

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



Fenotypová charakterizácia transgénnych línií lucerny počas interakcie  
s prospešnými mikroorganizmami

## DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor: Bc. Ema Heffnerová  
Študijný program: N0512A13007 Biotechnológie a génové  
inžinierstvo  
Študijný obor: Biotechnológie a génové inžinierstvo  
Forma štúdia: Prezenčná  
Vedúci práce: Mgr. Olga Šamajová, Dr.  
Rok: 2024

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa ..... *podpis študenta*



Chcela by som poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Olge Šamajovej, Dr., za odborné a tpezlivé vedenie, pomoc a čas, ktorý mi venovala pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Svoje poďakovanie by som tiež chcela venovať zamestnancom KBT, ktorý mi vždy ochotne pomohli. Poďakovanie patrí aj vedúcemu oddelenia prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. za umožnenie práce v laboratóriu a využitie všetkého vybavenia.

Práca bola podporená grantami IGA (projekty č. IGA\_PrF\_2022\_014, IGA\_PrF\_2023\_015 a IGA\_PrF\_2024\_012) zo Študentskej grantovej súťaže na Univerzite Palackého v Olomouci.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Ema Heffnerová
Názov práce	Fenotypová charakterizácia transgénnych línií lucerny počas interakcie s prospešnými mikroorganizmami
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

Rastliny sú neustále vystavované rozličným biotickým a abiotickým stresom. Pri prekonávaní týchto stresových faktorov im pomáhajú prospešné mikroorganizmy. Medzi prospešné mikroorganizmy patria aj baktérie *Enterobacter* sp. SA187, ktoré dokážu solubilizovať zinok a produkovať siderofori. *Enterobacter* sp. SA187 u *Arabidopsis thaliana* indukoval odolnosť voči soľnému stresu. Na interakcii medzi mikroorganizmami a rastlinami sa podieľajú rôzne signálne dráhy vrátane signalizácie sprostredkovej pomocou mitogénom aktivovaných proteín kináz (MAPK). Rastlinný cytoskelet je dynamická štruktúra hrajúca významnú úlohu pri regulácii tolerance rastlín voči abiotickým a biotickým stresom, delení buniek, pohybe organel či transporte proteínov.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo uskutočniť fenotypovú analýzu rastlín *Medicago sativa* divokého typu Regen SY (RSY) a transgénnych línií *SIMKK* RNAi, *SIMK* RNAi a GFP-SIMK po inokulácii s *Enterobacter* sp. SA187. Ďalším cieľom bolo pozorovanie vplyvu *Enterobacter* sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému pri reakcii *M. sativa* na abiotický stres. Posledným cieľom bola imunohistochemická lokalizácia stresom indukovanej MAPK (SIMK), fosforylovaných MAPK a cytoskeletu v bunkách koreňoch *M. sativa* počas interakcie s prospešnými mikroorganizmami v podmienkach abiotického stresu

Kľúčové slová	MAPK, SIMK, SIMKK <i>Medicago sativa</i> , prospešné mikroorganizmy, <i>Enterobacter</i> sp. SA187, somatická embryogenéza, imunolokalizácia, abiotický stres
---------------	---

Počet strán	121
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Ema Heffnerová
Title	Phenotypic characterization of alfalfa transgenic lines during interaction with beneficial microorganisms
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biotechnology
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>Plants are constantly exposed to various biotic and abiotic stresses. Beneficial microorganisms help them overcome these stress factors. Among beneficial microorganisms are bacteria <i>Enterobacter</i> sp. SA187, which can solubilize zinc and produce siderophores. <i>Enterobacter</i> sp. SA187 induced salt stress tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i>. The interaction between microorganisms and plants involves various signaling pathways, including mitogen-activated protein kinase (MAPK)-mediated signaling. The plant cytoskeleton is a dynamic structure playing a significant role in regulating plant tolerance to both abiotic and biotic stresses, as well as cell division, organelle movement, and protein transport.</p> <p>The primary objective of this thesis was to perform phenotypic analysis of <i>Medicago sativa</i> wild type Regen SY (RSY) plants and transgenic lines, including <i>SIMKK</i> RNAi, <i>SIMK</i> RNAi, and GFP-SIMK after inoculation with <i>Enterobacter</i> sp. SA187. Additionally, the study aimed to investigate the effect of <i>Enterobacter</i> sp. SA187 on the dynamics of root system growth in <i>M. sativa</i> under abiotic stress. The final objective was the immunohistochemical localization of stress-induced MAPK (SIMK), phosphorylated MAPK, and cytoskeleton in <i>M. sativa</i> roots during the interaction with beneficial microorganisms under abiotic stress conditions.</p>
Keywords	MAPK, SIMK, SIMKK <i>Medicago sativa</i> , beneficial microorganisms, abiotic stress, <i>Enterobacter SA187Y</i> , somatic embryogenesis, immunolocalization
Number of pages	121
Number of appendices	0
Language	Slovak

## Obsah

1. ÚVOD .....	1
2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	3
2.2 Lucerna siata .....	3
2.3 Prospešné baktérie.....	3
2.3.1 <i>Enterobacter</i> .....	4
2.4 Abiotický stres .....	7
2.4.1 Soľný stres.....	8
2.4.2 Teplotný stres .....	11
2.4.3 Stres zo sucha .....	13
2.4.4 Oxidatívny stres.....	14
2.4.5 Ťažké kovy .....	15
2.5 Úloha PGPR počas pôsobenia abiotického stresu.....	16
2.6 Cytoskelet rastlín.....	20
2.6.1 Mikrotubuly.....	21
2.6.2 Aktín.....	24
2.6.3 Bunkové delenie .....	26
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	28
3.1 Materiál .....	28
3.1.1 Biologický materiál .....	28
3.1.2 Chemikálie.....	28
3.1.3 Roztoky a médiá.....	29
3.1.1 Prístroje .....	36
3.1.2 Software.....	37
3.2 Metódy .....	37
3.2.1 Príprava kultivačných médií.....	37
3.2.2 Sterilizácia listov <i>Medicago sativa</i> .....	38
3.2.3 Somatická embryogenéza.....	38
3.2.4 Príprava bakteriálnej kultúry <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	38
3.2.5 Fenotypová analýza transgénnych línií <i>M. sativa</i> v podmienkach <i>ex vitro</i> .....	39
3.2.6 Aplikácia bakteriálnej kultúry <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	39
3.2.7 Príprava tuhého Fahraeus média obsahujúceho <i>Enterobacter</i> Sp. SA187 .....	39
3.2.8 Fenotypová analýza transgénnych línií <i>M. sativa</i> kultivovaných <i>in vitro</i> .....	40

3.2.9	Vplyv <i>Enterobacter</i> sp. SA187Y na rast koreňov <i>M. sativa</i> počas pôsobenia soľného stresu .....	40
3.2.10	Príprava zalievacieho média.....	40
3.2.11	Fixácia koreňov <i>M. sativa</i> .....	41
3.2.12	Imunoznačenie SIMK.....	41
3.2.13	Mikroskopické pozorovanie vzoriek .....	43
3.2.14	Odber a homogenizácia vzoriek .....	43
3.2.15	Extrakcia proteínov .....	44
3.2.16	Meranie koncentrácie proteínov .....	44
3.2.17	Príprava vzoriek pre naniesenie na gél .....	45
3.2.18	Príprava polyakrylamidových gélov .....	45
3.2.19	Príprava Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gélov .....	46
3.2.20	Gélová elektroforéza v prítomnosti dodecylsírany sodného .....	47
3.2.21	Prenos proteínov na membránu .....	47
3.2.22	Blokácia nešpecifických väzieb a aplikácia protilátok.....	48
3.2.23	Detekcia proteínov .....	48
4.	Výsledky .....	49
4.1	Vplyv <i>Enterobacter</i> sp. SA187 na fenotyp nadzemnej časti rastlín <i>M. sativa</i> v <i>ex vitro</i> podmienkach .....	49
4.1.1	Fenotyp nadzemnej časti štyri mesiace od inokulácie.....	51
4.1.2	Fenotyp nadzemnej časti päť mesiacov od inokulácie .....	52
4.1.3	Fenotyp nadzemnej časti osem mesiacov od inokulácie .....	54
4.1.4	Fenotyp nadzemnej časti desať mesiacov od inokulácie.....	55
4.2	Fenotyp nadzemnej časti rastlín <i>M. sativa</i> inokulovaných <i>in vitro</i> s <i>Enterobacter</i> sp. SA187 po prenose do <i>ex vitro</i> .....	56
4.2.1	Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín <i>SIMKi</i> a <i>SIMKKi</i> po 3 mesiacoch od prenesenia do <i>ex vitro</i> podmienok .....	56
4.2.2	Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín <i>SIMKi</i> a <i>SIMKKi</i> po 4 mesiacoch od prenesenia do <i>ex vitro</i> podmienok .....	57
4.2.3	Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín <i>SIMKi</i> a <i>SIMKKi</i> po 7 mesiacoch od prenesenia do <i>ex vitro</i> podmienok.....	58
4.2.4	Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín <i>SIMKi</i> a <i>SIMKKi</i> po 9 mesiacoch od prenesenia do <i>ex vitro</i> podmienok .....	59
4.2.5	Fenotyp nadzemnej časti transgénnych rastlín GFP-SIMK .....	61
4.3	Vplyv <i>Enterobacter</i> sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému somatických embryí <i>M. sativa</i> .....	64
4.4	Vplyv soľného stresu na rast koreňového systému embryí <i>M. sativa</i> inokulovaných <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	65
4.5	Dynamika rastu koreňového systému rastlín <i>M. sativa</i> po inokulácii <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	67

4.6	Vplyv <i>Enterobacter</i> sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému rastlín <i>M. sativa</i> počas pôsobenia soľného stresu .....	68
4.6.1	Dynamika rastu koreňového systému inokulovaného <i>Enterobacter</i> sp. SA187 u rastlín vystavených soľnému stresu .....	68
4.6.2	Vplyv soľného stresu na dynamiku rastu koreňového systému rastlín kultivovaných na médiu inokulovanom s <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	70
4.7	Analýza bunkového cyklu v koreňoch rastlín divokého typu a transgénej línie <i>SIMKKi</i> .....	76
4.8	Analýza orientácie kortikálnych mikrotubulov po aplikácii <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	78
4.9	Analýza orientácie kortikálnych mikrotubulov počas pôsobenia soľného stresu .....	85
4.10	Vplyv <i>Enterobacter</i> sp. SA187 na lokalizáciu SIMK a fosforylovaných MAPK u <i>M. sativa</i> .....	89
4.2	Analýza fluorescenčného signálu SIMK a pERK v deliacich sa bunkách koreňov <i>M. sativa</i> .....	96
4.3	Imunoblotová analýza transgénnych rastlín <i>M. sativa</i> počas interakcie s <i>Enterobacter</i> sp. SA187 .....	98
5.	DISKUSIA .....	101
6.	ZÁVER .....	105
7.	Referencie .....	106
1.	Zoznam použitých skratiek .....	120

## **CIELE PRÁCE**

### **Teoretická časť**

Vypracovanie literárnej rešerše na tému významu prospešných mikroorganizmov v odpovedi rastlín na abiotické stresy.

### **Praktická časť**

- 1) Fenotypová analýza transgénnych línií lucerny (*Medicago sativa*) počas interakcie s prospešnými mikroorganizmami rodu *Enterobacter*
- 2) Vplyv prospešných mikroorganizmov pri reakcii lucerny na abiotický stres
- 3) Lokalizácia MAPK a cytoskeletu u lucerny počas interakcie s prospešnými mikroorganizmami



## 1. ÚVOD

Lucerna siata (*M. sativa* L.) je trvalá, dvojkličnolistová rastlina patriaca do čeľade bôbovité (*Fabaceae*). V symbióze s hľuzovitými baktériami obohacuje pôdu o dusík. *M. sativa* má taktiež schopnosť odsoľovať pôdy. Preto je lucerna dobrou predplodinou pre mnoho poľnohospodárskych plodín a využíva sa tiež pri fyto-remediácii, na kŕmenie zvierat, výrobu biopaliva etanolu a produkciu rekombinantných proteínov s farmaceutickým využitím (Bora a Sharma, 2011; Flajoulot et al., 2005; Fu et al., 2015; Hrbáčková et al., 2020).

V pôde sa nachádza mnoho mikroorganizmov schopných interagovať s koreňovým systémom vyšších rastlín. Táto interakcia je buď negatívna, prospešná alebo neutrálna. Korene rastlín vypúšťajú exudáty, obsahujúce rôzne látky vrátane cukrov, fyto-sideroforov, aminokyselín a vitamínov. Pomocou exudátov dokážu rastliny manipulovať s množstvom a zložením mikroorganizmov v rizosfére (Badri et al., 2009; Bakker et al., 2012). Prospešné mikróby (PGPR) dokážu nepriamo alebo priamo podporovať vývin a rast rastlín. Medzi mechanizmy podpory rastu rastlín patrí napríklad aktivácia rezistencie voči fytopatogénom, znižovanie hladiny etylénu, produkcia fytohormónov, sideroforov a antibiotík, odbúravanie škodlivých xenobiotík ako aj bioremediácia pôd znečistených ťažkými kovmi (Ahemad a Malik, 2011; Braud et al., 2009; Glick et al., 2007; Hayat et al., 2010; Rajkumar et al., 2010). Medzi PGPR patria patria zástupcovia rôznych rodov vrátane *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Variovorax*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, a *Serratia*.

*Enterobacter* je fakultatívne anaeróbna, gramnegatívna, tyčinkovitá baktéria. Niektoré kmene *Enterobacter* sú schopné podporovať rast rastlín a to napríklad solubilizáciou fosfátu, fixáciou vzdušného dusíka či produkciou indol-3-octovej kyseliny, antifungálnych zlúčenín, sideroforov a fytohormónov. Jedným z týchto kmeňov je *Enterobacter* sp. SA187, ktorý bol izolovaný z koreňových hľúzok púštnej rastliny *Indigofera argentea*. Jedná sa o endofytickú baktériu schopnú prežiť samostatne v rizosfére, ale aj v spojení s rôznymi druhmi rastlín. Počas rôznych abiotických stresoch, ako je sucho, salinita alebo vysoká teplota, *Enterobacter* sp. SA187 podporil rast *Arabidopsis thaliana*. *Enterobacter* sp. SA187 dokáže produkovať siderofory a trehalózu (Andrés-Barrao et al., 2017). Taktiež pomohol rastlinám *A. thaliana* prekonať soľný stres produkciou kyselina 2-keto-4-metyltiomaslovej (de Zélicourt et al., 2018).

Rastlinný cytoskelet je tvorený mikrotubulami, aktínovými mikrofilamentami a asociovanými proteínmi. Cytoskelet sa účastní bunkových procesov ako je transport vezikúl a proteínov alebo delenie bunky. Mikrotubuly sa podieľajú na raste rastlinných buniek, tvorbe preprofázneho zväzku, deliaceho vretienka ale aj fragmoplastu (Alberts et al., 2015).

## **2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY**

### **2.2 Lucerna siata**

Lucerna siata je dôležitá poľnohospodárska plodina. Táto cudzoopelivá, dvojklíčnolistová rastlina patrí do čeľade bôbovité. Vďaka svojmu hlbokému koreňovému systému dokáže znášať vysoké teploty a sucho. Lucerna v symbióze s hľuzkovými baktériami je schopná viazať dusík. Preto na jej pestovanie nie je potrebné používať dusíkaté hnojivá. Lucerná má tetraploidný genóm. Pre svoj vysoký obsah proteínov, vitamínov a mikroelementov je využívaná na kŕmenie dobytká. Okrem toho sa môže primiešavať do kŕmnych zmesí repy či kukurice ako lacná prímes. Využívaná je taktiež na výrobu etanolu a produkciu farmakologických rekombinantných proteínov (Fu et al., 2015; McCoy a Bingham, 1988, Radovic et al., 2009).

### **2.3 Prospešné baktérie**

Baktérie žijúce v tesnom kontakte s rastlinami dokážu pomocou rôznych mechanizmov podporovať vývoj a rast rastlín ako aj zvyšovať toleranciu stresu a odolnosť voči patogénom (Eida et al., 2019; Chakraborty, 2023; Liu et al., 2017; Zamioudis et al., 2013). Rizobaktérie podporujúce rast rastlín (PGPR) preto zohrávajú významnú úlohu v poľnohospodárstve. PGPR môžu slúžiť ako biohnojivá alebo biokontrolné činidlá. Vedia tak výrazne zlepšovať výnos plodín vďaka svojej schopnosti pomôcť rastlinám prekonať abiotické stresy ako je napríklad vysoká salinita, sucho, či extrémne teploty (Backer et al., 2018; de Zélicourt et al., 2013; Cherif-Silini et al., 2019; Marasco et al., 2012; Mukherjee et al., 2019; Tiwari et al., 2017).

Väčšina PGPR kolonizuje korene rastlín, pričom endofytické kmene obsadzujú vnútorné pletivá rastlín, zatiaľ čo epifytické kmene kolonizujú iba povrch koreňov (Bisseling et al., 2009; Liu et al., 2017). Mnohé kmene PGPR interagujú s pomerne širokým spektrom hostiteľov (Droge et al., 2012). Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú vytvorenie prospešných interakcií medzi baktériami a rastlinami patria klimatické podmienky a vlastnosti pôdy (Berg a Smalla, 2009).

Rhizobaktérie sú ku koreňom rastlín priťahované koreňovými exudátmi, ktoré ovplyvňujú fyzikálno-chemické vlastnosti okolitej pôdy. Koreňové exudáty sú zložené z vitamínov, jednoduchých cukrov, polysacharidov, aminokyselín a organických kyselín. Niektoré rastliny vypúšťajú exudáty obsahujúce antimikrobiálne, nematocídne a isekticídne metabolity. Koreňové exudáty majú schopnosť priamo ovplyvňovať kolobeh

dusíka a uhlíka, keďže vplývajú na mikroorganizmy rozkladajúce organickú hmotu v pôde. Navyše môžu spôsobovať inhibíciu nitrifikácie pôdnymi nitrifikačnými mikroorganizmami (Bais et al., 2006; Berg a Smalla, 2009; Haichar et al., 2014; Massalha et al., 2017). Koreňový sliz zložený z polysacharidov, proteínov a fosfolipidov slúži ako výživný substrát pre mikroorganizmy žijúce v rizosfére. Popritom kľavým spôsobom uľahčuje predlžovací rast koreňov medzi časticami pôdy, zvyšuje stabilitu pôdneho agregátu a chráni koreňový meristém pred toxickými kovmi. Je produkovaný bunkami koreňovej čiapočky a epidermálnymi bunkami koreňa. Koncentrácia niektorých exudátov nie je rovnaká v jednotlivých koreňových zónach. To má za následok odlišné zloženie bakteriálnej kolonizácie pozdĺž koreňa (Gamalero et al., 2004; Haichar et al., 2014). V závislosti od stresových podmienok môžu rastliny kontrolovať bakteriálnu kolonizáciu zložením svojich exsudátov (Haichar et al., 2008; Massalha et al., 2017).

Prvým krokom pri bakteriálnej kolonizácii koreňov rastlín je nešpecifické, reverzibilné prichytenie baktérií na povrch koreňa pomocou bičika alebo pilli. Neskôr sa baktérie na povrch koreňa viažu špecifickejšie. Špecifické naviazanie baktérii je sprostredkované adhezívnymi a extracelulárnymi proteínmi (Wheatley a Poole, 2018). Následným množením prichytených baktérií dochádza k tvorbe biofilmu (Synek et al., 2021). Na vstup do vnútorných pletív rastlín môžu PGPR využívať koreňové vlásky, hydratody, prieduchy, rany spôsobené hmyzom a bylinožravcami a poškodené trichómy (Hardoim et al., 2015). Na pasívny vstup do vnútorných pletív koreňa rastlín niektoré baktérie využívajú taktiež otvory okolo miest vyrastania nových laterálnych koreňov (Synek et al., 2021). Mnohé PGPR dokážu aktívne vstupovať do koreňových pletív uvoľňovaním enzýmov degradujúcich bunkovú stenu. Medzi tieto enzýmy patria hlavne pektinázy, celulózy, endo/exo-glukanázy a xylanázy (Compant et al., 2005; Reinhold-Hurek et al., 2006; Sessitsch et al., 2012). Po vstupe do vnútorných pletív rastlín je ďalšou prekážkou v kolonizácii rastliny endodermis. Baktérie, ktoré nedokážu prekonať túto bariéru kolonizujú medzibunkové priestory lokálne, zatiaľ čo baktérie schopné preniknúť do endodermis, využívajú xylém pre pohyb rastlinou a systémovú kolonizáciu vnútorných kompartmentov celej rastliny (Frank et al., 2017; Hardoim et al., 2015).

### 2.3.1 *Enterobacter*

Čeľaď *Enterobacteriaceae* obsahuje veľké množstvo rodov, žijúcich v rôznych environmentálnych podmienkach. Baktérie patriace do rodu *Enterobacter* sa pohybujú

pomocou bičiek, no patria sem aj nepohyblivé druhy. Sú to fakultatívne-anaeróbne baktérie schopné fermentovať laktózu. Tento rod zahŕňa 22 druhov, z ktorých niektoré tvoria puzdrá. Puzdrá majú ochrannú funkciu. Chránia bunku pred faktormi vonkajšieho prostredia, ako sú napríklad dezinfekčné prostriedky či slnečné žiarenie. Baktérie patriace do tohto rodu netvorí spory (Davin-Regli et al., 2019; Ristuccia a Cunha, 1985).

Mnohé druhy *Enterobacter* sú zodpovedné za veľa nozokomiálnych infekcií. Okrem toho môžu spôsobovať infekcie mäkkých tkanív, dýchacích a močových ciest, endokarditídy, osteomyelitídy a mnohé ďalšie ochorenia. Niektoré druhy tejto baktérie sa môžu vyskytovať na povrchu ľudskej kože, v potravinách, vo vode, v pôde, v odpadových vodách alebo môžu byť súčasťou mikroflóry gastrointestinálneho traktu cicavcov. Baktérie patriace do tohto rodu sú bežne využívané ako indikátory fekálneho znečistenia vody (Němec et al., 2006; Ramirez a Giron, 2021).

Mnohé baktérie patriace do čeľade *Enterobacteriaceae* majú vlastnosti PGPR vrátane schopnosti fixovať dusík, solubilizovať fosfát, produkovať antifugálne zlúčeniny, siderofory, či fytohormóny (Melo et al., 2016). Kmene patriace do rodu *Enterobacter* vykazovali napríklad schopnosť degradovať glyfozát alebo tolerovať arzén (Azua-Bustos a González-Silva, 2014; Benslama a Boulahrouf, 2013).

*Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter oryzae* Ola51T alebo *Enterobacter cloacae* STUPM20 dokážu fixovať dusík (Kreutzer et al., 1991; Laili et al., 2017; Peng et al., 2009). *E. cloacae* MSA4 produkuje biosurfaktant urýchľujúci biodegradáciu polycyklických aromatických uhľovodíkov, ktoré sú súčasťou pôd znečistených motorovým olejom (Diab et al., 2017). *Enterobacter hormaechei* dokáže solubilizovať fosfát, produkovať draslík a IAA. Okrem toho je *E. hormaechei* schopný rásť na platni bez zdroja dusíka, čo naznačuje jeho schopnosť fixovať dusík (Ranawat et al., 2021). *Enterobacter* sp. EnB1, ktorý bol izolovaný z polopúštnej pôdy v Mexiku, je schopný solubilizovať fosfát (Delgado et al., 2014). *Enterobacter* sp. B6 vykazoval biopesticídne vlastnosti proti nymfám *Locusta migratoria* L5 (Oulebsir-Mohandkaci et al., 2015). Navyše *E. cloacae* CAL2, *E. cloacae* UW4 a rizosférický *E. cloacae* a *Enterobacter cancerogenus* produkujú 1-aminocyklopropán-1-karboxylát (ACC) deaminázu, ktorá znižuje hladinu etylénu v rastlinách a uľahčuje tak ich rast (Holguin a Glick, 2001; Glick, 2014; Loper et al., 2012; Shah et al., 1998; Shen et al., 2013). *E. cloacae* MSR1 vykazuje viaceré vlastnosti PGPB ako je napríklad produkcia bioaktívnych zlúčenín a fytohormónu acetoínu, či solubilizácia fosfátov. Jeho aplikácia viedla k podpore rastu rastlín *Pisum sativum* (Khalifa et al., 2016). Ďalej *Enterobacter* sp. 638 produkuje acetoín a 2,3-

butándiol. Tieto prchavé organické zlúčeniny (VOC), sú emitované mnohými PGPB na zlepšenie rastu rastlín (Ryu et al., 2003; Taghavi et al., 2010). Ďalším príkladom PGPB patriacej do čeľade *Enterobacteriaceae* je *E. cloacae* UW5, ktorý bol schopný produkovať vysoké hladiny kyseliny indol-3-octovej (IAA), ale aj *E. cloacae* SBP-8, ktorý mal pozitívny vplyv na rast pšenice počas pôsobenia solného stresu (Coulson a Patten, 2015; Singh et al., 2015, 2017). *E. cloacae* MSR1 podporil rast *P. sativum*.

*Enterobacter* sp. SA187 je tyčinkovitá, gram-negatívna endofytická baktéria patriaca do čeľade *Enterobacteriaceae*. *Enterobacter* sp. SA187 je schopný žiť v rizosfére ale aj v asociácii s mnohými druhmi jednoklíčnolistových a dvojklíčnolistových rastlín. Jeho genóm pozostáva z jedného samostatného veľkého chromozómu, ktorý má 4 429 597 bp. SA187 bol prvý krát izolovaný z koreňových hľúzok púštnej rastliny *Indigofera argentea*. *Enterobacter* sp. SA197 je rezistentný na penicilín G ako aj na ampicilín. To mu pravdepodobne poskytuje výhodu v súboji proti ostatným hubám a baktériám nachádzajúcim sa v púštnej pôde a rizosfére. Táto baktéria dokáže dobre rásť v podmienkach solného, teplotného aj osmotického stresu. Betaín a prolín sú osmoprotektanty poskytujúce mikroorganizmom odolnosť voči solnému stresu. Genóm SA187 obsahuje kompletnú dráhu biosyntézy prolínu. SA187 nedokáže syntetizovať betaín, jeho genóm však kóduje membránové transportéry zodpovedné za internalizáciu osmoprotektantov z vonkajšieho prostredia (Andrés-Barrao et al., 2017). V genóme SA187 sú aj všetky potrebné gény pre syntézu celulózy, ktorú baktérie využívajú na sprostredkovanie adhézie a kolonizácie koreňov rastlín (Andrés-Barrao et al., 2017; Römling a Galperin, 2015). Ďalej genóm SA187 kóduje gény pre syntézu enzýmov umožňujúcich transformáciu aminokyselín na polyamíny putrescín, spermin a spermidín látky. Polyamíny sú látky zlepšujúce kondíciu baktérií a produkujú ich viaceré PGPR vrátane *Klebsiella* sp. D5A alebo *Bacillus subtilis* OKB105 (Andrés-Barrao et al., 2017; Liu et al., 2016; Xie et al., 2014).

Pre *Enterobacter* sp. SA187 sú charakteristické viaceré vlastnosti PGPR. Dokáže solubilizovať zinok a produkovať siderofori, nie je však schopný solubilizácie fosfátu (Andrés-Barrao et al., 2017). Taktiež vie syntetizovať antibiotiká pôsobiace proti rastlinným patogénnym baktériám vrátane fenazínu a 4-hydroxybenzoátu. SA187 dokáže syntetizovať chitinázu (silný enzým proti hmyzu a hubám) a proteíny podieľajúce sa na rezistencii voči niekoľkým antimikrobiálnym zlúčeninám ako je vankomycín,  $\beta$ -laktám a kationový antimikrobiálny peptid (CAP). SA187 zvýšil výnos *M. sativa* v poľných podmienkach počas pôsobenia solného stresu, preto by mohol byť jednoduchým

biologickým riešením na pestovanie rastlín v extrémnych nepriaznivých podmienkach. U *Arabidopsis thaliana*, SA187 zvýšil toleranciu na soľný stres, sucho a vysoké teploty. Počas pôsobenia soľného stresu SA187 výrazne posilnil rast výhonkov a koreňov a taktiež viedol k zvýšenej hustote laterálnych koreňov a tým aj k zväčšeniu celkovej plochy povrchu koreňa *A. thaliana*. SA187 ďalej zvýšil odolnosť *A. thaliana* voči soľnému stresu znížením pomeru  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a produkciou bakteriálnej 2-keto-4-metyltiomaslovej kyseliny, ktorá spúšťa tvorbu etylénu a jeho signalizačnú dráhu (Andrés-Barrao et al., 2017; de Zélicourt et al., 2018).

SA187 kolonizuje rastliny endofyticky, ale aj epifyticky. Vie sa do koreňov rastlín dostávať pasívne cez miesta poškodenia, alebo je schopný aktívneho prenikania do koreňovej epidermis. To mu umožňuje produkcia pektináz a proteolýz ktoré degradujú komponenty bunkovej steny rastlín. SA187 prednostne kolonizuje primárne korene. Rovnako ako k miestam poškodenia je SA187 priťahovaný na miesta vzniku budúcich laterálnych koreňov, kde na pasívny vstup do vnútra koreňov využíva otvory v okolí vzniku laterálnych koreňov. Do tkanív rastlín vie SA187 vstupovať cez prieduchy, tým že ich dokáže aktívne otvárať po ich počiatočnom zatvorení. SA187 je priťahovaný už ku hydratovaným semenám rastlín *A. thaliana* a akumuluje sa na nich v oblasti miesta budúceho klíčenia koreňov. Po vyklíčení semena kolonizuje mladé korene *A. thaliana* (Synek et al., 2021).

*Enterobacter* takisto podporuje odolnosť rastlín voči soľnému stresu znížením aktivity signálnych dráh spúšťaných kyselinou abscisovou. Tým rastline umožní zatvoriť prieduchy v reakcii na osmotický stres a predísť tak nedostatku vody. Okrem toho pomáha zachovať fotosyntézu a primárny metabolizmus, ktoré bývajú pôsobením soľného stresu utlmené (de Zélicourt et al., 2018).

## 2.4 Abiotický stres

Rastliny, keďže majú prisadlý spôsob života, nedokážu opustiť svoje stanovište a uniknúť tak nepriaznivým podmienkam prostredia. Museli si preto vyvinúť receptory a vzájomne prepojené regulačné dráhy, ktoré im umožňujú prispôsobiť sa prostrediu. Medzi faktory pôsobiace stresovo na rastliny patrí sucho, chlad, vysoké teploty, UV žiarenie, nadmerné množstvo NaCl, extrémne svetelné podmienky a chemické faktory ako sú napríklad ťažké kovy (Suzuki et al., 2014). Abiotický stres ovplyvňuje výnos, rozmnožovanie a rast

rastlín (Sinha et al., 2011; Zhang et al., 2018). Odhaduje sa, že nepriaznivé podmienky prostredia spôsobujú až 70% strát na úrode (Vij a Tyagi, 2007; Zurbriggen et al., 2010).

Abiotický stres spôsobuje zmeny v bunkových procesoch, z ktorých niektoré patria medzi adaptívne a niektoré medzi neadaptívne procesy. Neadaptívne reakcie odrážajú poškodenie spôsobené stresom. Môže to byť napríklad narušenie kinetiky enzýmov a molekulárnych interakcií spôsobených toxickými iónmi, ale aj poškodenie štruktúry proteínov a fluidity membrán spôsobené stresom z vysokých alebo nízkych teplôt. Adaptívne reakcie vedú k zvýšenej odolnosti rastliny voči stresu. Tieto procesy zahŕňajú obnovenie rovnováhy bunkovej homeostázy, opravu poškodenia spôsobeného stresom a prispôbenie rastu na úrovne vhodné pre konkrétny stresový stav (Zhang et al., 2020; Zhu, 2016).

Abiotický stres vyvoláva viacúrovňové reakcie, iniciované v rôznych bunkových štruktúrach a kompartmentoch vrátane plazmatickej membrány, bunkovej steny, cytoplazmy, jadra, mitochondrií, chloroplastov, peroxizómov a endoplazmatického retikula. Medzi tieto reakcie patrí vnímanie stresu, prenos signálu, transkripcia, spracovanie transkriptu, translácia a napokon postranlačné modifikácie proteínov. K niektorým reakciám dochádza pri pôsobení viacerých stresorov (napríklad detoxikácia nadmerne akumulovaných reaktívnych foriem kyslíka (ROS)), iné sú špecifické pre určitý stres (Zhu, 2016).

#### 2.4.1 Soľný stres

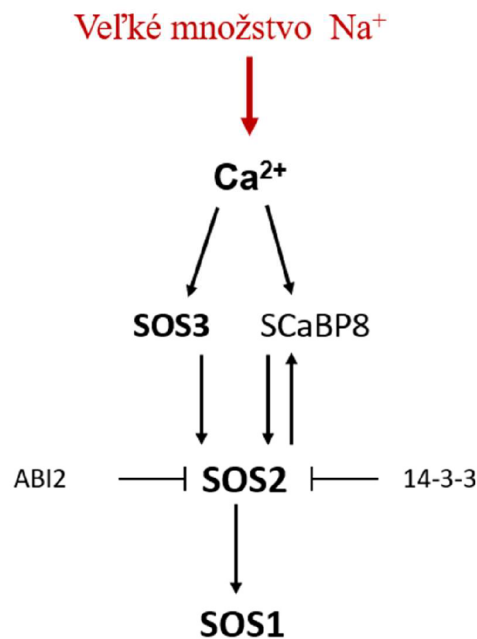
Soľný stres u rastlín nastáva, v dôsledku vysokej koncentrácie solí v pôde. Môže veľmi nepriaznivo pôsobiť na vývoj a rast rastlín a znižovať tak výnosy plodín. Preto predstavuje pre poľnohospodárstvo čoraz väčší problém. Vysoká salinita spôsobuje ako hyperiontový tak aj hyperosmotický stres. Za zvýšenie salinity pôdy môžu byť zodpovedné viaceré faktory, vrátane zvetrávania hornín, odlesňovania a vyparovania. Na salinite pôd sa podieľa aj zavlažovanie (voda používaná pri zavlažovaní obsahuje stopové množstvá NaCl) a morská voda (Flowers a Yeo, 1995; Mahajan a Tuteja, 2005; Tester a Danvepot, 2005; Yadav et al., 2011).

Halofyty sú rastliny používajúce špecializované stratégie, vďaka ktorým dokážu žiť v pôdach obsahujúcich vysoké koncentrácie solí (van Zelm et al., 2020). Väčšina suchozemských rastlín vrátane plodín ako ryža (*Oryza sativa*), kukurica (*Zea mays*), sója (*Glycine max*) a fazuľa (*Phaseolus vulgaris*) patrí medzi glykofyty. Sodík je pre ne



toxický, keďže nedokážu tolerovať koncentrácie  $\text{Na}^+$  presahujúce 50 mM (Munns a Tester, 2008). Vysoká koncentrácia  $\text{Na}^+$  v pôde môže viesť k zníženiu pórovitosti pôdy a následne k zníženiu vodivosti vody a prevzdušnenia pôdy. Prijatím veľkého množstva  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  koreňmi dochádza k zníženiu účinnosti fotosyntézy a zhoršeniu metabolických procesov. Okrem toho zvýšená koncentrácia solí v pôde vytvára zónu s nízkym vodným potenciálom, čo má u rastlín za následok zníženie schopnosti prijímať živiny a vodu (Flowers a Yeo, 1995; Mahajan a Tuteja, 2005; Mäser et al., 2002).

