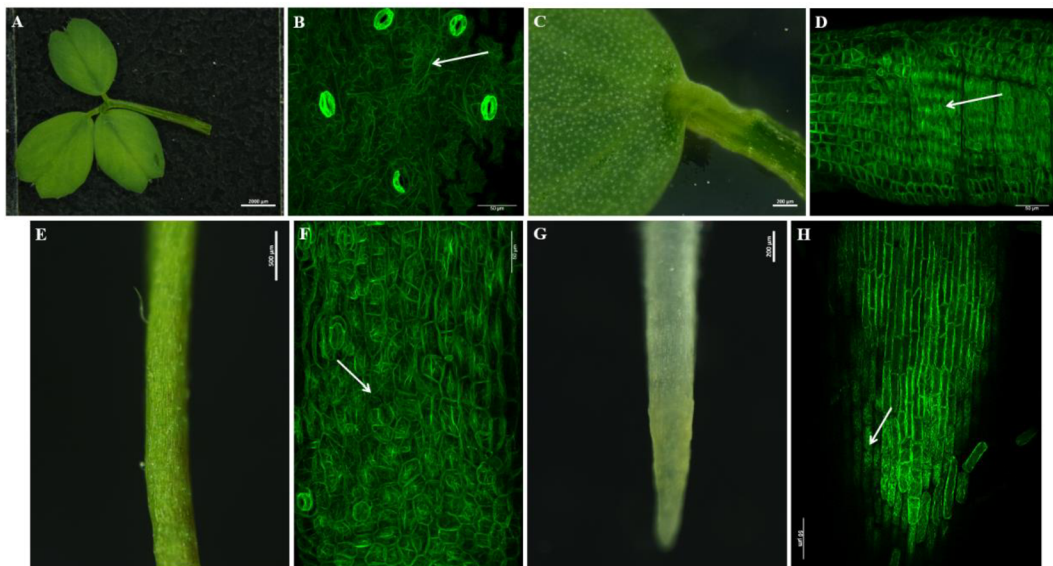
Z rastlín transgénnych línií GFP-FABD2, tagRFP-TUA6, GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 a tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2 boli odobraté orgány, z ktorých boli pripravené preparáty na mikroskopiu. Konkrétne boli preparáty pripravované z listov, stopiek, stoniek a koreňov. Tieto rastlinné orgány boli najskôr zdokumentované na Zoom stereomikroskope a následne pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu bol analyzovaný v bunkách cytoskelet. Keďže po selekcii „dvojité“ transgénne línie vykazovali vždy prítomnosť len jedného cytoskeletálneho markera, v líniách GFP-FABD2 (Obr. 15), GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 (Obr. 17), tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2 (Obr. 19) boli dokumentované len aktínové mikrofilamenty, a v líniách tagRFP-TUA6 (Obr. 16) a GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 (Obr. 18) naopak len mikrotubuly.



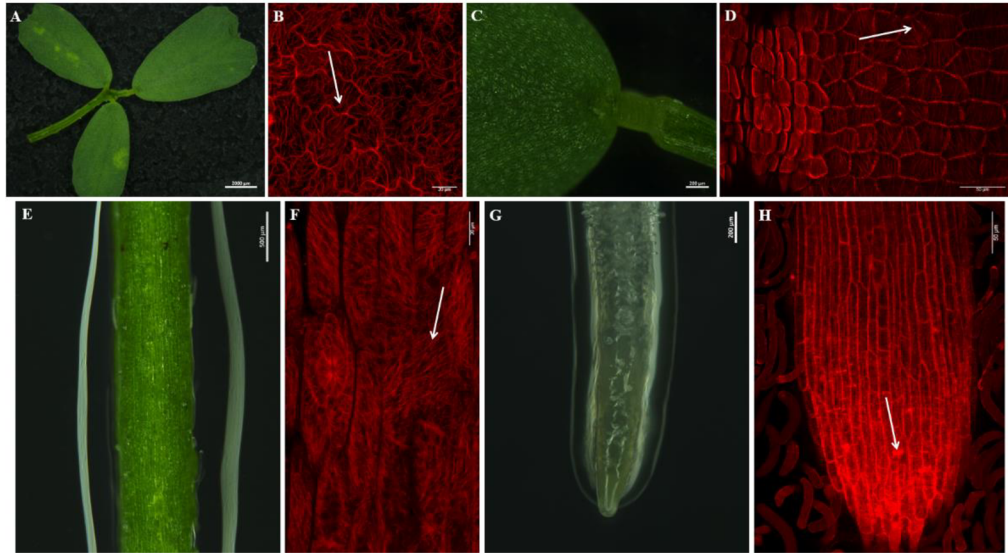
Obrázok 15. Mikroskopická analýza aktínových mikrofilamentov u línie GFP-FABD2. (A) list, (B) epidermálne bunky listu, (C) časť listu a stopka, (D) bunky stopky, (E) stonka, (F) epidermálne bunky stonky, (G) koreň, (H) bunky koreňa. (A, C, E, G) Zoom stereomikroskop. (B, D, F, H) Konfokálny laserový mikroskop, fluorescenčný kanál pre GFP. (A) Mierka 2000 µm. (B, D, F) Mierka 20 µm. (C, G) Mierka 200 µm. (E) Mierka 500 µm. (H) Mierka 100 µm. Šípky ukazujú na aktínové vlákna v bunkách.



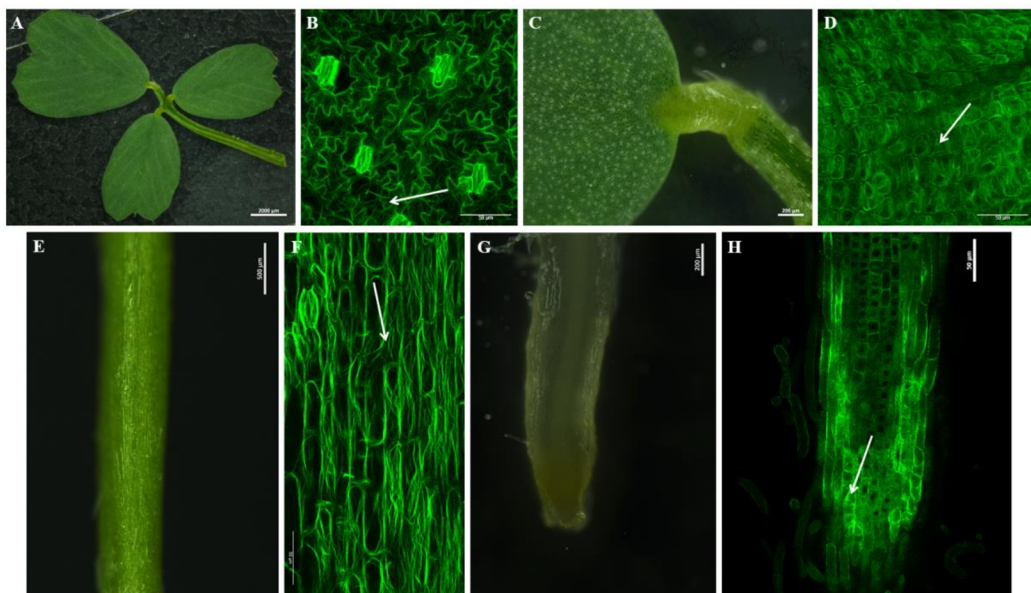
Obrázok 16. Mikroskopická analýza mikrotubulov u línie tagRFP-TUA6. (A) list, (B) epidermálne bunky listu, (C) časť listu a stopka, (D) bunky stopky, (E) stonka, (F) epidermálne bunky stonky, (G) koreň, (H) bunky koreňa. (A, C, E, G) Zoom stereomikroskop. (B, D, F, H) Konfokálny laserový mikroskop, fluorescenčný kanál pre tagRFP. (A) Mierka 2000 μm . (B, F) Mierka 20 μm . (C, G) Mierka 200 μm . (D, H) Mierka 500 μm . (E) Mierka 500 μm . Šípky ukazujú na mikrotubuly v bunkách.



Obrázok 17. Mikroskopická analýza aktínových mikrofilamentov u línie GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6. (A) list, (B) epidermálne bunky listu, (C) časť listu a stopka, (D) bunky stopky, (E) stonka, (F) epidermálne bunky stonky, (G) koreň, (H) bunky koreňa. (A, C, E, G) Zoom stereomikroskop. (B, D, F, H) Konfokálny laserový mikroskop, fluorescenčný kanál pre GFP. (A) Mierka 2000 μm . (B, D, F, H) Mierka 50 μm . (C, G) Mierka 200 μm . (E) Mierka 500 μm . Šípky ukazujú na aktínové vlákna v bunkách.



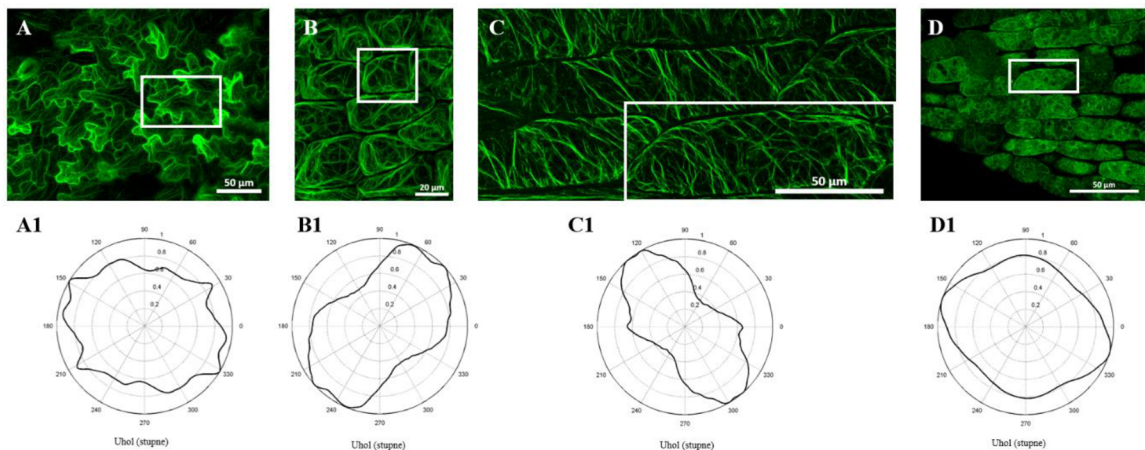
Obrázok 18. Mikroskopická analýza mikrotubulov u línie GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6. (A) list, (B) epidermálne bunky listu, (C) časť listu a stopka, (D) bunky stopky, (E) stonka, (F) epidermálne bunky stonky, (G) koreň, (H) bunky koreňa. (A, C, E, G) Zoom stereomikroskop. (B, D, F, H) Konfokálny laserový mikroskop, fluorescenčný kanál pre tagRFP. (A) Mierka 2000 μm . (B, F) Mierka 20 μm . (C, G) Mierka 200 μm . (D, H) Mierka 100 μm (E) Mierka 500 μm . Šípky ukazujú na mikrotubuly v bunkách.



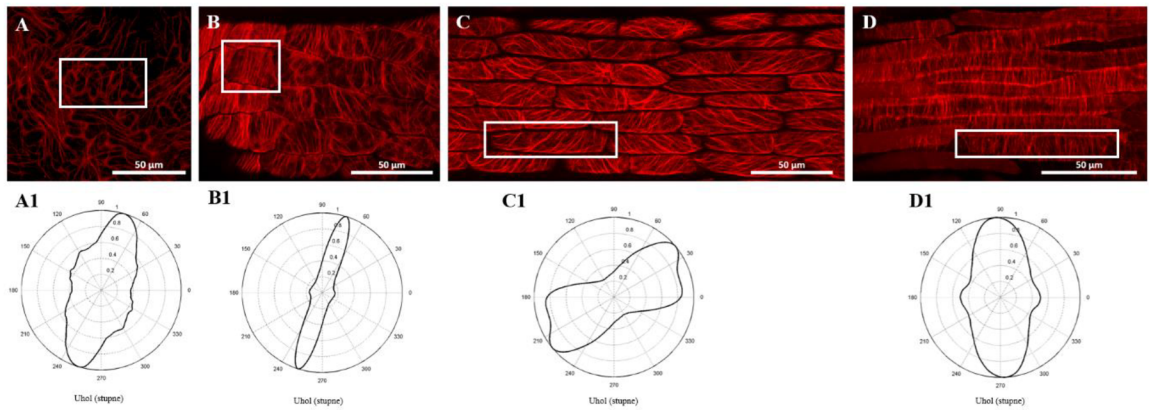
Obrázok 19. Mikroskopická analýza aktínových mikrofilamentov u línie tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2. (A) list, (B) epidermálne bunky listu, (C) časť listu a stopka, (D) epidermálne bunky stopky, (E) stonka, (F) bunky stonky, (G) koreň, (H) bunky koreňa. (A, C, E, G) Zoom stereomikroskop. (B, D, F, H) Konfokálny laserový mikroskop, fluorescenčný kanál pre GFP. (A) Mierka 2000 μm . (B, D, F, H) Mierka 50 μm . (C, G) Mierka 200 μm . (E) Mierka 500 μm . (H) Mierka 100 μm . Šípky ukazujú na aktínové vlákna v bunkách.