Rastliny sa voči salinite bránia mechanizmami na zmiernenie straty vody. Obrana rastlín proti salinite taktiež zahŕňa kompartmentalizáciu  $\text{Na}^+$  do vakuol cez  $\text{NHX1}$  tonoplastový antiportér a taktiež udržiavanie vysokých intracelulárnych pomerov  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  transportérmi HKT (Munns a Tester, 2008). Okrem toho rastliny aktívne vylučujú  $\text{Na}^+$  z buniek prostredníctvom  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportéru, salinity overly sensitive 1 (SOS1), nachádzajúceho sa na plazmatickej membráne. SOS1 antiportér je súčasťou proteínkinázovej dráhy závislej od vápnika, známej ako dráha SOS (Obr.1). Táto dráha sa podieľa na signalizácii soľného stresu a tolerancii  $\text{Na}^+$ . Na začiatku tejto dráhy je “EF-hand” proteín viažuci vápnik SOS3. Po vzniku cytosolického vápnikového signálu vyvolaného soľným stresom dochádza k spusteniu SOS3. Ten následne aktivuje serín/treonín proteínkinázu SOS2, ktorá fosforyláciou aktivuje SOS1. SOS3 je prednostne exprimovaný v koreni. Vo výhonkoch funkciu SOS3 zastáva jeho paralóg – proteín SCaBP8/CBL10. SOS2 je inhibovaný pomocou ABI2 (Quan et al., 2007; Zhu, 2002). 14-3-3 proteíny a SOS2-LIKE PROTEIN KINASE5 (PKS5) sprostredkujú ďalšiu dráhu, ktorá aktivuje SOS2. Za kontrolných podmienok môže PKS5 fosforylovať SOS2, potláčajúc SOS2 indukciou väzby s 14-3-3 proteínmi. Počas soľného stresu sa vápnik viaže na proteíny 14-3-3 a dochádza k potlačeniu aktivity PKS5 (van Zelm et al., 2020).



Obrázok 1. SOS dráha. Vysoká koncentrácia soli vedie k zvýšeniu koncentrácií  $\text{Ca}^{2+}$  v cytozole, tá aktivuje SOS3 / SCaBP8, ktorý následne aktivuje SOS2 a ten napokon aktivuje SOS1. SOS2 je inhibovaný proteínom ABI2 a 14-3-3 (Upravené podľa Ali et al., 2023)

Vysoká salinita narúša organizáciu bunkovej steny akumuláciou ROS a vytesňovaním vápenatých katiónov. Vápenaté katióny sú zodpovedné za zosieťovanie pektínov. Akumulácia ROS spôsobuje zosieťovanie fenolov a glykoproteínov, čo vedie k stuhnutiu bunkovej steny. U *A. thaliana* sa na snímaní porúch bunkovej steny vyvolaných vysokou salinitou podieľa modul LRX–RALF–FER (Zhang et al., 2022).

Hyperosmotická expozícia a salinita, okrem iných skorých signálnych udalostí, spôsobujú aktiváciu syntézy kyseliny fosfatidovej sprostredkovanej fosfolipázou D (PLD), tvorbu ROS, dočasné zvýšenie koncentrácií  $\text{Ca}^{2+}$  v cytozole a nahromadenie oxidu dusnatého (Smékalová et al., 2014). Títo sekundárny poslovia ďalej aktivujú rôzne signálne proteíny vrátane MAPK. Vysoké koncentrácie soli, kyselina abscisová a sucho indukujú v ryži aktiváciu DSM1 (mutant 1 hypersenzitívny na sucho) (Ning et al., 2010).

V *Arabidopsis* koncentrácie soli, vyvolávajúce hyperosmotickú reakciu, aktivujú MKKK20. MKKK20 sa nachádza pred MPK6 (Kim et al., 2012a). Počas solného stresu dochádza u *A. thaliana* k aktivácii MEKK1 (MAP3K), ktorý ďalej aktivuje MKK2 (MAP2K) jeho fosforylácia spúšťa aktiváciu MPK4 aj MPK6. MEKK1 má najskôr dva režimy signalizácie: jeden cez MKK2, ktorý prenáša fosfo-signal na MPK6 aj MPK4, a druhý cez MKK1, ktorý výhradne prenáša fosfo-signal na MPK4 (Matsuoka et al.,

2002; Teige et al., 2004). Nulové mutanty *mkk2* sú hypersenzitívne na soľ, čo naznačuje pozitívnu úlohu MKK2 v odpovedi na stres vyvolaný vysokou salinitou (Teige et al., 2004). Naopak, u *Arabidopsis* negatívnu úlohu v reakcii na soľ pravdepodobne zohráva MEKK1 a MKK9 (Su et al., 2007). MKK9 aktivuje MPK3 a MPK6 (Zhao a Guo, 2011). Knockout mutanty *mkk9* vykazujú zníženú citlivosť na soľ (Xu et al., 2008). Tri hlavné MPK, MPK3, MPK6 a MPK4, súvisiace so stresom u *Arabidopsis*, sú rozdielne aktivované salinitou a hyperosmotickým stresom (Smékalová et. al, 2014).

MPK6 hrá dôležitú úlohu ako v skorých tak aj dlhodobých odpovediach rastliny na soľný stres. Počas pôsobenia soľného stresu dochádza k zvýšeniu hladiny kyseliny fosfatidovej, ktorá stimuluje kinázovú aktivitu MPK6. Aktivovaná MPK6 sa následne podieľa na detoxikácii  $\text{Na}^+$  a fosforyláciou SOS1. To vedie k efluxu sodíka na úkor okyslenia cytozolu. Ďalej MPK6 fosforyluje transkripčný faktor ZAT6, a tak reguluje hyperosmoticky indukovanú transkripčnú transaktiváciu responzívnych génov (Yu et al., 2010; Liu et al., 2013).

#### 2.4.2 Teplotný stres

Rastliny sú často vystavené teplotám, ktoré sa líšia od ich optimálneho teplotného rozsahu. Zmeny teplôt môžu mať negatívny vplyv na úrodu keďže ovplyvňujú dozrievanie plodov, fyziológiu rastlín a reguláciu metabolizmu (Smékalová et. al, 2014; Theocharis et al., 2012). Teplotné výkyvy majú vplyv na fluiditu fosfolipidových membrán. Vysoké teploty zvyšujú fluiditu plazmatickej membrány, zatiaľ čo chlad vedie k zníženiu fluidity. Teplotné výkyvy taktiež ovplyvňujú sekundárnu štruktúru RNA a konformáciu proteínov (Mittler et al., 2012; Wang et al., 2003).

Mnohé rastliny, vrátane sóje (*G. max*), kukurice (*Z. mays*), bavlny (*Gossypium hirsutum*) a rajčiaka (*Lycopersicon esculentum*), sú citlivé na teploty pod 10 – 15 °C. Stres z nízkych teplôt môže mať za následok vädnutie, zníženú expanziu listov, chlorózu (žltnutie listov). Okrem toho môže brániť reprodukčnému vývoju rastlín a viesť k nekróze (Mahajan a Tuteja, 2005).

Stres z chladu je pravdepodobne vnímaný pomocou  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov umiestnených v plazmatickej membráne alebo regulátorov  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov. Napríklad cyklické nukleotidom riadené iónové kanály (CNGC) lokalizované v membráne môžu snímať zmeny fyzikálnych vlastností bunkových membrán. Mutantné rastliny so stratou funkcie v *OsCNGC140*, *OsCNGC9* a *OsCNGC16* boli menej tolerantné voči teplotnému stresu.

U týchto rastlín bolo takisto pozorované zhoršenie v  $\text{Ca}^{2+}$  signalizácii (Cui et al., 2020; Wang et al., 2021). U *A. thaliana*,  $\text{Ca}^{2+}$  transportér AtANN1 sprostredkuje chladom indukované výkyvy  $\text{Ca}^{2+}$ . Strata jeho funkcie vedie k zníženej tolerancii voči mrazu. U ryže sa na prechodnom zvýšení hladiny vápenatých kationov spôsobenom chladom podieľa proteín COLD1. Ako COLD1 tak aj AtANN1 dokážu priamo snímať chladom vyvolané zmeny v fluidite membránových lipidov (Liu et al., 2021; Ma et al., 2015).

Teplotný stres taktiež spôsobuje zmeny v stabilite proteínov. Môže tak byť zaznamenaný vo všetkých bunkových kompartmentoch. U *A. thaliana* počas stresu z nízkych teplôt dochádza k akumulácii CBF transkripčných faktorov, ktoré interagujú s fytochróm-interagujúcim proteínom PIF3. To vedie k stabilizácii termosenzora phyB. Stabilizovaný phyB následne podporuje toleranciu voči mrazu riadením expresie génov súvisiacich s rastom a génov reagujúcich na chlad (Jiang et al., 2020). Termosenzor phyB hrá úlohu aj v reakciách na vysoké teploty. Pri nich prechádza phyB z aktívneho do neaktívneho stavu. Následne dochádza k uvoľneniu phyB-sprostredkovanej inhibície transkripčného faktora PIF4, čo vedie k termomorfogenéze (Casal a Balasubramanian, 2019; Jung et al., 2016; Legris et al., 2016).

Tepelný stres môže spôsobovať denaturáciu proteínov. Pri normálnych teplotách špecifické proteíny tepelného šoku HSP bránia zvyšovaniu transkripcie rôznych génov kódujúcich HSP a aktivácii expresie génov reagujúcich na teplo väzbou na transkripčné faktory tepelného stresu (HSF). Avšak pri vysokých teplotách dochádza k hromadeniu nesprávne poskladaných proteínov. Tie sa následne viažu na HSP, pričom uvoľňujú HSF, ktoré následne spúšťajú reakcie na tepelný stres (Scharf et al., 2012). Takisto varianta histónu H2A.Z u *A. thaliana*, reaguje na zmeny teploty. Zvýšené teploty pravdepodobne vedú k disociácii H2A.Z od nukleozómov, čo zvyšuje dostupnosť DNA pre RNA polymerázu Pol II. Vďaka tomu dochádza k zvýšenej transkripcii génov kódujúcich HSP a iných génov reagujúcich na teplo (Kumar et al., 2010).

Myc-podobný transkripčný faktor známy ako induktor expresie CBF 1 (ICE1), C-repeat väzbové faktory (CBF/DREB) a myb-podobný transkripčný faktor SNOW1, ktorý interaguje s ICE1 pri regulácii expresie CBF/DREB, sú významnými efektormi chladom indukovanej regulácie transkripcie. Export mRNA, zostrih pre-mRNA, a degradácia mRNA sú niektoré z posttranskripčných procesov, ktoré sú ovplyvnené stresom z chladu (Smékalová et al., 2014).

Úlohu v reakciách na chlad zohrávajú aj MAPK. Medzi MAPK, ktoré sa podieľajú na reakciách na soľný stres patrí MPK6 a MPK4. U *A. thaliana* aktivita MPK6 dosahuje

vrchol do 10 minút od zníženia teploty a aktivita MPK4 dosahuje vrchol 60 minút po znížení teploty. MPK6 sa podieľa aj na strese spôsobenom vysokými teplotami. MPK6 fosforyluje hlavný transkripčný faktor tepelného stresu, HsfA2. K fosforylácii dochádza na zvyšku T249 a táto fosforylácia je zodpovedná za nukleo-cytoplazmatický prenos HsfA2 (Evrard et al., 2013).

### 2.4.3 Stres zo sucha

Dezertifikácia pôd a globálne zvyšovanie teplôt vedie v niektorých oblastiach k zníženiu potenciálu vody v pôde. Väčšina rastlín je náchylná na suchu, čo má za následok zníženie výnosu plodín. Sucho má negatívny dopad na bunkové membrány a proteíny. Vysušenie membrány spôsobí narušenie normálnej dvojvrstvovej štruktúry. Membrána sa tak stáva veľmi poréznu. Vytiesnenie membránových proteínov spôsobené stresom v lipidovej dvojvrstve prispieva k strate selektivity, integrity membrány, zníženej enzýmovej aktivite a narušeniu bunkovej kompartmentalizácie. Dehydratácia môže viesť k zníženej aktivite alebo dokonca úplnej denaturácii organelových a cytosolických proteínov. Dehydratácia protoplazmy je príčinou vysokej koncentrácie bunkových elektrolytov. Tie môžu interferovať s bunkovým metabolizmom (Mahajan a Tuteja, 2005).

Sucho má na rastliny aj fyziologické účinky, ako je pokles rastu výhonkov a vegetatívneho rastu vo všeobecnosti. V podmienkach nedostatku vody znížená aktivita cyklín-dependentnej kinázy inhibuje rast a spomaľuje delenie buniek. Vo všeobecnosti je rast koreňov menej citlivý ako rast výhonkov. V podmienkach nedostatku vody je pre rastliny výhodné znížiť expanziu listov a tak aj transpiráciu. Z toho dôvodu mnohé dospelé rastliny vystavené suchu reagujú zrýchlením procesu starnutia a opadávaním starších listov. Príkladom takejto rastliny je bavlna. Rastliny dokážu zosilniť rast koreňov, čo im pomáha extrahovať vodu z hlbších vrstiev pôdy (Mahajan a Tuteja, 2005).

Výsledkom stresu zo sucha sú početné bunkové zmeny, vrátane produkcie molekulárných chaperónov, zmien v úrovniach expresie génov typu dehydrín alebo late embryogenesis abundant (LEA) ako aj odstraňovania denaturovaných a poškodených proteínov proteínázami. Týmto stresom sa aktivujú aj enzýmy, ktoré sa podieľajú na tvorbe a odstraňovaní ROS. Okrem toho dochádza k produkcii kyseliny fosfatidovej sprostredkovej PLD (Bargmann et al., 2009; Hong et al., 2010; Choudhury et al., 2013; Mahajan a Tuteja, 2005; Yao et al., 2013).

Dlhodobé reakcie rastlín na stres zo sucha zvyčajne zahŕňajú prestavbu gémovej expresie. Tieto procesy sú sprostredkované transkripčnými faktormi, ktoré sú transkripčne a posttranslačne regulované. Medzi tieto transkripčné faktory patria základné faktory leucínového zipsu a WRKY (Shen et al., 2012; Tang et al., 2012). Signalizácia MAPK riadi skoré až strednodobé reakcie rastlín na nízku dostupnosť vody, ako aj transkripčnú transaktiváciu spôsobenú suchom (Sinha et al., 2011).

MPK9 a MPK12 sú primárne zodpovedné za kontrolu stomatálnych pohybov spôsobených stresom zo sucha. Tieto MAPK sú spúšťané zvýšenými hladinami kyseliny abscisovej (ABA). Ukázalo sa, že tieto MAPK sú prednostne exprimované v zatváracích bunkách prieduchov (Jammes et al., 2009; Jammes et al., 2011, Salam et al., 2012, Salam et al., 2013). Ďalšou MAPK u *Arabidopsis*, ktorá sa aktivuje za sucha, je MPK6. Na rozdiel od MPK12 a MPK9 nie je MPK6 spúšťaná vysokými hladinami ABA, ale je spúšťaná akumuláciou kyseliny fosfatidovej (PA) a ROS (Tsugama et al., 2012; Yu et al., 2010). Pozitívny vplyv na zvládanie stresu zo sucha má aj MKK4 a jej následný cieľ MPK3 (Kim et al., 2011). Sucho v poľnohospodársky dôležitých rastlinách aktivuje rôzne MAPK, ako napríklad GhMPK16 a GhMPK2 v bavle, OsMPK3, 4, 7, 14, 20-4 a 20-5 v ryži, ZmMPK3 v kukurici (Smékalová et al., 2014).

#### 2.4.4 Oxidatívny stres

ROS sú častými vedľajšími produktmi metabolizmu kyslíka. Medzi ROS patria voľné radikály (napr. superoxidový, kyselina dusičná, hydroxylový) alebo neradikálové formy (napr. peroxid vodíka). ROS hrajú významnú úlohu v bunkovej signalizácii a homeostáze a sú silne zapojené do signalizácie MAPK. Patogénne invázie ale aj abiotické stresy ako vodný stres, genotoxické ožiarenie, sucho a extrémne teploty môžu spôsobiť ich produkciu (O'Brien et al., 2012; Suzuki et al., 2012). Nadmerné hromadenie ROS je však škodlivé. Antioxidačné enzýmy ako superoxidodismutáza (SOD) a kataláza rýchlo neutralizujú ROS generované metabolizmom kyslíka a tým zabraňujú hromadeniu škodlivých hladín H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gill a Tuteja, 2010).

Zvýšené hladiny ROS v *Arabidopsis* indukujú transkripciu OX11 (oxidative signal-inducible 1), ktorý kóduje serín/treonín kinázu. Proteín OX11 má celý rad funkcií vrátane udržiavania normálneho rastu koreňových vláskov v stresových podmienkach. Aktivácia OX11 je potrebná pre úplnú aktiváciu MPK6 aj MPK3.

Oxidatívnym stresom je u *Arabidopsis* spúšťaná MAPK fosfatáza 2 (MKP2). MKP2 je lokalizovaná prevažne v jadre. MKP2 podporuje toleranciu oxidatívneho stresu defosforyláciou MPK6 a MPK3 (Lee a Ellis, 2007).

#### 2.4.5 Ťažké kovy

Ťažké kovy sú prvky s vysokou atómovou hmotnosťou a hustotou aspoň 5x väčšou ako je hustota vody. Ťažké kovy sú prirodzenou súčasťou životného prostredia. No kvôli rôznym antropogénnym aktivitám dochádza k nadmernému zvyšovaniu ich koncentrácie (Tchounwou et al., 2012).

Niektoré ťažké kovy sú nevyhnutné pre rast rastlín. Napríklad zinok je nevyhnutnou katalytickou a štruktúrnou zložkou hydrolytických enzýmov a proteínov viažucich DNA. Nadmerné množstvo ťažkých kovov je však pre rastliny, ale aj iné organizmy škodlivé. Medzi najtoxickejšie ťažké kovy patrí olovo, ortuť, chróm, kadmium a arzén (Clemens et al., 2002; Tchounwou et al., 2012). K hromadeniu ťažkých kovov v poľnohospodárskych pôdach dochádza hlavne kvôli dlhodobej aplikácii komunálnych splaškových kalov, používaniu agrochemikálií, spaľovaniu odpadu, likvidácii priemyselného odpadu a výfukovým plynom z vozidiel (Mishra et al., 2017).

Ťažké kovy môžu priamo aj nepriamo ovplyvňovať zdravie rastlín. Priamo ťažké kovy vplývajú na rastliny poškodením bunkových štruktúr v dôsledku indukcie oxidatívneho stresu a taktiež inhibíciou cytoplazmatických enzýmov (Jadia a Fulekar, 2009). K vzniku oxidatívneho stresu pôsobením niektorých ťažkých kovov môže dôjsť aj nepriamo inhibíciou antioxidantných enzýmov, indukciou enzýmov produkujúcich ROS, depléciou glutatiónu či väzbou na sulfhydrylové skupiny proteínov (Bielen et al., 2013; Valko et al., 2005).

Stres z ťažkých kovov spúšťa v rastlinách niekoľko rôznych signálnych dráh. Medzi signálne dráhy iniciované stresom z ťažkých kovov patria aj MAPK kaskády. U rastlín *Broussonetia papyrifera* došlo po 3 hodinách pôsobenia stresu z kadmia (Cd) k zníženiu transkripcie MAPK, no po 6 hodinách bola u rastlín pozorovaná upregulácia MAPK transkriptov. U rastlín paradajky viedla nadmerná expresia SIMAPK3 k zvýšenej tolerancii rastlín na Cd. Transgénne rastliny nadmerne exprimujúce SIMAPK3 vykazovali zvýšenú koreňovú aktivitu, zvýšené hladiny chlorofylu v listoch a nahromadenie koreňovej biomasy (Li et al., 2022).

Pri vystavení semenáčikov *M. sativa* zvýšeným koncentráciám kadmia a medi došlo k aktivácii 4 rôznych MAPK vrátane stresom indukovanej MAPK (SIMK), stresom aktivovanej MAPK (SAMK), MMK3 a MMK2. K aktivácii SIMK, MMK3, MMK2 a SAMK iónmi kadmia dochádza po dlhšej dobe ako k aktivácii MAPK iónmi medi. V protoplastoch SIMKK špecificky sprostredkovala aktiváciu SAMK a SIMK. Navyše SIMKK aktivovala MAPK iba po aplikácii  $\text{CuCl}_2$ , ale nie pri vystavení rastlín  $\text{CdCl}_2$  (Jonak et al., 2004).

V koreňoch kukurice došlo pôsobením stresu z kadmia k ROS sprostredkovanej aktivácii *ZmMPK6-1* a *ZmMPK3-1* (Liu et al., 2019). Ošetrovanie ryže arzénom indukovalo transkripciu *OsMPK4* a *OsMPK3* v koreňoch a transkripciu *OsMPK3* v listoch. Taktiež došlo k indukcii transkripcie *OsMCK4* ako v koreňoch tak aj v listoch (Rao et al., 2011). U *A. thaliana* stres z kadmia indukuje akumuláciu ROS, ktoré následne sprostredkovávajú aktiváciu MPK4, MPK3 a MPK6 (Liu et al., 2010; Smékalová et al., 2014). Vystavenie rastlín vysokým koncentráciám kadmia taktiež spôsobuje zvýšenú expresiu transkripčných faktorov WRKY 25, WRKY22 a WRKY29 (Opdenakker et al., 2012; Smeets et al., 2013).

## 2.5 Úloha PGPR počas pôsobenia abiotického stresu

PGPR dokážu rôznymi spôsobmi pomôcť rastlinám prekonať abiotické stresy. Majú schopnosť biologicky transformovať nutričné prvky z nedostupného stavu na dostupný (Ma et al., 2011). Početné prírodné faktory vrátane typu a vlastností pôdy, abiotického stresu (ako je slanosť a sucho) a kontaminácie kovmi majú významný vplyv na ich výkonnosť. *Pseudomonas alcaligenes* PsA15, *Bacillus polymyxa* BcP26 a *Micobacterium phlei* MbP18 odolné voči vysokým koncentráciám solí a teplotám pomohli prosperovať *Z. mays* v suchých a slaných pôdach. Toto zlepšenie rastu bolo spôsobené stimulačnými účinkami PGPR na príjem fosforu, dusíka a draslíka rastlinami vo vápenatej pôde s nedostatkom živín (Egamberdiyeva et al., 2007).

Počas pôsobenia solného stresu dochádza k inhibícii rastu rastlín v dôsledku zvýšenej koncentrácie  $\text{Na}^+$  a nízkeho pomeru  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  v rastlinách. Niektoré PGPR bránia nadmernej akumulácii  $\text{Na}^+$  a udržiavajú tak homeostázu iónov počas solného stresu (Bharti et al., 2014). Inokulácia rastlín *Lactuca sativa* baktériou *Pseudomonas mendocina* viedla k zmierneniu negatívnych účinkov solného stresu zvýšením príjmu  $\text{K}^+$  a znížením príjmu  $\text{Na}^+$ . To malo za následok vyšší pomer  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Kohler et al., 2009).



Mikróby vylučujú extracelulárne polymérne látky, ktoré napomáhajú pri odstraňovaní kovov z rizosféry prostredníctvom biosorpcie. Medzi tieto látky patria napríklad lipopolysacharidy, glykoproteíny a polysacharidy. Tieto látky obsahujú množstvo aniónových funkčných skupín a ich produkcia v reakcii na expozíciu ťažkými kovmi indukuje tvorbu biofilmu. Ten tvorí ochranný obal a taktiež vedie k transformácii toxických kovových iónov na netoxické formy po adsorpcii (Ayangbenro a Babalola, 2017; Gupta a Diwan, 2017). PGPR tiež produkujú siderofory, ktoré znižujú dostupnosť kovových iónov a tým bránia toxickému hromadeniu kovov v pôde (Dimkpa et al., 2009).

Počas pôsobenia abiotických stresov dochádza v rastlinách k biosyntéze hormónu etylénu. Nadmerné množstvo etylénu má za následok zníženie proliferácie koreňov a potlačenie rastu rastlín. Niektoré PGPR produkujú enzým 1-aminocyklopropán-1-karboxylát (ACC) deaminázu a vďaka nemu dokážu znižovať nadmerné množstvo etylénu u rastlín. ACC deamináza hydrolyzuje rastlinný ACC na amoniak a  $\alpha$ -ketobutyrate, čím obmedzuje dostupnosť substrátu na výrobu etylénu. Medzi PGPR produkujúce ACC deaminázu patrí napríklad *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas oryzae* a *Pseudomonas stutzeri*. Aplikácia PGPR produkujúcich ACC deaminázu zlepšila napríklad rast pšenice, ryže a repky počas pôsobenia soľného stresu, rast rastlín *Rumex palustris* počas záplav, ako aj rast ryže počas pôsobenia stresu vyvolaného ťažkými kovmi (Mellidou a Karamanoli, 2022; Mishra et al., 2017; Ravanbakhsh et al., 2017). Taktiež aplikácia *Achromobacter piechaudii* viedla k výraznému zvýšeniu čerstvej hmotnosti a hmotnosti sušiny paradajky počas pôsobenia soľného stresu (Mayak et al., 2004).

PGPR sú schopné ovplyvňovať expresiu génov zapojených do odpovedi na abiotické stresy. Napríklad aplikácia baktérie *Pseudomonas putida* MTCC5279 zlepšila rast rastlín cíceru (*Cicer arietinum*) počas pôsobenia soľného stresu. U inokulovaných rastlín boli pozorované zmeny v expresii génov zapojených do biosyntézy kyseliny salicylovej, etylénu, aktivácie transkripcie jasmonátu (MYC2), CAT, SOD, DREB1A, NAC1 (transkripčné faktory exprimované pri abiotickom strese), DHN (dehydríny) a LEA (Tiwari et al., 2016). Taktiež aplikácia *B. subtilis* na rastliny *A. thaliana* viedla k pletivo špecifickým zmenám v expresii génu iónového transportéra HKT1 (Vysoko affinitný  $K^+$  transportér), čo malo za následok nižšiu akumuláciu  $Na^+$  v celej rastline (Zhang et al., 2008).

Zníženie negatívneho vplyvu stresu z nízkych teplôt bolo pozorované po aplikácii *Burkholderia phytofirmans* na rastliny viniča (*Vitis vinifera*) ale aj po aplikácii

*Pseudomonas vancouverensis* OB155 a *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 na rastliny rajčiaka (*Solanum lycopersicum*). Inokulácia *B. phytofirmans* viedla k zníženiu poškodenia viniča moduláciou metabolizmu uhl'ohydrátov. U *S. lycopersicum* bola po naočkovaní pozorovaná zvýšená expresia génov aklimatizácie na chlad a antioxidačná aktivita v pletivách listov (Fernandez et al., 2012; Subramanian et al., 2015).

Aplikácia halotolerantnej baktérie *Bacillus mesonae* H20-5 zlepšila zdravie rastlín paradajky počas pôsobenia soľného stresu. Rastliny ošetrované *B. mesonae* H20-5 akumulovali viac antioxidačných enzýmových,  $Ca^{2+}$ , prolínu a ABA ako neošetrované rastliny. U týchto rastlín bol taktiež pozorovaný nižší únik elektrolytov (Yoo et al., 2019).

Medzi mechanizmy, ktorými PGPR pomáhajú rastlinám prekonať abiotické stresy patrí mimo iné aj syntéza hormónov ako kyselina abscisová (ABA), kyselina indolactová (IAA), giberelíny a cytokiníny (Mellidou a Karamanoli, 2022). ABA sa u rastlín podieľa na zatváraní prieduchov. Ošetrovanie rastlín baktériami produkujúcimi ABA môže zvýšiť toleranciu rastlín voči suchu indukciou uzavretia prieduchov a znížením rýchlosti transpirácie listov (Aloo et al., 2012). Naočkovanie rastlín ryže *B. amyloliquefaciens*, ktorý tvorí ABA zvýšilo toleranciu rastlín voči slanosti (Shahzad et al., 2017). Zvýšením obsahu ABA zvýšila PGPB *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 schopnosť *A. thaliana* odolávať osmotickému stresu. Výsledkom vyššej koncentrácie ABA v listoch naočkovaných rastlín bolo uzavretie prieduchov, ktoré viedlo k zníženiu rýchlosti transpirácie (Bresson et al., 2013). Podobný výsledok bol pozorovaný po inokulácii rastlín kukurice baktériou *Azospirillum lipoferum*. Inokulované rastliny boli odolnejšie voči stresu zo sucha a boli u nich nájdené zvýšené hladiny ABA a giberelínov (Cohen et al., 2009). Taktiež u sadenic *Platycladus orientalis* došlo k zvýšeniu obsahu ABA a k zvýšeniu tolerancie voči suchu po inokulácii PGPB *B. subtilis* (Liu et al., 2013). ABA je tvorená *B. licheniformis*, *Achromobacter xylooxidans*, *Azospirillum brasiliense* a *B. pumilus* (Mellidou a Karamanoli, 2022).

IAA u rastlín podporuje bunkovú proliferáciu, diferenciáciu a noduláciu koreňov (Aloo et al., 2023). PGPR produkujúce IAA stimulujú rast a výnos plodín v podmienkach stresu spôsobeného ťažkými kovmi, salinitou ale aj nedostatkom vody (Mellidou a Karamanoli, 2022). Napríklad inokulácia rastlín *Brassica juncea* baktériou *B. subtilis* SJ-101 produkujúcou IAA viedla k stimulácii rastu v pôde kontaminovanej Ni (Zaidi et al., 2006). Podobne rast a vývoj *Triticum aestivum*, ako aj koncentrácia P, N, Mn a Fe v rastlinných výhonkoch v normálnej a zasolenej pôde sa významne zvýšili inokuláciou IAA produkujúcou baktériou *Streptomyces* (Sadeghi et al. 2012). IAA je tvorená

baktériami *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Sinorhizobium* a *Rhizobium* (Shah et al., 2021).

Giberelíny u rastlín ovplyvňujú rast a diferenciáciu orgánov (Hedden, 2020). Giberelíny dokážu produkovať epifytické a rizosférické baktérie patriace do rodov *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Rhizobium* a *Clostridium* (Tsavkelova et al., 2006). Rizobaktéria vylučujúca gibberelín, *Pseudomonas putida* H-2-3, zlepšila rast rastlín sóje v podmienkach stresu zo sucha a salinity (Kang et al., 2014; Mellidou a Karamanoli, 2022). Taktiež bolo pozorované zlepšenie rastu papriky (*Capsicum annum*) v podmienkach stresu z nízkych teplôt po aplikácii giberelín produkujúcej PGPR *Serratia nematodiphila*. Rastliny naočkované *S. nematodiphila* obsahovali menej kyseliny jasmonovej a salicilovej a viac ABA a giberelovej kyseliny (Kang et al., 2015).

Cytokiníny hrajú kľúčovú úlohu pri vývoji a raste rastlín. Regulujú fyziologické procesy podieľajúce sa napríklad na delení buniek, produkcii kvetov a plodov, apikálnej dominancii či raste koreňov a výhonkov. Syntéza cytokinínov bola zaznamenaná u PGPR ako *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* a *Pseudomonas* (Shah et al., 2021). PGPR-indukované zvýšenie hladín cytokinínov pomohlo tolerovať suchu u rastlín pšenice, paradajky a lucerny (Mekureyaw et al., 2022; Xu et al., 2012; Zaheer et al., 2022). Taktiež naočkovanie rastlín *Platycladus orientalis* baktériou *B. subtilis* viedlo k stimulácii rastu koreňov a zníženiu negatívnych účinkov sucha (Liu et al., 2013).

Štrukturálne a fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy môžu byť zmenené komplexnými dynamickými interakciami, ktoré sa vyskytujú v rizosfére medzi koreňmi rastlín, mikróbmami a pôdou (Ma et al., 2016). Pôdne mikroorganizmy produkujú extracelulárne polysacharidy (EPS), ktoré môžu viazať pôdne častice a vytvárať mikro a/alebo makroagregáty. Baktérie, hýfy húb a korene rastlín, zapadajú do pórov medzi mikroagregáty a podieľajú sa tak na stabilizácii makroagregátov (Naseem et al., 2018). EPS produkované baktériami môžu optimalizovať štruktúru pôdy a zvyšovať tak odolnosť rastlín voči stresu zo slanosti a suchu (Naseem et al., 2018; Sandhya et al., 2009). Navyše sa EPS môžu viazať na katióny (napr. Na<sup>+</sup>) a brániť tak v ich absorpcii v zasolených pôdach (Bano a Fatima, 2009). Napríklad EPS produkované PGPB zlepšili obsah pôdnej vlhkosti, čo viedlo k zlepšeniu tolerance sucha a k lepšiemu rastu rastlín pšenice (Khan a Bano 2019). Taktiež koinokulácia s *Pseudomonas* a *Rhizobium* znížila u rastlín *Z. mays* únik elektrolytov, zvýšila syntézu prolínu a viedla k zachovaniu

relatívneho obsahu vody v listoch a selektívnej absorpcii  $K^+$ , čo v konečnom dôsledku zlepšilo schopnosť *Z. mays* odolávať soľnému stresu (Bano a Fatima, 2009).

Abiotický stres vyvoláva nadprodukciiu ROS, čo spôsobuje zníženú fluiditu membrán, inaktiváciu membránovo viazaných proteínov, inhibíciu syntézy proteínov a enzymatickej aktivity a poškodenie DNA. Niektoré PGPR môžu pomôcť rastlinám prekonať abiotické stresy manipuláciou antioxidantných enzýmov. Napríklad aplikácia endofytickej baktérie *Pseudomonas azotoformans* ASS1 stimulovala aktivitu SOD a CAT u rastlín *Trifolium arvense* počas stresu spôsobeného ťažkými kovmi a suchom (Ma et al., 2017).

Počas pôsobenia stresu spôsobeného suchom alebo vysokou salinitou môžu niektoré PGPR napomáhať rastu rastlín produkciou osmolytov ako je trehalóza, prolín, či polyamíny (Paul et al., 2008). Prolín má schopnosť v podmienkach salinity a sucha, stabilizovať proteíny a membrány a priamo zachytávať reaktívne formy kyslíka (ROS) čím upravuje kyslosť cytozolu a znižuje peroxidáciu lipidov (Gill a Tuteja, 2010). Vo viacerých prípadoch bolo pozorované zvýšenie množstva prolínu u rastlín vystavených abiotickému stresu, ktoré boli naočkované PGPR. Napríklad u rastlín *Mentha arvensis* vystavených soľnému stresu bolo pozorované zvýšené množstvo prolínu po aplikácii PGPR (Bharti et al., 2014). Stále však nie je jasné, či je to kvôli zvýšenej regulácii dráhy biosyntézy prolínu alebo preto, že sa prolín absorbuje z rizosférických pôd (Ma et al., 2020).

## 2.6 Cytoskelet rastlín

Rastlinný cytoskelet je vysoko dynamická štruktúra. Podieľa sa na mnohých fyziologických procesoch, vrátane transportu proteínov a vezikúl, delení buniek a pohybu organel. Medzi jeho funkcie patrí aj regulácia tolerance rastlín voči abiotickým a biotickým stresom, udržiavanie bunkovej morfológie a ochrana voči mechanickému stresu (He et al., 2020; Li a Staiger, 2018; Wang et al., 2021).

Cytoskelet je rozmiestnený vnútri celej bunky a je spojený s organelami, jadrovou a cytoplazmatickou membránou. Cytoskelet sa skladá z mikrofilamentov (MF) a mikrotubúl (MT). Každé z týchto troch typov vlákien má na starosti rôzne aspekty mechanických vlastností a priestorovej organizácie bunky. Mikrotubuly riadia vnútrobunkový transport a určujú polohu membránou uzavretých organel (plastidy, jadro, mitochondrie). Navyše tvoria mitotické vretienko, ktorého funkciou je oddeľovanie

chromozómov počas delenia. Aktínové vlákna sú nevyhnutné pre pohyb celej bunky a tvarujú povrch bunky. Sú zodpovedné za rozdelenie bunky počas bunkového delenia. Aktínové vlákna môžeme taktiež nájsť v plazmodezmatoch, kde sa podieľajú na intracelulárnom prenose proteínov a iných molekúl (Kost et Chua, 2002).