4.6 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza cytoskeletu v rôznych orgánoch a pletivách rastlín transgénnych línií *Medicago sativa*

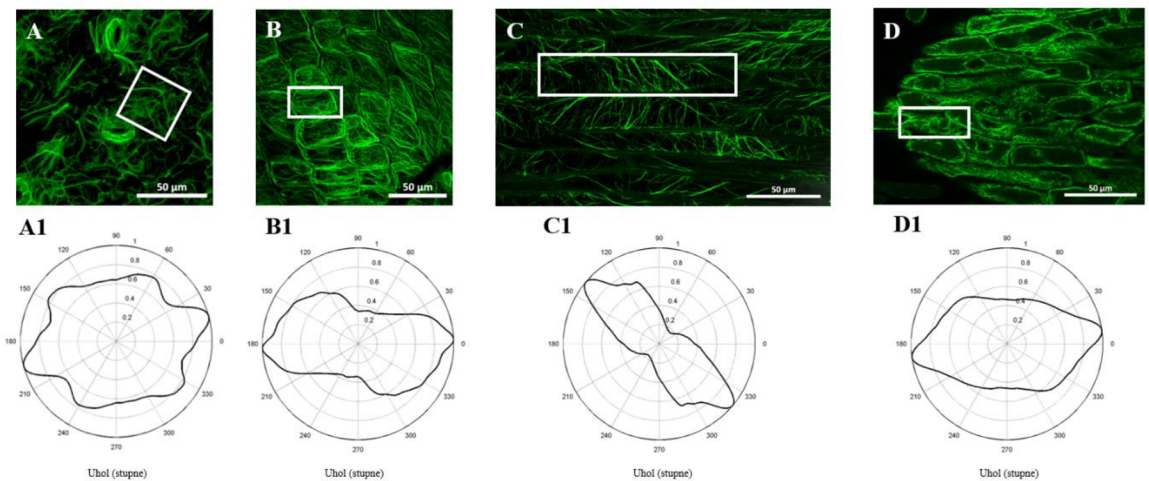
Po kvalitatívnej mikroskopickej analýze jednotlivých rastlinných orgánov bola pomocou programu CytoSpectre kvalitatívne analyzovaná organizácia cytoskeletu. Konkrétne bola analyzovaná organizácia aktínových vlákien v líniách GFP-FABD2 (Obr. 20), GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 (Obr. 22) a tagRFPTUA6 in GFPFABD2 (Obr. 24). V líniách tagRFP-TUA6 (Obr. 21) a GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 (Obr. 23) bola analyzovaná organizácia kortikálnych mikrotubulov. Analyzované bunky boli orientované tak, aby bolo usporiadanie cytoskeletálnych komponentov vyhodnocované vždy vzhľadom k najdlhšej osi danej bunky. Táto úprava bola aplikovaná pred analýzou vo všetkých zahrnutých aktínových aj mikrotubulových transgénnych líniách. Analýza pomocou CytoSpectre zobrazuje výsledky ako kruhové grafy, ktoré ukázali, že orientácia aktínových filametov sa v líniách zhodovala najmä v bunkách stonky u všetkých línií (Obr. 20, 22, 24 - C1). V ostatných orgánoch sa usporiadanie aktínových filametov v analyzovaných bunkách značne líšilo. V prípade mikrotubulových línií bola v organizácii kortikálnych mikrotubulov meraných buniek veľká podobnosť hlavne v bunkách stonky, koreňa a stopky, avšak v bunkách listu boli mikrotubuly usporiadané najmenej pravidelne.



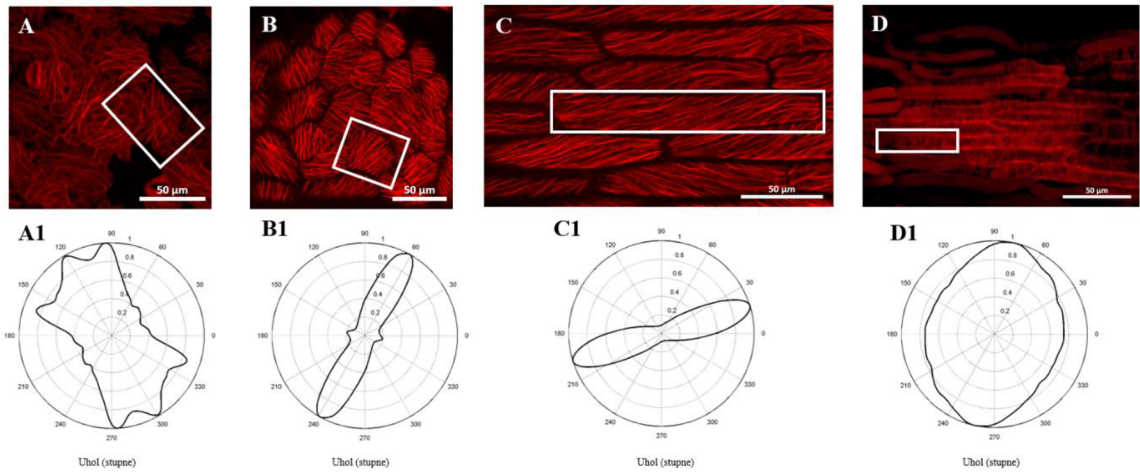
Obrázok 20. Organizácia aktínových mikrofilamentov v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa línie GFP-FABD2. (A) bunky listu, (B) stopky, (C) stonky a (D) koreňovej špičky. (A1-D1) Grafy organizácie aktínových mikrofilamentov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-D). Mierka 50 μm.



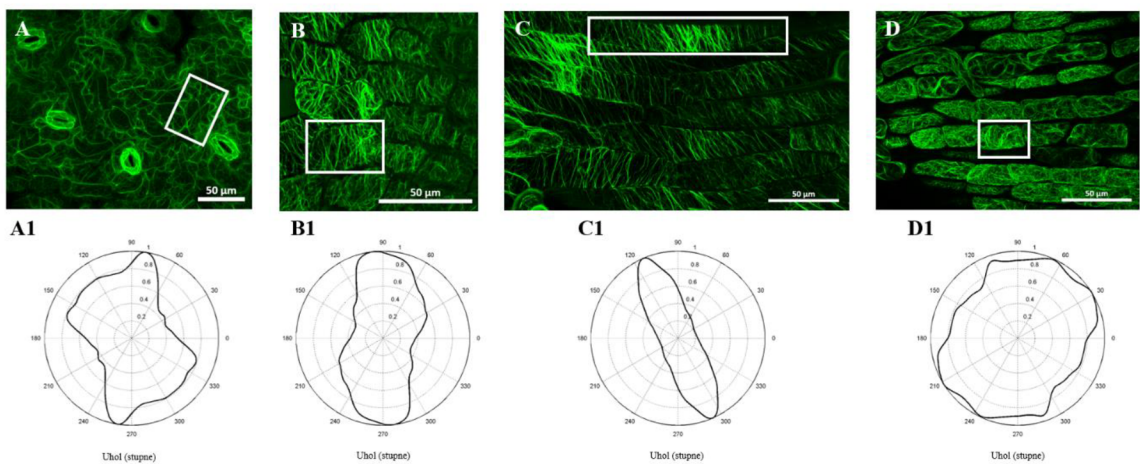
Obrázok 21. Organizácia mikrotubulov v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa línie tagRFP-TUA6. (A) bunky listu, (B) stopky, (C) stonky a (D) koreňovej špičky. (A1-D1) Grafy organizácie mikrotubulov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-D). Mierka 50 μm .



Obrázok 22. Organizácia aktínových mikrofilamentov v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa línie GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6. (A) bunky listu, (B) stopky, (C) stonky a (D) koreňovej špičky. (A1-D1) Grafy organizácie aktínových mikrofilamentov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-D). Mierka 50 μm .



Obrázok 23. Organizácia mikrotubulov v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa línie GFP-FABD2 tagRFP-TUA6. (A) bunky listu, (B) stopky, (C) stonky a (D) koreňovej špičky. (A1-D1) Grafy organizácie mikortubulov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-D). Mierka 50 µm.

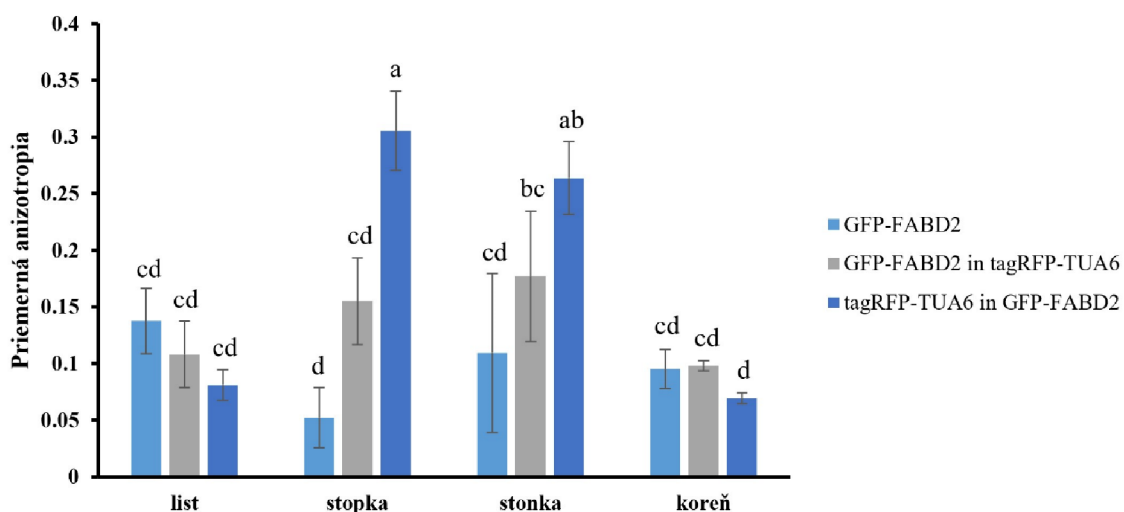


Obrázok 24. Organizácia aktínových mikrofilamentov v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa línie tagRFP-TUA6 in tagRFP-TUA6. (A) bunky listu, (B) stopky, (C) stonky a (D) koreňovej špičky. (A1-D1) Grafy organizácie aktínových mikrofilamentov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-D). Mierka 50 µm.

4.6.1 Kvantitatívne vyhodnotenie cytoskeletu stanovením anizotropie

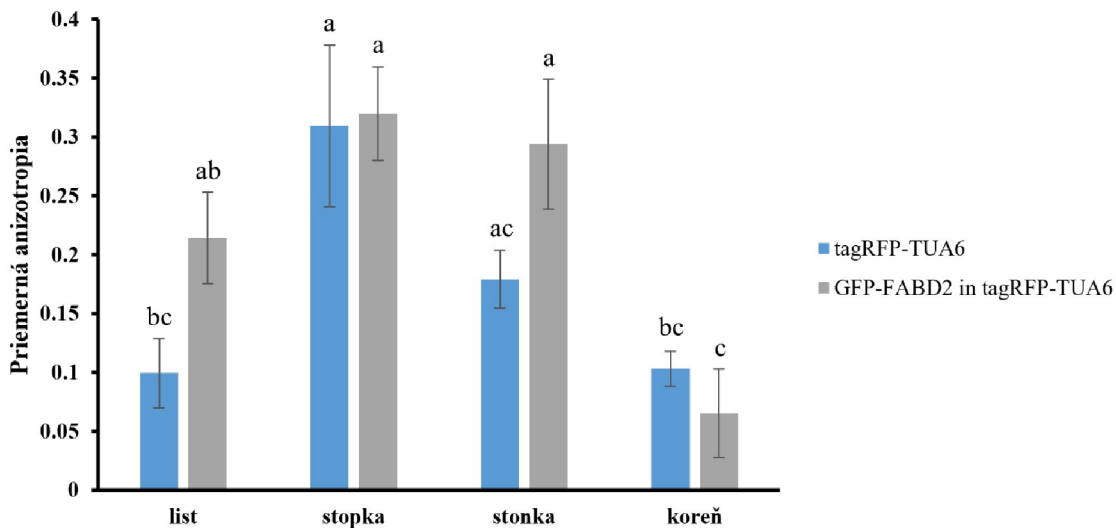
Po analýze orientácie mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov v programe CytoSpectre bol kvantitatívne hodnotený stupeň ich usporiadania meraním anizotropie, ktorá porovnáva výskyt dominantných mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov vzhľadom na orientáciu hlavnej osy bunky. Numerický výsledok anizotropie nadobúda hodnoty od 0 (úplná izotropia – rovnomerné rozloženie bez prevládajúcej orientácie) po 1 (dokonalá anizotropia – determinované usporiadanie podľa jednej orientácie). Celá analýza bola robená v programe ImageJ pomocou makra FibrilTool, podľa publikácie Boudaoud et al. (2014). Vo vybraných bunkách boli v programe pomocou nástroja Polygon zvolené najskôr oblasti záujmu (ROI) tak aby sa vynechali okraje buniek, kde často býva signál saturovaný. Následne sa v ROI použil nástroj FibrilTool, ktorý stanovil numerickú hodnotu anizotropie danej oblasti. V líniách GFP-FABD2, GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 a tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2 bola vyhodnotená priemerná anizotropia aktínových mikrofilamentov (Obr. 25). V líniách tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 bola analyzovaná priemerná anizotropia kortikálnych mikrotubulov (Obr. 26). Z každej línie sa analyzovali listy, stopky, stonky a korene, kde boli náhodne zvolené tri bunky, z ktorých bola stanovená anizotropia. Hodnoty anizotropie boli následne spriemerované a vložené do grafu, kde boli štatisticky vzhodnotené. Výsledky ukazujú, že najväčšie hodnoty anizotropie aktínových mikrofilamentov aj mikrotubulov boli v bunkách stonky a stopky u všetkých línií. Medzi líniami v prípade aktínových mikrofilamentov neboli pozorované žiadne štatisticky významné rozdiely pri analýze v listoch a naopak najväčšie rozdiely sa ukazovali v stopke. Mikrotubuly v jednotlivých líniách vykazovali najmenšie rozdiely v stopke, kde boli získané hodnoty anizotropie takmer totožné. V ďalších rastlinných orgánoch je už vidieť štatisticky významné rozdiely. Celkové porovnanie hodnôt priemernej anizotropie u mikrotubulov aj aktínových mikrofilamentov medzi orgánmi, vykazovalo štatisticky významné rozdiely v oboch prípadoch.

Anizotropia aktínových filamentov



Obrázok 25. Kvantitatívna analýza stupňa usporiadania aktínových mikrofilamentov meraním anizotropie u líní: GFP-FABD2, GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 a tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2. Stĺpce znázorňujú priemernú hodnotu anizotropie v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa. Úsečka označuje smerodajnú odchýlku. Malé písmená indikujú štatisticky významné rozdiely medzi rastlinnými orgánmi jednotlivých líní podľa One-way ANOVA testu a Tukey's multiple comparisons testu ($P < 0,05$). $N=3$.

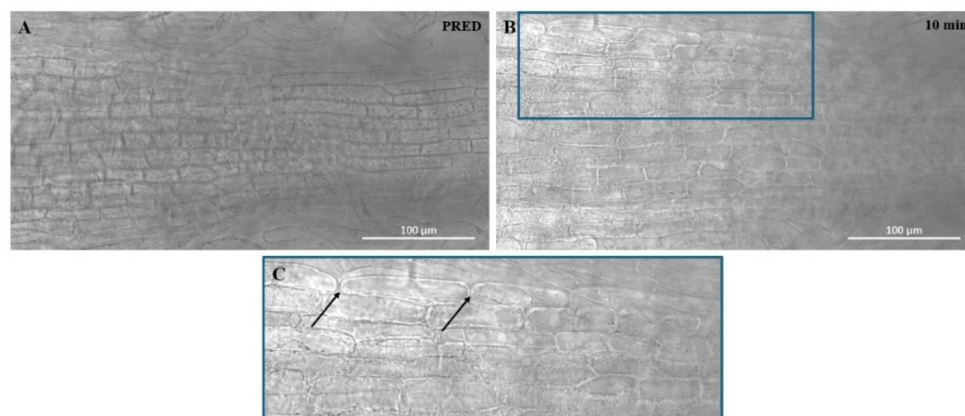
Anizotropia mikrotubulov



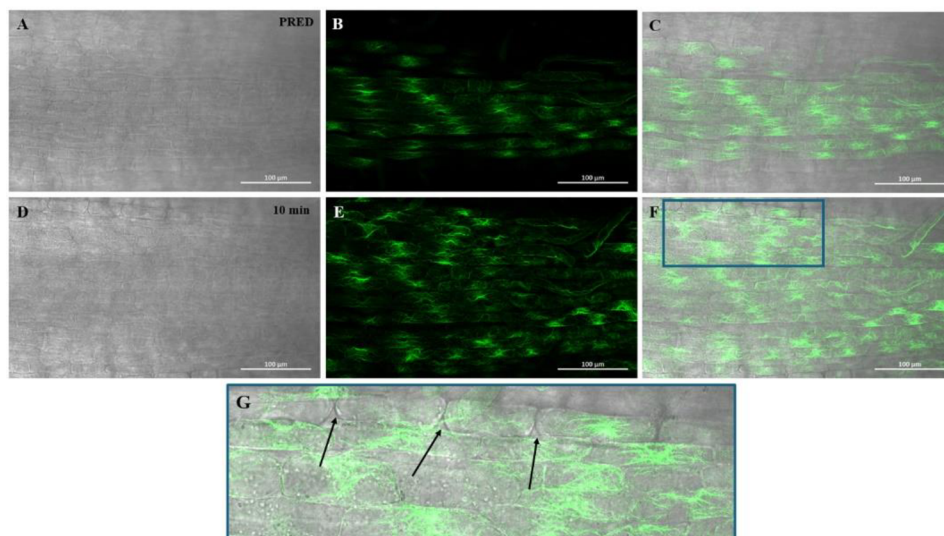
Obrázok 26. Kvantitatívna analýza stupňa usporiadania mikrotubulov meraním anizotropie u líní: GFP-FABD2, GFP-FABD2 in tagRFP-TUA6 a tagRFP-TUA6 in GFP-FABD2. Stĺpce znázorňujú priemernú hodnotu anizotropie v bunkách listu, stopky, stonky a koreňa. Úsečka označuje smerodajnú odchýlku. Malé písmená indikujú štatisticky významné rozdiely medzi rastlinnými orgánmi jednotlivých líní podľa One-way ANOVA testu a Tukey's multiple comparisons testu ($P < 0,05$). $N=3$.

4.7 Soľný stres aplikovaný na korene transgénnych línií *Medicago sativa*

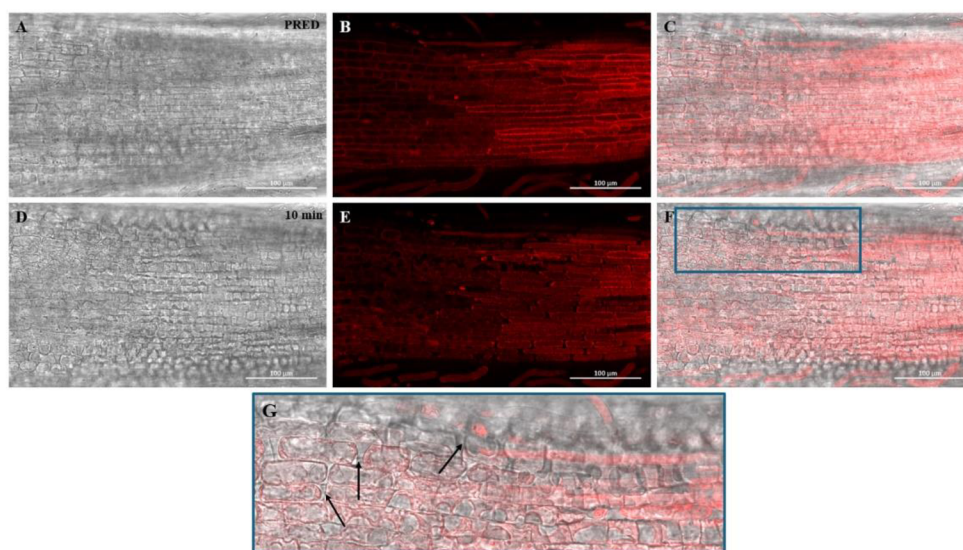
Na experiment so soľným stresom boli zvolené tri línie, a to kontrolná línia RSY (Obr. 27), línia produkujúca GFP-FABD2 k vizualizácii aktínových mikrofilamentov (Obr. 28) a línia produkujúca tagRFP-TUA6 k vizualizácii mikrotubulov (Obr. 29). Z rastlín týchto línií rastúcich v *in vitro* podmienkach boli pripravené preparáty, odrezané korene položené na podložné sklíčko s tekutým MS médiom. Takto pripravené preparáty boli nasnímané na konfokálnom laserovom skenovačom mikroskope pri s využitím objektívu Plan-Achromat 20x/0,8 NA M27 s fluorescenčnou excitáciou pomocou lasera 488 nm a s detekciou fluorescencie v rozmedzí 500-560 nm, a lasera 561 nm a s detekciou fluorescencie v rozmedzí 582-656 nm. Na snímání bol použitý aj kanál pri prechádzajúcom svetle. Následne bol perfúziou aplikovaný 300 mmol.l⁻¹ roztok NaCl. V 10 minútových intervaloch bol preparát snímaný po dobu 40 minút. Už po 10 minútach od aplikácie soľného roztoku bola u všetkých analyzovaných línií pozorovaná plazmolýza buniek, čo naznačovalo aktívnu reakciu buniek na dobre zvolenú koncentráciu soli. Po 40 minútach boli preparáty pre detailnejšie zobrazenie buniek snímané objektívom Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27 s fluorescenčnou excitáciou pomocou lasera 488 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 500-560 nm a lasera 561 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 582-656 nm (Obr. 30). Je možné vidieť, že po 40 minútach aktínové mikrofilamenty boli stále veľmi dobre pozorovateľné (Obr. 30 B,D), zatiaľ čo výskyt kortikálnych mikrotubulov sa výrazne zredukoval a v bunkách bol pozorovaný difúzny signál (Obr. 30 A,C).



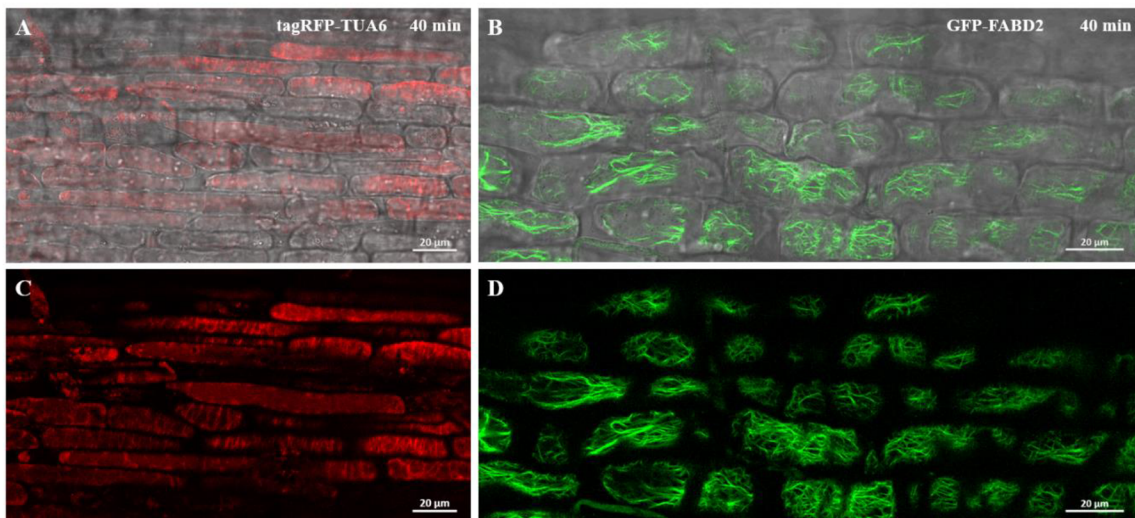
Obrázok 27. Soľný stres aplikovaný na bunky koreňa línie Regen-SY. (A) Bunky koreňa pred aplikáciou 300 mmol.l⁻¹ NaCl a (B) bunky koreňa 10 minút po aplikácii 300 mM NaCl. Modrý rámik (B) znázorňuje výrez zväčšený na (C). Šípky ukazujú na miesta plazmolýzy v bunkách. Mierka 100 μm.



Obrázok 28. Soľný stres aplikovaný na bunky koreňa línie GFP-FABD2. (A-C) Bunky koreňa pred aplikáciou 300 mmol.l^{-1} NaCl a (D-F) bunky koreňa 10 minút po aplikácii 300 mM NaCl. (A,D) prechádzajúce svetlo, (B,E) fluorescenčný kanál pre GFP, (C,F) prekryv oboch kanálov. Modrý rámik (F) znázorňuje výrez zväčšený na (G). Šípky ukazujú na miesta plazmolýzy v bunkách. Mierka 100 μm .



Obrázok 29. Soľný stres aplikovaný na bunky koreňa línie tagRFP-TUA6. (A-C) Bunky koreňa pred aplikáciou 300 mmol.l^{-1} NaCl a (D-F) bunky koreňa 10 minút po aplikácii 300 mM NaCl. (A,D) prechádzajúce svetlo, (B,E) fluorescenčný kanál pre tagRFP, (C,F) prekryv oboch kanálov. Modrý rámik (F) znázorňuje výrez zväčšený na (G). Šípky ukazujú na miesta plazmolýzy v bunkách. Mierka 100 μm .