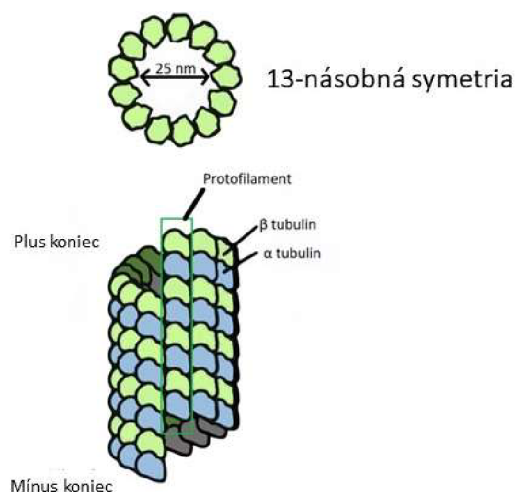
### 2.6.1 Mikrotubuly

Takmer všetky eukaryotické bunky obsahujú MT. Mikrotubuly spolupracujú s inými proteínmi pri vytváraní základných štruktúr, ako je napríklad centriola, bičíky u živočíšnych buniek a deliace vretienko rastlinných aj živočíšnych buniek. MT sú nevyhnutné pre bunkové delenie, bunkový cyklus, udržiavanie bunkovej morfológie, prenos informácií, prenos signálu, vnútrobunkový transport materiálu a ďalšie procesy. Dynamické vlastnosti MT zahŕňajú delenie, nukleáciu, viazanie, polymerizáciu a depolymerizáciu (Martinez et al., 2019; Yue et al., 2014).

Mikrotubuly sú duté 25 nm veľké tubulárne štruktúry zvyčajne zložené z 13 profilamentov (Obr. 2). Profilamenty sú tvorené z jednotiek alfa-tubulínu a beta-tubulínu. Každý monomér je tvorený jadrom dvoch  $\beta$ -listov obklopených  $\alpha$ -helixami a kyslým C-koncom (Margolin et al., 2012). Alfa-tubulíny sa spájajú s beta-tubulínmi za vzniku diméru. Aminokyselínová sekvencia alfa a beta tubulínu je zo 40% zhodná (Nogales et al., 1998).

Obidve formy tubulínu existujú vo viacerých izoformách, ktoré sú u *Arabidopsis* nepretržite exprimované v priebehu vývoja. Výnimkou sú proteíny TUB9 a TUA1, ktoré sú exprimované prevažne v reprodukčných orgánoch. Navyše u *A. thaliana* je známych šesť izoform  $\alpha$ -tubulínu (označené AtTUA1-AtTUA6) a deväť izoform  $\beta$ -tubulínu (označené AtTUB1-AtTUB9). Okrem toho genóm *A. thaliana* kóduje dve izofornie  $\gamma$ -tubulínu (Komis et al., 2015).

Tubulíny, ktoré prešli rôznymi posttranslačnými modifikáciami, môžu tvoriť rôzne podtypy MT (Janke and Bulinski, 2011). Medzi hlavné postranlačné modifikácie tubulínu u rastlín patrí acetylácia  $\alpha$ -tubulínu, karboxyterminálna tyrozinácia a fosforylácia  $\alpha$ -tubulínu. Okrem toho môže byť  $\alpha$ -tubulín počas normálnej signalizácie oxidu dusnatého alebo v podmienkach nitrozatívneho stresu špecificky zacielený reaktívnymi druhmi dusíka (Komis et al., 2015).

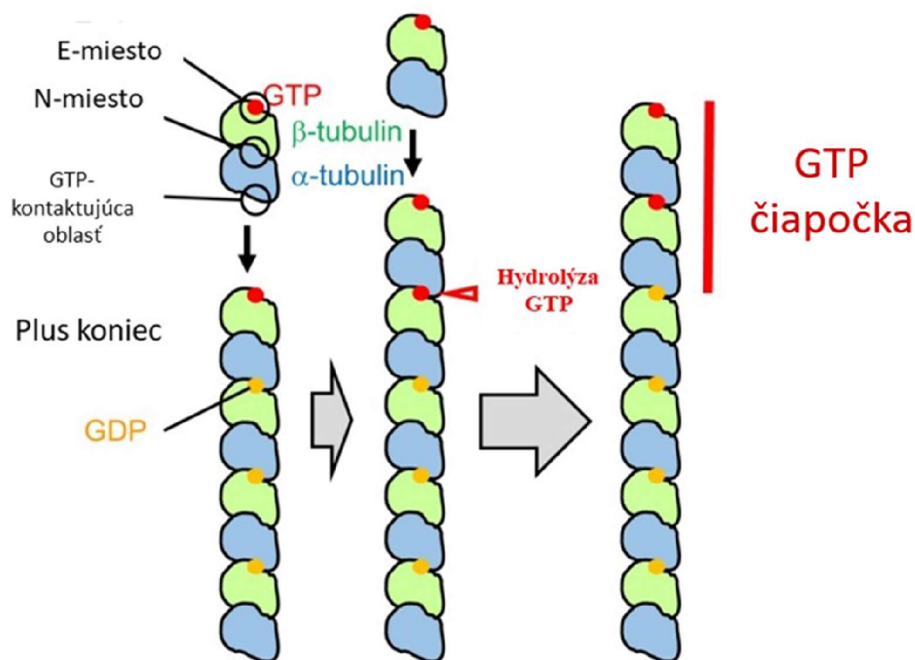


Obrázok 2. Štruktúra mikrotubulov (upravené podľa Hashimoto, 2015).

Na mikrotubulovom vlákne rozlišujeme plus a mínus koniec. Koniec s exponovaným  $\beta$ -tubulínom je plus koniec, zatiaľ čo mínus koniec je tvorený  $\alpha$ -tubulínom. Ako  $\alpha$ -tubulín tak aj  $\beta$ -tubulín viaže GTP. Tubulínové heterodiméry sú prednostne pridávané na plus koniec. Pri kontakte alfa-tubulínu nového heterodiméru s existujúcim vláknom MT dochádza k hydrolýze GTP viazaného na  $\beta$ -tubulín na exponovanom plus konci MT. Hydrolýza GTP na GDP nie je tak rýchla ako prikladanie nových heterodimérov. Z toho dôvodu na plus konci vzniká GTP čiapočka, ktorá pomáha rastu mikrotubulov vďaka silným laterálnym interakciám medzi jednotkami GTP (Hashimoto, 2015; Margolin et al., 2012).

Hydrolýzou GTP-čiapky dochádza k odhaleniu labilnej vnútornej kostry s GDP-tubulínom a následnej depolymerizácii. Po obnovení GTP-čiapky však môže fáza depolymerizácie opäť prejsť do fázy polymerizácie. Depolymerizácia MT môže byť navodená pomocou propyzamidu alebo oryzalínu. Naopak na stabilizáciu mikrotubulov môže byť použitý taxol (Margolin et al., 2012).

Prefoldíny sú nevyhnutné pre podporu správneho skladania  $\alpha$ - aj  $\beta$ -tubulínu v podmienkach solného stresu a taktiež uľahčujú skladanie vznikajúcich tubulínových polypeptidových reťazcov. (Gu et al., 2008, Locascio et al., 2013; Rodríguez-Milla a Salinas, 2009).



Obrázok 3. Rast mikrotubulov (upravené podľa Hashimoto, 2015).

Mikrotubuly interagujú s mnohými asociovanými proteínmi (MAP, microtubule associated proteins). K rastlinným MAP patria proteíny viažuce sa na plus koniec mikrotubulov, motorové proteíny, zosieťovače mikrotubulov, regulátory zostavovania/dynamiky mikrotubulov a regulátory skladania tubulínu (Gardiner, 2013; Gu et al., 2008; Rodriguez-Milla a Salinas, 2009).

Medzi mikrotubulárne zosieťovače patria proteíny rodiny MAP65 a proteíny rodiny MAP70. U *A. thaliana* existuje 9 členov patriacich do rodiny MAP65 (AtMAP65-1 až AtMAP65-9) a 5 členov patriacich do rodiny MAP70. MAP65-1 a MAP65-2 sú intracelulárne lokalizované na rovnakých miestach a vykazujú rovnaké vzory pletivovej expresie (Lucas a Shaw, 2012). Iní členovia rodiny MAP65 vykazujú lokalizáciu závislú na bunkovom cykle (Komis et al., 2015).

Proteíny viažuce sa na koniec mikrotubulov (EB) ovplyvňujú dynamiku mikrotubulov (Van Damme et al., 2004). *A. thaliana* exprimuje tri gény EB1 (EB1a, EB1b a EB1c; Chan et al., 2003). EB1a vykazuje vysokú homológiu s EB1b. Tieto dva proteíny sú funkčne redundantné počas celého rastlinného bunkového cyklu (Chan et al., 2005). Pôsobenie solného stresu môže viesť k reorganizácii mikrotubulov. Prvou fázou pri dlhotrvajúcom vystavení podmienkam stresu zo soli je depolymerizácia MT. Následne dochádza a vytváraniu nových sietí MT, ktoré sú odolnejšie voči vysokej slanosti. Na

reorganizácií mikrotubulov počas soľného stresu sa podieľa proteín SKU6/SPIRAL1 (Shoji et al., 2006). Proteín SKU6/SPIRAL1 je malý proteín lokalizovaný prevažne na rastúcich + koncoch MT. Jeho funkciou je stabilizácia MT. Počas pôsobenia soľného stresu dochádza k jeho degradácii závislej od 26S proteazómu. Táto degradácia uľahčuje depolymerizáciu MT a podporuje toleranciu voči stresu zo soli (Wang et al., 2011)

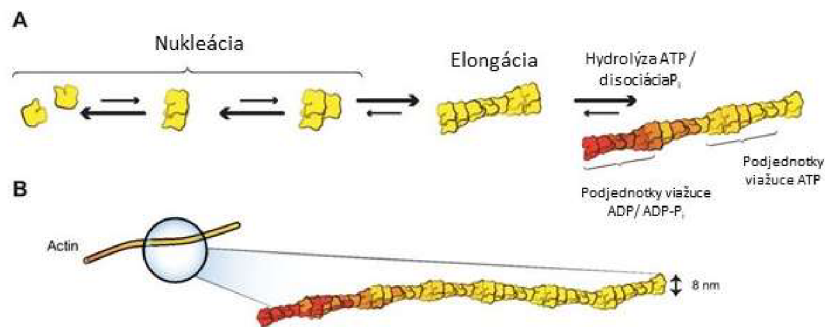
Rastlinné motorické proteíny závislé od mikrotubulov sú súčasťou rodiny kinezínov. V genóme ryže môžeme nájsť 41 génov kódujúcich kinezín, zatiaľ čo genóm *A. thaliana* kóduje najmenej 61 takýchto génov (Li et al., 2012). Kinezíny plnia mnoho funkcií počas intracelulárneho transportu. Mimo to sú všadeprítomne zapojené do organizácie mikrotubulov, segregácie chromozómov, zostavovania mitotického vretienka a cytokinézy, bunkového rastu a diferenciácie (Komis et al., 2015).

## 2.6.2 Aktín

Aktínové vlákna sú rozptýlené po celej bunke, no najviac koncentrované sú tesne pod plazmatickou membránou. Vlákňitý aktín (F-aktín) tvorí dvojvláknovú špiralovitú štruktúru. Má priemer 5-7 nm. Je tvorený podjednotkami globulárneho aktínu (G-aktín). G-aktín je 42-kDa proteín s dvoma hlavnými lalokmi, ktoré sú rozdelené hlbokou štrbinou. G-aktín obsahuje väzobné miesta pre dvojmocné katióny (vápenaté a horečnaté) a nukleotidy. Tvorba nového aktínového vlákna prebieha v dvoch fázach (Obr. 4). Počas prvej fázy tzv. nukleácii dochádza k tvorbe dimérov a neskôr trimérov z aktínových monomérov. Po nukleácii nastáva elongačná fáza, pri ktorej sa na trimér pripojujú ďalšie monomérmé jednotky. Tak dochádza k postupnému predlžovaniu aktínového vlákna. Elongácia je poháňaná energiou získanou hydrolýzou ATP (Blanchoin et al., 2014; Li et al., 2014).

Aktínové vlákna rovnako ako mikrotubuly obsahujú plus a mínus koniec. Ku skracovaniu reťazca dochádza na pomalšie rastúcom (mínus) konci odštepovaním monomérov s naviazaným ADP. Naopak aktínové vlákno rastie na plus konci. Tam dochádza k pridávaniu nových monomérov, ktoré majú na sebe naviazané ATP. Po pripojení dôjde k hydrolýze ATP na ADP-Pi a následne k odpojeniu Pi. Naviazané podjednotky preto obsahujú ADP (Li et al., 2014).





Obrázok 4. Tvorba aktínového vlákna (upravené podľa Blanchoin et al., 2014).

Aktín podlieha viacerým posttranslačným modifikáciám. Jednou z nich je napríklad transglutaminázou katalyzovaná adícia polyamínu. Okrem toho môže byť aktín počas oxidatívneho stresu podrobený oxidácii a tionitrozylácii (Komis et al., 2015).

Dynamika a architektúra aktínových filamentov je regulovaná pomocou aktín-viažúcich proteínov (ABP, actin binding proteins). ABP zahŕňajú myozínové motorové proteíny, regulátory F-aktínovej polymerizácie/depolymerizácie, aktínové mikrofilamentové sieťovacie činidlá (alebo F-aktín zväzkujúce proteíny) a aktínové monoméry viažuce a/alebo uzatváracie proteíny (globulárne alebo G-aktín viažuce proteíny) ABP (Komis et al., 2015; Li et al., 2014).

ABP sa môžu viazať na F-aktín alebo G-aktín alebo oboje. Medzi proteíny viažuce monoméry patrí napr. profilín, aktindepolymerizačný faktor (ADF) a proteín spojený s cyklázou (CAP, Li et al., 2014). Genóm *A. thaliana* kóduje 5 profilínov. Všetky profilíny *A. thaliana* indukujú depolymerizáciu F-aktínu sekvenciou aktínových monomérov (Xue and Robinson, 2013). Na zostavovaní aktínových filamentov sa podieľajú nukleačné faktory vrátane formínov a komplexu ARP2/3. Na tento proces nukleačné faktory využívajú monoméry G-aktínu alebo komplex profilín-aktín (Li et al., 2014).

Vilín, ADF/kofilín a niektoré formíny sú príkladmi proteínov, ktoré skracujú aktínové vlákna tým, že spôsobujú zlomy v kostre F-aktínu a vytvárajú nové konce na polymerizáciu a depolymerizáciu. Krycie proteíny (napr. villin a CP) sa viažu na konce vlákna a tak bránia strate alebo pridávaniu podjednotiek (Li et al., 2014). Tropomyozín sa viaže na šesť až sedem podjednotiek aktínového vlákna. Jeho funkciou je stabilizácia mikrofilamentov. Okrem toho však jeho naviazanie môže brániť interakciám aktínu s inými proteínmi (Alberts et al., 2015).

Formíny, fimbríny a vilíny sú u rastlín súčasťou aktín zväzkujúcich proteínov (Thomas et al., 2009). Fimbríny majú schopnosť zosieťovať susedné aktínové mikrofilamenty a tak podporovať mnohé bunkové funkcie, vrátane klíčenia peľu rastu peľových vrecúšok (Kovar et al., 2000; Su et al., 2012, Wu et al., 2010). Zosieťovanie sprostredkované fimbrínom chráni mikrofilamenty pred depolymerizáciou vyvolanou profilínom (Kovar et al., 2000).

Formíny sa dokážu viazať na mikrotubuly a aktínové mikrofilamenty. Navyše sú niektoré formíny transmembránovo pripojené k bunkovej stene prostredníctvom svojej extracelulárnej domény a viazané na kortikálny aktín pomocou svojej intracelulárnej časti. Formíny teda pravdepodobne zohrávajú úlohu pri prevode extracelulárnych stimulov na podmienenú remodeláciu aktínového cytoskeletu (Cheung et al., 2010; Martinière et al., 2011).

Myozíny sú mechanochemické enzýmy s konzervovanou hlavovou doménou obsahujúcou väzobné miesto pre aktín a ATP. Hlavová doména má ATPázovú aktivitu. Na chvoste myozínu sa nachádza doména schopná viazať náklad. Myozíny poháňajú pohyb membránovo viazaných vezikúl a rôznych organel pozdĺž aktínových vlákien. (Komis et al., 2015; Li et al., 2014).

Medzi inhibítory aktínového cytoskeletu patrí cytochalasin a latrunculin. Jedná sa o fungálne metabolity inhibujúce polymerizáciu aktínu. Cytochalasiny spomaľujú fázu elongácie aktínových filamentov (Alberts et al., 2015).

### 2.6.3 Bunkové delenie

Bunkové delenie rastlinných buniek je dynamický proces, pri ktorom dochádza k reorganizácii cytoskeletu. Rastlinné bunky sa delia v mediálnej rovine (Kost a Chua, 2002). Za určenie polohy fragmaplastu a roviny bunkového delenia je zodpovedný preprofázny zväzok (PPB). K tvorbe PPB okolo jadra dochádza ešte pred začiatkom mitózy po replikácii DNA v G2 fáze bunkového cyklu. PPB je tvorený z aktínových filamentov a z nahusto uložených kortikálnych mikrotubulov. K rozpadu PPB dochádza v neskorej profáze po rozpustení jadrovej membrány (Seagull, 2016).

V metafáze sa na centroméry špiralizovaných chromozómov pripája mitotické vretienko. Pripojenie mitotického vretienka je sprostredkované proteínmi kinetochormi. Mitotické vretienko je tvorené mikrotubulmi. Na rozdiel od živočíšnych buniek,

mitotické vretienko rastlín neobsahuje centroméry a nemá tak ani presne vymedzené póly (Kost et Chua, 2002).

V anafáze postupným skracovaním deliaceho vretienka dochádza k rozchodu sesterských chromatíd na opačný pól bunky. Po skončení anafázy sa deliace vretienko rozpadá. Na konci telofázy medzi novovzniknutými dcérskymi jadrami začne vznikáť fragmoplast. Fragmoplast je tvorený dvoma sadami antiparalerných mikrotubulov, aktínovými filamentami a ďalšími proteínmi. Mikrotubuly fragmoplastu sa prekrývajú v centrálnej rovine. Na tomto mieste začína vnikáť bunková prepážka. Tá sa následne rozširuje smerom k bunkovej stene materskej bunky s ktorou sa nakoniec spojí. Kalóza a ďalšie proteíny nevyhnutné pre rast bunkovej prepážky sa syntetizujú a dodávajú na rastúcu bunkovú prepážku cielenou sekréciou (Otegui et al. 2001). Sekrečné vezikuly odvodené od Golgiho sú transportované k rastúcej bunkovej prepážky pozdĺž mikrotubulov pomocou motorových proteínov (Otegui et al., 2005).

### 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Biologický materiál

*Medicago sativa* L. - divoký typ, kultivar Regen SY (RSY)

*Medicago sativa* L. – transgénná línia exprimujúca *SIMKK RNAi*

*Medicago sativa* L. – transgénná línia exprimujúca *SIMK RNAi*

*Medicago sativa* L. – transgénná línia nadexprimujúca *GFP-SIMK*

*Enterobacter* sp. SA187

##### 3.1.2 Chemikálie

Abcam: Alexa fluor 488 kozia protilátka voči králičej protilátke

Alfa Aesar: Phytigel

Biorad: 4x Laemmli vzorkovací pufor, Akrylamid/bis-akrylamid roztok 37,5:1, Clarity TM Western ECL Substrate: Luminol/enhancer solution a Peroxide solution, Precision Plus Protein TM Dual Color Standards, Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x, kryšia protilátka voči  $\alpha$ -tubulínu

Cell signaling technology: myšia protilátka voči pERK

Duchefa Biochemie: 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), Nitsch & Nitsch zmes vitamínov (1000x), Gamborg B5 médium základná zmes solí, Gamborg B5 zmes vitamínov (1000x), Murashige & Skoog (MS) základná zmes solí, kinetin, L-Glutamin, Myoinositol,

Ecolab: Incidur

Life technologies: Alexa fluor 546 kozia protilátka voči krysej protilátke

MO BIO laboratories: LB broth

Penta: 70% a 96% etanol

Roche: cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, PhosSTOP

Sigma-Aldrich: sacharóza, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), dusičnan draselný ( $\text{KNO}_3$ ), heptahydrát siranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Tween 20, chlorid sodný (NaCl), hydroxid draselný (KOH), chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ ), síran horečnatý ( $\text{MgSO}_4$ ), DAPI, králičia protilátka voči MPK6, 2-Merkaptoethanol, BSA (hovädzi sérový albumín), Dithiothreitol (DTT), Dodecylsírán sodný (SDS), Glycerol,

Isopropanol, L-glutathion, L-Prolin, L-Serin, metanol, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Ponceau S, Tween ® 20, kyselina octová

### 3.1.3 Roztoky a médiá

#### **Zásobný roztok kinetínu (0,1 mg/ml)**

4 mg kinetín  
80 µl 1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH  
39,92 ml milliQ H<sub>2</sub>O, sterilizované filtráciou cez membránový filter (veľkosť pórov 0,22 µm)

#### **Zásobný roztok 2,4-D (1 mg/ml)**

40 mg 2,4-D  
300 µl 1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH  
39,7 ml milliQ H<sub>2</sub>O sterilizované filtráciou cez membránový filter (veľkosť pórov 0,22 µm)

#### **Roztok aminokyselín (250 ml)**

0,83 g L-serín  
6,65 g L-glutamín  
0,004 g adenín  
0,083 g L-glutation  
milliQ H<sub>2</sub>O, sterilizované filtráciou cez membránový filter (veľkosť pórov 0,22 µm)

#### **Kalus indukujúce B5H médium**

3,1 g·l<sup>-1</sup> Gamborg B5 základná zmes solí  
0,25 g·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
0,5 g·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>  
30 g·l<sup>-1</sup> sacharóza  
4,5 g·l<sup>-1</sup> phytigel  
0,5 g·l<sup>-1</sup> prolín  
milliQ H<sub>2</sub>O  
pH 5,7 (upravené 1 mol·l<sup>-1</sup> a 0,1 mol·l<sup>-1</sup> KOH), sterilizované autoklávaním, po vychladnutí prídanie:

- 0,1 mg·l<sup>-1</sup> kinetín (1,0 ml·l<sup>-1</sup> zásobného roztoku kinetínu 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> )
- 1,0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D (1,0 ml·l<sup>-1</sup> zásobného roztoku 2,4-D 1,0 mg·ml<sup>-1</sup> )
- 30 ml·l<sup>-1</sup> zásobný roztok aminokyselín
- 1,0 ml·l<sup>-1</sup> 1000x Gamborg B5 zmes vitamínov

### **B50 médium**

- 3,1 g·l<sup>-1</sup> Gamborg B5 základná zmes solí
- 0,5 g·l<sup>-1</sup> prolín
- 0,25g·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O
- 0,5 g·l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>
- 30 g·l<sup>-1</sup> sacharóza
- 4,5 g·l<sup>-1</sup> phytigel
- milliQ H<sub>2</sub>O
- pH 5,7 (upravené 1 mol·l<sup>-1</sup> a 0,1 mol·l<sup>-1</sup> KOH), sterilizované autoklávaním, po vychladnutí pridané:
- 1,0 ml·l<sup>-1</sup> 1000x Gamborg B5 zmes vitamínov
- 30 ml·l<sup>-1</sup> zásobný roztok aminokyselín

### **MMS médium**

- 4,3 g·l<sup>-1</sup> MS základná zmes solí
- 0,1 g·l<sup>-1</sup> myoinositol
- 30 g·l<sup>-1</sup> sacharóza
- 4,5 g·l<sup>-1</sup> phytigel
- milliQ H<sub>2</sub>O
- pH 5,7 (upravené 1 mol·l<sup>-1</sup> a 0,1 mol·l<sup>-1</sup> KOH), sterilizované autoklávaním, po vychladnutí pridané:
- 1 ml·l<sup>-1</sup> 1000x Nitsch & Nitsch zmes vitamínov

### **MS médium**

- 4,3 g·l<sup>-1</sup> MS základná zmes solí
- 30 g·l<sup>-1</sup> sacharóza
- 4,5 g·l<sup>-1</sup> phytigel
- milliQ H<sub>2</sub>O
- pH 5,7 (upravené 1 mol·l<sup>-1</sup> a 0,1 mol·l<sup>-1</sup> KOH), sterilizované autoklávaním

### **Tekuté Fahraeus médium bez dusíku**

#### Maktonutrienty:

- 1 ml·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,0953 g·ml<sup>-1</sup>)  
1 ml·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,1232 g·ml<sup>-1</sup>)  
2 ml·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,0712 g·ml<sup>-1</sup>)  
2,5 ml·l<sup>-1</sup> Fe-EDTA

#### Mikronutrienty:

- 0,1 ml·l<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,001g·ml<sup>-1</sup>)  
0,1 ml·l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,0015g·ml<sup>-1</sup>)  
0,1 ml·l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,001 g·ml<sup>-1</sup>)  
0,1 ml·l<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,0017g·ml<sup>-1</sup>)  
0,1 ml·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,0011g·ml<sup>-1</sup>)  
pH 6,5 sterilizované autoklávaním, po vychladnutí pridanie:  
0,1 ml·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (0,11098g·ml<sup>-1</sup>)

### **Pevné Fahraeus médium bez N<sub>2</sub>**

#### Zásobné roztoky:

Makro- a mikronutrienty viz. Tekuté Fahraeus médium bez N<sub>2</sub>

- 13 g·ml<sup>-1</sup> mikroagar  
pH 6,5 (upravené pomocou HCl), sterilizované autoklávaním, po vychladnutí pridanie:  
0,1 ml·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>

### **LB médium pre kultiváciu *Enterobacter SA187Y***

- 40 g·l<sup>-1</sup> LB Broth (Miller) s agarom  
pH 7,2 (upravené pomocou HCl), sterilizované autoklávaním

### **Roztoky na western-blot**

#### Extrakčný pufor E (100 ml)

- 1,19 g HEPES, úprava pH na 7,5 (NaOH)  
38 mg EGTA

0,43 g	NaCl
100 µl	1M MgCl <sub>2</sub>
10 ml	10% glycerol
4 mg	NaF

Doplnené na 100 ml MiliQ H<sub>2</sub>O, sterilizácia bakteriologickým filtrom s pórmi o veľkosti 0,22 µm, uchovávané pri -20 °C

Kompletný extrakčný pufor (EB), tesne pred použitím pridanie (na 1ml E):

1 µl	1M DTT (0,154 g·µl <sup>-1</sup> )
20 µl	Complete <sup>TM</sup>
100 µl	PhoStop <sup>TM</sup>

Running pufor (RB)

144 g·l <sup>-1</sup>	Glycin
30 g·l <sup>-1</sup>	Tris
10 g·l <sup>-1</sup>	SDS

Doplnené do 1 litra MiliQ H<sub>2</sub>O

Pracovný RB

100 ml	RB
900 ml	MilliQ H <sub>2</sub> O

Transfer pufor 10x (TB)

144 g·l <sup>-1</sup>	Glycin
30 g·l <sup>-1</sup>	Tris

Doplnené do 1 litra MiliQ H<sub>2</sub>O

Pracovný TB

100 ml	10x TB
100 ml	100% metanol
800 ml	MilliQ H <sub>2</sub> O

Tris buffered saline 10x (TBS)

24,2 g·l <sup>-1</sup>	Tris
87,8 g·l <sup>-1</sup>	NaCl



pH 7,4 (pomocou koncentrovanej HCl), doplnené do 1 litra MilliQ  
H<sub>2</sub>O,

Pracovný TBS-T pufo

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

Ponceau S farbiaci roztok

1 g	Ponceau S
50 ml	kyselina octová
	950 ml MilliQ H <sub>2</sub> O

**Roztoky pre sterilizáciu listov *M. sativa***

Roztok 1

70% (v/v) etanol

Roztok 2

0,1% (w/v) Tween

20 milliQ H<sub>2</sub>O

sterilizácia filtráciou cez membránový filter (veľkosť pórov 0,22 μm)

Roztok 3

0,05% (w/v) Tween 20

1% (v/v) hypochlorid sodný

milliQ H<sub>2</sub>O

sterilizácia filtráciou cez membránový filter (veľkosť pórov 0,22 μm)

**Chemikálie na fixáciu, natrávenie bunkovej steny a permeabilizáciu koreňov *M. sativa***

Fixačný roztok:

2% paraformaldehyd (PFA) (v/v)

0,2% glutaraldehyd (GA) (v/v)

10% DMSO (v/v)

0,3% Tween-20 (v/v)

0,3% Triton X-100 (v/v)

v ½ MTSB

#### MTSB

5 mmol·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,23 g

50 mmol·l<sup>-1</sup> PIPES 15,1 g

5 mmol·l<sup>-1</sup> EGTA 10 ml 0,5 mol·l<sup>-1</sup> zásobného média

pH 6,9 (upravené pomocou KOH), konečný objem 1000 ml, zásobný roztok sterilizovaný pomocou bakteriologického filtra a skladovaný pri izbovej teplote.

#### EGTA

3,8 g EGTA

10 ml milliQ H<sub>2</sub>O, pridáva sa tuhý KOH, kým nie je roztok číry, doplnený na 20 ml,

pH = 8

#### Enzymový koktejl pre natrávenie bunkovej steny

2% meiceláza 0,2g

2% macerozým R10 0,2 g

2% celuláza R10 0,2 g

0,5% celuláza RS 0,05g

0,5% pektolyáza Y23 0,05g

0,1% hemiceluláza HP 0,01g

v PBS

Centrifugované 2 minúty pri 13 000 g, použitý supernatant.

#### PBS

2,7 mmol·l<sup>-1</sup> KCl 0,2 g

140 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl 8 g

1,5 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2

6,5 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,15g

pH 7,3, doplnené dH<sub>2</sub>O na 1000 ml, sterilizované autoklávaním a skladované pri izbovej teplote

#### Permeabilizačný pufor

10 % DMSO (100 µl)

2% Nonidet (20 µl na 1 ml PBS), kvapka Tween-20

### **Chemikálie na redukciu, blokovanie, farbenie jadra a zalievacie**

#### Redukčný roztok

0,05% (w/v) tetrahydridoboritan sodný (NaBH<sub>4</sub>) v PBS

Redukčný roztok musí byť pripravený bezprostredne pred použitím.

#### Blokovací roztok

5% (w/v) hovädzi sérový albumín (BSA) v PBS (0,05g/1 ml)

#### Roztoky na farbenie jadier a chromozómov

Zásobný roztok:

0,1 mg·ml<sup>-1</sup> (w/v) 4'-6-diamidino-2-fenyindol (DAPI) v DMSO (0,004575g/ml)

Rozdelený na alikvóty a skladovaný pri -20 °C v tme.

Pracovný farbiaci roztok bol pripravený bezprostredne pred použitím zriedením zásobného roztoku DAPI 1: 1000 pomocou PBS.

#### Zalievacie médium

0,1% parafenylendiamin

90% glycerol

10% PBS (pH= 8,3-8,5)

### **Protilátky**

#### **Protilátky použité na western-blot**

Primárna afinitne izolovaná králičia polyklonálna protilátka anti-AtMPK6 (Sigma-Aldrich)

Sekundárna kozia anti-králičia protilátka s naviazanou chrenovou peroxidázou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)

#### **Protilátky použité na imunohistochemické farbenie**

##### Primárne protilátky

**myšia** anti pERK

**králičia** anti MPK6

**potkania** anti  $\alpha$ -tubulín Roztok primárnej protilátky bol pripravený bezprostredne pred použitím v PBS obsahujúcom 2,5% (w/v) BSA, riedenie pERK je 1:400, MPK6 je 1:750 a  $\alpha$ -tubulínu je 1:350.

### Sekundárne protilátky

Kozia anti králičia protilátka značená AlexaFluor 555  
Králičia anti-myšia protilátka značená AlexaFluor 647  
Kozia anti-potkania protilátka značená AlexaFluor 488

Kozia anti králičia protilátka značená AlexaFluor 488  
Králičia anti-myšia protilátka značená AlexaFluor 647  
Kozia anti-potkania protilátka značená AlexaFluor 546

Roztok sekundárnych protilátok bol pripravený bezprostredne pred použitím v PBS obsahujúcom 2,5% (w/v) BSA, riedenie 1:500. Vzorky boli inkubované s pracovným roztokom protilátky v tme.

### 3.1.1 Prístroje

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)  
Aparatúra na výrobu gelov (Bio-Rad)  
Aparatúra na SDS-PAGE (Bio-Rad)  
Aparatúra na Western blot (Bio-Rad)  
Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group) 31  
Automatické pipety (Eppendorf)  
Centrifúga stolná chladená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)  
Elektromagnetická miešačka MSH-420 (Boeco)  
Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)  
Chladená centrifúga Allegra (Beckman Coulter)  
Inkubátor s nastaviteľnou teplotou (Mettler)  
Konfokálny laserový skenovací mikroskop LSM 710 (operační program Zen Black 2012, Zeiss)  
Laboratórna chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)  
Laboratórny digestor (M 1200, MERCI)  
Laboratórne predvážky S1502 (BEL-Engineering)  
Mikrocentrifúga s vortexom FVL-2400N (BioSan)  
Mikrovlnná trúba MHE21 (HITACHI)  
Mikroskop Axio Zoom.V16 (Zeiss)  
Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)

Napáťový a prúdový zdroj Bio-Rad Power Pac™ Basic (Bio-Rad)  
pH meter stolný PC 2700 (Eutech instruments)  
Skener Image Scanner III (Epson)  
Spektrofotometer (Smart Spec™ plus, Bio-Rad)  
Sterilný laminárny box (Merci)  
Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)  
Trepáčka s inkubáciou ES-20 (Biosan)  
Vákum (Bachofer)  
Vortex Genie - 2 (Scientific Industries)  
Výrobník deionizovanej vody Simplicity water purification system (Millipore)

### 3.1.2 Software

Excel 365 (Microsoft Office)  
Microplate Reader Software (Tecan)  
PowerPoint 365 (Microsoft Office)  
Zen Blue version 2.3 (Zeiss)  
Zen Black 2.3 PS1 (Zeiss)  
ImageJ with Java 8  
Image Lab (Bio-Rad)  
i-control 2.0™ Microplate Reader Software (Tecan)  
Cytospectre verzia 1.2  
Oriana 4.02

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 Príprava kultivačných médií

- Príslušné chemikálie boli navážené a následne postupne rozpustené v  $\frac{3}{4}$  výsledného objemu milliQ H<sub>2</sub>O za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke.
- Následne bolo pomocou roztoku KOH upravené pH roztoku.
- Potom bol roztok doplnený na požadovaný objem milliQ H<sub>2</sub>O.
- Médium bolo naliate do sklenených fliaš a následne sterilizované v autokláve.
- Fytohormóny, vitamíny, aminokyseliny a antibiotiká boli sterilizované filtráciou cez membránový filter (veľkosť pórov 0,22 μm) a do médií pridané po jeho autoklávovaní a vychladnutí na 55 °C, aby nedošlo k ich degradácii.

### 3.2.2 Sterilizácia listov *Medicago sativa*

- Z nekvitnúcich rastlín rastúcich v *in vivo* boli odstrihnuté listy:
- Listy boli následne vložené do vody.
- Listy z *in vivo* podmienok boli po dobu maximálne 10 s sterilizované v 70% (v/v) etanole v laminárnom boxe.
- Následne boli listy prenesené do 0,1% (w/v) roztoku Tween 20.
- Potom boli listy sterilizované 1,5 min v roztoku 1% (v/v) chlornanu sodného s 0,05% (w/v) Tween 20.
- Po sterilizácii boli listy trikrát premyté v sterilnej vode.
- Premyté listy boli prenesené na sterilný filtračný papier a rozrezané na polovicu.

### 3.2.3 Somatická embryogenéza

- Vysterilizované rozrezané listy lucerny (vid'. 3.2.2 ) alebo listy z rastlín rastúcich v *in vitro* podmienkach boli prenesené na pripravené kalus-indukujúce B5H médium v Petriho miske.
- Petriho miska bola zalepená páskou a označená.
- Explantáty boli kultivované 2 až 3 týždne vo fytotrone alebo klimakomore.
- Vzniknuté kalusy boli za sterilných podmienok prenesené na B50 médium a následne kultivované minimálne ďalšie 3 týždne.
- Embrya v torpédovitom štádiu boli prenesené na MMS médium kde sa ďalej vyvíjali a začali klíčiť.
- Po vytvorení radikuly boli embryá prenesené na MS médium, kde sa postupne vyvinuli v celú rastlinu.
- Mladé rastliny s dostatočne vyvinutým koreňovým systémom boli prenesené na tuhé Fahraeus médiu bez N<sub>2</sub>, kde sa kultivovali 5 dní. V priebehu rastu sa rastlinky skenovali každé 2-4 dni.
- Petriho misky boli kultivované v kultivačnej miestnosti, pri teplote 21 °C, 71 % vlhkosti a fotoperiode 16 hodín svetlo, 8 hodín tma.