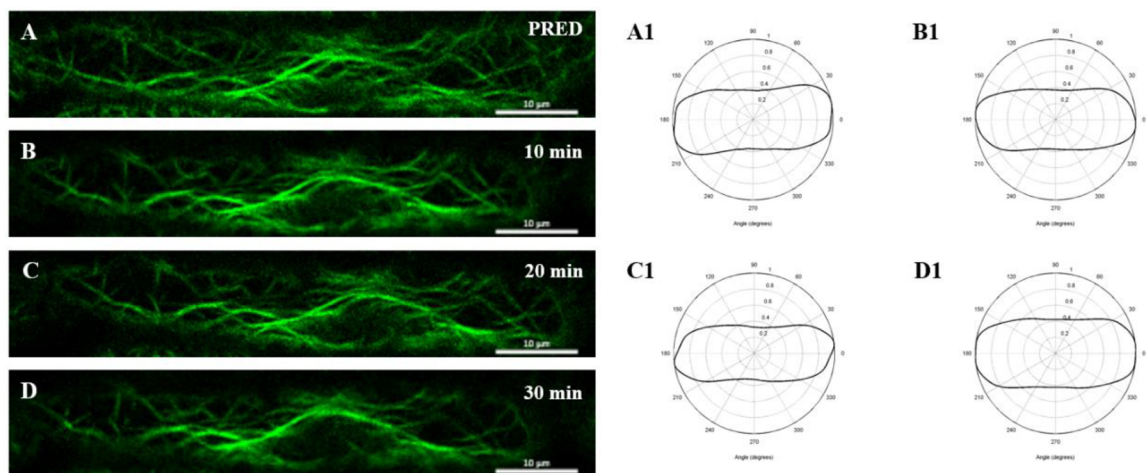


Obrázok 30. Bunky koreňa línií tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2 40 minút po aplikácii 300 mmol.l^{-1} NaCl. (A,C) bunky koreňa línie tagRFP-TUA6 a (B,D) bunky koreňa línie GFP-FABD2. (A) prekryv fluorescenčného kanálu pre RFP a prechádzajúceho svetla, (B) prekryv fluorescenčného kanálu pre GFP a prechádzajúceho svetla. Mierka $20 \mu\text{m}$.

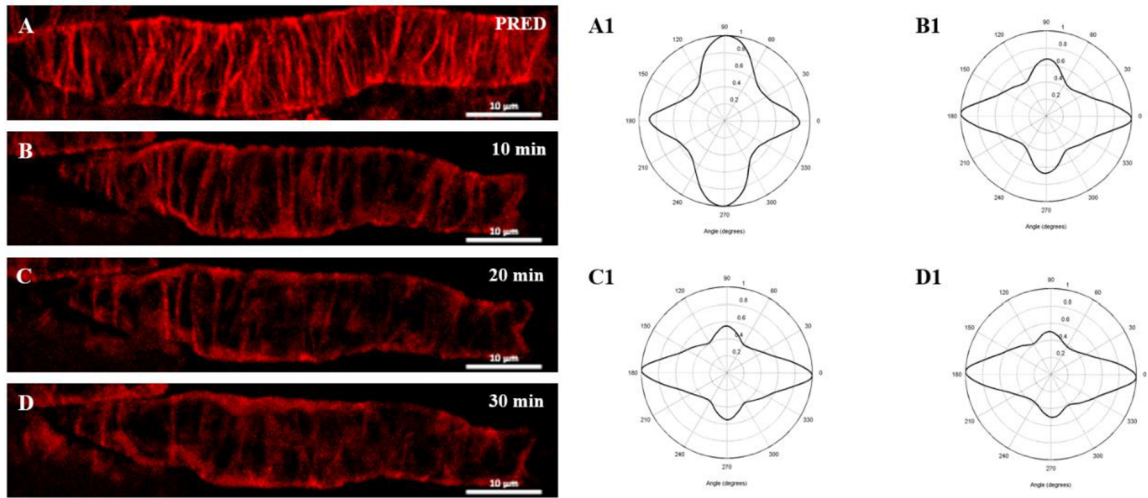
4.8.1 Analýza zmien v usporiadaní a organizácii cytoskeletu v reakcii na sol'ný stres

Po stanovení vhodnej koncentrácie roztoku NaCl na 300 mmol.l^{-1} , bol experiment zopakovaný, ale tentokrát s použitím konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu s objektívom Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27 s fluorescenčnou excitáciou pomocou lasera 488 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 500-560 nm a lasera 561 nm a s detekciou fluorescencie v rozmedzí 582-656 nm. Získané mikroskopické dáta z koreňových buniek boli spracované v programe CytoSpektre na stanovenie zmien v orientácii kortikálnych mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov vplyvom sol'ného stresu. Výsledky v podobe kruhových grafov naznačujú, že aktínové mikrofilamenty sú viac tolerantné na sol'ný stres ako kortikálne mikrotubuly. Ich organizácia počas 30 minút pôsobenia nebola nijako významne zmenená (Obr. 31). Pri kruhových grafoch zobrazujúcich orientáciu kortikálnych mikrotubulov je možné pozorovať výraznú horizontálnu elipsu, ktorá je avšak spôsobená tým, že po aplikácii soli došlo v priebehu času k postupnému rozpadu kortikálnych mikrotubulov a najsilnejší signál bol zachytený na plazmatickej membráne (Obr. 32). Ďalej bola kvantitatívne vyhodnotená úroveň usporiadania kortikálnych

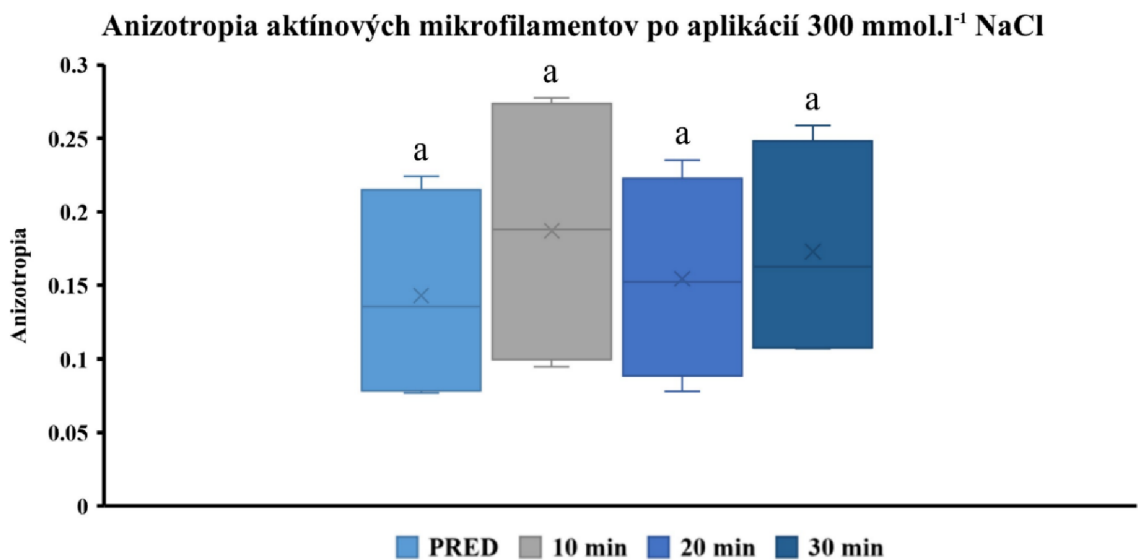
mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov stanovením anizotropie po vplyve soľného stresu. Získané výsledky ukazujú, že v prípade aktínových mikrofilamentov v línii GFP-FABD2 nedošlo vplyvom soľného stresu po dobu 30 minút k štatisticky významnému rozdielu v hodnotách anizotropie (Obr. 33). V prípade kortikálnych mikrotubulov v línii tagRFP-TUA6 sú štatisticky významné rozdiely hlavne v porovnaní hodnôt anizotropie pred aplikáciou soli a hodnôt anizotropie po aplikácii, pričom najväčší je po 30 minútach od aplikácie. Rozdiely v hodnotách anizotropie medzi samotnými časovými úsekmi po aplikácii soli už boli štatisticky významné najmä v porovnaní 10 a 30 minúty (Obr. 34).



Obrázok 31. Kvalitatívna analýza vplyvu 300 mmol.l^{-1} roztoku NaCl na aktínové mikrofilamenty v bunkách koreňa línie GFP-FABD2 (A) pred aplikáciou soľného roztoku, (B) 10 min po aplikácii soľného roztoku, (C) 20 min po aplikácii soľného roztoku a (D) 30 min po aplikácii soľného roztoku. (A1-D1) Grafy organizácie aktínových filamentov buniek z (A-D). (A-D) Zelený fluorescenčný kanál pre GFP. (A-F) Mierka $10 \mu\text{m}$.

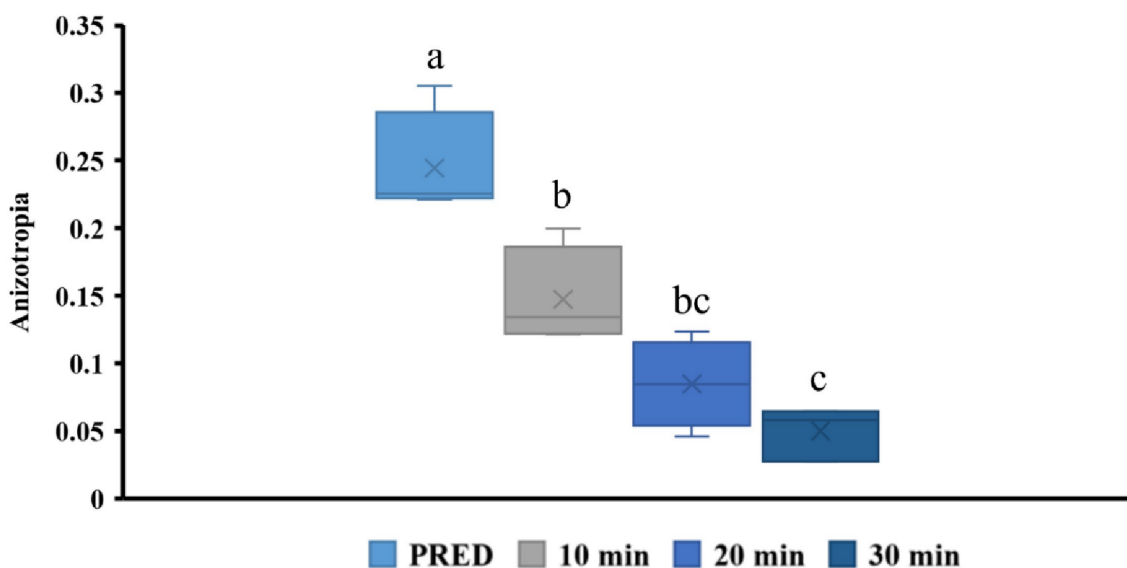


Obrázok 32. Kvalitatívna analýza vplyvu 300 mmol.l⁻¹ roztoku NaCl na kortikálne mikrotubuly v bunkách koreňa línie tagRFP-TUA6 (A) pred aplikáciou soľného roztoku, (B) 10 min po aplikácii soľného roztoku, (C) 20 min po aplikácii soľného roztoku a (D) 30 min po aplikácii soľného roztoku. (A1-D1) Grafy organizácie kortikálnych mikrotubulov buniek z (A-D). (A-D) Červený fluorescenčného kanál pre tagRFP. (A-F) Mierka 10 µm.



Obrázok 33. Kvantitatívne vyhodnotenie úrovne usporiadania aktínových mikrofilamentov na základe merania anizotropie po aplikácii 300 mmol.l⁻¹ roztoku NaCl v líni GFP-FABD2, (B) tagRFP-TUA6. Malé písmená indikujú štatisticky významné rozdiely v časových intervaloch od aplikácie roztoku NaCl podľa One-way ANOVA testu a Tukey's multiple comparisons testu ($P < 0,05$). $N=4$.