### 3.2.4 Príprava bakteriálnej kultúry *Enterobacter* sp. SA187

- Do 20 ml LB média bolo za sterilných podmienok v laminárnom boxe pridaný 1ml zásobnej kultúry *Enterobacter* sp. SA187.
- Kultúra bola následne kultivovaná v tme 2 dni na trepačke pri 28 °C a 200 RPM.

- Bakteriálna kultúra bola následne centrifugovaná pri 6500 RPM po dobu 8 min pri 18 °C.
- Pelet bol resuspendovaný v tekutom Fahraeus médiu bez N<sub>2</sub> a centrifugácia a resuspendácia sa ešte raz opakovala.
- Potom bola bakteriálna kultúra kultivovaná ďalšie 4 h na trepačke pri 28 °C a 200 RPM.
- Následne bolo zmeraná absorbancia pri OD<sub>600</sub>.

### 3.2.5 Fenotypová analýza transgénnych línií *M. sativa* v podmienkach *ex vitro*

- Naočkované rastliny rastúce v kvetináčoch v skleníku boli každých 30 až 90 dní ostrihané.
- Strihala sa nadzemná časť rastlín 4-5 cm od koreňovej hlavy.
- Odstrihnuté stonky boli odvážené, bola zmeraná ich dĺžka a spočítaný počet nodusov a zmeraná ich dĺžka.
- Následne boli stonky sušené v sušičke po dobu 24 hod pri teplote 70 °C.
- Po vysušení boli stonky znovu odvážené.

### 3.2.6 Aplikácia bakteriálnej kultúry *Enterobacter* sp. SA187

- Na koreňový systém rastlín rastúcich v Petriho miskách v *in vitro* podmienkach bolo v laminárnom boxe pomocou pipety aplikovaných 100 až 200 µl bakteriálnej kultúry *Enterobacter* sp. SA187 zriedenej na OD<sub>600</sub> = 0,2 (viď 3.2.4).
- V prípade embryí bolo aplikovaných 10 až 50 µl bakteriálnej kultúry.
- Ako kontrola slúžili rastliny, na ktoré bolo aplikované tekuté Fahraeus médium.

### 3.2.7 Príprava tuhého Fahraeus média obsahujúceho *Enterobacter* Sp. SA187

- Fahraeus médium sa nechalo vysterilizovať v autokláve, následne vychladnúť na 55 °C a v laminárnom boxe bol pridaný sterilný CaCl<sub>2</sub>.
- Do sterilnej kónickej skúmavky bolo v laminárnom boxe napipetovaných 50 µl bakteriálnej suspenznej kultúry s OD<sub>600</sub> = 0,2 (viď. 3.2.4).
- Následne bolo pridaných 50 ml Fahraeus média.
- Kónická skúmavka bola uzavretá viečkom a premiešaná krúživými pohybmi.
- Následne bolo médium vyliate do Petriho misky.
- Po zatuhnutí média boli Petriho misky uzavreté a zalepené páskou.
- Petriho misky boli pre kultiváciu baktérii ponechané v tme po dobu 48 hodín pri teplote 28 °C.

- Nárast *Enterobacter* Sp. SA187 značeného GFP bol skontrolovaný pomocou fluorescenčného ZOOM mikroskopu. Na médium obsahujúce baktérie boli prenesené rastliny *M. sativa*, ktoré rástli na Fahraeus médiu .

### 3.2.8 Fenotypová analýza transgénnych línií *M. sativa* kultivovaných *in vitro*

- Fenotypovou analýzou bol pozorovaný vplyv *Enterobacter* sp. SA187 na rast koreňového systému rastlín *M. sativa* RSY a transgénnych línií *SIMKK RNAi*, *SIMK RNAi* a *GFP-SIMK*.
- Rastliny boli naočkované po 5 dňoch po prenesení na tuhé Fahraeus médium bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 (viď 3.2.4).
- Petriho misky boli skenované pred aplikáciou a potom na 3., 5., 7., 11. a 14. deň po naočkovaní (DPI).
- Dĺžka koreňovej sústavy rastlín bola meraná zo skenov pomocou programu ImageJ. Namerané hodnoty boli štatisticky vyhodnotené použitím ANOVA (analysis of variance) s Tukey HSD testom a Študentovho t-testu.

### 3.2.9 Vplyv *Enterobacter* sp. SA187Y na rast koreňov *M. sativa* počas pôsobenia soľného stresu

- Päť dní po aplikácii bakteriálnej kultúry *Enterobacter* sp. SA187 alebo 6 dní po prenesení rastlín na Fahraeus médium s *Enterobacter* sp. SA187 boli rastliny za sterilných podmienok prenesené na Fahraeus médium obsahujúce 100 mM NaCl.
- Ako kontrola slúžili rastliny prenesené na tuhé Fahraeus médiu médium bez NaCl.
- Rastliny boli skenované každé 2-4 dni. Rast baktérii bol pozorovaný pomocou fluorescenčného ZOOM mikroskopu.
- Dĺžka koreňového systému bola meraná v programe ImageJ. Výsledky boli štatisticky spracované v programe Excel alebo pomocou ANOVA (analysis of variance) s Tukey HSD testom
- Petriho misky boli kultivované v kultivačnej miestnosti, pri teplote 21 °C, 71 % vlhkosti a fotoperiode 16 hodín svetlo, 8 hodín tma.

### 3.2.10 Príprava zalievacieho média

- Do kadičky bolo navážených 100 mg parafenylen diamínu v digestore. Následne rozpustených v 100 µl DMSO intenzívnym krúžením dna kadičky po pracovnej ploche digestora.



- Potom bolo pridaných 10 ml 1 M Tris pufru (pH 8,8).
- Roztok bol premiešaný a bol doň pridaný 100% glycerol (90 ml).
- Roztok bol intenzívne premiešaný pomocou sklenenej tyčinky.
- Pripravené zalievacie médium bolo aliquotované uložené v tme pri teplote -20 °C.

### 3.2.11 Fixácia koreňov *M. sativa*

- Rastliny *M. sativa* získané somatickou embryogenezou boli minimálne 5 dní pred aplikáciou *Enterobacter SA187Y* prenesené na pevné Fahraeus médium.
- Na rastliny bolo aplikované samotné Fahraeus médium alebo bakteriálna suspenzná kultúra *Enterobacter SA187Y*.
- Koreňové špičky boli odobrané pred ošetrením, po 1 a 2 hodinách inkubácie s baktériami alebo médiom.
- Asi 1 cm dlhé špičky laterálnych a primárnych koreňov boli odrezané a následne prenesené do fixačného roztoku nachádzajúceho sa v platničke s jamkami v digestore.
- Vzorky boli 3 krát po dobu 30 sekúnd podrobené vákuovej infiltrácií. Následne boli vzorky inkubované 1 hodinu v digestore pri izbovej teplote.
- Vzorky boli po fixácii uchovávané v platničkách pri 4 °C.

### 3.2.12 Imuno značenie SIMK

- Prvé tri kroky imuno značenia prebiehali v digestore.
- Doštička zo vzorkami bola vytiahnutá z chladničky, vzorky boli presunuté do plastových košíčkov a následne boli premyté 2 krát po dobu 10 minút v MTSB a 2 krát po dobu 10 minút v PBS.
- Na redukciu nezreagovaných aldehydových skupín boli vzorky inkubované 3x po dobu 5 minút v NaBH<sub>4</sub> v PBS.
- Potom boli vzorky premyté v PBS 3 krát po dobu 5 minút
- Na natrávenie bunkovej steny bol použitý roztok enzýmov. Vzorky v ňom boli inkubované pri 37 °C po dobu 30 minút.
- Po natrávení bunkovej steny boli vzorky 4 krát premyté v PBS po dobu 5 minút.
- Následne boli bunkové membrány permeabilizované príslušným permeabilizačným roztokom Bunkové membrány boli permeabilizované 30 minút pri 37 °C a následne ďalších 10 minút pri izbovej teplote.
- Vzorky boli 4 krát premyté v PBS po dobu 10 minút.

- Potom boli vzorky 2 krát 30 minút blokované v PBS obsahujúcom 5% BSA pri izbovej teplote.
- Nasledovalo prenesenie vzoriek do roztoku primárnej králičej protilátky proti-MPK6 a myšej protilátky proti-pERK. Pre dosiahnutie lepšieho preniknutia protilátok boli vzorky vystavené vákuu (3x 5 minút). Doštička bola zalepená parafilmom a obalená alobalom. Vzorky boli v roztoku primárnych protilátok inkubované cez noc pri 4 °C a následne ráno 45 minút pri 37 °C.
- Prebytočné primárne protilátky boli vymyté použitím PBS (5x 10 minút).
- Nasledovala blokácia v 5% BSA (w/v) v PBS pri izbovej teplote (2x 20 minút).
- Po blokácii boli vzorky sekvenčne inkubované so sekundárnymi protilátkami v tme pri 37 °C počas 2 hodín.
- V prípade že, neboli prítomné vzorky z transgéennej línie GFP-SIMK, koreňové špičky sa najskôr inkubovali so sekundárnou kozou protilátkou proti-myšej s fluoroforom Alexa Fluor 647. Potom sa vzorky premyli v PBS 5x po dobu 10 min. Nasledovala blokácia v PBS obsahujúcom 5% (w/v) BSA pri izbovej teplote po dobu 20 min. Následne sa tento postup inkubácie zopakoval sekundárnou kozou protilátku proti-králičej s fluoroforom Alexa Fluor 488.
- V prípade, že boli prítomné vzorky z transgéennej línie GFP-SIMK, koreňové špičky sa najskôr inkubovali so sekundárnou kozou protilátkou proti-myšej s fluoroforom Alexa Fluor 647. Potom sa vzorky premyli v PBS 5x po dobu 10 min. Nasledovala blokácia v PBS obsahujúcom 5% (w/v) BSA pri izbovej teplote po dobu 20 min. Následne sa tento postup inkubácie zopakoval pre sekundárnu kozu protilátku proti-králičej s fluoroforom Alexa Fluor 555.
- Vzorky sa premyli v PBS 5x po dobu 10 min a následne sa inkubovali s PBS obsahujúcim 5% (w/v) BSA pri izbovej teplote po dobu 20 min.
- Nasledovalo prenesenie vzoriek do primárnej potkanej protilátky voči  $\alpha$ -tubulínu. Doštička bola zalepená parafilmom a obalená alobalom. Vzorky boli v roztoku primárnych protilátok inkubované cez noc pri 4 °C a následne ráno 45 minút pri 37 °C.
- Vzorky boli premyté 5x po dobu 10 minút v PBS.
- Nasledovala blokácia v 5% BSA (w/v) v PBS pri izbovej teplote (2x 20 minút).
- Po blokácii boli vzorky inkubované so sekundárnou protilátkou voči potkanovi značenou buď Alexafluor 546 v prípade neprítomnosti vzoriek z línie GFP-SIMK

alebo značenou AlexaFluor 488 v prípade, že boli prítomné vzorky línie GFP-SIMK.

- Potom boli vzorky 3x po dobu 10 minút premyté v PBS.
- Nasledovala inkubácia vzoriek v DAPI pri izbovej teplote po dobu 10 minút a premytie vzoriek v PBS (3x 10 min).
- Nakoniec boli pripravené mikroskopické preparáty:
  - 3-8 koreňových špičiek bolo prenesených do kvapky zalievacieho média na podložnom sklíčku.
  - Vzorka bola zakrytá krycím sklíčkom a okraje krycieho sklíčka boli zalakované priehľadným lakom na nechty.

### 3.2.13 Mikroskopické pozorovanie vzoriek

- Vzorky boli mikroskopované konfokálnym laserovým skenovacím mikroskopom LSM 710 s použitím laserov s vhodnou vlnovou dĺžkou: na excitáciu AlexaFuor 488 bol použitý laserom s vlnovou dĺžkou 488 nm a filter 493-551 nm; pre AlexaFuor 555 to bol laser s vlnovou dĺžkou 555 nm a filter 561-639 nm a pre AlexaFuor 647 bol použitý laser s vlnovou dĺžkou 647 nm a filter 638-755 nm. Na excitáciu DAPI bol použitý laser s vlnovou dĺžkou 405 nm a filter 410-495 nm. Získaný obrazový materiál bol použitý na ďalšiu analýzu. Intenzita fluorescenčného signálu bola vyhodnocovaná pomocou programu Zen 3.3 z obrazového materiálu.
- Štatistické vyhodnotenie výsledkov bolo spracované v programe Excel a ANOVA (analysis of variance) s Tukey HSD testom.

### 3.2.14 Odber a homogenizácia vzoriek

- Korene a nadzemná časť rastlín boli zvlášť odobrané do vychladenej trecej misky na 3 a 6 deň po prenesení na médium obsahujúce *Enterobacter* sp. SA186. Ako kontrola slúžili rastliny rastúce na čistom Fahraeus médiu.
- Korene boli rozdrvené na jemný prášok pomocou tekutého dusíku a tlčičku. Prášok bol následne prenesený do označenej 2 ml mikroskúmavky typu Eppendorf.
- Mikroskúmavky s odobranými vzorkami boli hneď zmrazené v tekutom dusíku a uchovávané v mrazničke pri -80 °C.
- Medzi homogenáciou jednotlivých vzoriek boli nástroje očistené 96% etanolom.

### 3.2.15 Extrakcia proteínov

- Zhomogenizované vzorky boli zvážené na analytických váhach a následne vložené do ľadu.
- Do pripraveného extrakčného pufru (EB) bol pred použitím pridaný inhibitor fosfatáz PhosSTOP™, inhibitor proteáz cOmplete™ a činidlo na rozrušenie a redukciu disulfidických väzieb DTT.
- Ku vzorkám bolo pridaných 200 µl EB na 100 mg vzorky. Mikroskúmavky so vzorkami a EB boli zvortexované a ponechané na extrakciu na ľade po dobu 30 minút.
- Behom extrakcie boli mikroskúmavky 3x pretrepané.
- Následne boli mikroskúmavky centrifugované pri teplote 4 °C a 13 000g po dobu 20 minút. Vzniknutý supernatant bol následne odpipetovaný pomocou pipety so sterilnou špičkou do čistej mikroskúmavky typu Eppendorf.
- Mikroskúmavky so supernatantmi boli znovu vložené do centrifúgy na ďalších 10 minút pri 4 °C a 13 000g. Výsledný supernatant bol prenesený do čistých 1,5 ml mikroskúmaviek a uložený na ľade. Vzorky boli znovu zcentrifugované, ak sa v supernatante stále nachádzali pevné častice.

### 3.2.16 Meranie koncentrácie proteínov

- Na meranie koncentrácie proteínov bola použitá metóda podľa Bradforda (Bradford, 1976).
- Najskôr bol pripravený roztok činidla Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x, obsahujúci MilliQ vodu, a Coomassie Brilliant Blue G-250 v pomere 4:1.
- Do jednotlivých jamiek 96 jamkovej mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 299 µl pripraveného roztoku a následne bol pridaný 1 µl vzorky v podobe proteínového extraktu. Ako blank bol použitý 1 µl EB.
- Obsah jamiek bol premiešaný pomocou pipety so sterilnou špičkou a inkubovaný po dobu 10 min pri laboratórnej teplote. Následne bola spektrofotometricky zmeraná absorbancia pri 595 nm za pomocou softwaru i-control 2.0™. Každá vzorka bola meraná v troch technických opakovaniach.
- Kvantifikácia vzoriek bola spravená pomocou kalibračnej krivky zostrojenej meraním absorbancie roztokov BSA o známej koncentracii.

- Dáta boli spracované v programe Microsoft Excel 365. Pomocou kalibračnej krivky a nameraných absorbancií jednotlivých proteínov bolo vypočítané, aký objem proteínu bude nanosený na gél.

### 3.2.17 Príprava vzoriek pre nanosenie na gél

- Najprv bol v digestory zmiešaný 2- merkaptoetanol s 4x Laemmli pufrom v pomere 1:4. 4x Laemmli pufru. Výsledný nanášajúci pufr bol a extrakt proteínov bol následne napipetovaný do čistých 1,5 ml mikroskúmaviek v pomere 3:1.
- Zmes bola premiešaná na vortexe a povarená v termobloku pri 95 °C po dobu 5 minút.

### 3.2.18 Príprava polyakrylamidových gélov

- Pred samotnou výrobou gélov boli sklíčka očistené 70% etanolom a zložené do aparatury. Medzi sklíčka v aparatúre bola nanosená destilovaná voda a jej hladina bola pozorovaná pre kontrolu tesnenia aparatury.
- Potom bola voda vyliata a priestor medzi sklíčkami bol vysušený plynným dusíkom.
- Najskôr bol v digestory pre výrobu deliaceho gélu zmiešaný 40% roztok akrylamidu/bis (37,5:1), 1,5M Tris pufru, SDS a MiliQ vody v kyvete. Pre zahájenie polymerizácie gélu bol nakoniec pridaný TEMED a APS.
- Roztok bol premiešaný miernym vírením kyvety a následne nanosený Pasteurovou pipetou medzi skla, približne 0,5 – 1 cm pod spodnú časť zubou hrebeňa. Pre vytvorenie anaeróbného prostredia k zaisteniu správnej polymerizácie a ustálenie vodorovnej hladiny bol gél zaliaty izopropanolom.
- Gél sa nechal polymerizovať minimálne 45 minút. Následne bol izopropanol vyliaty a priestor usušený pomocou filtračného papiera.
- Potom bol v digestory podľa protokolu pripravený zaostrovací gél. Ten bol následne vyliaty do aparatury a bol doňho vložený hrebeň. Zaostrovací gél bol ponechaný na polymerizáciu po dobu 30 minút.

Tabuľka 1: Príprava 1 mm 10% polyakrylamidového gélu

Separačný gél		Zaostrovací gél	
40% roztok akrylamid/bis (37,5:1)	1,250 ml	40% roztok akrylamid/bis (37,5:1)	0,200 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,250 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,504 ml
10% SDS	0,050 ml	10% SDS	0,020 ml
MiliQ	2,425 ml	MiliQ	1,272 ml
TEMED	0,0025 ml	TEMED	0,002 ml
APS 10%	0,025 ml	APS 10%	0,010 ml

### 3.2.19 Príprava Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gélov

- Sklička boli očistené 96% etanolom a zložené do aparatury. Pre kontrolu tesnenia aparatury bola do priestoru medzi sklička naliata destilovaná voda a bola pozorovaná jej hladina.
- Pokiaľ voda vytekala z aparatury, aparatura bola znovu rozobraná a opätovne poskladaná. Pokiaľ nedochádzalo k vytekaniu vody, voda bola vyliala a priestor bol vysušený plynným dusíkom a filtračným papierom.
- Roztoky pro rozdeľovací i zaostrovací gél boli pripravené použitím sústavy TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10% podľa pokynov výrobcu (Tab. 1).
- Najskôr bol asi 1,5 cm pod horný okraj pomocou Pasteurovej pipety nanesený deliaci gél. Ihneď potom bol zvyšný priestor vyplnený roztokom zaostrovacieho gélu. Nakoniec bol pre vytvorenie jamiek navrch umiestnený hrebienok.
- Polymerizácia gélu trvala približne 30-45 minút.

Tabuľka 2. Príprava 1,5mm 10% Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gélu.

Separačný gél		Zaostrovací gél	
Roztok separačného gélu A	4 ml	Roztok zaostrovacieho gélu A	1,5 ml
Roztok separačného gélu B	4 ml	Roztok zaostrovacieho gélu B	1,5 ml
TEMED	4 µl	TEMED	3 µl
APS 10%	40 µl	APS 10%	15 µl

### 3.2.20 Gélová elektroforéza v prítomnosti dodecylsírany sodného

- Po zatuhnutí gélu bola poskladaná elektroforetická aparátúra. Následne bola aparátúra vložená do pripravenej vane.
- Vaňa a aparátúra boli zaliate running pufrom po risku. Potom bol z gélu odstránený hrebeň.
- Do prvej jamky boli napipetované 4  $\mu$ l proteínového štandardu (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) a do ostatných jamiek bolo nanosené predom vypočítané množstvo proteínov.
- Aparátúra bola pripevnená k elektrickému zdroju a proteíny boli separované 10 minút pri 100 V, a potom približne 70 minút pri 150 V.
- Po skončení elektroforézy bol gél premytý v MilliQ H<sub>2</sub>O a následne zdokumentovaný pomocou dokumentačného prístroja ChemiDoc™ MP Imaging System s využitím protokolu pro Stain-Free gély a programu Image Lab, pre kontrolu nanosenia jednotnej koncentrácie proteínov.

### 3.2.21 Prenos proteínov na membránu

- Polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána o veľkosti 8,5 x 6 cm bola aktivovaná v 100% metanole (30 s).
- Štyri filtračné papiere, 2 plastové hubky a gél boli ponorené do transfer pufry.
- Po inkubácii komponentov bola zostavená kazeta na prenos proteínov, pozostávajúca s zvlhčenej plastovej hubky, 2 filtračných papierov, gélu, membrány, opäť 2 filtračných papierov a zvlhčenej plastovej hubky.
- Vzduchové bubliny boli odstránené pomocou plastového valčeka a kazeta bola zaistená proti otváraniu. Potom bola kazeta s chladiacou vložkou vložená do elektroforetickej vane. Vaňa bola naplnená transfer pufrom po značku a vložená do chladničky.
- Najprv prenos prebiehal 15 minút pri 100 V a následne cez noc (17 hodín) pri 24V a ráno 15 minút pri 100V
- Potom bola membrána zafarbená v roztoku 0,2% Ponceau S (30s) pre kontrolu prenosu a nanosenie jednotnej koncentrácie proteínov.
- Membrána bola odfarbená trepaním v MilliQ vode po dobu 3x5 min, a následne 2x10 min v TBS-T pufry.

### 3.2.22 Blokácia nešpecifických väzieb a aplikácia protilátok

- Po odfarbení bola membrána pre zabránenie nešpecifického viazania primárnej protilátky blokovaná v roztoku 4% BSA a 4% odtučneného sušeného mlieka v TBS-T po dobu 2 h za mierneho trepania (5RPM).
- Následne bola 1x premytá v roztoku TBS-T a inkubovaná v roztoku primárnej protilátky na trepačke pri pomalom pohybu trepania 1,5 h. Protilátka bola riedená 1:15000 v 4% roztoku BSA v TBS-T.
- Po skončení inkubácie bol roztok primárnej protilátky odliaty a membrána bola premytá 4x10 min v TBS-T na trepačke pri rýchlom pohybe trepania (40-50 RPM).
- Potom bola membrána inkubovaná so sekundárnou protilátkou s konjugovanou chrenovou peroxidázou po dobu 2 h za mierneho pohybu trepania pri laboratórnej teplote. Sekundárna protilátka bola riedená 1:5000 v 2% roztoku BSA v TBS-T.
- Nakoniec bola membrána rýchlym pohybom trepania premytá roztokom TBS-T 4x10 minút.

### 3.2.23 Detekcia proteínov

- Na detekciu a vizualizáciu proteínov bol vždy tesne pred použitím podľa návodu výrobcu pripravený čerstvý komerčný roztok Clarity Western ECL Substrate.
- Membrána bola inkubovaná v roztoku po dobu 2 min a následne bola membrána položená na dosku dokumentačného prístroja Bio-Rad ChemiDoc™ MP.
- Membrána bola snímaná s využitím protokolu „Chemi high sensitivity“ a „Colorimetric“.
- Získaný obrazový materiál bol spracovaný v programoch Image Lab a ImageJ.



## 4. Výsledky

Táto kapitola popisuje výsledky získané v experimentálnej časti tejto diplomovej práce. Prvá časť je venovaná fenotypovej charakterizácii nadzemnej časti rastlín *M. sativa* divokého typu a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMK<sup>i</sup>* a *SIMKK<sup>i</sup>* počas interakcie s prospešnou baktériou *Enterobacter* sp. SA187. GFP-SIMK línia nadexprimuje stresom indukovanú MAPK (SIMK) naopak línia SIMK produkuje znížené množstvo proteínu SIMK pomocou RNA interferencie. U línie *SIMKK<sup>i</sup>* je taktiež pomocou RNA interferencie znížená expresia proteínu SIMKK a tým aj proteínu SIMK.

Druhá časť je zameraná na fenotypovú charakterizáciu koreňového systému rastlín divokého typu a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMK<sup>i</sup>* a *SIMKK<sup>i</sup>* počas interakcie s baktériou *Enterobacter* sp. SA187 rastúcich *in vitro*. Fenotypová charakterizácia bola uskutočnená za kontrolných podmienok a počas pôsobenia soľného stresu.

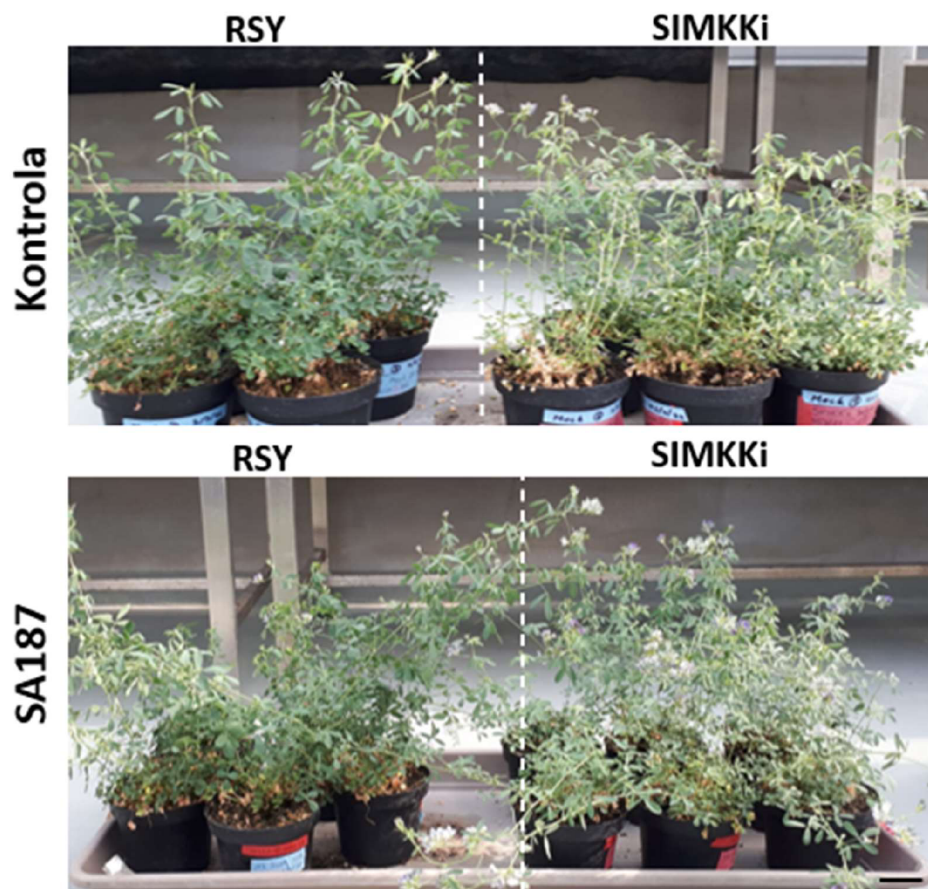
V tretej časti bola uskutočnená imunolokalizácia SIMK, fosforylovaných MAPK a  $\alpha$ -tubulínu. Vzorky pripravené imunohistochemickým značením boli využité na analýzu orientácie kortikálnych mikrotubulov po aplikácii baktérie *Enterobacter* sp. SA187 a počas pôsobenia soľného stresu. Taktiež boli pozorované zmeny v lokalizácii SIMK a fosforylovaných MAPK po aplikácii *Enterobacter* sp. SA187. Okrem toho bola prevedená analýza bunkového cyklu u kontrolných rastlín a transgéennej línie *SIMKK<sup>i</sup>*.

Posledná časť výsledkov je venovaná western blot analýze proteínu SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK v koreňoch rastlín *M. sativa* rastúcich na médiu inokulovanom *Enterobacter* sp. SA187.

### 4.1 Vplyv *Enterobacter* sp. SA187 na fenotyp nadzemnej časti rastlín *M. sativa* v *ex vitro* podmienkach

Fenotypová analýza vplyvu baktérií *Enterobacter* sp. SA187 na nadzemné časti rastlín *M. sativa* bola uskutočnená na 9 transgénnych rastlinách exprimujúcich *SIMKK<sup>i</sup>* a 9 rastlinách divokého typu RSY, ktoré rastli 1 rok *ex vitro* v skleníku (Obr. 5). Zemina v kvetináčoch 5 rastlín *SIMKK<sup>i</sup>* a 4 rastliny RSY bola inokulovaná roztokom bakteriálnej kultúry *Enterobacter* sp. SA187. Zvyšné rastliny boli zaliate tekutým Fahraeus médiom a slúžili ako kontrola. Takto ošetrované rastliny, ktoré boli pripravené v predchádzajúcich experimentoch (Hermanová, 2022), boli použité na ďalšiu analýzu. Nadzemné časti rastlín boli ostrihané a podrobené fenotypovej analýze 4., 5., 8. a 10. mesiac po inokulácii. Fenotypová analýza bola zameraná na počet stoniek na rastlinu, dĺžku stoniek,

suchú a čerstvú hmotnosť a na podiel sušiny. Podiel sušiny bol vypočítaný ako pomer suchej a čerstvej hmotnosti nadzemnej časti rastlín.



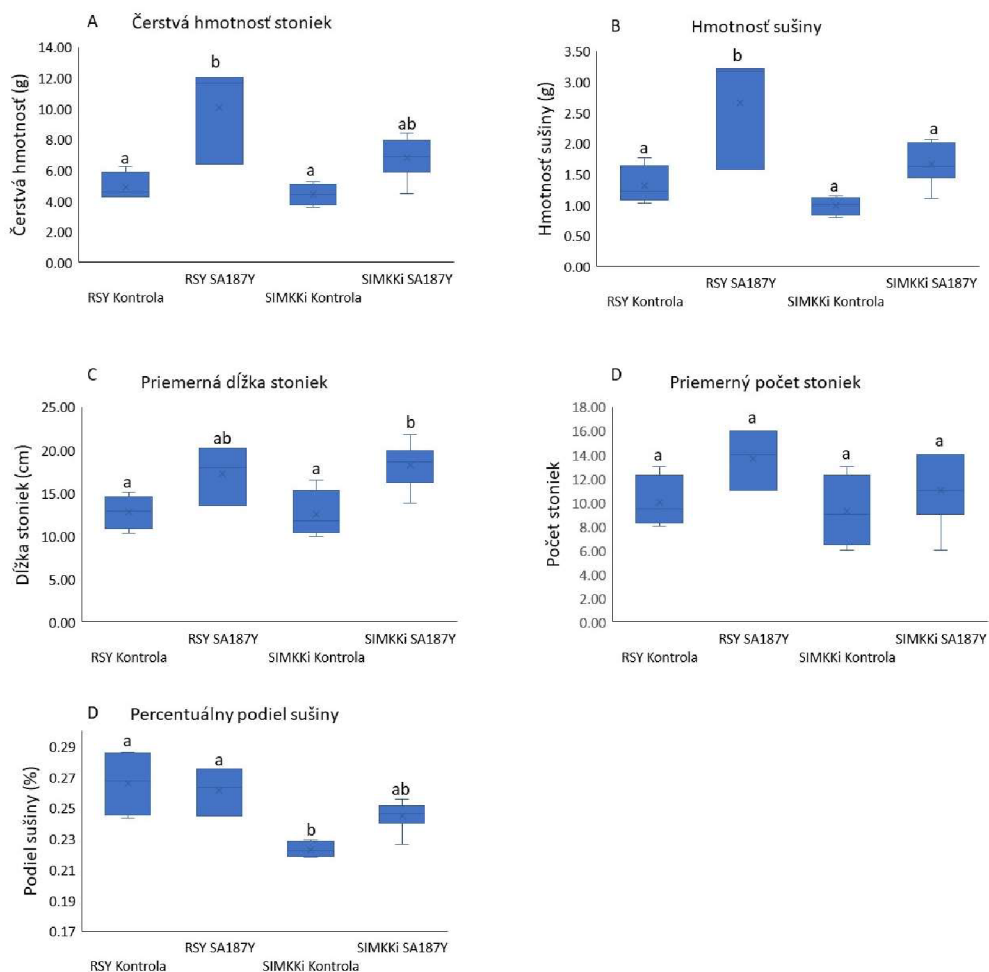
Obrázok 5. Rastliny *M. sativa* divokého typu RSY a transgénnej línie *SIMKKi* 4 mesiace po inokulácii *Enterobacter* sp. SA187.

#### 4.1.1 Fenotyp nadzemnej časti štyri mesiace od inokulácie

Získané údaje z fenotypovej analýzy nadzemnej časti rastlín po ošetroení baktériami *Enterobacter* sp. SA187 sa vyhodnotili metódou ANOVA (Analysis of variance) s Tukey HSD testom. Výsledné údaje boli uvedené v podobe krabicových grafov (Obr.6).

Po 4 mesiacoch od aplikácie baktérií mali rastliny divokého typu väčšiu čerstvú hmotnosť a hmotnosť sušiny ako rastliny RSY rastúce za kontrolných podmienok (Obr. 6A,B). Priemerná čerstvá hmotnosť kontrolných rastlín bola 4,906 g zatiaľ čo rastliny RSY ošetroené *Enterobacterom* dosiahli priemernú hmotnosť 7,827 g. U transgénej línie *SIMKKi* neboli pozorované štatisticky významné rozdiely v čerstvej hmotnosti medzi kontrolnými a ošetroenými rastlinami (Obr. 6A).

Transgéne rastliny línie *SIMKKi* ošetroené baktériami mali dlhšie stonky (18,22 cm) ako kontrolné rastliny (13,35 cm) (Obr. 6C). U rastlín RSY a transgénej línie *SIMKKi*, na ktoré bola aplikovaná bakteriálna suspenzná kultúra, nebola v porovnaní s rastlinami rastúcimi v kontrolných podmienkach pozorovaná zmena v počte stoniek (Obr. 6D). Transgéne rastliny *SIMKKi* rastúce za kontrolných podmienok mali menší podiel sušiny ako kontrolné a ošetroené rastliny divokého typu (Obr. 6E).



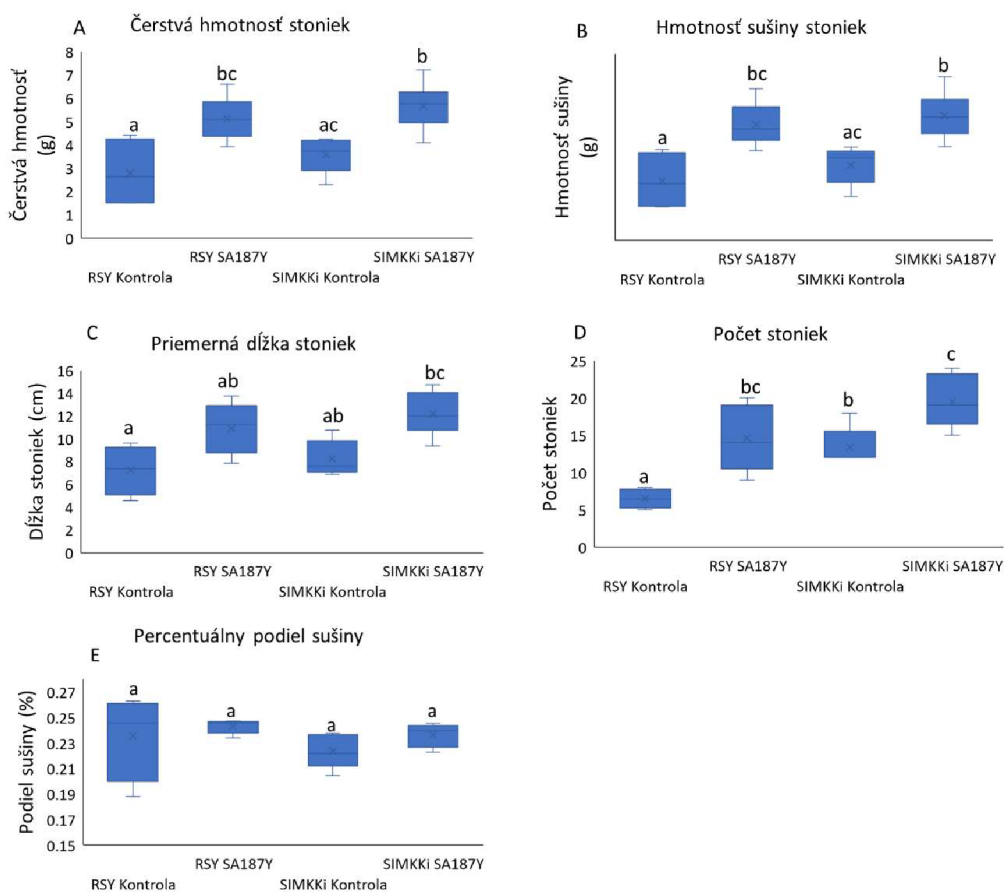
Obrázok 6. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín *M. sativa* divokého typu RSY a transgénnej línie *SIMKKi* po 4 mesiacoch po inokulácii bakteriálnou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), priemernej dĺžky stoniek (C), počtu stoniek (D) a podielu sušiny (E). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 Fenotyp nadzemnej časti päť mesiacov od inokulácie

Po 5 mesiacoch od aplikácie baktérii na rastliny boli pozorované zmeny v čerstvej hmotnosti stoniek, hmotnosti sušiny a v priemernom počte a dĺžke stoniek (Obr. 7 A-D). Rastliny naočkované bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 mali vyššie hodnoty čerstvej hmotnosti a väčší počet stoniek ako kontrolné rastliny (Obr. 7A,B,D). Priemerná čerstvá hmotnosť stoniek inokulovaných rastlín divokého typu bola 5,1 g, zatiaľ čo priemerná čerstvá hmotnosť kontrolných rastlín činila 2,79 g. Sušina stoniek kontrolných rastlín RSY vážila priemerne 0,64 g a sušina inokulovaných rastlín

1,24 g. Kontrolné transgénne rastliny *SIMKKi* mali priemernú čerstvú hmotnosť 3,57 g a priemernú hmotnosť sušiny 0,81 g. Inokulované rastliny *SIMKKi* dosiahli priemernú čerstvú hmotnosť 5,65 g a priemernú hmotnosť sušiny 1 g. Medzi čerstvou hmotnosťou ako aj hmotnosťou sušiny stoniek rastlín divokého typu a transgénnych rastlín *SIMKKi* rastúcich za kontrolných podmienok neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely.

Transgénne rastliny ošetrované bakteriálnou kultúrou mali dlhšie stonky (*SIMKKi* – 12,18 cm, RSY - 10,91 cm) ako rastliny *SIMKKi* a RSY rastúce za kontrolných podmienok (*SIMKKi* – 8,27 cm, RSY – 7,21 cm) (Obr. 7C). Najmenší počet stoniek sa vyskytoval u rastlín divokého typu ošetrovaných čistým Fahraeus médiom (Obr. 7C). Kontrolné rastliny RSY mali od 5 do 8 stoniek, zatiaľ čo u inokulovaných rastlín RSY sa počet stoniek pohyboval v rozmedzí 9 až 20 stoniek na rastlinu. Počet stoniek kontrolných rastlín línie *SIMKKi* bol v rozmedzí 12 až 18 a inokulovaných rastlín 15 až 23. U rastlín neboli pozorované štatisticky významné rozdiely v podiele sušiny (Obr. 7E).

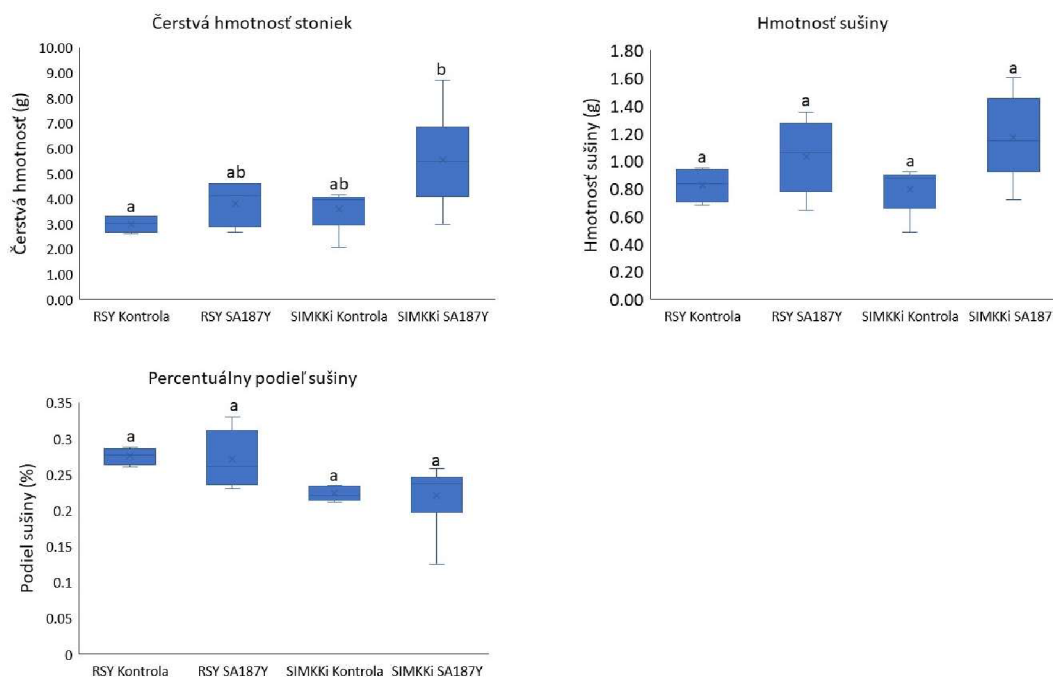


Obrázok 7. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín *M. sativa* divokého typu RSY a transgénnej línie *SIMKKi* po 5 mesiacoch po inokulácii bakteriálnou kultúrou *Enterobacter* sp.

SA187. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), priemernej dĺžky stoniek (C), počtu stoniek (D) a podielu sušiny (E). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3 Fenotyp nadzemnej časti osem mesiacov od inokulácie

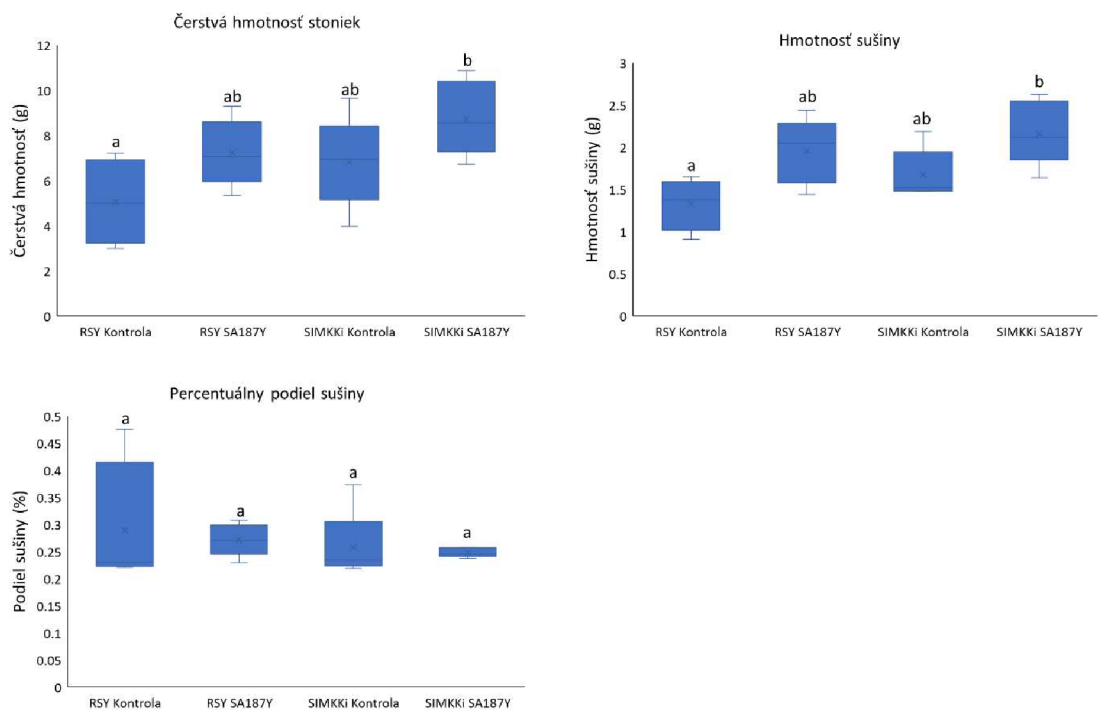
Po 8 mesiacoch od aplikácie *Enterobacter* sp. SA187 mali rastliny divokého typu aj transgénne rastliny *SIMKKi* vyššie hodnoty čerstvej hmotnosti ako aj hmotnosti sušiny (Obr. 8 A-B). Transgénne rastliny *SIMKKi* mali oproti rastlinám divokého typu nižší podiel sušiny (Obr. 8 C). Žiadny z daných výsledkov však v štatistickej analýze nevyšiel ako preukazný.



Obrázok 8. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín *M. sativa* divokého typu RSY a transgéennej línie *SIMKKi* po 8 mesiacoch po inokulácii bakteriálnou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Fenotyp nadzemnej časti desať mesiacov od inokulácie

Desať mesiacov po inokulácii rastlín bakteriálnou suspenznou kultúrou mali kontrolné rastliny RSY a *SIMKKi* nižšie hodnoty čerstvej hmotnosti a hmotnosti sušiny ako rastliny naočkované SA187 (Obr. 9 A-B). Avšak tieto rozdiely nie sú štatisticky preukazné. Kontrolné rastliny *SIMKKi* mali väčšiu čerstvú hmotnosť a hmotnosť sušiny (6,81 g a 1,67) ako kontrolné rastliny divokého typu (5,01 g a 1,33 g).



Obrázok 9. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín *M. sativa* divokého typu RSY a transgéennej línie *SIMKKi* po 11 mesiacoch po naočkovaní bakteriálnou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

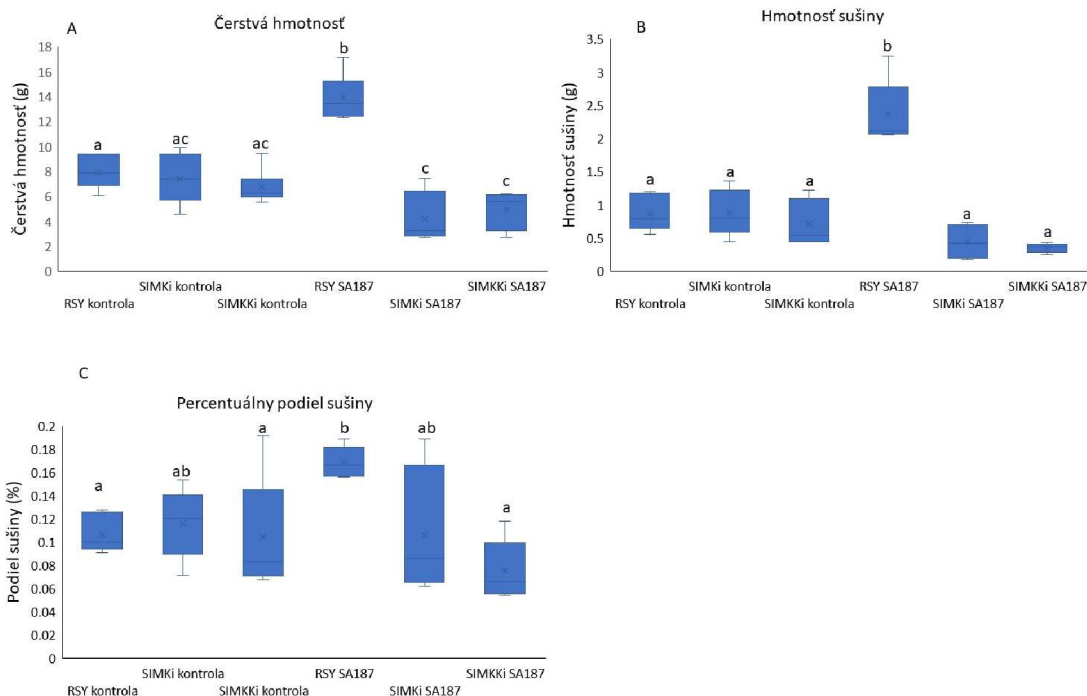
## 4.2 Fenotyp nadzemnej časti rastlín *M. sativa* inokulovaných *in vitro* s *Enterobacter* sp. SA187 po prenose do *ex vitro*

Rastliny *M. sativa* divokého typu a transgénné rastliny *SIMKi*, *SIMKKi* a GFP-SIMK rastúce v *in vitro* podmienkach boli inokulované suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. Na kontrolné rastliny bolo aplikované čisté Fahraeus médium. Na 21. deň po inokulácii boli rastliny presadené do kvetináčov s pôdou a ďalej pestované v skleníku. Rastliny transgénnnej línie GFP-SIMK boli inokulované a premiestnené do *ex vitro* podmienok s mesačným oneskorením oproti ostatným líniám, z dôvodu výskytu infekcií v ranných štádiách SE u tejto línie. Všetky rastliny, ktoré boli pripravené v predchádzajúcich experimentoch (Hermanová, 2022), boli následne podrobené fenotypovej analýze. Nadzemná časť rastlín bola v priebehu 6 mesiacov štyrikrát odobraná pomocou zostrihania. U rastlín bola analyzovaná čerstvá hmotnosť, hmotnosť sušiny, podiel sušiny, počet stoniek a dĺžka stoniek. Fenotypová analýza bola uskutočnená na 12 rastlinách divokého typu, 10 rastlinách transgénnnej línie *SIMKi*, 12 rastlinách transgénnnej línie *SIMKKi* a 11 rastlinách transgénnnej línie GFP-SIMK.

### 4.2.1 Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín *SIMKi* a *SIMKKi* po 3 mesiacoch od prenesenia do *ex vitro* podmienok

Po 3 mesiacoch od prenesenia do *ex vitro* podmienok bol pozorovaný pozitívny vplyv *Enterobacter* sp. SA187 na rast rastlín iba u divokého typu RSY. Transgénné rastliny oboch línií *SIMKi* a *SIMKKi*, ošetrované bakteriálnou suspenznou kultúrou, mali menšiu čerstvú hmotnosť a hmotnosť sušiny než inokulované rastliny divokého typu (Obr. 10 A, B). Kontrolné rastliny RSY mali priemernú čerstvú hmotnosť 7.94 g a priemernú hmotnosť sušiny 0.86 g, zatiaľ čo inokulované rastliny mali čerstvú hmotnosť 13.9 g a hmotnosť sušiny 2.36 g. Štatisticky preukazný rozdiel medzi podielom sušiny bol pozorovaný iba medzi inokulovanými rastlinami divokého typu a inokulovanými transgénnyimi rastlinami *SIMKKi*, pričom väčší podiel sušiny mali rastliny divokého typu.





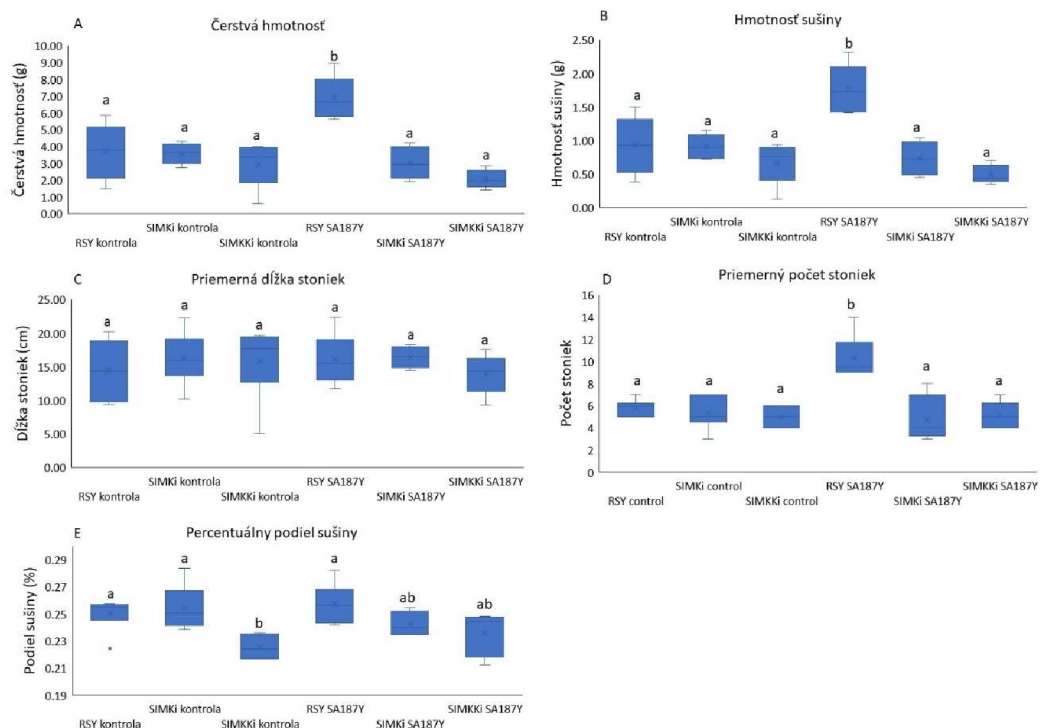
Obrázok 10. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín divokého typu (RSY) a transgénnych línií *SIMKi* a *SIMKKi* po 3 mesiacoch po presení do *ex vitro* podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2 Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín *SIMKi* a *SIMKKi* po 4 mesiacoch od presenia do *ex vitro* podmienok

Druhé strihanie nadzemnej časti rastlín divokého typu a transgénnych rastlín *SIMKi* a *SIMKKi* prebiehalo mesiac po prvom odbere nadzemnej časti rastlín.

Po 4 mesiacoch od presenia do *ex vitro* podmienok bol pozitívny vplyv na rast nadzemnej časti rastlín podobne ako po prvom strihaní pozorovaný iba u rastlín divokého typu RSY (Obr. 11). Inokulované rastliny divokého typu RSY mali väčšiu čerstvú hmotnosť, hmotnosť sušiny a priemerný počet stoniek ako kontrolné rastliny. Priemerná čerstvá hmotnosť inokulovaných rastlín divokého typu RSY bola 6.9 g a priemerná hmotnosť sušiny 1.78 g, zatiaľ čo kontrolné rastliny mali priemernú čerstvú hmotnosť 3.69 g a priemernú hmotnosť sušiny 0.93 g.

Najnižší podiel sušiny bol pozorovaný u kontrolných rastlín transgéennej línie *SIMKKi* (Obr. 11 E). Ako vyplýva z grafu priemernej dĺžky stoniek ani jedna skupina nemala štatisticky preukazný rozdiel v danom parametri (Obr. 11 C).

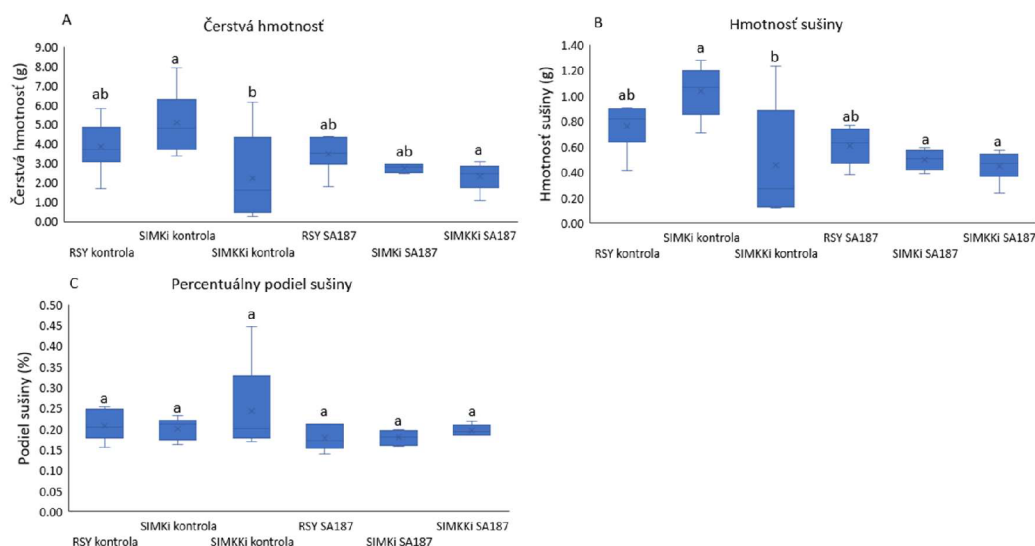


Obrázok 11. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín divokého typu (RSY) a transgénnych línií *SIMKi* a *SIMKKi* po 4 mesiacoch po prenosení do ex vitro podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), priemernej dĺžky stoniek (C), priemerného počtu stoniek (D) a podielu sušiny (E). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3 Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín *SIMKi* a *SIMKKi* po 7 mesiacoch od prenosenia do ex vitro podmienok

Tretie strihanie a následná analýza nadzemnej časti rastlín *M. sativa* divokého typu RSY a transgénej línie *SIMKKi* a *SIMKi* sa uskutočnilo po 7 mesiacoch od naočkovania s *Enterobacter* sp. SA187 čiže 4 mesiace po 2 strihaní. Na rozdiel od výsledkov z 1. a 2. strihania nebol pozorovaný pozitívny vplyv na rast nadzemnej časti ani u jednej línie.

Kontrolné rastliny *SIMKKi* mali menšiu čerstvú hmotnosť a hmotnosť sušiny ako kontrolné rastliny *SIMKi* pričom rastliny *SIMKKi* dosiahli priemernú čerstvú hmotnosť 1,98 g a priemernú hmotnosť sušiny 0,27 g a rastliny *SIMKi* dosiahli priemernú čerstvú hmotnosť 5,08 g a priemernú hmotnosť sušiny 0,5 g (Obr. 12). V ostatných prípadoch nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel medzi jednotlivými líniami.



Obrázok 12. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín divokého typu (RSY) a transgénnych línií *SIMKi* a *SIMKKi* po 7 mesiacoch po preneseaní do *ex vitro* podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

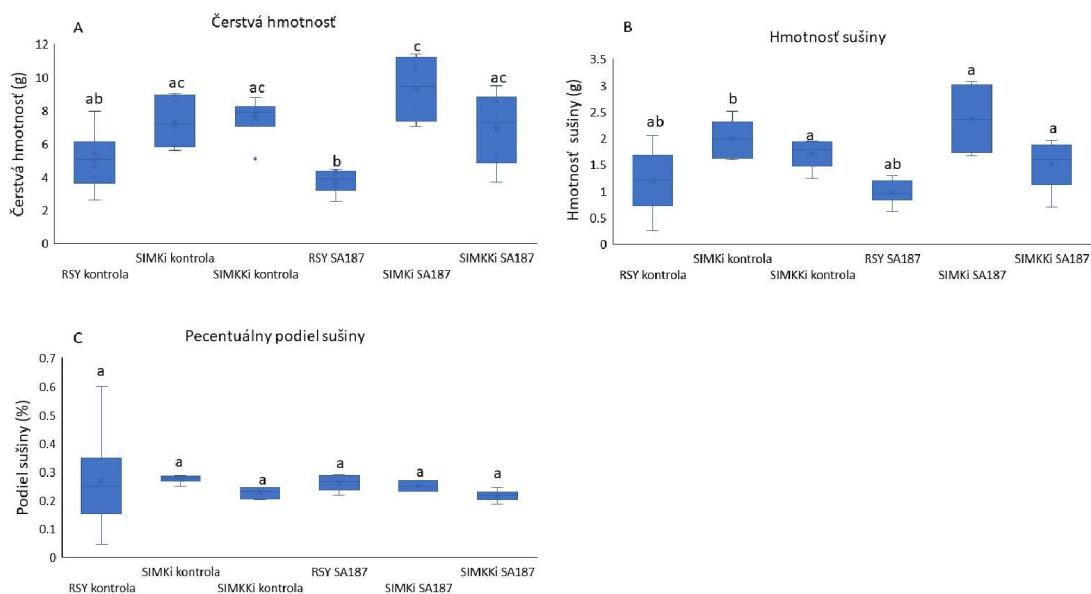
#### 4.2.4 Fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín *SIMKi* a *SIMKKi* po 9 mesiacoch od preneseania do *ex vitro* podmienok

Posledné strihanie nadzemnej časti rastlín bolo robené 2 mesiacoch po treťom strihaní, teda 9 mesiacov po preneseaní do *ex vitro* podmienok. Na rozdiel od prvých dvoch strihaní, ani rastliny transgénnych línií ani divokého typu RSY inokulované *Enterobacter* sp. SA187 nevykazovala oproti kontrolným rastlinám nárast v sledovaných parametroch (Obr. 13).

Štatisticky preukazné rozdiely boli pozorované medzi čerstvými hmotnosťami inokulovaných rastlín divokého typu a inokulovaných rastlín transgéennej línie *SIMKi* a *SIMKKi* (Obr. 13 A). Inokulované rastliny divokého typu mali oproti inokulovaným transgénym rastlinám menšiu čerstvú hmotnosť. Čerstvá hmotnosť rastlín RSY dosahovala 3,75 g, zatiaľ čo rastliny *SIMKi* a *SIMKKi* mali priemernú čerstvú hmotnosť 9.33g a 6.91g.

Štatisticky preukazný rozdiel bol taktiež pozorovaný medzi hmotnosť sušiny kontrolných rastlín *SIMKi* a kontrolných rastlín *SIMKKi*, pričom väčšia hmotnosť sušiny bola zaznamenaná u línie *SIMKi* (Obr. 13 B).

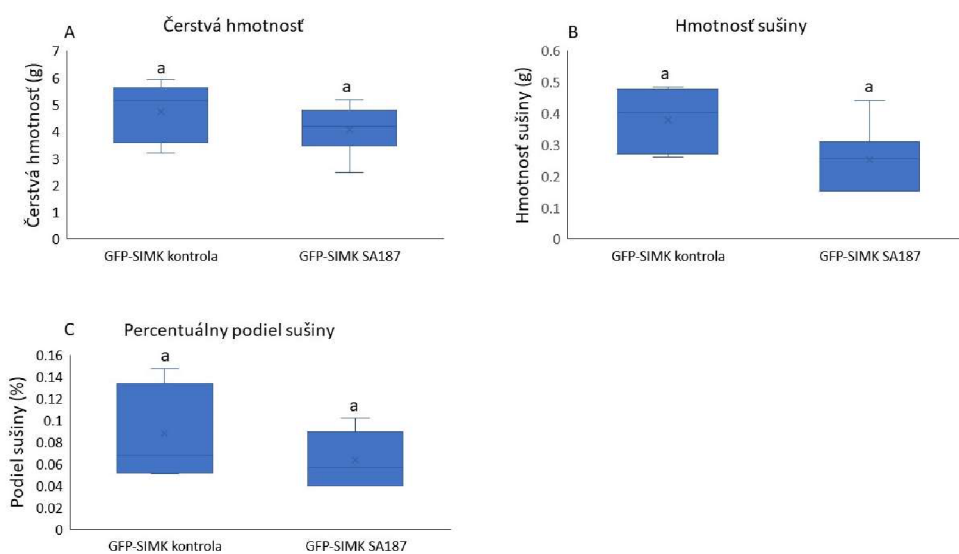
Ako vyplýva z krabicového grafu percentuálneho podielu sušiny ani medzi jednou skupinou rastlín nebol pozorovaný štatisticky preukazný rozdiel (Obr. 13 C). Hodnoty pozorovaných skupín sa pohybovali v rozmedzí od 0,04 do 0,28 %.



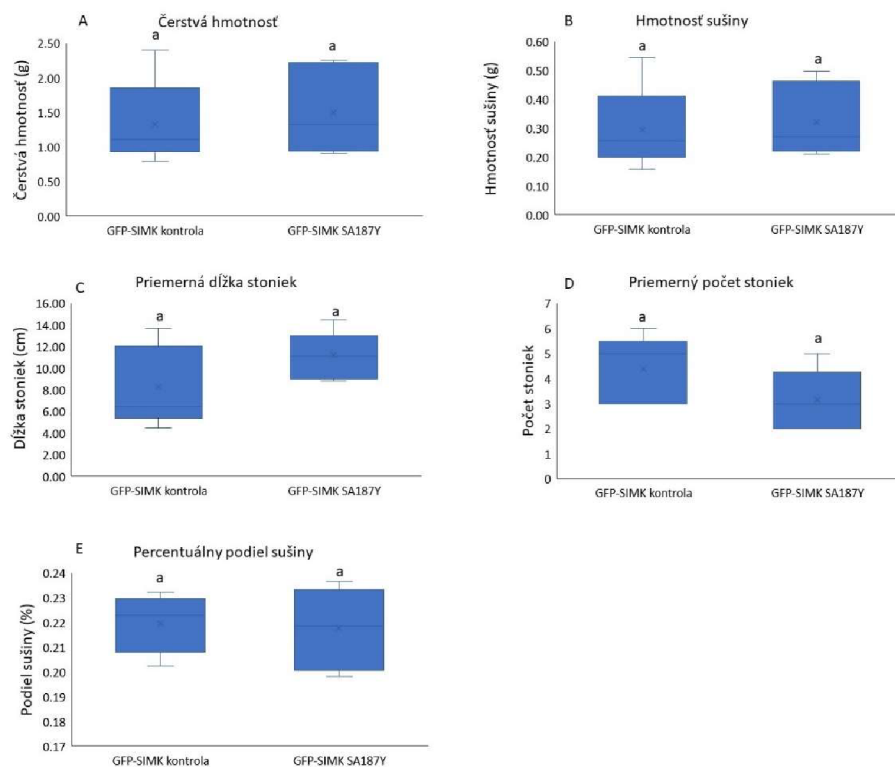
Obrázok 13. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín divokého typu (RSY) a transgénnych línii *SIMKí* a *SIMKKí* po 9 mesiacoch po prenesení do ex vitro podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Odlišné písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú preukaznosť pri  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5 Fenotyp nadzemnej časti transgénnych rastlín GFP-SIMK

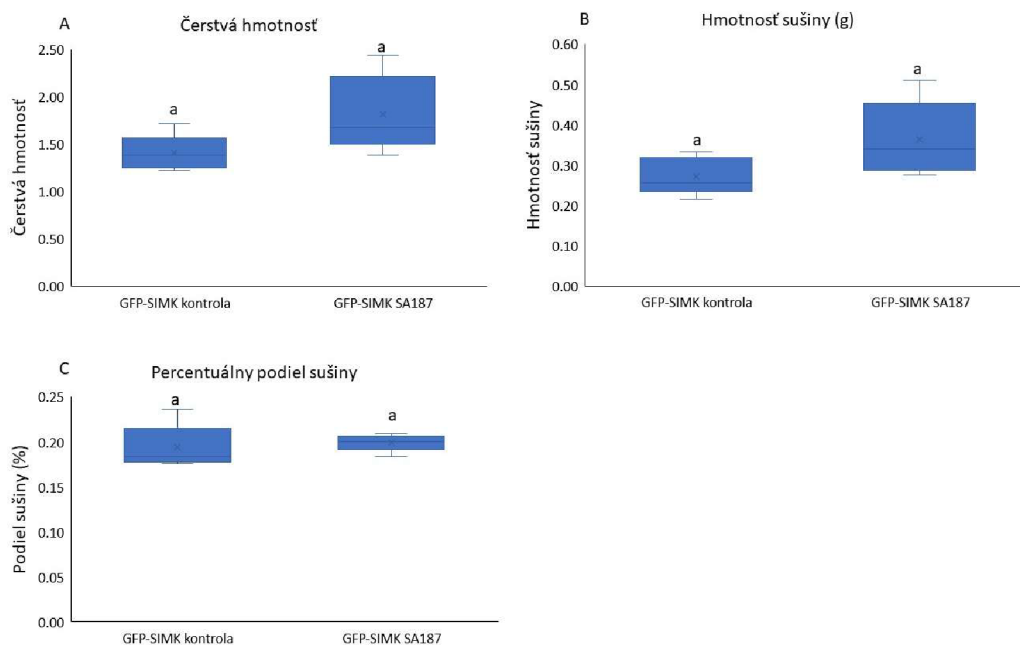
U transgénnych rastlín GFP-SIMK boli ich nadzemné časti podrobené analýze čerstvej hmotnosti, hmotnosti sušiny, podielu sušiny, počtu a dĺžke stoniek. Avšak u žiadneho z odberov nadzemných častí, ktoré boli robené 2, 3, 6 a 8 mesiacov po prenose do *ex vitro* podmienok, neboli pozorované štatisticky preukazné rozdiely medzi kontrolnými rastlinami a rastlinami ošetrovanými bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 (Obr. 14-17).



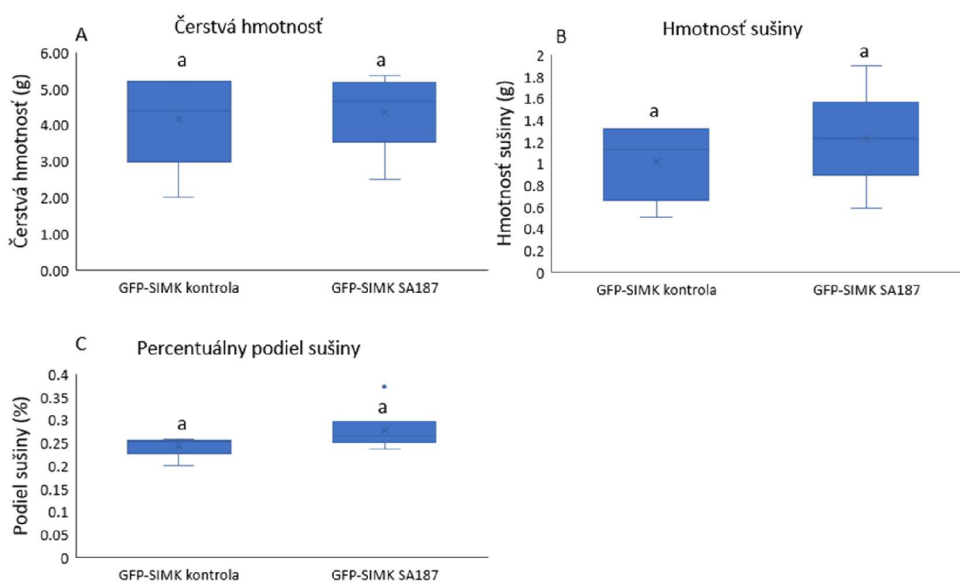
Obrázok 14. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín transgénnej línie GFP-SIMK po 2 mesiacoch po prenesení do *ex vitro* podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Rovnaké písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú nepreukaznosť pri  $p < 0,05$ .



Obrázok 15. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín transgéennej línie GFP-SIMK po 3 mesiacoch po preneseaní do ex vitro podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), priemernej dĺžky stoniek (C), priemerného počtu stoniek (D) a podielu sušiny (E). Rovnaké písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú nepreukaznosť pri  $p < 0,05$ .



Obrázok 16. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín transgéennej línie GFP-SIMK po 7 mesiacoch po prenesení do *ex vitro* podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Rovnaké písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú nepreukaznosť pri  $p < 0,05$ .