Anizotropia mikrotubulov po aplikácii 300 mmol.l⁻¹ NaCl



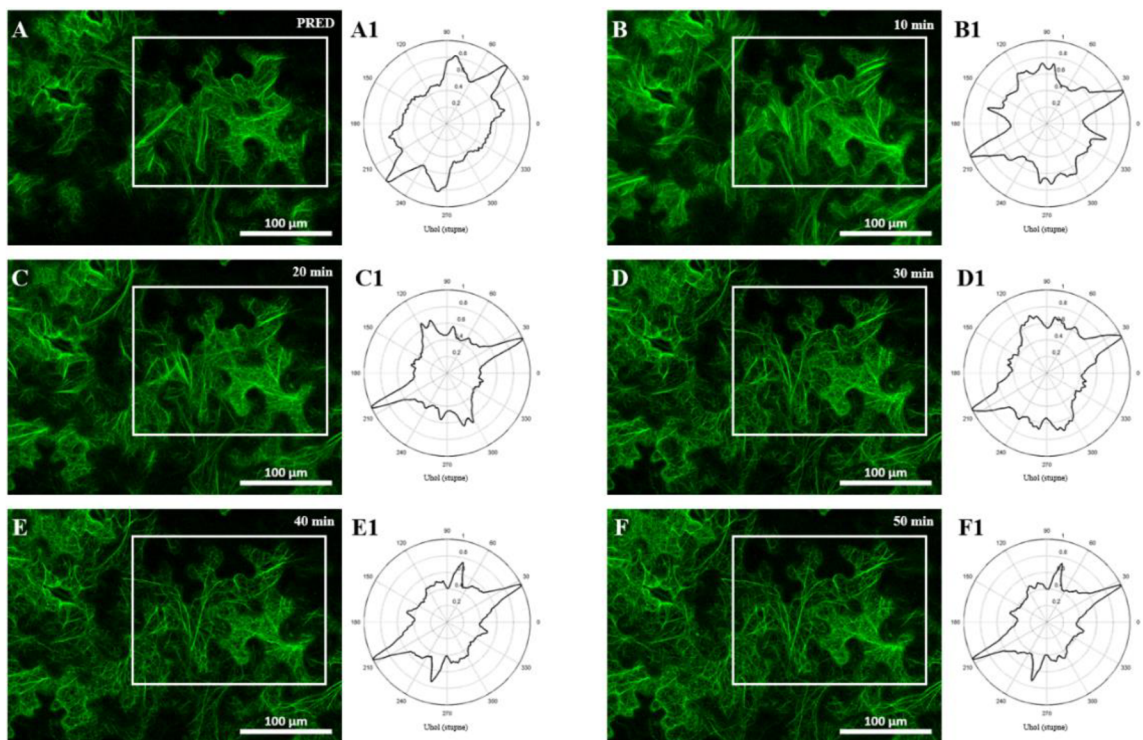
Obrázok 34. Kvantitatívne vyhodnotenie úrovne usporiadania mikrotubulov na základe merania anizotropie po aplikácii 300 mmol.l⁻¹ roztoku NaCl v línii GFP-FABD2, (B) tagRFP-TUA6. Malé písmená indikujú štatisticky významné rozdiely v časových intervaloch od aplikácie roztoku NaCl podľa One-way ANOVA testu a Tukey's multiple comparisons testu ($P < 0,05$). N=4.

4.8 Sol'ný stres aplikovaný na listy tranzientne transformovaných rastlín

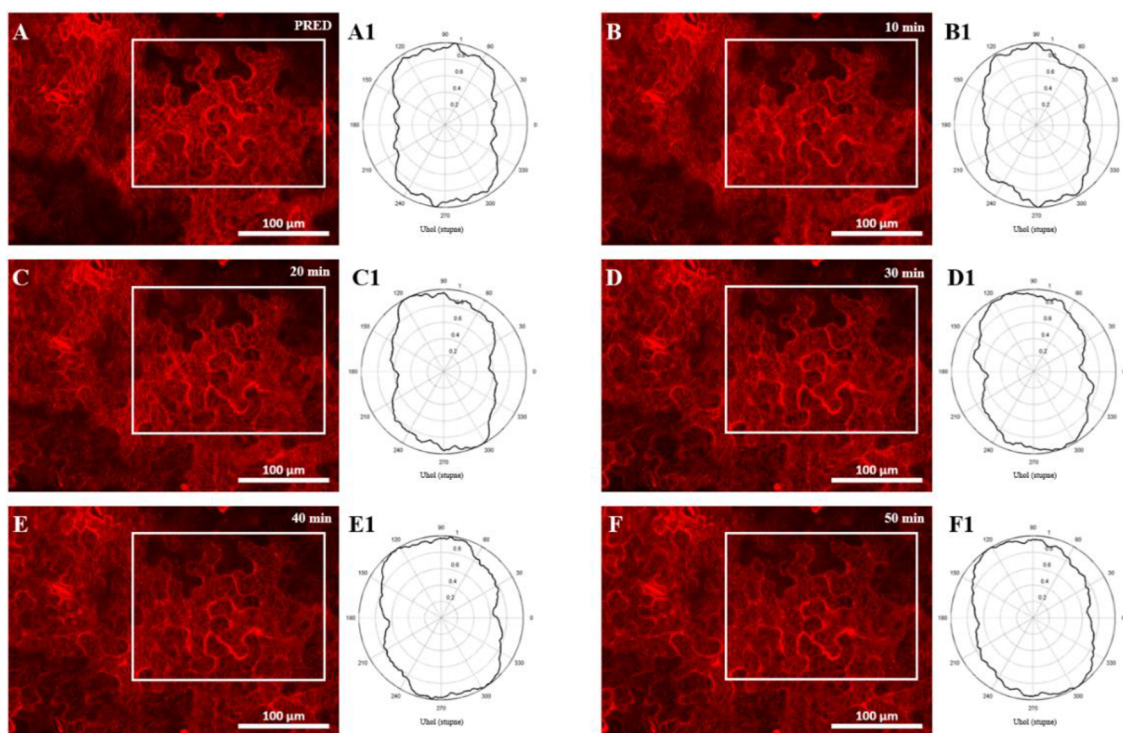
Nicotiana benthamiana

Listy rastlín *N. benthamiana* boli tranzientne transformované baktériami *A. tumefaciens* nesúce konštrukty: 35S::*GFP*::*FABD2*, 35S::*tagRFP*:*TUA6*. Z týchto listov bola 72 hodín po transformácii odobratá časť, z ktorej bol pripravený pomocou podložného skla, krycieho skla a kvapky vody mikroskopický preparát. Listy, ktoré vykazovali prítomnosť oboch konštruktov boli nasnímané a následne ďalej použité na experiment so sol'ným roztokom (Obr. 37). Na listy bola perfúziou aplikovaná rovnaká koncentrácia roztoku NaCl, ako pri *M. sativa* (300 mmol.l⁻¹). Na mikroskopickú analýzu bol použitý konfokálny mikroskop a objektív Plan-Achromat 20x/0,8 NA M27 s fluorescenčnou excitáciou pri 488 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 500-560 nm a pri 561 nm a detekciou fluorescencie v rozmedzí 582-656 nm, spolu s detekciou v prechádzajúcom svetle. Preparáty boli snímané v 10 minútových intervaloch po dobu 50 minút. Vo fluorescenčnom kanáli pre GFP boli analyzované aktínové mikrofilamenty v bunkách a ich usporiadanie bolo ďalej

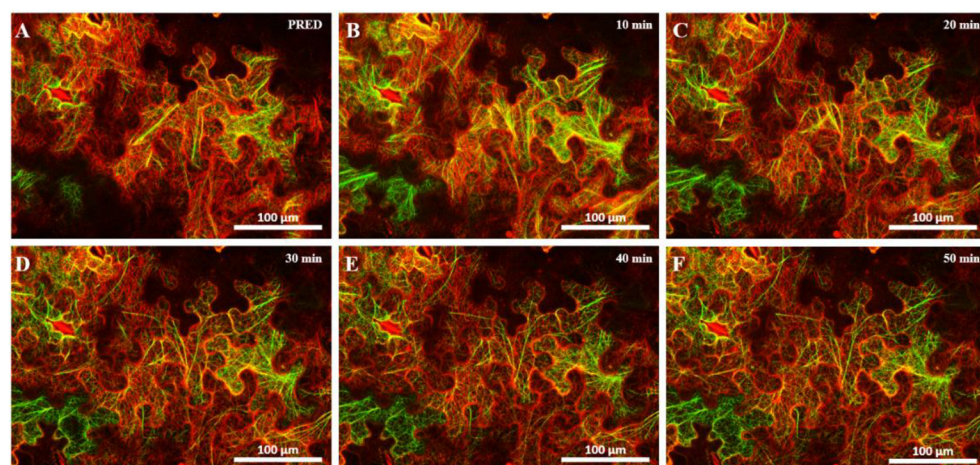
charakterizované pomocou programu CytoSpectre. Bolo možné vidieť, že po 10 minútach došlo k miernej zmene usporiadania aktínových mikrofilamentov, avšak po 40 minútach od aplikácie soľného roztoku už zmeny v organizácii boli minimálne (Obr. 35). Vo fluorescenčnom kanáli pre tagRFP boli naopak sledované mikrotubuly, ktoré po analýze v programe Cytospektre nevykazovali výrazné zmeny v organizácii (Obr. 36). Pri analýze bol analyzovaný vždy rovnaký výrez v každom čase v oboch kanáloch.



Obrázok 35. Kvalitatívna analýza vplyvu 300 mmol.l^{-1} roztoku NaCl na aktínové mikrofilamenty epidermálnych buniek listov *Nicotiana benthamiana*. (A) Pred aplikáciou soľného roztoku, (B) 10 min po aplikácii soľného roztoku, (C) 20 min po aplikácii soľného roztoku, (D) 30 min po aplikácii soľného roztoku, (E) 40 min po aplikácii soľného roztoku a (F) 50 min po aplikácii soľného roztoku. (A1-F1) Grafy organizácie aktínových mikrofilamentov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-F). (A-F) Zelený fluorescenčného kanál pre GFP. (A-F) Mierka $100 \mu\text{m}$.



Obrázok 36. Kvalitatívna analýza vplyvu 300 mmol.l^{-1} roztoku NaCl na mikrotubuly epidermálnych buniek listov *Nicotiana benthamiana*. (A) Pred aplikáciou soľného roztoku, (B) 10 min po aplikácii soľného roztoku, (C) 20 min po aplikácii soľného roztoku, (D) 30 min po aplikácii soľného roztoku, (E) 40 min po aplikácii soľného roztoku a (F) 50 min po aplikácii soľného roztoku. (A1-F1) Grafy organizácie mikrotubulov zodpovedajúce označeným bunkám v (A-F). (A-F) Červený fluorescenčný kanál pre tagRFP. (A-F) Mierka $100 \mu\text{m}$.



Obrázok 37. Mikroskopická analýza vplyvu 300 mmol.l^{-1} roztoku NaCl na cytoskelet listov *Nicotiana benthamiana*. (A) Pred aplikáciou soľného roztoku, (B) 10 min po aplikácii soľného roztoku, (C) 20 min po aplikácii soľného roztoku, (D) 30 min po aplikácii soľného roztoku, (E) 40 min po aplikácii soľného roztoku a (F) 50 min po aplikácii soľného roztoku. (A-F) Prekryv zeleného fluorescenčného kanálu pre GFP a červeného fluorescenčného kanálu pre tagRFP. (A-F) Mierka $100 \mu\text{m}$.

5 DISKUSIA

Fluorescenčné proteíny sú využívané v rôznych oblastiach vrátane biotechnológií, kde sú predovšetkým v bunkovej biológii významným nástrojom pri zobrazovaní štruktúr. Translačná fúzia takýchto proteínov s cytoskeletálnymi komponentami prispieva ku kvalitnej analýze štruktúry a dynamiky aktínových mikrofilamentov a mikrotubulov v živých bunkách (Niu & Guo, 2017). U niekoľkých rastlinných druhov, ako napríklad *Arabidopsis thaliana*, *M. truncatula*, *Zea mays*, *Gossypium spp.* ale aj *Oryza sativa*, boli vyvinuté transgénne línie, s fluorescenčným značením cytoskeletu (Z. Liu et al., 2022). Podľa doterajších štúdií boli vytvorené transgénne línie s mikrotubulovými a aktínovými fluorescenčnými markermi aj u *M. sativa*. Fluorescenčné proteíny ako napríklad GFP a tagRFP, boli fúzované s MBD, podjednotkami tubulínu alfa 6, tubulínu beta 6, a aktín-viažucou doménou č. 2 proteínu Fimbrín (Buschmann et al., 2010; Colin et al., 2022). V tejto diplomovej práci bola snaha o vytvorenie transgénnych línií *M. sativa*, ktoré by obsahovali fluorescenčné cytoskeletálne markre ako pre mikrotubuly, tak aj pre aktínové mikrofilamenty. Avšak nepodarilo sa získať transgénne rastliny, ktoré by vykazovali aktivitu oboch konštruktov ($35S::GFP::FABD2$, $35S::tagRFP:TUA6$) súčasne. Expresia zvolených markerov je riadená silným konštitutívnym promótorom 35S vírusu mozaiky karfiolu (Cauliflower Mosaic Virus – CaMV). Je to najčastejšie používaný promótor v génovom inžinierstve u rastlín, vykazujúci vysokú a konštitutívnu transkripčnú aktivitu (Kiselev et al., 2021). Zatiaľ čo niektoré výskumy ukazujú jeho vysokú efektivitu pri transformačných procesoch, iné naznačujú možné problémy s ním spojené. Nadmerná expresia môže viesť k spúšťaniu mechanizmov zodpovedných za ko-supresiu a umlčanie génov (Grefen et al., 2010; Vypelová et al., 2018; Amack & Antunes, 2020). Toto by mohlo vysvetľovať prečo snaha o vytvorenie dvojitého línií s cytoskeletálnym značením v *M. sativa* nebola úspešná. Aj štúdia, ktorá sa zaoberala produkciou transgénnych línií *O. sativa* s fluorescenčnými cytoskeletálnymi markermi podporuje túto teóriu. V tejto štúdií autori poukazujú na účinnosť rôznych promótorov (*Ubi1*, *RUBQ2*, *35S*) a potvrdzujú, že práve 35S promótor, aj napriek jeho nožnej užitočnosti pre štúdium prieduchov, indukuje umlčanie génov v mnohých orgánoch a pletivách ryže. Taktiež odporúčajú z testovaných promótorov využiť *Ubi1* ako lepšiu alternatívu k 35S (Z. Liu et al., 2022). Aj výskumy na modelovom organizme *A. thaliana* poskytujú ďalšie dáta, ktoré popisujú problémy s fenotypom rastlín, stratou fluorescencie, a inhibičné účinky spojené

s používaním 35S promótoru. Avšak tieto záležitosti sú okrem typu promótoru často prepojené s použitým variantom fluorescenčného proteínu, s typom väzobnej domény, ale aj a tým, či je expresia tranzientná alebo stabilná. Aj v týchto prípadoch bolo navrhnuté použiť iný typ promótoru, ako napríklad ubiquitin 10 (UBQ10), ktorý by mohol minimalizovať popísané problémy (Dyachok et al., 2014). Ubiquitínový promótor sa javí ako vhodná alternatíva a cesta riešenia problémov s 35S promótorom vo viacerých rastlinných druhoch, a tak by bolo vhodné experimentálne vyskúšať tento spôsob aj v prípade rastlín *M. sativa*. Využitím ubiquitínového promótoru by sa mohlo predísť umlčovaniu génov a tým umožniť expresiu oboch fluorescenčných cytoskeletálnych markerov v jednej transgénej rastline súčasne. Ďalšími faktormi, ktoré by bolo dobré zohľadniť, je voľba väzobnej domény, typu fúzie a taktiež správneho variantu fluorescenčného proteínu. Vplyv na efektivitu transformácie by mohol mať aj vek donorových rastlín, z ktorých boli odoberané listové explantáty. Úlohu môže zohrávať aj fakt, že tieto rastliny už boli transgéne, a teda efektivita ďalšej transformácie sa mohla znížiť. Na preukázanie skutočných dôvodov, ktoré zapríčinili neúspech transformácie a tiež nové metódy, ktorými by sa tomu dalo predísť, je potrebná ďalšia analýza.

Soľný stres je významným negatívnym abiotickým faktorom, ktorý vplýva na rast, kvalitu a produktivitu rastlín. Z tohto dôvodu je veľa štúdií zameraných na toleranciu voči tomuto stresu. Doposiaľ vykonané výskumy poskytujú množstvo údajov, ktoré poukazujú na dôležitú úlohu rastlinného cytoskeletu v rámci tolerancie voči zasoleniu (C. Wang et al., 2011). Pri analýze cytoskeletu rastlín *A. thaliana* a *O. sativa* počas soľného stresu bolo preukázané, že mikrotubuly hrajú dôležitú úlohu v tolerancii voči tomuto stresu. V oboch rastlinách bola zdokumentovaná depolymerizácia a opätovné zostavenie mikrotubulov v reakcii na stres. Toto zostavovanie bolo viditeľné po 6-8 hodinách od aplikácie soli. Mikrotubuly sa začali postupne obnovovať z vytvorených „ohnísk“, ktoré zostali zachované po ich rozpade. Aktínové vlákna sa preukázali ako viac tolerantné na soľný stres a neboli charakterizované žiadne významné depolymerizačné udalosti. Tieto údaje naznačujú, že depolymerizácia a reorganizácia cytoskeletu je v rastlinách dôležitá pre zvládanie soľného stresu (Chun et al., 2021; Z. Liu et al., 2022). V diplomovej práci pri analýze efektu soľného stresu na línie *M. sativa* boli dosiahnuté podobné výsledky, ako v uvedených publikáciách, avšak s tým rozdielom, že nedošlo k obnove mikrotubulov do stavu pred aplikáciou soli. To

mohlo byť zapríčinené tým, že mikroskopické pozorovanie bolo maximálne v dĺžke 40 minút, zatiaľ čo obnova v uvedených prácach nastala až po niekoľkých hodinách. Ďalším dôležitým faktorom, ktorý treba zohľadniť, je aplikácia soli. V diplomovej práci bol soľný roztok aplikovaný perfúziou na odrezaných koreňoch, zatiaľ čo v uvedených publikáciách boli celé sadenice ryže inkubované v tekutom médiu s NaCl, a rastliny *A. thaliana* boli pestované v pôde, ktorá bola zalievaná raz týždenne vodou obsahujúcou NaCl. Aj samotný proces odrezania koreňov je však mechanický stres čo mohlo ovplyvniť usporiadanie a organizáciu cytoskeletu aj v podmienkach pred aplikáciou soľného roztoku. Tomuto by sa dalo predísť mikroskopickou analýzou na koreňoch intaktných živých rastlín napríklad s pomocou light-sheet fluorescenčnej mikroskopie (Ovečka et al., 2015; Vyplelová et al., 2018). Taktiež mnohé publikácie popisujú účinky rôznych chemických látok, ako napríklad latrunculin b, oryzalin a propyzamid na cytoskelet počas stresových podmienok (C. Wang et al., 2011; Z. Liu et al., 2022). Uvedené podnety by bolo vhodné zohľadniť a experimentálne otestovať pri ďalších výskumoch zameraných na soľný stres u rastlín *M. sativa*.

Pre úplné potvrdenie alebo prípadné vyvrátenie dosiahnutých výsledkov tejto diplomovej práce by bolo potrebné jednotlivé experimenty zopakovať a doplniť viacero pozorovaní.

6 ZÁVER

Diplomová práca bola rozdelená na teoretickú a praktickú časť. V teoretickej časti bola vypracovaná rešerš zameraná na charakteristiku lucerny ako modelového druhu pre genetickú modifikáciu v porovnaní s druhom *Medicago truncatula* a popis základných a pokročilých metód transgenózy lucerny k získaniu geneticky modifikovaných línií. Druhá časť teoretickej časti sa venovala cytoskeletu rastlín, jeho základnej charakteristike, proteínom asociovaným s cytoskeletom, princípom dynamiky a vzťahu k signálnym procesom. Ďalej bol objasnený podiel cytoskeletu rastlín na regulácii vývojových procesov lucerny a jeho reakcie na vonkajšie stresové podmienky. Posledná kapitola bola zameraná na stručný prehľad molekulárnych markerov a zobrazovacích metód k lokalizácii komponentov cytoskeletu.

Praktická časť diplomovej práce obsahovala dva celky. V prvom boli najskôr vykonané experimenty zamerané na overenie konštruktov, pomocou Colony PCR a tranzientnej transformácie *N. benthamiana*. Tieto výsledky potvrdili prítomnosť konštruktov v baktériách *A. tumefaciens*. Taktiež sa úspešne podarilo tranzientne natransformovať bunky *N. benthamiana* obomi konštruktami simultánne, čo potvrdila mikroskopická analýza. Ďalej sa táto časť venovala produkcii, selekcii a následnej analýze transgénnych línií *M. sativa* obsahujúcich fluorescenčné cytoskeletálne markery. V rámci produkcie bola snaha o vytvorenie dvojitych línií *M. sativa*, kde sa do už transgénnych línií tagRFP-TUA6, v ktorých sú značené mikrotubuly, transformoval konštrukt 35S::*GFP*::*FABD2*. Alternatívne do transgennej línie GFP-FABD2, v ktorých sú značené aktínové mikrofilamenty, sa transformoval konštrukt 35S::*tagRFP*::*TUA6*. Avšak dvojité línie neboli úspešne vytvorené. Najpravdepodobnejším dôvodom je použitie konštitutívneho 35S promótora pochádzajúceho z rastlinného patogénu vírusu mozaiky karfiolu u oboch konštruktov, ktorý podľa viacerých dostupných štúdií môže zapríčiniť umlčovanie génov. Rastliny získané pri transformácií vykazovali vždy aktivitu len jedného konštraktu. U týchto rastlín, spoločne s jednoduchými líniami, bola mikroskopicky analyzovaná organizácia a usporiadanie cytoskeletu v rôznych orgánoch a pletivách, čo bolo vyhodnotené pomocou špecializovaných programov CytoSpecter a FibrinTool. Výsledky ukázali, že organizácia sa v jednotlivých líniách mierne líši. Najmenšie rozdiely v organizácii cytoskeletu boli zaznamenané v bunkách stonky a naopak, najväčšie v bunkách listov.

Druhý celok praktickej časti diplomovej práce bol zacielený na štúdium reakcií transgénnych rastlín voči soľnému stresu, so zámerom zmapovania zmien v usporiadaní a organizácii cytoskeletu. Na korene rastlín vybraných línií *M. sativa* tagRFP-TUA6, GFP-FABD2 a RSY bol aplikovaný 300 mmol.l⁻¹ roztok NaCl. Z dosiahnutých výsledkov je zrejmé, že zvolená koncentrácia mala výrazný efekt na koreňové bunky, v ktorých už po 10 minútach od aplikácie bola pozorovaná plazmolýza. Taktiež analýza cytoskeletu ukázala, že došlo k postupnému miznutiu kortikálnych mikrotubulov, zatiaľ čo aktínové mikrofilameny boli tolerantnejšie voči soľnému stresu. Na simultánnu analýzu aktínových vlákien a mikrotubulov, bol experiment vykonaný aj na tranzientne transformovaných listoch *N. benthamiana*. V tomto prípade výsledky ukázali, že najväčšie zmeny v organizácii aktínových mikrofilamentov boli v prvých 10 - 30 minútach po aplikácii soli. V prípade mikrotubulov sa jednalo skôr o ich postupné miznutie a zvyšovanie difúzneho signálu v cytoplazme. Celkovo dosiahnuté výsledky môžu prispieť k lepšiemu pochopeniu organizácie cytoskeletu v rôznych častiach rastlín *M. sativa* v prirodzených, ale aj stresových podmienkach.

7 LITERATÚRA

- Ahmad, M., Ali, Q., Hafeez, M. M., & Malik, A. (2021). IMPROVEMENT FOR BIOTIC AND ABIOTIC STRESS TOLERANCE IN CROP PLANTS. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2021(1), Article 1. <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2021i1.50>
- Ali, I., & Yang, W.-C. (2020). The functions of kinesin and kinesin-related proteins in eukaryotes. *Cell Adhesion & Migration*, 14(1), 139–152. <https://doi.org/10.1080/19336918.2020.1810939>
- Amack, S. C., & Antunes, M. S. (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*, 24, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179>
- Ambrose, J. C., Shoji, T., Kotzer, A. M., Pighin, J. A., & Wasteneys, G. O. (2007). The Arabidopsis CLASP Gene Encodes a Microtubule-Associated Protein Involved in Cell Expansion and Division. *The Plant Cell*, 19(9), 2763–2775. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053777>
- Audenaert, R., Heremans, L., Heremans, K., & Engelborghs, Y. (1989). Secondary structure analysis of tubulin and microtubules with Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 996(1), 110–115. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90102-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90102-7)
- Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., & Voytas, D. F. (2017). Chapter One - Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Challenges. V D. P. Weeks & B. Yang (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Roč. 149, s. 1–26). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.011>
- Bhatia, S., & Bera, T. (2015). Chapter 7—Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture. V S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Ed.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (s. 231–291). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00007-8>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Boudaoud, A., Burian, A., Borowska-Wykręt, D., Uyttewaal, M., Wrzalik, R., Kwiatkowska, D., & Hamant, O. (2014). FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nature Protocols*, 9(2), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.024>
- Bowne-Anderson, H., Zanic, M., Kauer, M., & Howard, J. (2013). Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *Bioessays*, 35(5), 452–461. <https://doi.org/10.1002/bies.201200131>
- Burk, D. H., Zhong, R., & Ye, Z.-H. (2007). The Katanin Microtubule Severing Protein in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(8), 1174–1182. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00544.x>
- Burnett, M. J. B., & Burnett, A. C. (2020). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 2(2), 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
- Buschmann, H., Sambade, A., Pesquet, E., Calder, G., & Lloyd, C. W. (2010). Chapter 20—Microtubule Dynamics in Plant Cells. V L. Cassimeris & P. Tran (Ed.), *Methods in Cell Biology* (Roč. 97, s. 373–400). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)97020-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)97020-9)
- Caillaud, M.-C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., de Almeida Engler, J., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., et al. (2008). MAP65-3 Microtubule-Associated Protein Is Essential for Nematode-Induced Giant Cell Ontogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(2), 423–437. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057422>
- Carlsson, A. E. (2010). Actin Dynamics: From Nanoscale to Microscale. *Annual Review of Biophysics*, 39, 91. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131207>