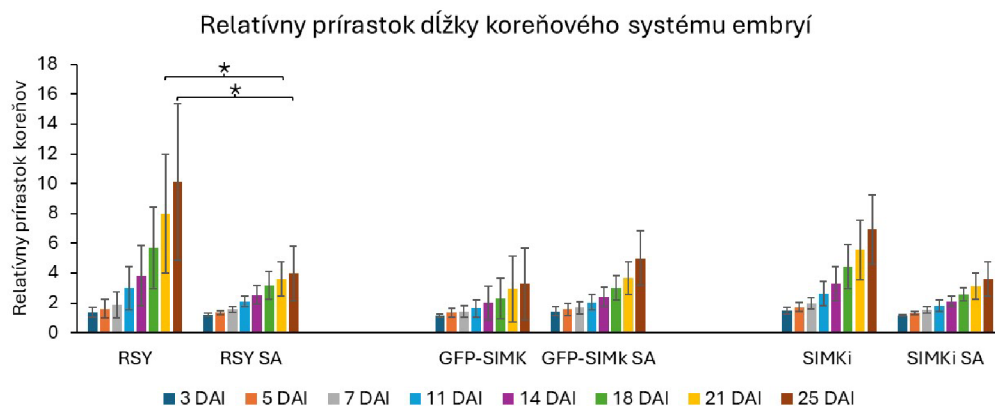
Obrázok 17. Fenotypová analýza nadzemnej časti rastlín transgéennej línie GFP-SIMK po 9 mesiacoch po prenesení do *ex vitro* podmienok. Krabicový graf čerstvej hmotnosti (A), hmotnosti sušiny (B), podielu sušiny (C). Rovnaké písmená nad krabicami v grafoch indikujú štatistickú nepreukaznosť pri  $p < 0,05$ .

### 4.3 Vplyv *Enterobacter* sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému somatických embryí *M. sativa*

Petriho misky so somatickými embryami divokého typu RSY a transgénnych línií *SIMKi* a GFP-SIMK kultivované 5 dní pred inokuláciou na Fahraeus médiu boli skenované ihneď po inokulácii (0. deň) bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 a potom na 3., 5., 7., 11., 14., 18., 21. a 25. deň po inokulácii. Kontrolné embryá boli ošetrené tekutým Fahraeus médiom. Celková dĺžka koreňového systému bola meraná pomocou programu ImageJ. Relatívny prírastok (RP) dĺžky koreňového systému bol vyhodnotený v programe Microsoft Excel. Celkovej dĺžke koreňového systému rastlín ihneď po inokulácii (0 DAI) bola priradená hodnota 1. V ostatných dňoch bol počítaný RP ako podiel celkovej dĺžky koreňového systému rastliny v daný deň a celkovej dĺžky koreňového systému rastliny v 0 DAI. Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené pomocou ANOVA (Analysis of variance) programu s Tukey HSD testom.

Z troch línií najpomalšie rástol koreňový systém u línie GFP-SIMK (Obr. 18). U embryí divokého typu RSY a transgénnej línie *SIMKi* bol RP po celú dobu experimentu väčší u neinokulovaných ako u inokulovaných. Naopak u línie GFP-SIMK rástol rýchlejšie koreňový systém inokulovaných embryí. Najväčší rozdiel v RP medzi kontrolnými a inokulovanými koreňovými systémami bol pozorovaný u línie RSY na 25 deň po inokulácii. RP koreňového systému u kontrolných rastlín bol 10,12; zatiaľ čo u inokulovaných rastlín RP dosiahol 3,98. Od 18 dňa najrýchlejšie rástol koreňový systém rastlín divokého typu. Štatisticky preukazný rozdiel ( $p < 0,05$ ) v raste koreňového systému bol však pozorovaný iba medzi kontrolnými a inokulovanými rastlinami RSY na 21 a 25. deň.





Obrázok 18. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému embryí rastlín divokého typu RSY a transgénnych rastlín *SIMKi* a *GFP-SIMK* na 3., 5., 7., 11., 14., 18., 21. a 25. deň od inokulácie bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 (SA187) a čistým Fahraeus médiom (kontrola). Štatisticky preukazný rozdiel ( $p < 0,05$ ) bol pozorovaný len na 21. a 25. deň medzi kontrolnými a inokulovanými rastlinami RSY.

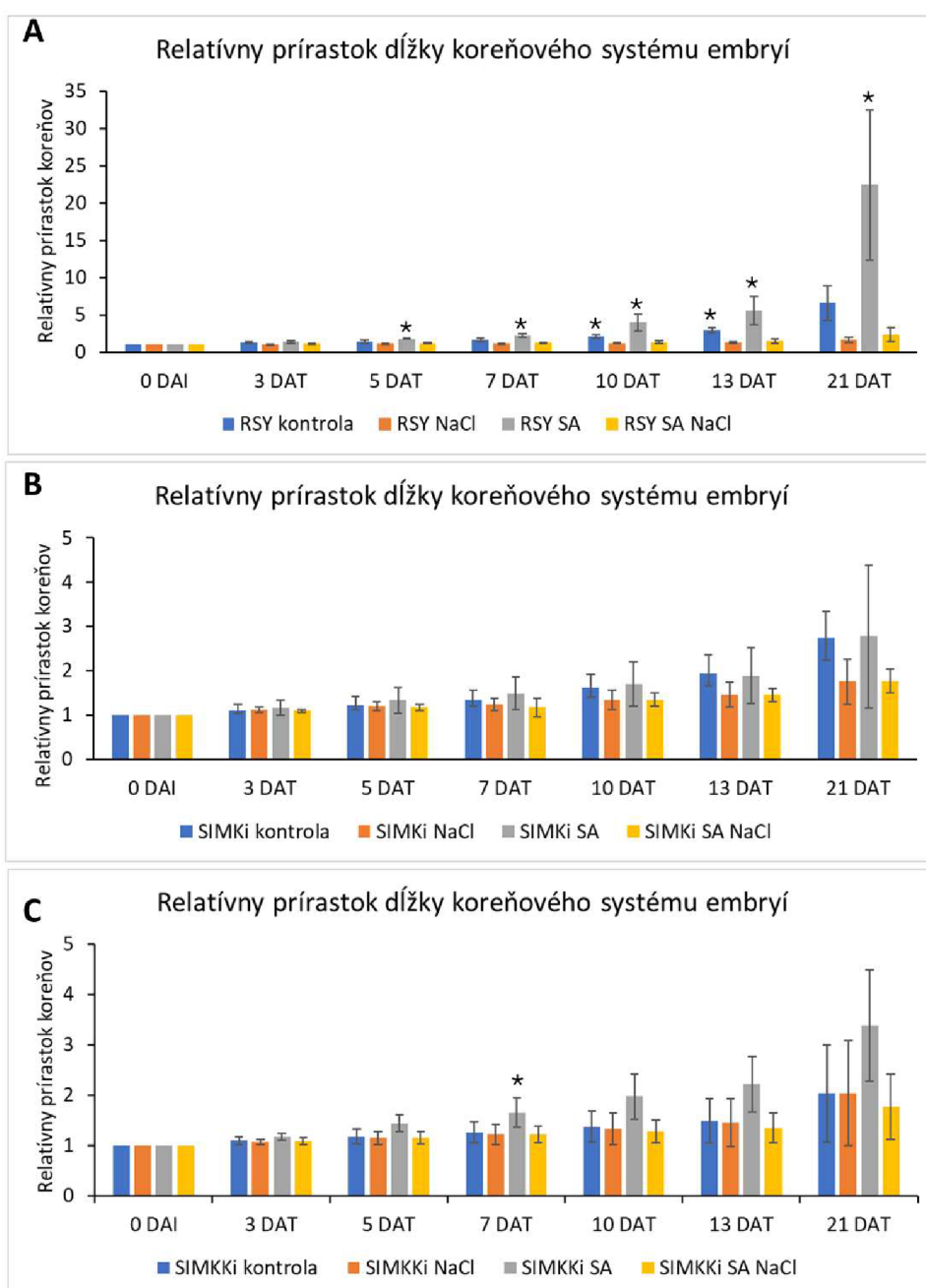
#### 4.4 Vplyv soľného stresu na rast koreňového systému embryí *M. sativa* inokulovaných *Enterobacter* sp. SA187

Somatické embryá rastlín *M. sativa* RSY a transgénnych línií *SIMKki* a *SIMKi* rastúce v Petriho miskách na Fahraeus médiu po dobu 5 dní boli inokulované bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 alebo čistým tekutým Fahraeus médiom (kontrola). Po 5 dňoch bola polovica rastlín prenesená na Fahraeus médium obsahujúce 100mM NaCl a zvyšné rastliny boli preložené na Fahraeus médium bez pridania soli. Petriho misky boli naskenované tesne po prenesení na médium obsahujúce soľ (0 DAT) a potom na 3., 5, 7., 10., 13., a 21. deň po prenesení. Dĺžka koreňového systému bola meraná pomocou programu ImageJ a následne spracovaná rovnakým spôsobom ako v časti 4.2.

Spomedzi troch pozorovaných línií najrýchlejšie rástol koreňový systém rastlín divokého typu ošetrovaných bakteriálnou suspenznou kultúrou na médiu bez soli (Obr. 19). Na 13. deň bol RP inokulovaných rastlín RSY rastúcich na médiu bez NaCl 22,4, zatiaľ čo RP kontrolných rastlín rastúcich na médiu bez NaCl bol 6,6. U línie RSY prítomnosť NaCl v médiu výrazne spomalila rast koreňov somatických embryí. Inokulované rastliny RSY rastúce na soľnom médiu mali oproti kontrolným rastlinám RSY rastúcim na soľnom médiu väčší RP. Štatisticky preukazný rozdiel medzi rastlinami bol však

pozorovaný len medzi inokulovanými rastlinami RSY rastúcimi na médiu bez NaCl a ostatnými rastlinami.

Embryá rastlín *SIMKKi* rastúce na kontrolnom médiu ošetrené bakteriálnou suspenznou kultúrou rástli rýchlejšie ako kontrolné rastliny rastúce na médiu bez soli. Štatisticky preukazný rozdiel v RP koreňového systému týchto rastlín bol však pozorovaný len na 7. deň, kedy RP kontrolných rastlín bol 1,19 a RP inokulovaných rastlín bol 1,66.

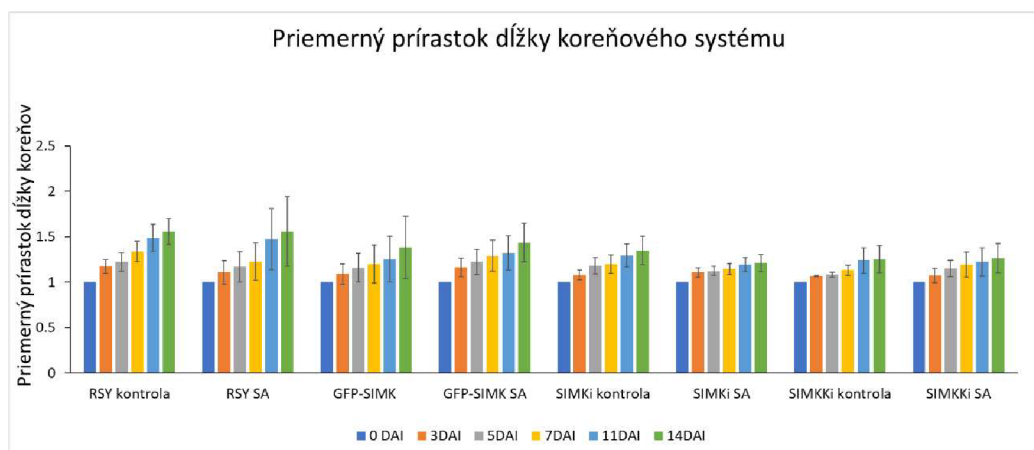


Obrázok 19. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému embryí rastlín divokého typu RSY (A) a transgénnych rastlín *SIMKi* (B) a *SIMKKi* (C) na 3., 5., 7., 11., 13. a 21. deň od prenesenia na Fahraeus médium obsahujúce 100 mM NaCl. Hviezdička nad stĺpcami poukazuje na štatisticky preukazný rozdiel oproti ostatným stĺpcom v daný deň ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Dynamika rastu koreňového systému rastlín *M. sativa* po inokulácii *Enterobacter* sp. SA187

V ďalšie experimenty boli zamerané na dynamiku rastu koreňového systému kompletných rastlín *M. sativa* divokého typu RSY a línií *SIMKi*, *SIMKKi* a GFP-SIMK rastúcich na pevnom Fahraeus médiu. Na koreňový systém rastlín bola aplikovaná bakteriálna suspenzná kultúra *Enterobacter* sp. SA187. Ako kontrola slúžili rastliny ošetrené tekutým Fahraeus médiom. Petriho misky boli skenované na 3., 5., 7., 11. a 14. deň po inokulácii SA187 alebo Fahraeus médiom. Na meranie dĺžky koreňového systému bol použitý program ImageJ. Spracovanie dát a vypočítanie prírastku dĺžky koreňového systému bolo vykonané v programe Microsoft Excel rovnakým spôsobom ako u embryí (vid'. 4.2).

Najväčší RP koreňového systému bol pozorovaný u rastlín divokého typu (Obr. 20). RP koreňového systému inokulovaných rastlín *SIMKi* bol menší (1,21) než u kontrolných rastlín ošetrených Fahraeus médiom (1,31). Koreňový systém línií GFP-SIMK, *SIMKKi* a *SIMKi* mal konštantný prírastok v priebehu merania, kontrolné rastliny sa od inokulovaných rastlín vo svojom prírastku takmer nelíšili. Avšak žiaden z pozorovaných rozdielov v raste koreňového systému nebol štatisticky preukazný.



Obrázok 20. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému rastlín divokého typu RSY a transgénnych rastlín *SIMKi*, *SIMKKi* a GFP-SIMK na 3., 5., 7. a 11. deň od inokulácie bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 (SA187) a čistým Fahraeus médiom (kontrola).

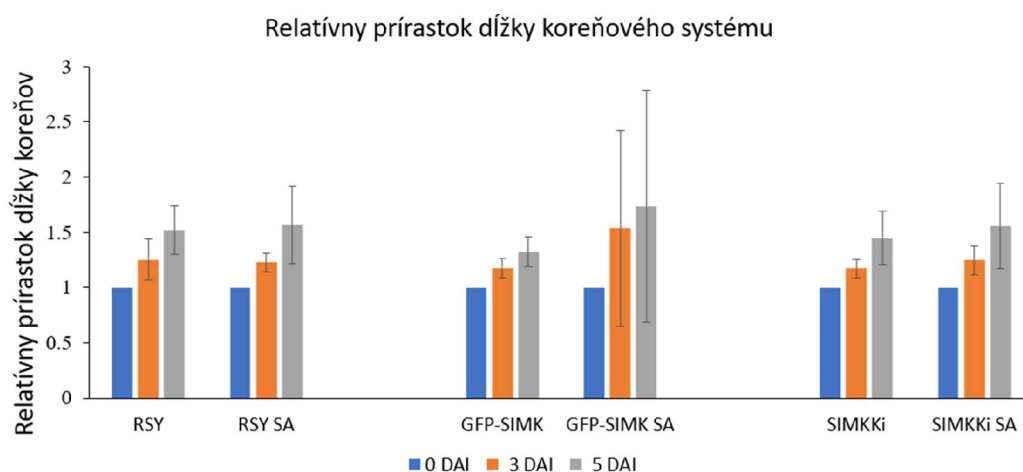
#### 4.6 Vplyv *Enterobacter* sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému rastlín *M. sativa* počas pôsobenia soľného stresu

U rastlín *M. sativa* divokého typu a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* bol sledovaný vplyv spôsobu ošetrovania koreňového systému rastlín baktériou *Enterobacter* sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému rastlín počas soľného stresu. V prvom experimente (4.6.1) bol koreňový systém rastlín rastúcich na Fahraeus médiu priamo inokulovaný bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. V druhom experimente (4.6.2) boli rastliny rastúce na MS médiu prenesené na tuhé médium inokulované *Enterobacter* sp. SA187. Dĺžka koreňového systému bola meraná v programe ImageJ a vyhodnotená spôsobom opísaným v kapitole 4.2.

##### 4.6.1 Dynamika rastu koreňového systému inokulovaného *Enterobacter* sp. SA187 u rastlín vystavených soľnému stresu

Koreňové systémy *M. sativa* divokého typu RSY a línií GFP-SIMK a *SIMKKi* boli po 5 dňoch od preloženia rastlín na Fahraeus médium inokulované bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 alebo čistým Fahraeus médiom. Petriho misky boli oskenované hneď po inokulácii (0 DAI) a na 3. a 5. deň po inokulácii.

U rastlín RSY a *SIMKKi* nebol pozorovaný výrazný rozdiel v raste koreňového systému medzi kontrolnými a inokulovanými rastlinami (Obr. 21). U transgénnych rastlín GFP-SIMK sa koreňový systém inokulovaných rastlín rýchlejšie predlžoval. Na 5. deň po inokulácii bol RP koreňového systému u kontrolných rastlín RSY 1,52 a *SIMKKi* 1,45 a u línie GFP-SIMK 1,32. RP inokulovaných rastlín RSY činil 1,57, rastlín *SIMKKi* 1,56 a rastlín GFP-SIMK 1,73. Rozdiely v RP však neboli štatisticky preukazné.



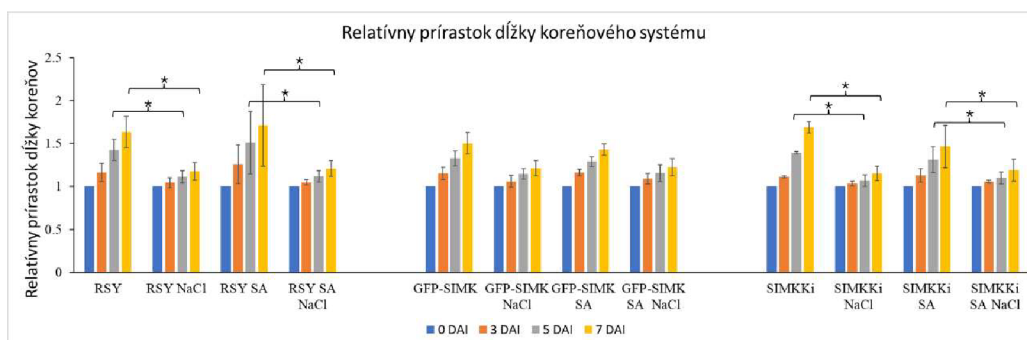
Obrázok 21. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému rastlín divokého typu RSY a transgénnych rastlín *SIMKKi* a GFP-SIMK na 3. a 5. deň od inokulácie bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187.

Na 5. deň od inokulácie boli rastliny prenesené buď na Fahraeus médium bez soli (kontrola) alebo na Fahraeus médium obsahujúce 100 mM NaCl. Rastliny boli oskenované hneď po prenesení (0DAT) a potom na 3., 5. a 7. deň.

U všetkých línii mali ako kontrolné tak aj inokulované rastliny rastúce na médiu obsahujúcom NaCl oproti rastlinám rastúcim na médiu bez soli menší RP koreňového systému (Obr. 22). Medzi jednotlivými líniami neboli pozorované významné rozdiely v rýchlosti rastu koreňového systému. Na 7. deň bol RP u neinokulovaných rastlín RSY rastúcich na kontrolnom médiu 1,63 a u rastlín inokulovaných bakteriálnou suspenznou kultúrou 1,7; zatiaľ čo rastliny rastúce na médiu obsahujúcom soľ mali RP neinokulovaných koreňových systémov 1,17 a 1,2 u inokulovaných. U línie GFP-SIMK bol na 7. deň RP koreňových systémov rastlín rastúcich na kontrolnom médiu 1,5 (neinokulované) a 1,42 (inokulované), zatiaľ čo u rastlín rastúcich na médiu obsahujúcom soľ dosiahol RP hodnotu 1,21 (neinokulované) a 1,22 (inokulované). U línie *SIMKKi*, RP koreňových systémov rastlín rastúcich 7 dní na médiu bez soli bol 1,68 (neinokulované) a 1,46 (inokulované) a u rastlín rastúcich na médiu so soľou 1,15 (neinokulované) a 1,18 (inokulované).

Štatisticky preukazný rozdiel bol pozorovaný medzi neinokulovanými rastlinami RSY a *SIMKKi* rastúcimi na médiu obsahujúcom NaCl a neinokulovanými rastlinami rastúcimi na médiu bez NaCl a inokulovanými rastlinami RSY rastúcimi na kontrolnom a NaCl obsahujúcom médiu. U žiadnej z troch línii nebol pozorovaný pozitívny vplyv

aplikácie *Enterobacter* sp. SA187 na dynamiku rastu koreňového systému v kontrolných podmienkach a taktiež počas solného stresu (Obr. 24).

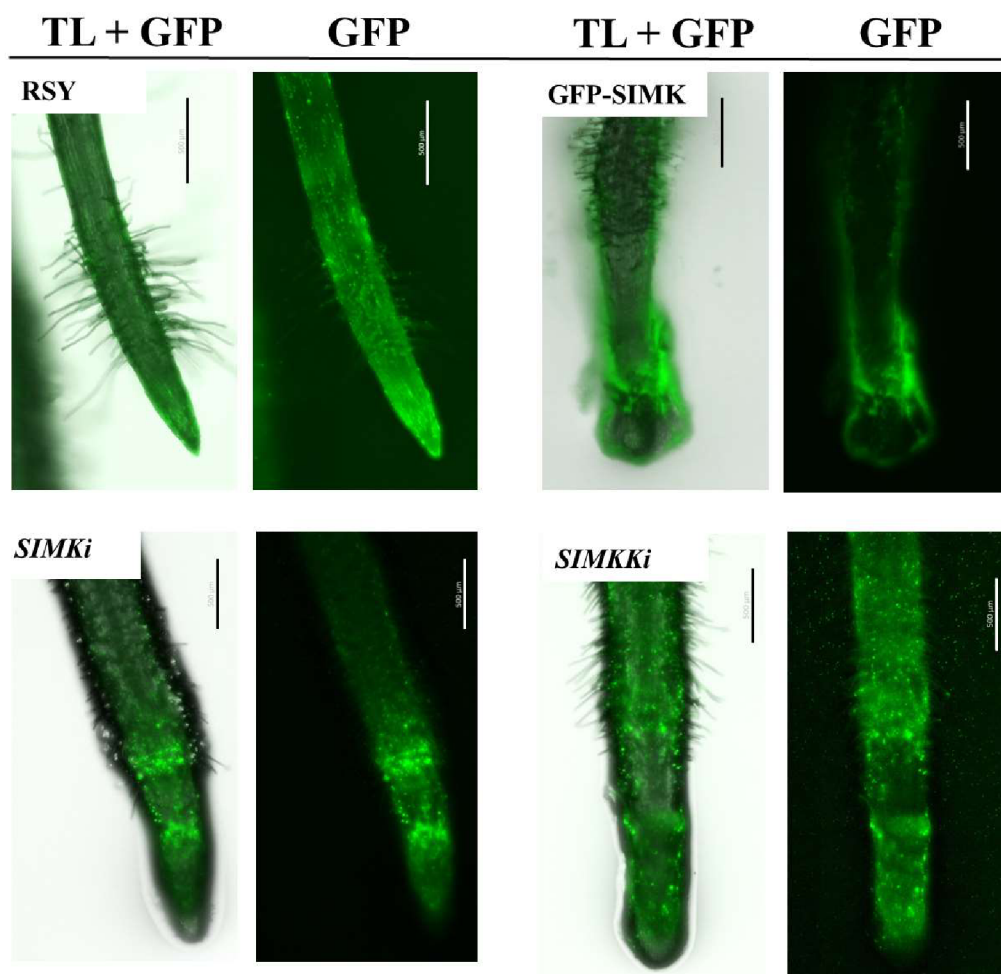


Obrázok 22. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému rastlín divokého typu RSY a transgénnych rastlín *SIMK*Ki** a GFP-SIMK na 3., 5. a 7. deň od prenesenia na Fahraeus médium obsahujúce 100 mM NaCl. Hviezdička nad stĺpcami poukazuje na štatisticky preukazný rozdiel ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6.2 Vplyv solného stresu na dynamiku rastu koreňového systému rastlín kultivovaných na médiu inokulovanom s *Enterobacter* sp. SA187

Rastliny *M. sativa* divokého typu RSY a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMK*Ki** a *SIMK*Ki** boli prenesené na Fahraeus médium, ktoré bolo inokulované *Enterobacter* sp. SA187, alebo na kontrolné médium bez baktérií. Petriho misky boli skenované v deň prenesenia (0 DAI) a potom na 3. a 6. deň po prenesení.

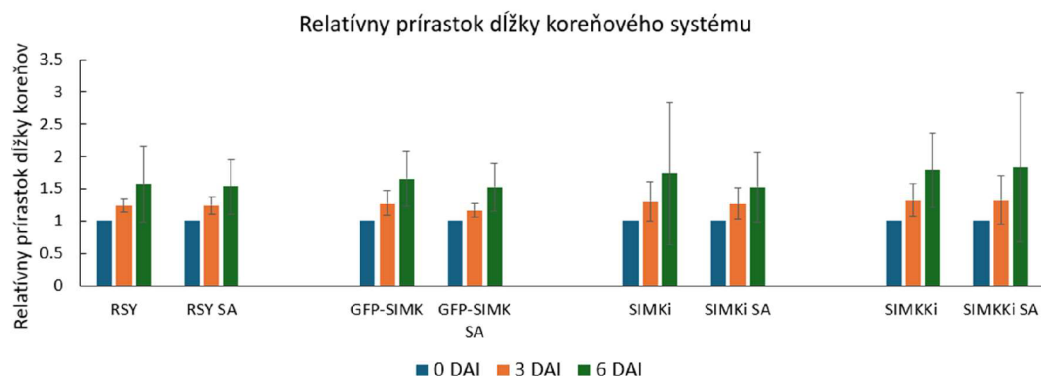
Na 5. deň po prenesení rastlín, na médium inokulované *Enterobacter* sp. SA187, bola pomocou mikroskopu Axio ZOOM.V16 na povrchu koreňov pozorovaná prítomnosť baktérií a tvorba biofilmu (Obr. 23). K vytvoreniu biofilmu došlo na koreňoch všetkých transgénnych línií a taktiež u divokého typu.



Obrázok 23. Tvorba biofilmu na koreňoch rastlín *M.sativa* divokého typu RSY a transgénnych línii GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* na 5. deň po prenesení na Fahraeus médiu s *Enterobacter* sp. SA187. Pozorované v prechádzajúcom svetle (TL) a GFP kanály (GFP). Nasnímané pomocou mikroskopu Axio ZOOM.V16. Mierka 500  $\mu$ m.

Spomedzi troch transgénnych línii rástol najrýchlejšie koreňový systém rastlín *SIMKKi* (Obr. 24). Rastliny kultivované na inokulovanom médiu sa od kontrolných rastlín na neinokulovanom médiu v RP nelíšili. Na 6. deň bol RP u naočkovaných rastlín priemerne 1,83 a u kontrolných rastlín 1,79. Podobne, koreňový systém kontrolných rastlín divokého typu RSY rástol približne rovnako rýchlo ako koreňový systém inokulovaných rastlín, pričom RP kontrolných rastlín na 6 deň bol 1,57 a RP inokulovaných rastlín bol 1,53. U transgénej línie *SIMKi* a GFP-SIMK sa naopak predlžoval rýchlejšie koreňový systém kontrolných rastlín (RP = 1,73 u *SIMKi* a 1,65 u GFP-SIMK) než inokulovaných rastlín (RP = 1,53 u *SIMKi* aj GFP-SIMK). Ani u jednej línie však rozdiely v RP neboli štatisticky preukazné.



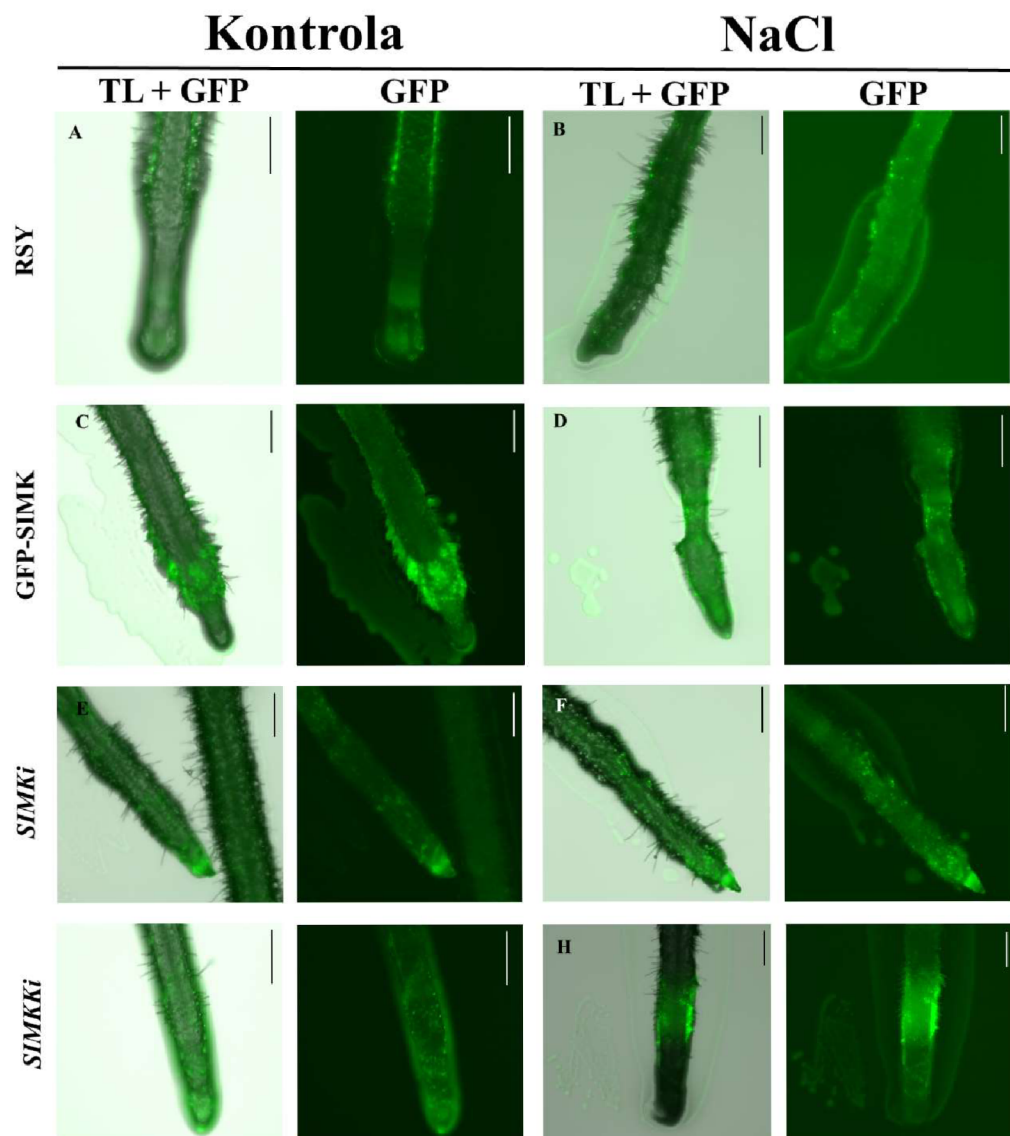


Obrázok 24. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému rastlín divokého typu RSY a transgénnych rastlín *SIMKi*, *SIMKKi* a GFP-SIMK na 3. a 6. deň po prenesení na médium obsahujúce *Enterobacter* sp. SA187.

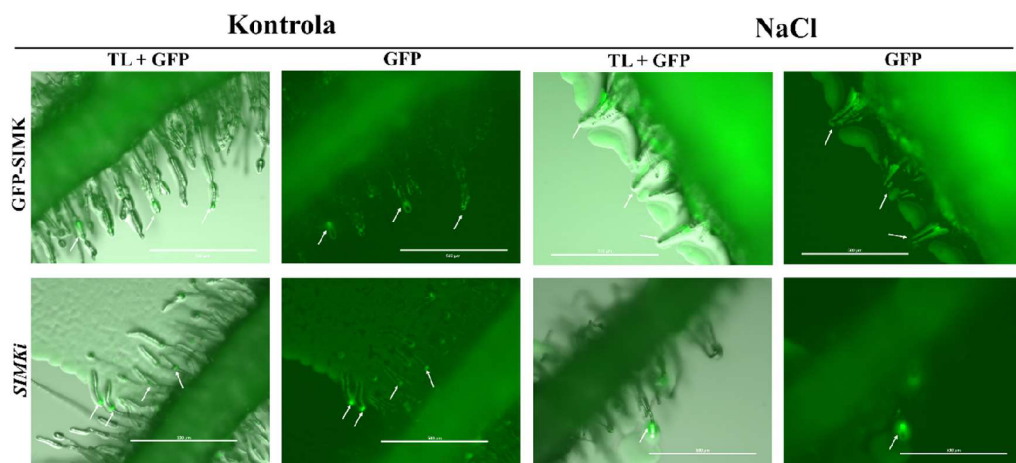
Po šiestich dňoch boli rastliny prenesené na nové Fahraeus médium. Polovica rastlín bola prenesená na čisté Fahraeus médium a druhá časť rastlín bola prenesená na Fahraeus médium obsahujúce 100 mM NaCl. Koreňový systém rastlín bol skenovaný ihneď po prenesení na nové médium (0 DAT) a potom na 2., 6., 12. a 14. deň po prenesení.

Prítomnosť baktérií a biofilmu na povrchu koreňov bola mikroskopicky pozorovaná aj po prenesení rastlín na nové Fahraeus médium. Na 12. deň od prenosu bolo u všetkých línii pozorované zväčšovanie biofilmu spolu s rastom koreňov (Obr. 25). Medzi líniami neboli pozorované rozdiely v tvorbe biofilmu. K zväčšovaniu biofilmu dochádzalo ako u koreňov rastlín rastúcich na kontrolnom médiu, tak aj u rastlín na médiu s NaCl. U každej línie bola pozorovaná tvorba biofilmu aj na koreňových vláskoch rastúcich na kontrolnom médiu. Avšak iba u línie GFP-SIMK a *SIMKi* bola pozorovaná tvorba biofilmu na koreňových vláskoch rastlín rastúcich na médiu obsahujúcom NaCl (Obr. 26).



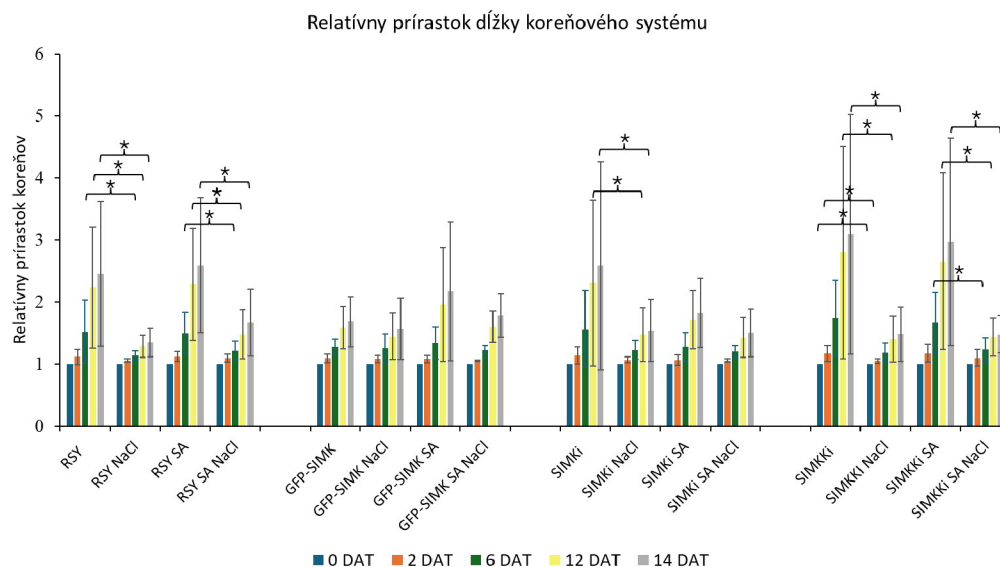


Obrázok 25. Tvorba biofilmu na koreňoch rastlín *M.sativa* divokého typu RSY a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMK<sup>i</sup>* a *SIMK<sup>Ki</sup>* na 12. deň po prenesení na médium s alebo bez 100 mM NaCl. Pozorované v prechádzajúcom svetle (TL) a GFP kanály (GFP). Nasnímané pomocou mikroskopu Axio ZOOM.V16. Mierka 500  $\mu$ m.