- Colin, L., Martin-Arevalillo, R., Bovio, S., Bauer, A., Vernoux, T., Caillaud, M.-C., Landrein, B., & Jaillais, Y. (2022). Imaging the living plant cell: From probes to quantification. *The Plant Cell*, 34(1), 247–272. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab237>
- Cooper, G. M. (2000). Structure and Organization of Actin Filaments. V *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9908/>
- Cui, J., Wang, X., Wei, Z., & Jin, B. (2022). *Medicago truncatula* (model legume), *Medicago sativa* (alfalfa), *Medicago polymorpha* (bur clover), and *Medicago ruthenica*. *Trends in Genetics*, 38(7), 782–783. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.005>
- De Mey, J., Lambert, A. M., Bajer, A. S., Moeremans, M., & De Brabander, M. (1982). Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemanthus endosperm* with the immunogold staining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6), 1898–1902. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.1898>
- Dominguez, R. (2004). Actin-binding proteins – a unifying hypothesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(11), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.09.004>
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- Dubrovsky, J. G., & Rost, T. L. (2003). ROOT DEVELOPMENT | Lateral Root Initiation. V B. Thomas (Ed.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (s. 1101–1107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00042-9>
- Dyachok, J., Sparks, J. A., Liao, F., Wang, Y.-S., & Blancaflor, E. B. (2014). Fluorescent protein-based reporters of the actin cytoskeleton in living plant cells: Fluorophore variant, actin binding domain, and promoter considerations. *Cytoskeleton*, 71(5), 311–327. <https://doi.org/10.1002/cm.21174>
- Echeverria, A., Larrainzar, E., Li, W., Watanabe, Y., Sato, M., Tran, C. D., Moler, J. A., Hirai, M. Y., Sawada, Y., Tran, L.-S. P., et al. (2021). *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* Show Contrasting Root Metabolic Responses to Drought. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.652143>
- Elliott, A., & Shaw, S. L. (2018). Update: Plant Cortical Microtubule Arrays1[OPEN]. *Plant Physiology*, 176(1), 94–105. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01329>
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)
- Fache, V., Gaillard, J., Van Damme, D., Geelen, D., Neumann, E., Stoppin-Mellet, V., & Vantard, M. (2010). Arabidopsis Kinetochore Fiber-Associated MAP65-4 Cross-Links Microtubules and Promotes Microtubule Bundle Elongation. *The Plant Cell*, 22(11), 3804–3815. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080606>
- Finer, J. J., Finer, K. R., & Ponappa, T. (2000). Particle Bombardment Mediated Transformation. V J. Hammond, P. McGarvey, & V. Yusibov (Ed.), *Plant Biotechnology: New Products and Applications* (s. 59–80). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60234-4_3
- Flanders, D. J., Rawlins, D. J., Shaw, P. J., & Lloyd, C. W. (1990). Nucleus-associated microtubules help determine the division plane of plant epidermal cells: Avoidance of four-way junctions and the role of cell geometry. *Journal of Cell Biology*, 110(4), 1111–1122. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1111>
- Fosket, D. E. (1994). 5—Characteristics of Plant Cells That Are Important in Development. V D. E. Fosket (Ed.), *Plant Growth and Development* (s. 197–270). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-262430-8.50009-7>
- Fosket, D. E., & Morejohn, L. C. (1992). Structural and Functional Organization of Tubulin. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 201–240. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.001221>
- František Hrabě. (2004). *Trávy a jetelovino trávy v zemědělské praxi*. Petr Baštan.
- Frugoli, J., & Harris, J. (2001). *Medicago truncatula* on the Move! *The Plant Cell*, 13(3), 458–463. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.3.458>

- Fujino, H., Murayama, T., & Regan, J. W. (2010). Chapter five—Assessment of Constitutive Activity in E-Type Prostanoid Receptors. V P. M. Conn (Ed.), *Methods in Enzymology* (Roč. 484, s. 95–107). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381298-8.00005-8>
- García-González, J., & van Gelderen, K. (2021). Bundling up the Role of the Actin Cytoskeleton in Primary Root Growth. *Frontiers in Plant Science*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.777119>
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>
- Gilbert, S. P., & Sardar, H. S. (2012). 4.17 Kinesin Structure and Biochemistry. V E. H. Egelman (Ed.), *Comprehensive Biophysics* (s. 321–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00421-5>
- Glyakina, A. V., & Galzitskaya, O. V. (2020). Bioinformatics Analysis of Actin Molecules: Why Quantity Does Not Translate Into Quality? *Frontiers in Genetics*, *11*, 617763. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.617763>
- Golberg, A., & Rubinsky, B. (2013). Chapter 12—Mass Transfer Phenomena in Electroporation. V S. M. Becker & A. V. Kuznetsov (Ed.), *Transport in Biological Media* (s. 455–492). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415824-5.00012-6>
- Golds, T. J., Lee, J. Y., Husnain, T., Ghose, T. K., & Davey, M. R. (1991). Agrobacterium rhizogenes Mediated Transformation of the Forage Legumes Medicago sativa and Onobrychis viciifolia. *Journal of Experimental Botany*, *42*(242), 1147–1157.
- Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(6), a022608. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, *64*(2), 355–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x>
- Gunarathne, V., Gunatilake, S. R., Wanasinghe, S. T., Atugoda, T., Wijekoon, P., Biswas, J. K., & Vithanage, M. (2020). 7—Phytoremediation for E-waste contaminated sites. V M. N. V. Prasad, M. Vithanage, & A. Borthakur (Ed.), *Handbook of Electronic Waste Management* (s. 141–170). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817030-4.00005-X>
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., & Yang, J. (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology Advances*, *37*(1), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.008>
- Hadidi, M., Orellana Palacios, J. C., McClements, D. J., Mahfouzi, M., & Moreno, A. (2023). Alfalfa as a sustainable source of plant-based food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *135*, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.023>
- Hashimoto, T. (2015). Microtubules in Plants. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *13*, e0179. <https://doi.org/10.1199/tab.0179>
- Hawkins, C., & Yu, L.-X. (2018). Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal*, *6*(6), 565–575. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.006>
- Heimann, J. M. (2018). Exploring Agrobacterium’s shuttle. V *Using Nature’s Shuttle* (s. 83–96). Wageningen Academic. https://doi.org/10.3920/9789086868803_012
- Higaki, T., Sano, T., & Hasezawa, S. (2007). Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(6), 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.012>
- Hlaváčková, K., Šamaj, J., & Ovečka, M. (2023). Cytoskeleton as a roadmap navigating rhizobia to establish symbiotic root nodulation in legumes. *Biotechnology Advances*, *69*, 108263. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108263>

- Hubbs, A., Porter, D. W., Mercer, R., Castranova, V., Sargent, L., & Sriram, K. (2013). Chapter 43—Nanoparticulates. V W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Ed.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (s. 1373–1419). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00043-1>
- Cherian, S., & Oliveira, M. M. (2005). Transgenic Plants in Phytoremediation: Recent Advances and New Possibilities. *Environmental Science & Technology*, 39(24), 9377–9390. <https://doi.org/10.1021/es051134l>
- Choudhary, A. D., Kessmann, H., Lamb, C. J., & Dixon, R. A. (1990). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) IV. Expression of defense gene constructs in electroporated suspension cell protoplasts. *Plant Cell Reports*, 9(1), 42–46. <https://doi.org/10.1007/BF00232133>
- Chun, H. J., Baek, D., Jin, B. J., Cho, H. M., Park, M. S., Lee, S. H., Lim, L. H., Cha, Y. J., Bae, D.-W., Kim, S. T., Yun, D.-J., & Kim, M. C. (2021). Microtubule Dynamics Plays a Vital Role in Plant Adaptation and Tolerance to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115957>
- Jinturkar, K. A., Rathi, M. N., & Misra, A. (2011). 3—Gene Delivery Using Physical Methods. V A. Misra (Ed.), *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (s. 83–126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384964-9.00003-7>
- Kaloriti, D., Galva, C., Parupalli, C., Khalifa, N., Galvin, M., & Sedbrook, J. C. (2007). Microtubule Associated Proteins in Plants and the Processes They Manage. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(8), 1164–1173. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00541.x>
- Kang, Y., Li, M., Sinharoy, S., & Verdier, J. (2016). A Snapshot of Functional Genetic Studies in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2016.01175>
- Kartasalo, K., Pölönen, R.-P., Ojala, M., Rasku, J., Lekkala, J., Aalto-Setälä, K., & Kallio, P. (2015). CytoSpectre: A tool for spectral analysis of oriented structures on cellular and subcellular levels. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 344. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0782-y>
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., & Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 485–504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>
- Ketelaar, T., Anthony, R. G., & Hussey, P. J. (2004). Green Fluorescent Protein-mTalin Causes Defects in Actin Organization and Cell Expansion in Arabidopsis and Inhibits Actin Depolymerizing Factor's Actin Depolymerizing Activity in Vitro. *Plant Physiology*, 136(4), 3990–3998. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050799>
- Kiselev, K. V., Aleynova, O. A., Ogneva, Z. V., Suprun, A. R., & Dubrovina, A. S. (2021). 35S promoter-driven transgenes are variably expressed in different organs of *Arabidopsis thaliana* and in response to abiotic stress. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2235–2241. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06235-x>
- Kost, B., Mathur, J., & Chua, N.-H. (1999). Cytoskeleton in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(6), 462–470. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00024-2)
- Krebs, J. (2004). Calcium-Binding Proteins: Cytosolic (Annexins, Gelsolins, C2-Domain Proteins). V W. J. Lennarz & M. D. Lane (Ed.), *Encyclopedia of Biological Chemistry* (s. 287–293). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00059-4>
- Krishnan, K., & Moens, P. D. J. (2009). Structure and functions of profilins. *Biophysical Reviews*, 1(2), 71–81. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0010-y>
- Krtková, J., Benáková, M., & Schwarzerová, K. (2016). Multifunctional Microtubule-Associated Proteins in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 474. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00474>
- Küster, H. (2013). *Medicago truncatula*. V S. Maloy & K. Hughes (Ed.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (s. 335–337). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00915-3>

- Li, C.-H., Wang, G., Zhao, J.-L., Zhang, L.-Q., Ai, L.-F., Han, Y.-F., Sun, D.-Y., Zhang, S.-W., & Sun, Y. (2014). The Receptor-Like Kinase SIT1 Mediates Salt Sensitivity by Activating MAPK3/6 and Regulating Ethylene Homeostasis in Rice. *The Plant Cell*, 26(6), 2538–2553. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125187>
- Liu, E., Vega, S., Treiser, M. D., Sung, H.-J., & Moghe, P. V. (2011). 3.317—Fluorescence Imaging of Cell–Biomaterial Interactions. V P. Ducheyne (Ed.), *Comprehensive Biomaterials* (s. 291–303). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00101-X>
- Liu, W., Li, L., Khan, M. A., & Zhu, F. (2012). Popular molecular markers in bacteria. *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiya I Virusologiya*, 3, 14–17.
- Liu, Z., Østerlund, I., Ruhnnow, F., Cao, Y., Huang, G., Cai, W., Zhang, J., Liang, W., Nikoloski, Z., Persson, S., et al. (2022). Fluorescent cytoskeletal markers reveal associations between the actin and microtubule cytoskeleton in rice cells. *Development*, 149(12), dev200415. <https://doi.org/10.1242/dev.200415>
- Lü, D., Cao, X., Tang, S., & Tian, X. (2000). Regeneration of foreign genes co-transformed plants of *Medicago sativa* L by *Agrobacterium rhizogenes*. *Science in China Series C: Life Sciences*, 43(4), 387–394. <https://doi.org/10.1007/BF02879303>
- Luptovčiak, I., Komis, G., Takáč, T., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2017). Katanin: A Sword Cutting Microtubules for Cellular, Developmental, and Physiological Purposes. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1982. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01982>
- Maciver, S. K., & Hussey, P. J. (2002). The ADF/cofilin family: Actin-remodeling proteins. *Genome Biology*, 3(5), reviews3007.1-reviews3007.12.
- Malik, K. A., & Maqbool, A. (2020). Transgenic Crops for Biofortification. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2020.571402>
- Matsumoto, T. K., & Gonsalves, D. (2012). 8—Biolistic and other non-*Agrobacterium* technologies of plant transformation. V A. Altman & P. M. Hasegawa (Ed.), *Plant Biotechnology and Agriculture* (s. 117–129). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00008-0>
- Mazumdar, M., & Misteli, T. (2005). Chromokinesins: Multitalented players in mitosis. *Trends in Cell Biology*, 15(7), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.006>
- McCurdy, D. W., Kovar, D. R., & Staiger, C. J. (2001). Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*, 215(1), 89–104. <https://doi.org/10.1007/BF01280306>
- Miki, B. L. A., Reich, T. J., & Iyer, V. N. (1987). Microinjection: An Experimental Tool for Studying and Modifying Plant Cells. V T. Hohn & J. Schell (Ed.), *Plant DNA Infectious Agents* (s. 249–265). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6977-3_10
- Molines, A. T., Marion, J., Chabout, S., Besse, L., Dompierre, J. P., Mouille, G., & Coquelle, F. M. (2018). EB1 contributes to microtubule bundling and organization, along with root growth, in *Arabidopsis thaliana*. *Biology Open*, 7(8), bio030510. <https://doi.org/10.1242/bio.030510>
- Motta, M. R., & Schnittger, A. (2021). A microtubule perspective on plant cell division. *Current Biology*, 31(10), R547–R552. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.087>
- Moujaber, O., & Stochaj, U. (2020). The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(2), 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.11.003>
- Muranaka, T., & Saito, K. (2010). 3.17—Production of Pharmaceuticals by Plant Tissue Cultures. V H.-W. (Ben) Liu & L. Mander (Ed.), *Comprehensive Natural Products II* (s. 615–628). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08045382-8.00065-4>
- Nakajima, K., Furutani, I., Tachimoto, H., Matsubara, H., & Hashimoto, T. (2004). SPIRAL1 Encodes a Plant-Specific Microtubule-Localized Protein Required for Directional Control of Rapidly Expanding *Arabidopsis* Cells. *The Plant Cell*, 16(5), 1178–1190. <https://doi.org/10.1105/tpc.017830>
- Nan, Q., Qian, D., Niu, Y., He, Y., Tong, S., Niu, Z., Ma, J., Yang, Y., An, L., Wan, D., et al. (2017). Plant Actin-Depolymerizing Factors Possess Opposing Biochemical Properties Arising from Key Amino Acid Changes throughout Evolution. *The Plant Cell*, 29(2), 395–408. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00690>

- Nandety, R. S., Wen, J., & Mysore, K. S. (2023). *Medicago truncatula* resources to study legume biology and symbiotic nitrogen fixation. *Fundamental Research*, 3(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.fmr.2022.06.018>
- Niu, W., & Guo, J. (2017). Chapter Seven—Novel Fluorescence-Based Biosensors Incorporating Unnatural Amino Acids. V R. B. Thompson & C. A. Fierke (Ed.), *Methods in Enzymology* (Roč. 589, s. 191–219). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.01.012>
- Novák, D., Kuchařová, A., Ovečka, M., Komis, G., & Šamaj, J. (2016). Developmental Nuclear Localization and Quantification of GFP-Tagged EB1c in Arabidopsis Root Using Light-Sheet Microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01187>
- Ovečka, M., Vaškebová, L., Komis, G., Luptovčiak, I., Smertenko, A., & Šamaj, J. (2015). Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols*, 10(8), 1234–1247. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.081>
- Paradez, A., Wright, A., & Ehrhardt, D. W. (2006). Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.005>
- Pereira, L. F., & Erickson, L. (1995). Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 14(5), 290–293. <https://doi.org/10.1007/BF00232030>
- Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2009). Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.010>
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. T. (Ed.). (2017). Chapter 33—Actin and Actin-Binding Proteins. V *Cell Biology (Third Edition)* (s. 575–591). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34126-4.00033-5>
- Potter, H. (1993). [34] Application of electroporation in recombinant DNA technology. V *Methods in Enzymology* (Roč. 217, s. 461–478). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17084-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17084-I)
- Quan, W., Liu, X., Wang, H., & Chan, Z. (2016). Physiological and transcriptional responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 105–115. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0981-x>
- Ramaiah, S. M., & Skinner, D. Z. (1997). Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science*, 73(8), 674–682.
- Reich, T. J., Iyer, V. N., Haffner, M., Holbrook, L. A., & Miki, B. L. (1986). The use of fluorescent dyes in the microinjection of alfalfa protoplasts. *Canadian Journal of Botany*, 64(6), 1259–1267. <https://doi.org/10.1139/b86-174>
- Sackett, D. L., & Lippoldt, R. E. (1991). Thermodynamics of reversible monomer-dimer association of tubulin. *Biochemistry*, 30(14), 3511–3517. <https://doi.org/10.1021/bi00228a023>
- Samac, D. A., & Austin-Phillips, S. (2006). Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:301>
- Sample, V., Newman, R. H., & Zhang, J. (2009). The structure and function of fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2852–2864. <https://doi.org/10.1039/B913033K>
- Saunders, J. A., Lin, C. H., Hou, B. H., Cheng, J., Tsengwa, N., Lin, J. J., Smith, C. R., McIntosh, M. S., & Van Wert, S. (1995). Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. *Molecular Biotechnology*, 3(3), 181–190. <https://doi.org/10.1007/BF02789328>
- Seagull, R. W. (2016). The Plant Cytoskeleton. V *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.02873-0>
- Seagull, R. W., & Gunning, B. (1989). The plant cytoskeleton. *Critical Reviews in Plant Sciences*. <https://doi.org/10.1080/07352688909382273>

- Schmit, A. C., & Lambert, A. M. (1990). Microinjected fluorescent phalloidin in vivo reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells. *The Plant Cell*, 2(2), 129–138. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.2.129>
- Schnurr, J. A., Jung, H.-J. G., & Samac, D. A. (2007). A Comparative Study of Alfalfa and Medicago truncatula Stem Traits: Morphology, Chemical Composition, and Ruminal Digestibility. *Crop Science*, 47(4), 1672–1680. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.12.0762>
- Smertenko, A., Hewitt, S. L., Jacques, C. N., Kacprzyk, R., Liu, Y., Marcec, M. J., Moyo, L., Ogden, A., Oung, H. M., Schmidt, S., et al. (2018). Phragmoplast microtubule dynamics – a game of zones. *Journal of Cell Science*, 131(2), jcs203331. <https://doi.org/10.1242/jcs.203331>
- Song, Y., Lv, J., Ma, Z., & Dong, W. (2019). The mechanism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) response to abiotic stress. *Plant Growth Regulation*, 89(3), 239–249. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00530-1>
- Spanò, L., Mariotti, D., Pezzotti, M., Damiani, F., & Arcioni, S. (1987). Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 73(4), 523–530. <https://doi.org/10.1007/BF00289189>
- Stepanenko, O. V., Stepanenko, O. V., Kuznetsova, I. M., Verkhusha, V. V., & Turoverov, K. K. (2013). Chapter Four - Beta-Barrel Scaffold of Fluorescent Proteins: Folding, Stability and Role in Chromophore Formation. V K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Roč. 302, s. 221–278). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407699-0.00004-2>
- Suliman, S., & Schulze, J. (2010). The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 167(9), 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.12.016>
- Svitkina, T. (2016). Imaging Cytoskeleton Components by Electron Microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1365, 99–118. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3124-8_5
- Takemoto, D., & Hardham, A. R. (2004). The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. *Plant Physiology*, 136(4), 3864–3876. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052159>
- Tanaka, K., Takeda, S., Mitsuoka, K., Oda, T., Kimura-Sakiyama, C., Maéda, Y., & Narita, A. (2018). Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04290-w>
- Terzaghi, W. B., & Cashmore, A. R. (1997). Plant Cell Transfection by Electroporation. V R. S. Tuan (Ed.), *Recombinant Gene Expression Protocols* (s. 453–462). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-480-1:453>
- Thomas, C., Tholl, S., Moes, D., Dieterle, M., Papuga, J., Moreau, F., & Steinmetz, A. (2009). Actin bundling in plants. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(11), 940–957. <https://doi.org/10.1002/cm.20389>
- Timmers, A. C. J., Auriac, M.-C., de Billy, F., & Truchet, G. (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development*, 125(3), 339–349. <https://doi.org/10.1242/dev.125.3.339>
- Tsien, R. Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Tylewicz, U. (2020). 1—How does pulsed electric field work? V F. J. Barba, O. Parniakov, & A. Wiktor (Ed.), *Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable Food for Tomorrow* (s. 3–21). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816402-0.00001-X>
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: Biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009>
- Ueda, K., Matsuyama, T., & Hashimoto, T. (1999). Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 206(1), 201–206. <https://doi.org/10.1007/BF01279267>

- van der Honing, H. S., Kieft, H., Emons, A. M. C., & Ketelaar, T. (2012). Arabidopsis VILLIN2 and VILLIN3 Are Required for the Generation of Thick Actin Filament Bundles and for Directional Organ Growth. *Plant Physiology*, *158*(3), 1426–1438. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192385>
- Vlahova, M., Stefanova, G., Petkov, P., Barbulova, A., Petkova, D., Kalushkov, P., & Atanassov, A. (2005). Genetic Modification of Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) for Quality Improvement and Production of Novel Compounds. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *19*(sup3), 56–62. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817286>
- Volkman, D., & Baluška, F. (1999). Actin cytoskeleton in plants: From transport networks to signaling networks. *Microscopy Research and Technique*, *47*(2), 135–154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19991015\)47:2<135::AID-JEMT6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19991015)47:2<135::AID-JEMT6>3.0.CO;2-1)
- Vyplelová, P., Ovečka, M., Komis, G., & Šamaj, J. (2018). Chapter 7—Advanced microscopy methods for bioimaging of mitotic microtubules in plants. V H. Maiato & M. Schuh (Ed.), *Methods in Cell Biology* (Roč. 145, s. 129–158). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.03.019>
- Wang, B., Zou, M., Pan, Q., & Li, J. (2023). Analysis of Actin Array Rearrangement During the Plant Response to Bacterial Stimuli. V P. J. Hussey & P. Wang (Ed.), *The Plant Cytoskeleton: Methods and Protocols* (s. 263–270). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2867-6_21
- Wang, C., Zhang, L.-J., & Huang, R.-D. (2011). Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(1), 29–31. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14202>
- Wang, J., Lian, N., Zhang, Y., Man, Y., Chen, L., Yang, H., Lin, J., & Jing, Y. (2022). The Cytoskeleton in Plant Immunity: Dynamics, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 15553. <https://doi.org/10.3390/ijms232415553>
- Wang, Y.-S., Yoo, C.-M., & Blancaflor, E. B. (2008). Improved imaging of actin filaments in transgenic Arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist*, *177*(2), 525–536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02261.x>
- Weeks, J. T., Ye, J., & Rommens, C. M. (2008). Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*, *17*(4), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9132-9>
- Xiong, J., Sun, Y., Yang, Q., Tian, H., Zhang, H., Liu, Y., & Chen, M. (2017). Proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in alfalfa roots and shoots. *Proteome Science*, *15*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0127-z>
- Yabuuchi, T., Nakai, T., Sonobe, S., Yamauchi, D., & Mineyuki, Y. (2015). Preprophase band formation and cortical division zone establishment: RanGAP behaves differently from microtubules during their band formation. *Plant Signaling & Behavior*, *10*(9), e1060385. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1060385>
- Yang, F., Moss, L. G., & Phillips, G. N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, *14*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nbt1096-1246>
- Yoneyama, K., & Natsume, M. (2010). 4.13—Allelochemicals for Plant–Plant and Plant–Microbe Interactions. V H.-W. (Ben) Liu & L. Mander (Ed.), *Comprehensive Natural Products II* (s. 539–561). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00105-2>
- Zou, M., Ren, H., & Li, J. (2019). An Auxin Transport Inhibitor Targets Villin-Mediated Actin Dynamics to Regulate Polar Auxin Transport1 [OPEN]. *Plant Physiology*, *181*(1), 161–178. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00064>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	2,4-dichlórfenoxyoctová kyselina
<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADF	aktín depolymerizujúci faktor
ADP	adenozín difosfát
AF	aktínové flamenty
Atm	atmosféra
ATP	adenozín trifosfát
Ca²⁺	dvojmocný kation vápnika
CaSO₄	síričitan vápenatý
CDPK	cyklín dependentné kinázy
CLASP	proteíny asociované s cytoplazmatickým linkerom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dS/m	jednotka elektrickej vodivosti
EB1	End binding1
ECFP	cyan fluorescenčný proteín
EGFP	zelený fluorescenčný proteín
EYFP	žltý fluorescenčný proteín
FABD2	aktín viažúca doména č. 2 proteínu Fimbrínu
F-aktín	vláknitý aktín
G-aktín	globulárny aktín
GDP	guanozindifosfát

GFP	zelený fluorescenčný proteín
GFP-FABD2	amino-terminálna fúzia zeleného fluorescenčného proteínu (GFP) na aktín-viažucu doménu 2 (ABD 2) proteínu Fimbrin 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
GTP	guanozíntrifosfát
H₂O	voda
H₂O₂	peroxid vodíka
chv	chromozomálne gény
INV	sacharózová invertáza
KCl	chlorid draselný
K-koniec	špicatý koniec
KNO₃	dusitan draselný
KOH	hydroxid draselný
LB broth	lysogeny broth
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
MAP	proteíny asociované s mikrotubulmi
MAPK	mitogén aktivované proteín kinázy
MBD	mikrotubulová väzbová doména
MES	kyselina 2-(N-morfolín)etánsulfónová
MgCl₂	chlorid horečnatý
MgSO₄	síran horečnatý
MgSO₄ . 7 H₂O	heptahydrát síranu horečnatého

MT	mikrotubuly
MT-viažuca doména	Mikrotubuly viažuca doména
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Na₂CO₃	uhličitan sodný
Na₂SO₄	síričitan sodný
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových kationov
PPB	preprofázny zväzok
Ppm	milióntina
PRR	receptory rozpoznávajúce vzory
Ri-plazmid	koreň indukujúci plazmid
ROS	reaktívne formy kyslíka
RPM	otáčky za minútu
RSY	Regen-SY
SA	kyselina salicylová
SPR1	SPIRAL1
SUS	sacharózová syntáza
TAE	tris-acetát EDTA
tagRFP-TUA6	amino-terminálna fúzia červeného fluorescenčného proteínu (tagRFP) na tubulín α -6

T-DNA	transferová DNA
Ti-plazmid	tumor-indukujúci plazmid
TUA6	podjednotka tubulínu alfa
TUB6	podjednotka tubulínu beta
UV	ultrafialové žiarenie