Obrázok 26. Tvorba biofilmu na koreňových vláskoch rastlín *M. sativa*, transgéennej línie GFP-SIMK, *SIMK1* 14. deň po prenesení na médium s alebo bez NaCl. Pozorované v transmisnom svetle (TL) a v GFP kanáli. Šípky ukazujú na biofilm. Nasnímané pomocou mikroskopu Axio ZOOM.V16. Mierka 500  $\mu$ m

Spomedzi štyroch línií rástol za kontrolných podmienok najrýchlejšie koreňový systém rastlín transgéennej línie *SIMKK1* (Obr. 27) a najpomalšie koreňový systém transgéennej línie GFP-SIMK. Na 14. deň bol RP u rastlín línie *SIMKK1* 3 a RP u rastlín línie GFP-SIMK 1,67. U línie *SIMK1*, *SIMKK1* a RSY prítomnosť NaCl v médiu výrazne znížila rast koreňového systému. U línie GFP-SIMK bol pozorovaný najmenší negatívny efekt soľného stresu na rast koreňov.



Obrázok 27. Graf relatívneho prírastku dĺžky koreňového systému rastlín divokého typu RSY a transgénnych línií *SIMKi*, *SIMKKi* a GFP-SIMK na 2., 6., 12. a 14. deň po prenesení na médium bez alebo s 100 mM NaCl. Hviezdička nad stĺpcami poukazuje na štatisticky preukazný rozdiel ( $p < 0,05$ ).

Koreňový systém inokulovaných rastlín RSY a GFP-SIMK rastúcich na kontrolnom médiu rástol oproti neinokulovaným rastlinám rýchlejšie. Na 14. deň činil RP rastlín rastúcich na kontrolnom médiu 2,44 u RSY a 1,67 u GFP-SIMK a u inokulovaných rastlín 2,58 u RSY a 2,16 u GFP-SIMK. U týchto línií taktiež prítomnosť *Enterobacter* sp. SA187 viedla k zníženiu negatívnych účinkov soľného stresu. Kontrolné rastliny RSY rastúce na médiu s NaCl mali priemerný RP na 14. deň 1,34 zatiaľ čo u inokulovaných rastlín bol RP 1,66. Koreňový systém u transgénnej línie GFP-SIMK sa predlžoval s priemerným RP na 14. deň pri kontrolných rastlinách 1,56 a pri naočkovaných rastlinách 1,77.

Koreňový systém rastlín *SIMKKi* rastúcich na kontrolnom médiu sa predlžoval podobne rýchlo ako koreňový systém inokulovaných rastlín (priemerný RP na 14. deň = 3,09 a 2,97). Rovnako RP rastlín *SIMKKi* rastúcich na médiu s NaCl bol rovnaký u inokulovaných a kontrolných rastlín (1,48).

Kontrolné rastliny *SIMKi* rastúce na médiu s NaCl sa od inokulovaných rastlín vo svojom prírastku takmer nelišili, s priemerným RP na 14 deň pri kontrolných rastlinách 1,54 a pri naočkovaných rastlinách 1,5. Koreňový systém kontrolných rastlín rastúcich na médiu bez NaCl rástol rýchlejšie (RP = 2,59) ako koreňový systém inokulovaných rastlín (priemerný RP = 1,82). Štatisticky preukazné rozdiely boli pozorované medzi

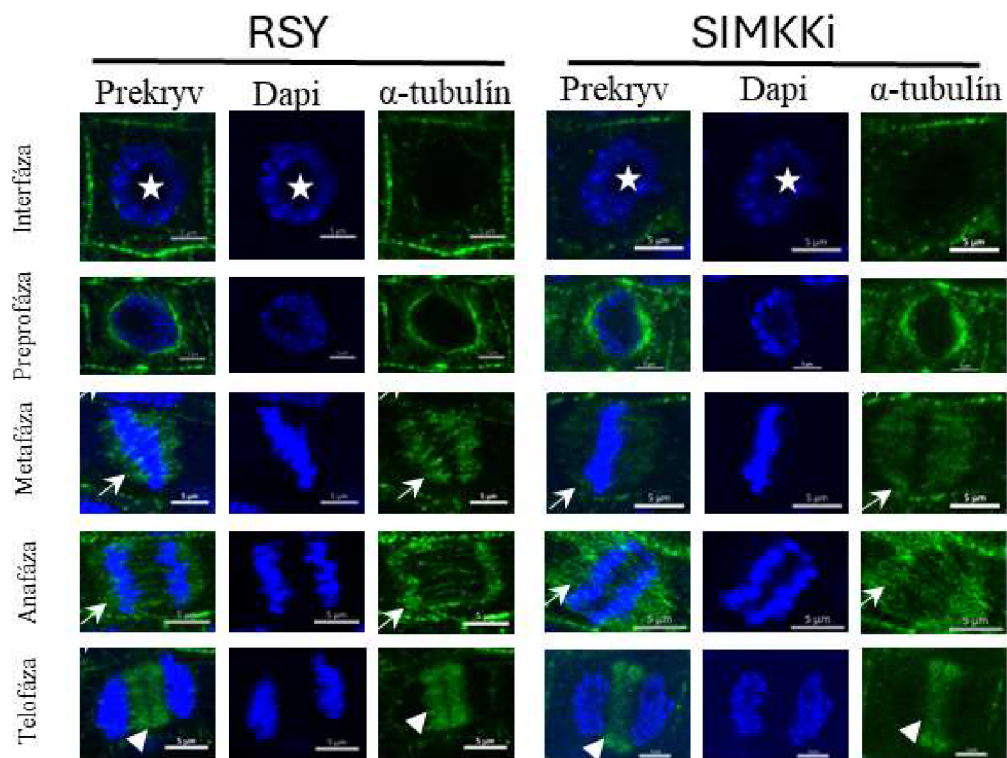
rastlinami RSY, *SIMKi* a *SIMKKi* rastúcimi na médiu bez soli a tými ktoré rástli na médiu s NaCl.

Oproti prvému experimentu neboli pozorované výrazné zmeny v dynamike rýchlosti rastu koreňového systému. V prvom experimente však mali rastliny na začiatku dlhšie korene. Po 7. dni koreňový systém dosiahol dno Petriho misky a nebolo tak možné pokračovať v meraní jeho dĺžky.

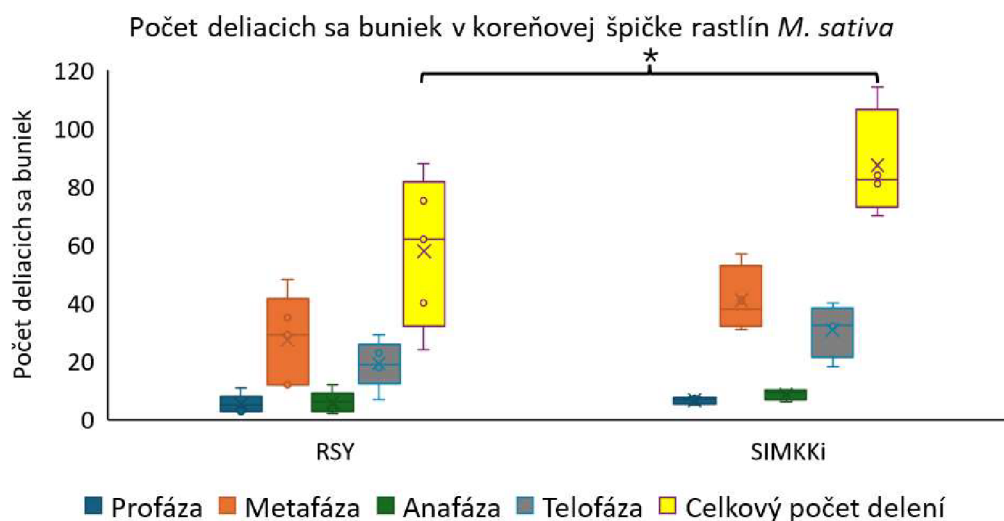
#### **4.7 Analýza bunkového cyklu v koreňoch rastlín divokého typu a transgénnej línie *SIMKKi***

Pre analýzu bunkového cyklu u rastlín divokého typu RSY a u transgénnej línie *SIMKKi* boli použité koreňové špičky, ktoré boli po odobraní ihneď zafixované a následne značené pomocou imunolokalizačnej metódy whole mount. DNA bola v preparátoch vizualizovaná pomocou fluorescenčného farbiva DAPI, zatiaľ čo mikrotubuly boli vizualizované pomocou primárnej anti- $\alpha$ -tubulínovej a sekundárnej Alexafluor 546 protilátky.

U vzoriek koreňov bol analyzovaný počet buniek v jednotlivých fázach mitotického delenia v meristematickej oblasti (Obr. 28). Výsledné dáta boli spracované v programe Microsoft Excel a vložené do grafu (Obr. 29). Väčší počet deliacich sa buniek bol pozorovaný u transgénnej línie *SIMKKi*. U rastlín divokého typu bolo priemerne 57 deliacich sa buniek v koreňovom meristeme, zatiaľ čo u transgénnej línie *SIMKKi* bolo priemerne pozorovaných 74 deliacich sa buniek. U oboch línií bolo najviac buniek v metafáze bunkového delenia, pričom u línie RSY bolo v metafáze zaznamenaných priemerne 27 buniek a u línie *SIMKKi* 35 buniek na koreňový meristém. Druhou najčastejšie vyskytujúcou sa fázou delenia buniek koreňových meristémov bola telofáza. V telofáze bolo pozorovaných priemerne 19 buniek u divokého typu RSY a 25 buniek u transgénnej línie *SIMKKi*. Z pozorovaných výsledkov však bol štatisticky preukazný len rozdiel v celkovom počte deliacich sa buniek.



Obrázok 28. Imunolokalizácia mikrotubul v interfáznych a deliacich sa meristematických bunkách u *M. sativa* divokého typu RSY a transgéennej línie *SIMKKi* v kontrolných podmienkach. Šípka ukazuje na deliace vretienko, hviezdička ukazuje jadierko, hrot šípky ukazuje na fragmoplast. Nasnímané pomocou CLSM 710 mikroskopu. Mierka 5  $\mu$ m.



Obrázok 29. Krabicový graf počtu jednotlivých fáz mitózy (profáza, metafáza, anafáza, telofáza) a celkového počtu deliacich sa buniek v koreňovej špičke rastlín divokého typu RSY a transgéenných rastlín *SIMKKi*. Hviezdička nad krabicami indukuje štatistickú preukaznosť  $p < 0,05$ .

#### 4.8 Analýza orientácie kortikálnych mikrotubulov po aplikácii *Enterobacter* sp. SA187

Pre analýzu orientácie MT u všetkých línii, boli odobrané koreňové špičky pred ošetrením a po 1 a 2 hodinách po aplikácii bakteriálnej suspenznej kultúry *Enterobacter* sp. SA187 alebo tekutého Fahraeus média (mokrú kontrolu). Odobrané špičky boli zafixované a následne farbené pomocou whole mount metódy. Pre vizualizáciu MT bola použitá primárna protilátka proti  $\alpha$ -tubulínu a sekundárna protilátka AlexaFluor značená zeleným alebo červeným fluorescenčným farbivom. Na meranie priemernej orientácie MT bol použitý program CytoSpectre. Výsledné hodnoty boli vložené do ružicových grafov pomocou programu Oriana.

Kontrolné rastliny RSY a GFP-SIMK mali priemernú hodnotu orientácie mikrotubulov  $45^\circ$  (Obr. 30 A, B). Transgénne línie *SIMKi* a *SIMKKi* mali rozdielnu priemernú hodnotu orientácie MT, a to  $65^\circ$  u línie *SIMKi* a  $16,26^\circ$  u línie *SIMKKi* (Obr. 36 C, D).

Medzi kontrolnými a inokulovanými rastlinami RSY boli pozorované rozdiely v orientácii kortikálnych MT po 1 hodine od aplikácie (Obr. 31 A, B). Rastliny ošetrené čistým Fahraeus médiom mali nižšiu priemernú hodnotu orientácie ( $16,9^\circ$ ) ako rastliny ošetrené baktériami ( $41^\circ$ ) (Obr. 31 A, B). Po dvoch hodinách od aplikácie neboli pozorované výrazné rozdiely v priemernej orientácii MT medzi kontrolnými ( $22,83^\circ$ ) a inokulovanými koreňmi ( $21,12^\circ$ ). Oproti neošetreným kontrolným RSY rastlinám (suchá kontrola; Obr. 30 A) bola pozorovaná nižšia priemerná orientácia MT po jednej hodine u mokrej kontroly a po 2 hodinách u mokrej kontroly a aj u rastlín ošetrených baktériami (Obr. 31).

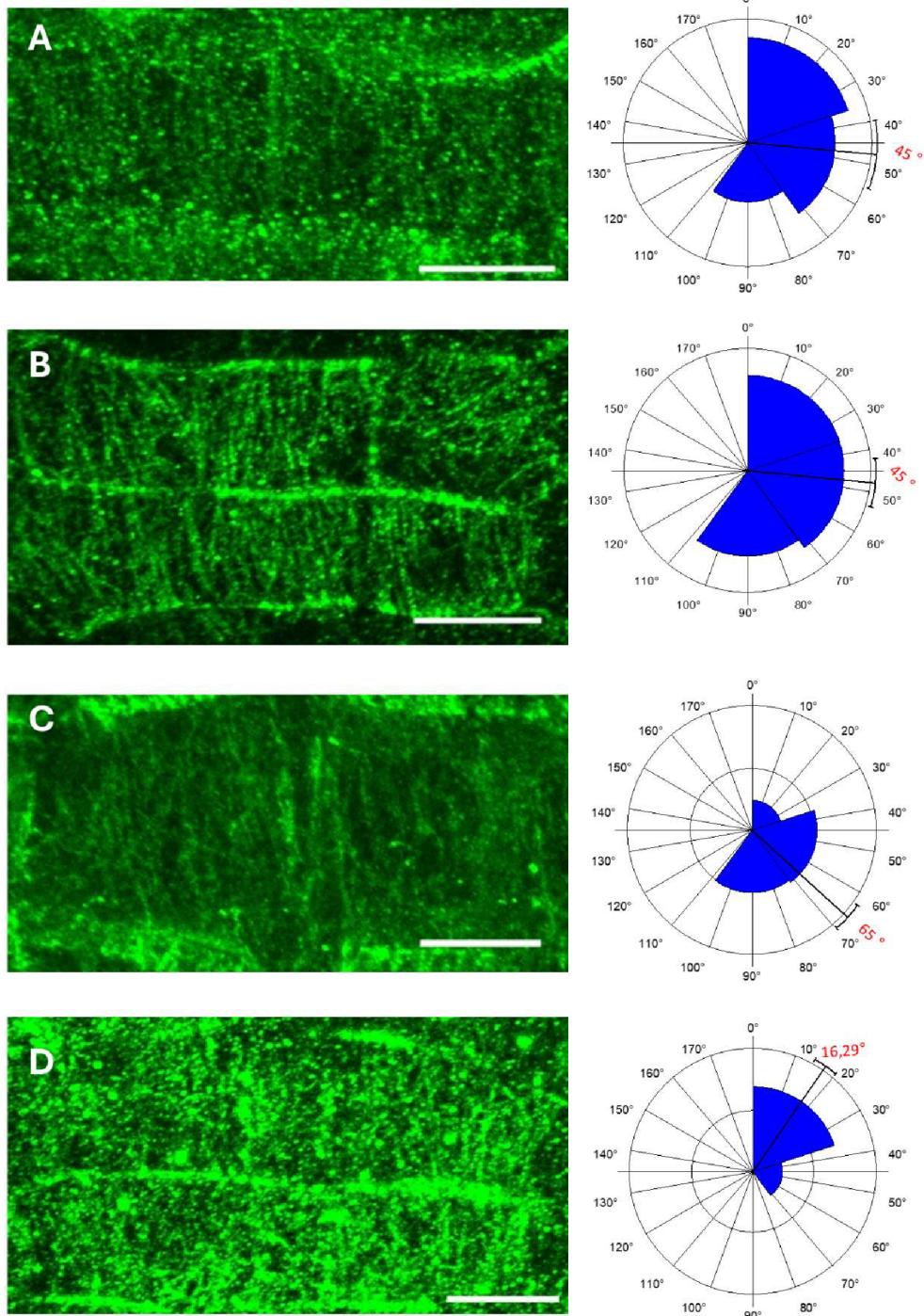
U transgénnej línie GFP-SIMK bola priemerná hodnota orientácie MT po 1 ale aj po 2 hodinách od ošetrenia vyššia u rastlín ošetrených baktériami ako u kontrolných rastlín ošetrených Fahraeus médiom (Obr. 32). Priemerná hodnota mokrej kontroly po 1 hodine je  $18^\circ$ , po ošetrení baktériami  $49^\circ$ . Po 2 hodinách bola priemerná hodnota orientácie MT u mokrej kontroly  $30,17^\circ$  a po ošetrení baktériami  $52,67^\circ$ . Najväčší rozdiel oproti suchej kontrole GFP-SIMK (Obr. 30 B) bol pozorovaný po 1 hodine u mokrej kontroly (Obr. 32 A).

U transgénnej línie *SIMKi* z dôvodu nedostatku vzoriek nebola vyhodnotená orientácia kortikálnych mikrotubulov po 1 hodine. Po dvoch hodinách od ošetrenia neboli

pozorované výrazné rozdiely v orientácii MT medzi mokrou kontrolou ( $54,57^\circ$ ) a rastlinami ošetrovanými baktériami ( $56,87^\circ$ ) (Obr. 33).

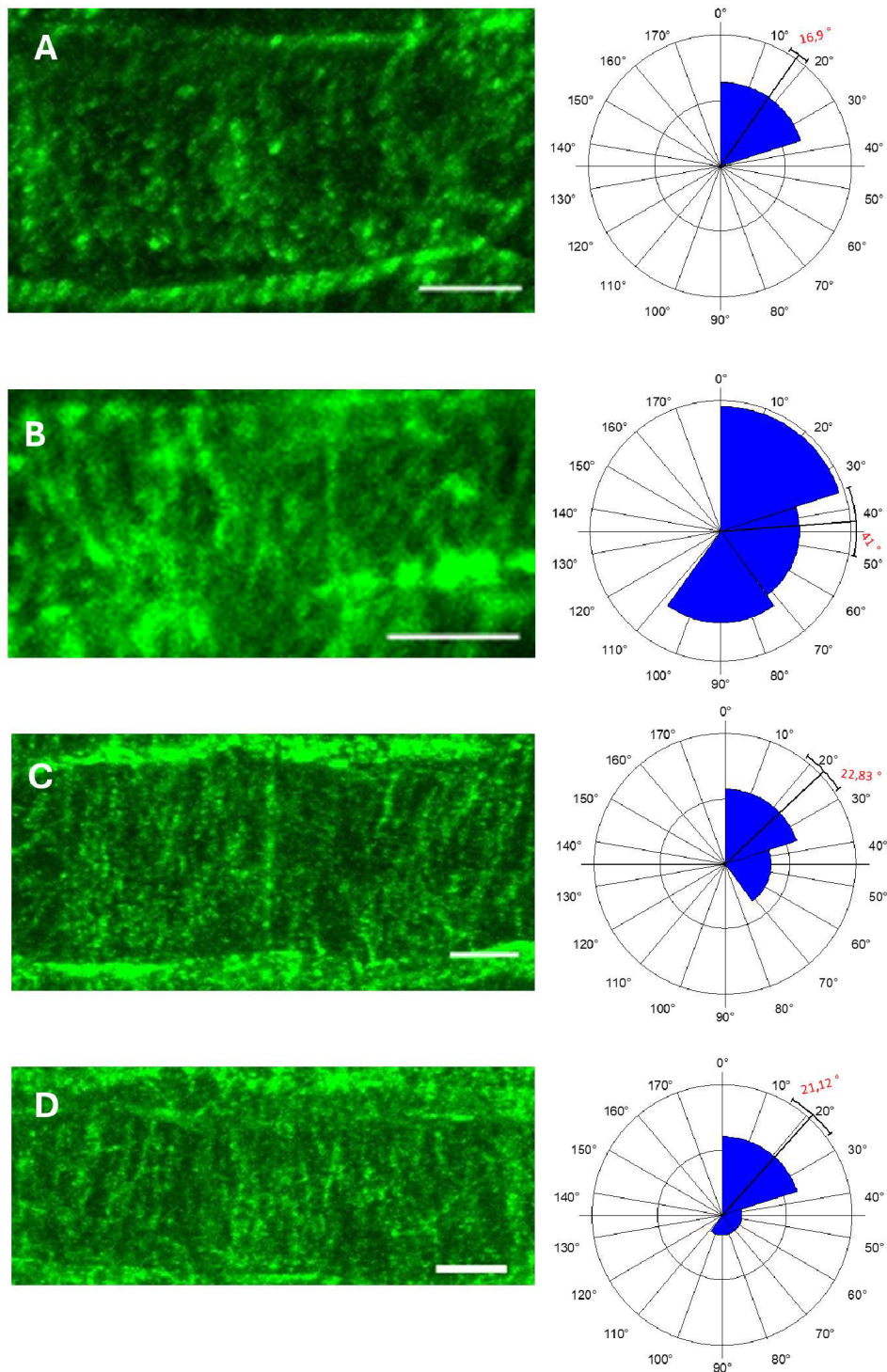
Priemerná hodnota orientácie MT u mokrej kontroly *SIMKKi* po 1 hodine bola  $5^\circ$ , zatiaľ čo u rastlín ošetrovaných baktériami dosiahla priemerná orientácia hodnotu  $56,11^\circ$  (Obr. 34). Rovnako po dvoch hodinách mali rastliny ošetrované baktériami vyššiu priemernú hodnotu orientácie MT ( $66^\circ$ ) ako mokrá kontrola ( $11^\circ$ ).



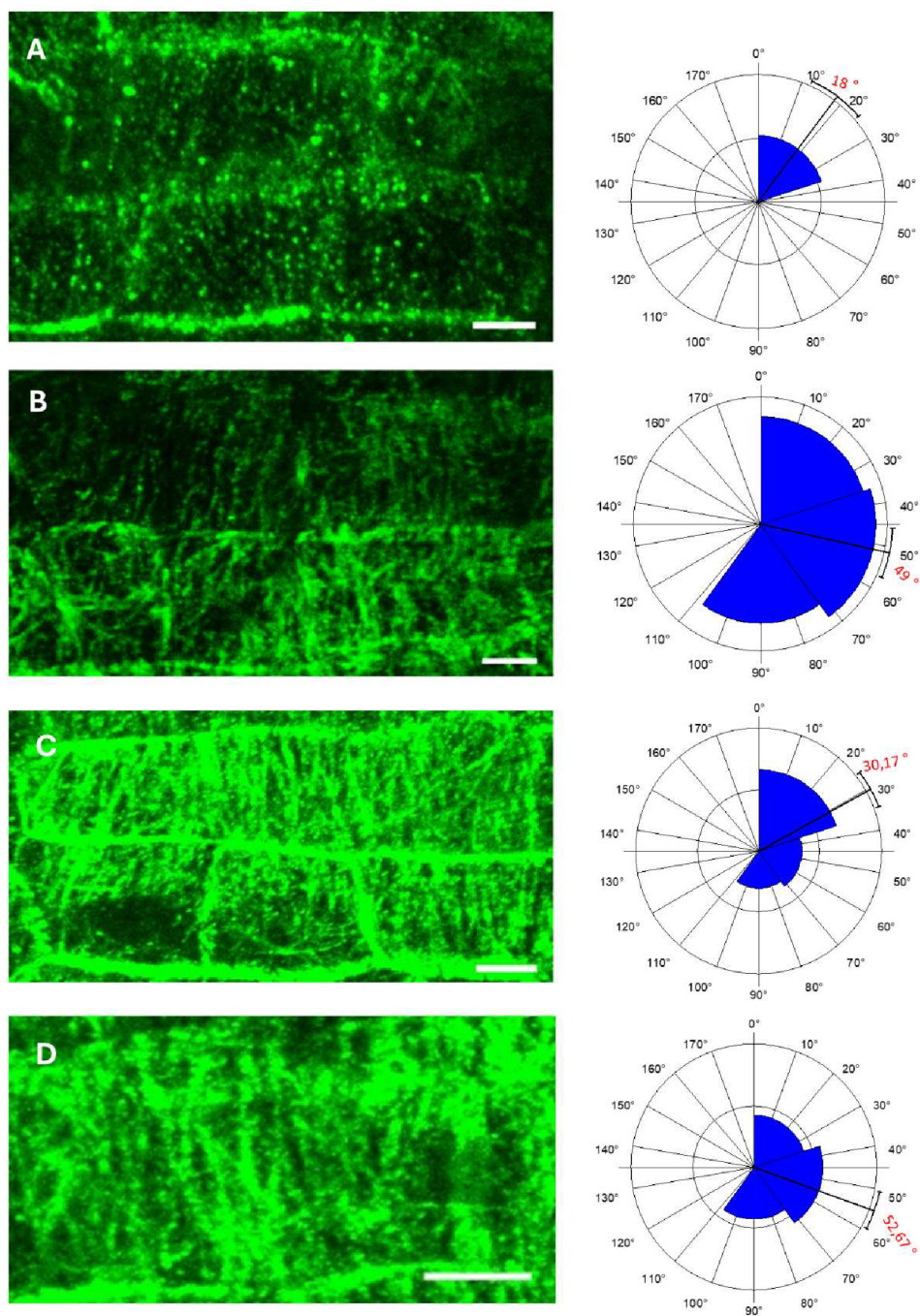


Obrázok 30. Usporiadanie kortikálnych MT a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách suchých kontrol *M. sativa* divokého typu RSY a transgénnych línii GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi*. A – RSY; B – GFP-SIMK; C – *SIMKi*; D – *SIMKKi*. Priemerný uhol orientácie MT (červeno): RSY – 45 °, GFP-SIMK – 45 °, *SIMKi* – 65 °, *SIMKKi* – 16,29 °. Mierka 10  $\mu$ m.

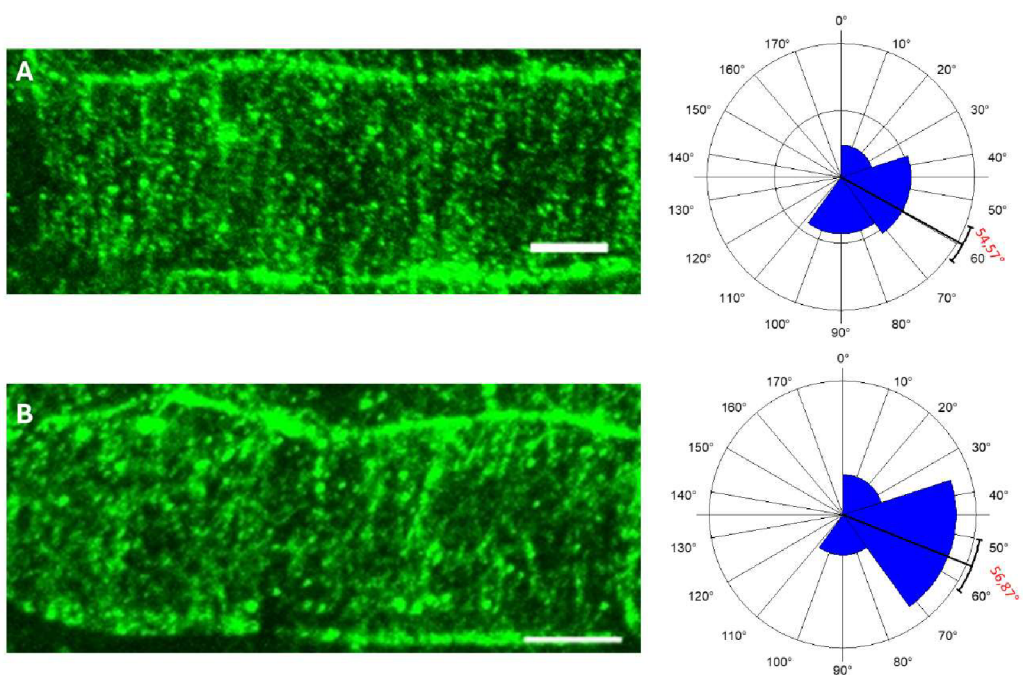




Obrázok 31. Usporiadanie kortikálnych MT a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* divokého typu RSY po 1 a 2 hodinách od ošetrenia čistým Fahraeus médiom alebo bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. A – 1 h RSY kontrola; B – 1h RSY SA187; C – 2 h RSY kontrola; D– 2 h RSY SA187. Priemerný uhol orientácie MT (červeno) 1h RSY kontrola – 16,9 °, 1 h RSY SA187 – 41°, 2 h RSY kontrola – 22,83°, 2h RSY SA187 – 21,12°. Mierka 5  $\mu$ m.

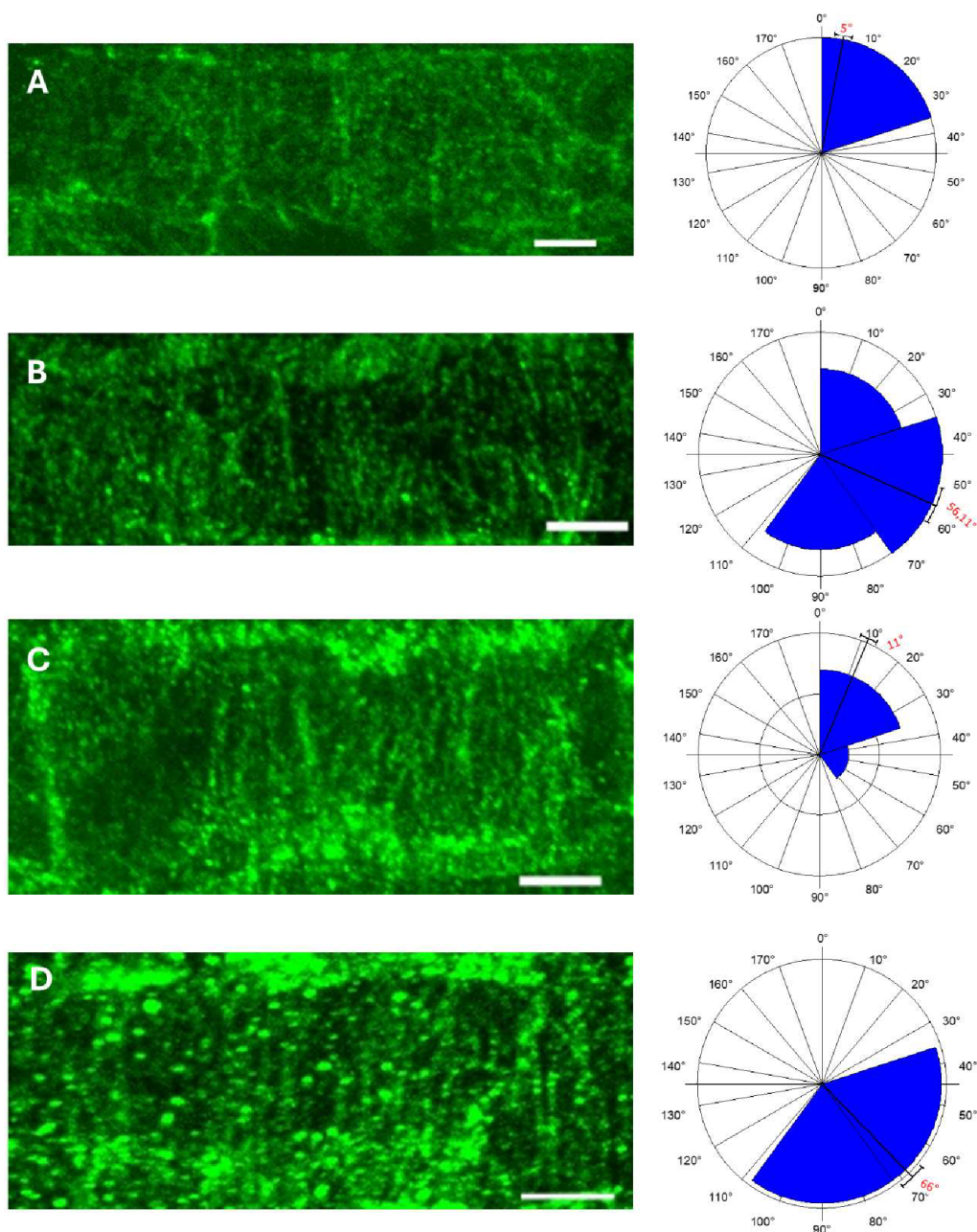


Obrázok 32. Usporiadanie kortikálnych MT a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* transgéennej línie GFP-SIMK po 1 a 2 hodinách od ošetrenia čistým Fahraeus médiom alebo bakteriálnou suspenziou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 . A – 1 h GFP-SIMK kontrola; B – 1h GFP-SIMK SA187; C – 2 h GFP-SIMK kontrola; D– 2 h GFP-SIMK SA187. Priemerný uhol orientácie MT (červeno) 1h GFP-SIMK kontrola – 18 °, 1 h GFP-SIMK SA187 – 49°, 2 h GFP-SIMK kontrola – 30,17°, 2h GFP-SIMK SA187 – 52,67°. Mierka 5 µm.



Obrázok 33. Usporiadanie kortikálnych MT a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* transgénnej línie *SIMKi* po 2 hodinách od ošetrenia čistým Fahraeus médiom alebo bakteriálnou suspenziou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. A – 2 h *SIMKi* kontrola; B – 2h *SIMKi* SA187. Priemerný uhol orientácie MT (červeno) 2 h *SIMKi* kontrola 54,57°, 2h *SIMKi* SA187 56,87°. Mierka 5  $\mu$ m.





Obrázok 34. Usporiadanie kortikálnych MT a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* transgénej línie *SIMKKi* po 1 a 2 hodinách od ošetrenia čistým Fahraeus médiom alebo bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. 1 . A – 1 h *SIMKKi* kontrola; B – 1h *SIMKKi* SA187; C – 2 h *SIMKKi* kontrola; D– 2 h *SIMKKi* SA187. Priemerný uhol orientácie MT (červeno) 1h *SIMKKi* kontrola – 5°, 1 h *SIMKKi* SA187 – 56,11°, 2 h *SIMKKi* kontrola – 11°, 2h *SIMKKi* SA187 – 66°. Mierka 10  $\mu$ m.

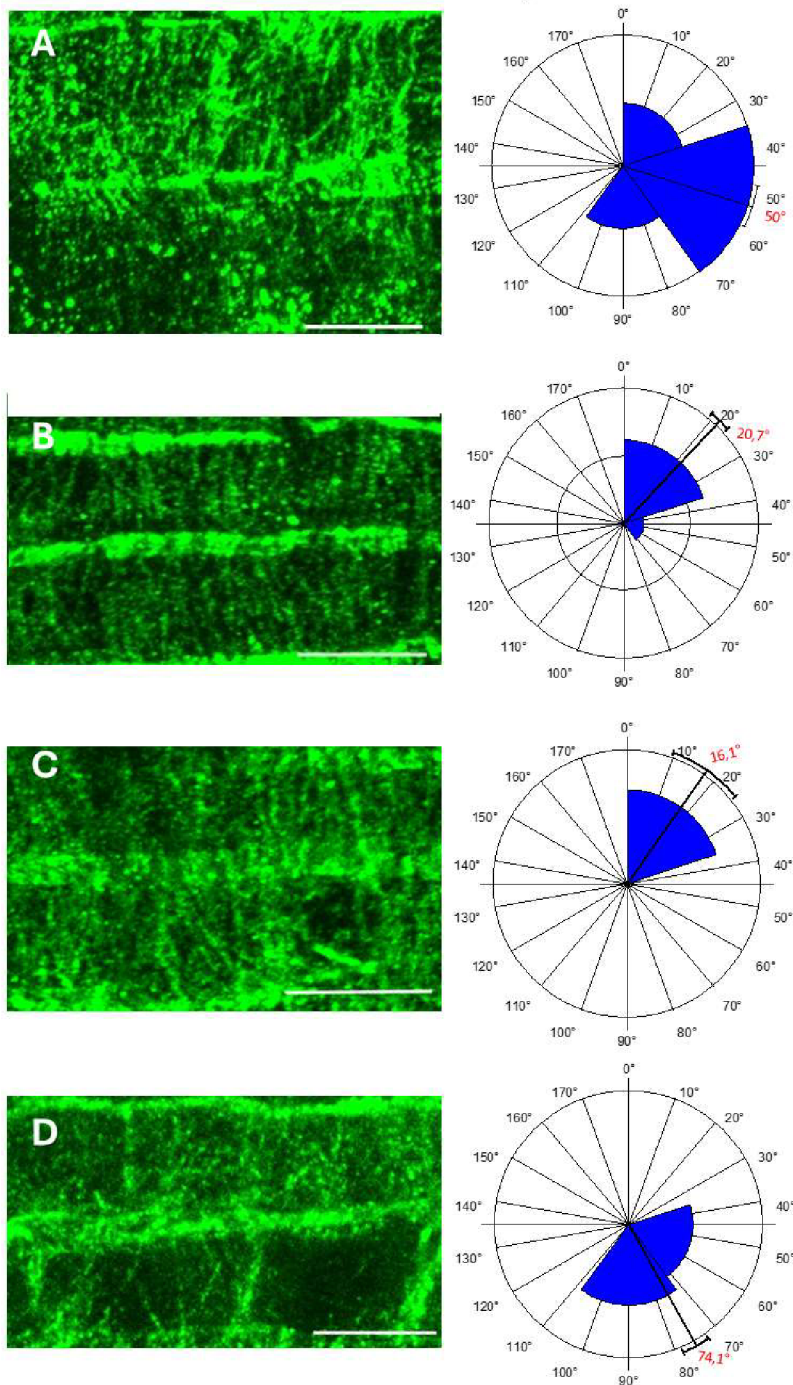
#### 4.9 Analýza orientácie kortikálnych mikrotubulov počas pôsobenia solného stresu

Na osemnásty deň od prenesenia na kontrolné médium alebo médium obsahujúce NaCl boli rastlinám z časti 4.6.2 odobrané koreňové špičky, ktoré boli ihneď zafixované. Následne boli MT značené pomocou imunohistochemickej metódy whole mount pomocou primárnej protilátky proti  $\alpha$ -tubulínu a sekundárnej protilátky AlexaFluor označenej zelenou alebo červenou fluorescenčnou farbou. Orientácia MT bola stanovená pomocou programu Cytospectre a následne vložená do ružicových grafov v programe Oriana.

U línie RSY mali kontrolné rastliny rastúce na médiu bez soli priemernú orientáciu MT  $50^\circ$ , zatiaľ čo kontrolné rastliny rastúce na médiu s NaCl (RSY NaCl) mali orientáciu MT  $20,7^\circ$  (Obr. 35 A, B). Priemerná orientácia mikrotubulov rastlín inokulovaných *Enterobacter* sp. SA187 rastúcich na kontrolnom médiu (RSY SA) bola menšia  $16,1^\circ$  ako orientácia inokulovaných rastlín rastúcich na médiu obsahujúcom NaCl, kde táto hodnota bola  $74,1^\circ$  (Obr. 35 C, D).

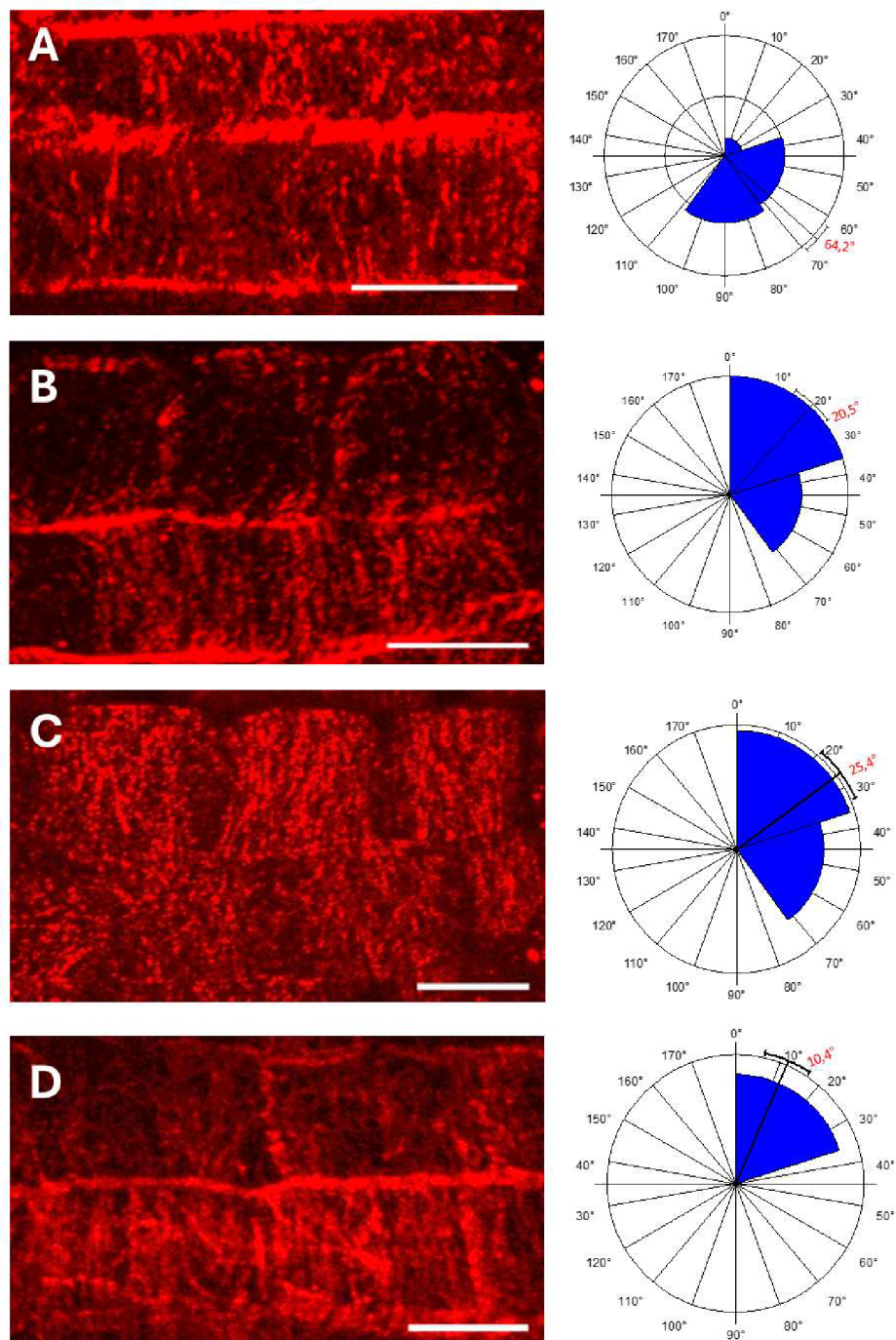
Kontrolné rastliny transgéennej línie GFP-SIMK rastúce na médiu bez NaCl mali väčšiu hodnotu priemernej orientácie MT ako kontrolné rastliny rastúce na médiu obsahujúcom NaCl (Obr. 36 A, B). Priemerná hodnota orientácie MT u rastlín rastúcich na médiu bez soli bola  $64,2^\circ$  a u rastlín rastúcich na médiu s NaCl  $20,5^\circ$ . Inokulované rastliny GFP-SIMK (GFP-SIMK SA) rastúce na kontrolnom médiu mali priemernú hodnotu orientácie MT  $25,4^\circ$  a inokulované rastliny GFP-SIMK rastúce na médiu obsahujúcom NaCl mali priemernú hodnotu orientácie MT  $10,4^\circ$  (Obr. 36 C, D).

Kontrolné rastliny transgéennej línie *SIMKKi* rastúce na médiu bez soli mali nižšiu hodnotu priemernej orientácie MT ( $45,8^\circ$ ) ako kontrolné rastliny rastúce na médiu s NaCl (*SIMKKi* NaCl,  $60^\circ$ ) (Obr. 37 A, B). Naopak u rastlín inokulovaných *Enterobacter* sp. SA187 bola pozorovaná vyššia hodnota orientácie MT u rastlín rastúcich na médiu bez soli (*SIMKKi* SA) (Obr. 37 C, D). Priemerná hodnota u rastlín *SIMKKi* SA bola  $67,5^\circ$  a u inokulovaných rastlín rastúcich na médiu so soľou (*SIMKKi* SA + NaCl)  $36,5^\circ$ .

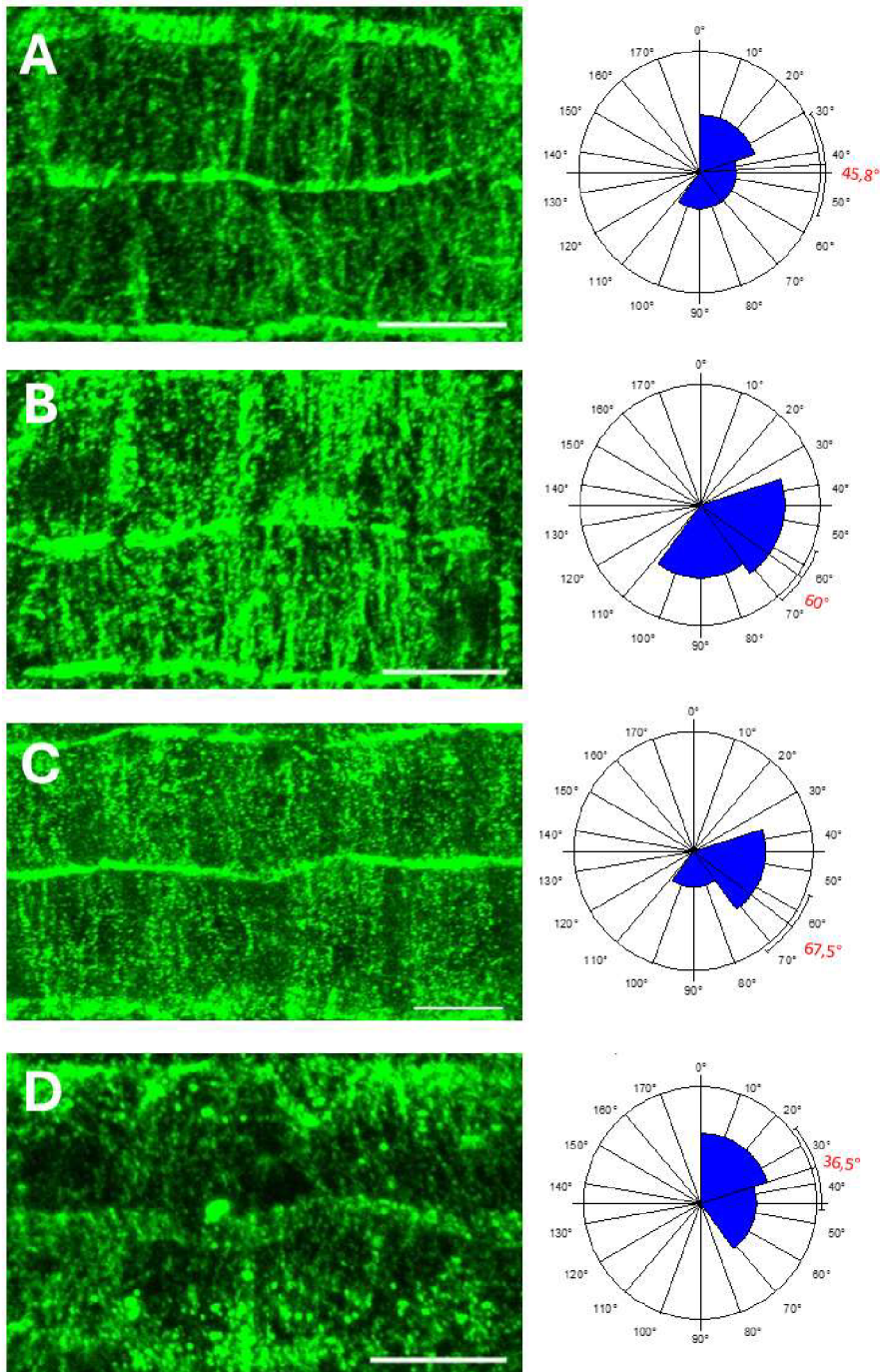


Obrázok 35. Usporiadanie kortikálnych mikrotubulov a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* divokého typu RSY kultivovaných na čistých alebo s *Enterobacter* sp. SA187 inokulovaných médiách po 18 dňoch od preloženia na médium obsahujúce NaCl. A – RSY kontrola; B – RSY NaCl; C – RSY SA187; D – RSY SA187 + NaCl. Priemerná hodnota orientácie mikrotubulov (červenou) RSY kontrola – 50°, RSY NaCl – 20,7°, RSY SA187 – 16,1°, RSY SA187 + NaCl – 74,1°. Mierka 10  $\mu$ m.





Obrázok 36. Usporiadanie kortikálnych mikrotubulov a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* transgénnej línie GFP-SIMK kultivovaných na čistých alebo *Enterobacter* sp. SA187 inokulovaných médiách po 18 dňoch od preloženia na médium obsahujúce NaCl. A – GFP-SIMK kontrola; B – GFP-SIMK NaCl; C – GFP-SIMK SA; D – GFP-SIMK SA + NaCl. Priemerná hodnota orientácie mikrotubulov (červenou) GFP-SIMK kontrola – 64,2°, GFP-SIMK NaCl – 20,5°, GFP-SIMK SA – 25,4°, GFP-SIMK SA + NaCl – 10,4°. Mierka 10  $\mu$ m.



Obrázok 37. Usporiadanie kortikálnych mikrotubulov a ružicový graf zobrazujúci orientáciu a rozloženie uhlov kortikálnych mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách *M. sativa* transgéennej línie *SIMKKi* kultivovaných na čistých alebo s *Enterobacter* sp. SA187 inokulovaných médiách po 18 dňoch od preloženia na médium obsahujúce NaCl. A – *SIMKKi* kontrola; B – *SIMKKi* NaCl; C – *SIMKKi* SA; D – *SIMKKi* SA + NaCl. Priemerná hodnota orientácie mikrotubulov (červenou) *SIMKKi* kontrola – 45,8°, *SIMKKi* NaCl – 60°, *SIMKKi* SA – 67,5°, *SIMKKi* SA NaCl – 36,5°. Mierka 10  $\mu$ m.



#### 4.10 Vplyv *Enterobacter* sp. SA187 na lokalizáciu SIMK a fosforylovaných MAPK u *M. sativa*

Na imunolokalizáciu SIMK a fosforylovaných MAPK boli použité koreňové špičky *M. sativa* divokého typu RSY a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* (Obr. 38). Na korene rastlín bola aplikovaná bakteriálna suspenzná kultúra *Enterobacter* sp. SA187 alebo čisté Fahraeus médium. Koreňové špičky boli odobrané pred aplikáciou a 1 a 2 hodiny po aplikácii baktérií.

Hneď po odobraní boli koreňové špičky zašixované a značené pomocou whole mount metódy. Lokalizácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom primárnych protilátok voči daným proteínom a sekundárnym protilátok s naviazanými fluoroformi Alexa Fluor. Fosforylované MAPK („pERK“) boli lokalizované pomocou kozej sekundárnej protilátky so žltým fluoroforom. SIMK bola vizualizovaná buď kozou sekundárnou protilátkou značenou červeným fluoroforom alebo kozou sekundárnou protilátkou značenou zeleným fluoroforom. Jadrá boli zafarbené modrým fluorescenčným farbivom DAPI.

U rastlín divokého typu RSY bol za kontrolných podmienok pozorovaný rovnaký signál SIMK v jadre aj v cytoplazme buniek (Obr. 38, 39). U transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* bola nameraná vyššia intenzita fluorescencie SIMK v cytoplazme buniek (Obr. 40-42). V jadierku bol u všetkých línií pozorovaný len minimálny signál (Obr. 38-42).

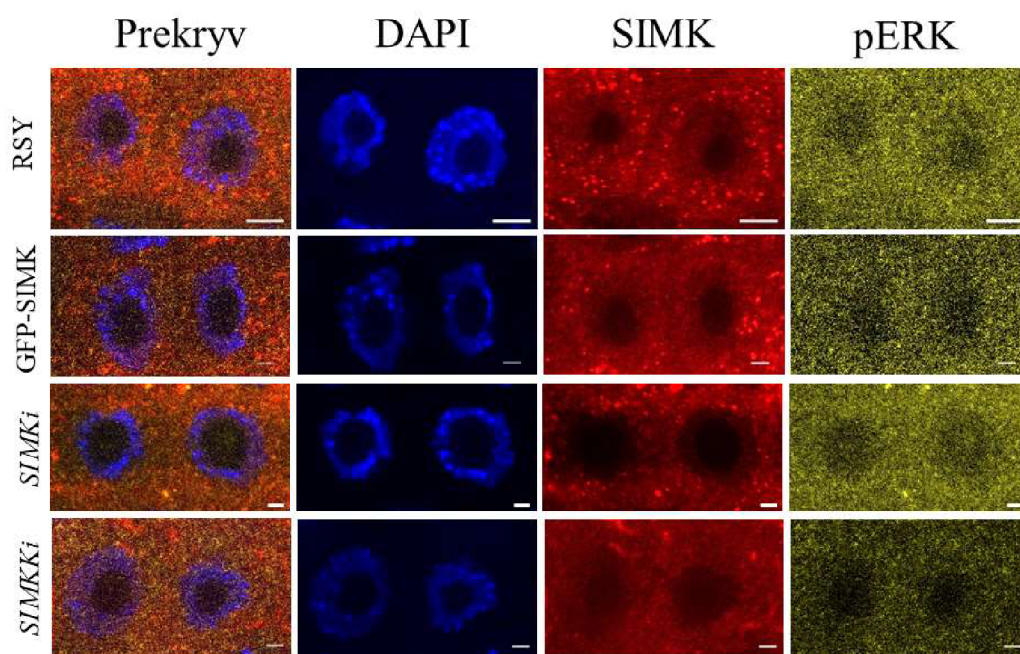
U línie RSY bola po 1 aj 2 hodinách od aplikácie u kontrolných tak aj u ošetrovaných rastlín pozorovaná vyššia intenzita signálu SIMK v cytoplazme buniek (Obr. 43). pERK po hodine od ošetrenia vykazovala oproti SIMK oveľa nižšiu intenzitu fluorescencie. Po dvoch hodinách od ošetrenia u kontrolných ale aj u ošetrovaných rastlín nebol zaznamenaný významný rozdiel medzi intenzitou signálu SIMK a pERK. Taktiež po dvoch hodinách od ošetrenia bol pozorovaný takmer rovnaký profil fluorescenčného signálu SIMK a pERK.

U línie GFP-SIMK bola SIMK u všetkých vzoriek lokalizovaná hlavne v cytoplazme buniek (Obr. 44). Najväčší rozdiel v intenzite fluorescenčného signálu SIMK medzi jadrami a cytoplazmou bol po 1 hodine od ošetrenia bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187. Po jednej hodine bol u kontrolných aj ošetrovaných vzoriek signál

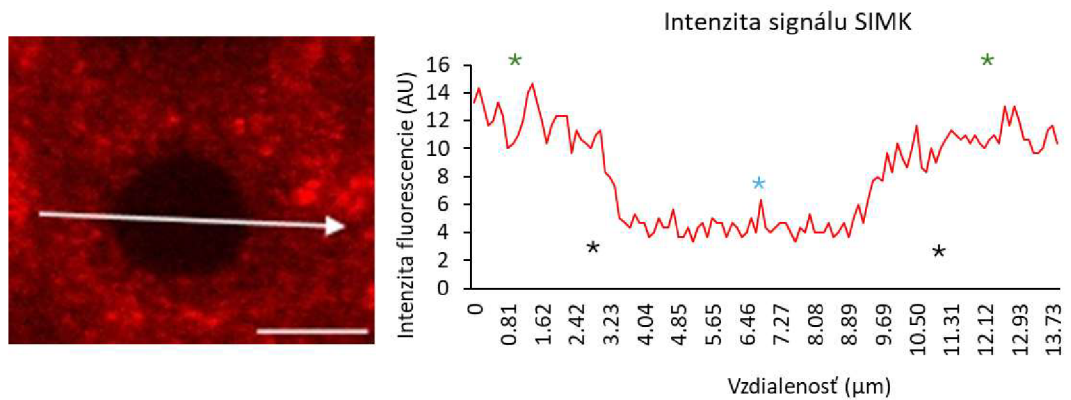
pERK v porovnaní so SIMK oveľa nižší. Po dvoch hodinách od ošetrenia vykazovali SIMK a pERK podobnú mieru intenzity signálu.

U línie *SIMKi* sa SIMK vo všetkých vzorkách nachádzala prevažne v cytoplazme (Obr. 45). Po dvoch hodinách od ošetrenia bol pozorovaný rovnaký profil intenzity fluorescencie SIMK s pERK ako u kontrolných tak aj u inokulovaných rastlín.

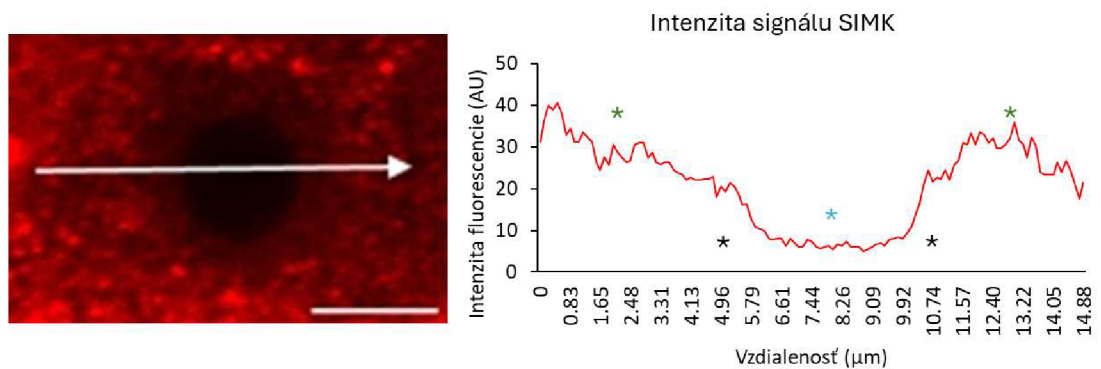
U línie *SIMKKi* bola po 1 hodine od ošetrenia u kontrolných rastlín pozorovaná rovnaká intenzita fluorescenčného signálu v jadre aj v cytoplazme (Obr. 46). V ostatných prípadoch sa viac SIMK nachádzalo v cytoplazme. Po jednej hodine od ošetrenia u inokulovaných rastlín a 2 hodinách od ošetrenia u kontrolných rastlín bola zaznamenaná podobná miera intenzity signálu SIMK a pERK.



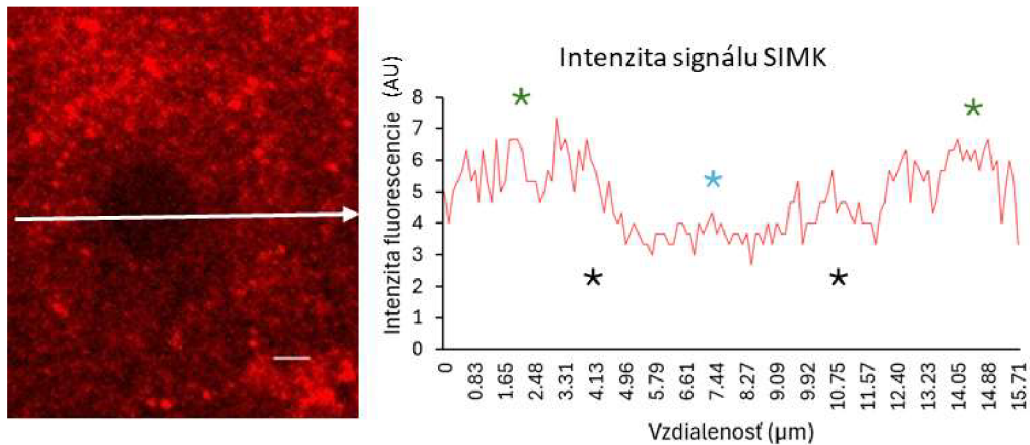
Obrázok 38. Imunolokalizácia SIMK a fosforylovaných MAPK (pERK) v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M. sativa* divého typu RSY a transgénnych rastlín GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* za kontrolných podmienok. Nasnímané pomocou CLSM 710. Mierka 5  $\mu\text{m}$  (RSY), 2  $\mu\text{m}$  (GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi*).



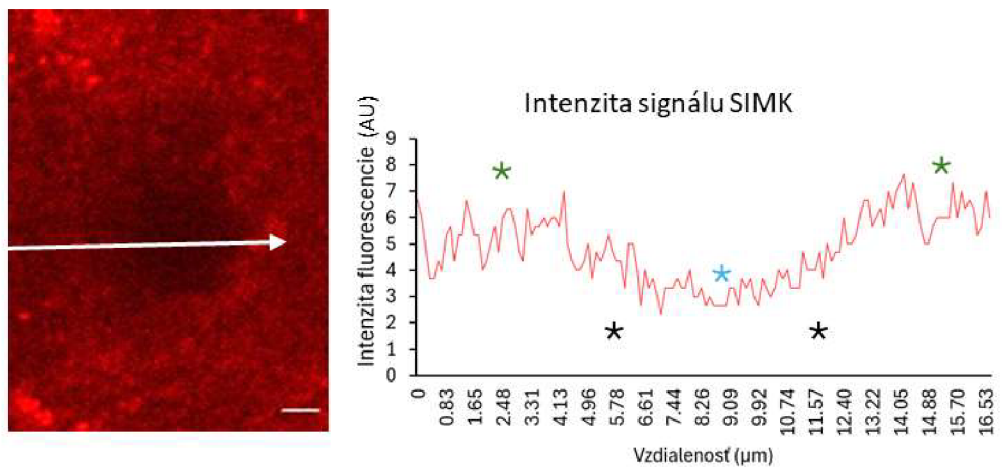
Obrázok 39. Meranie intenzity fluorescenčného signálu SIMK v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M.sativa* divokého typu RSY za kontrolných podmienok. Biela šípka ukazuje meranú oblasť. Modrá hviezdička (\*) ukazuje oblasť jadierka, čierna hviezdička (\*) oblasť jadra a zelená hviezdička (\*) oblasť cytoplazmy. Mierka 5 µm



Obrázok 40. Meranie intenzity fluorescenčného signálu SIMK v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M.sativa* transgéennej línie GFP-SIMK za kontrolných podmienok. Biela šípka ukazuje meranú oblasť. Modrá hviezdička (\*) ukazuje oblasť jadierka, čierna hviezdička (\*) oblasť jadra a zelená hviezdička (\*) oblasť cytoplazmy. Mierka 5 µm



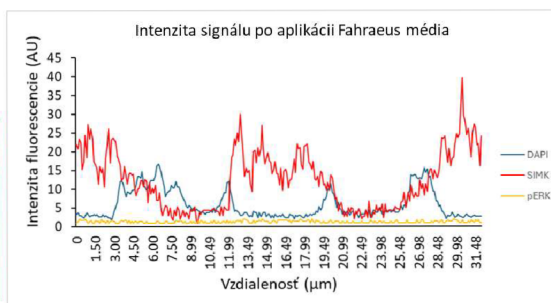
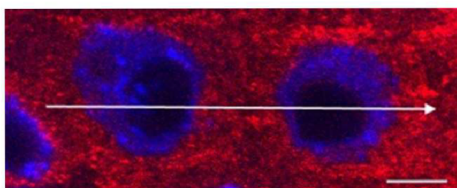
Obrázok 41. Meranie intenzity fluorescenčného signálu SIMK v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M.sativa* transgénnej línie *SIMKi* za kontrolných podmienok. Biela šípka ukazuje meranú oblasť. Modrá hviezdička (\*) ukazuje oblasť jadierka, čierna hviezdička (\*) oblasť jadra a zelená hviezdička (\*) oblasť cytoplazmy. Mierka 5 μm



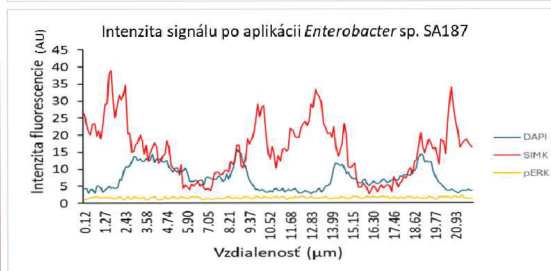
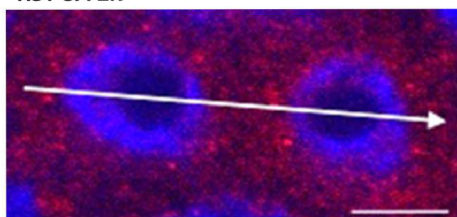
Obrázok 42. Meranie intenzity fluorescenčného signálu SIMK v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M.sativa* transgénnej línie *SIMKKi* za kontrolných podmienok. Biela šípka ukazuje meranú oblasť. Modrá hviezdička (\*) ukazuje oblasť jadierka, čierna hviezdička (\*) oblasť jadra a zelená hviezdička (\*) oblasť cytoplazmy. Mierka 5 μm



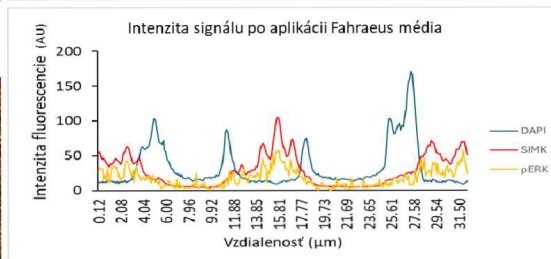
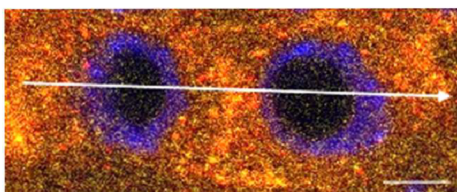
RSY kontrola 1h



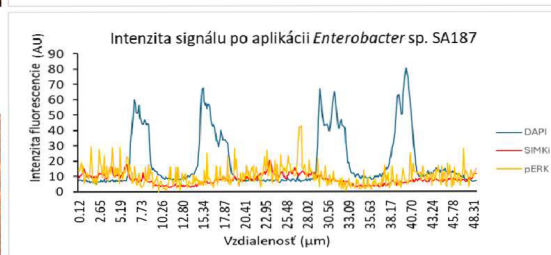
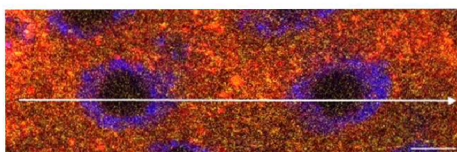
RSY SA 1h



RSY kontrola 2h

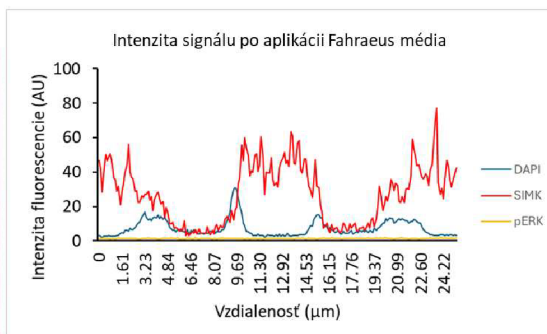
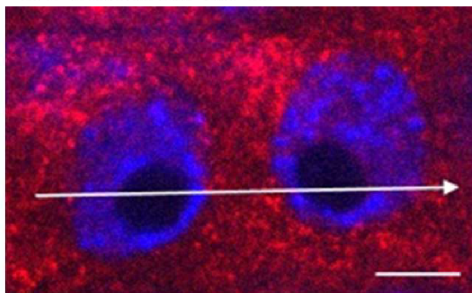


RSY SA 2h

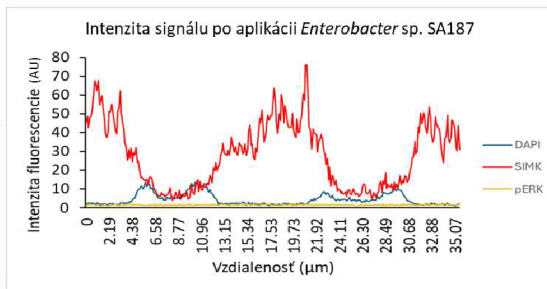
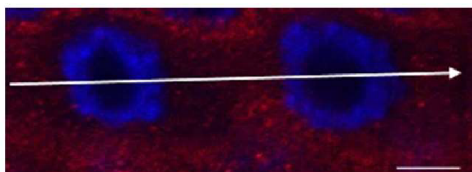


Obrázok 43. Intenzita fluorescenčného signálu SIMK, pERK a DAPI v epidermálnych meristematických bunkách koreňa rastlín divokého typu RSY po 1 a 2 hodinách od inokulácie čistým Fahraeus médiom alebo *Enterobacter* sp. SA187. Biela šípka ukazuje miesto merania signálu. Mierka 5  $\mu\text{m}$

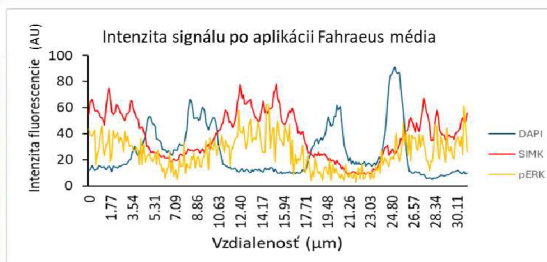
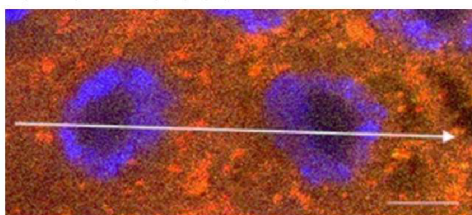
### GFP-SIMK kontrola 1h



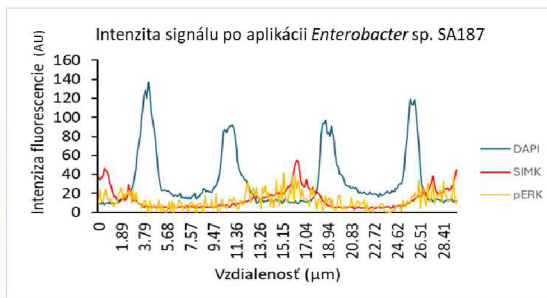
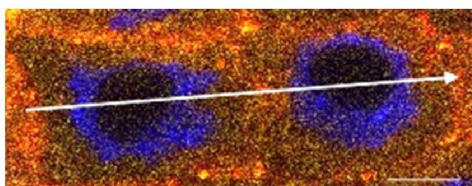
### GFP-SIMK SA 1h



### GFP-SIMK kontrola 2h

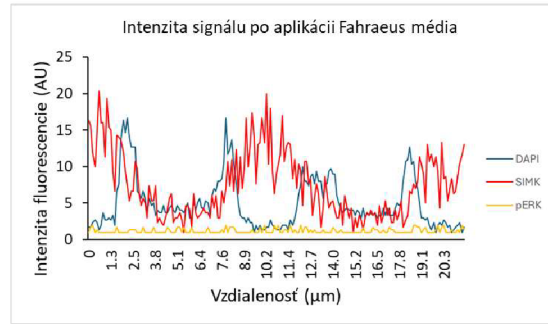
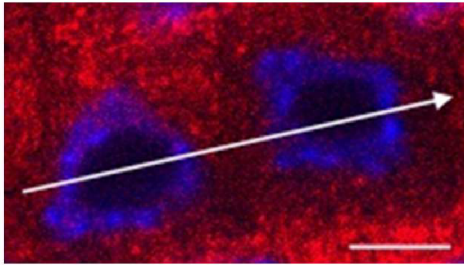


### GFP-SIMK SA 2h

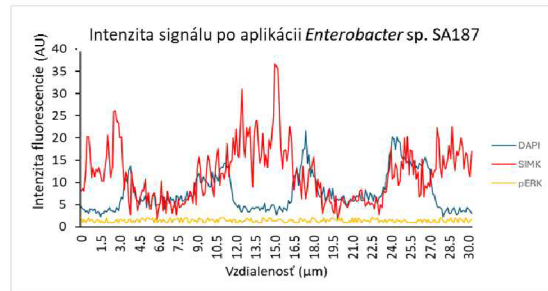
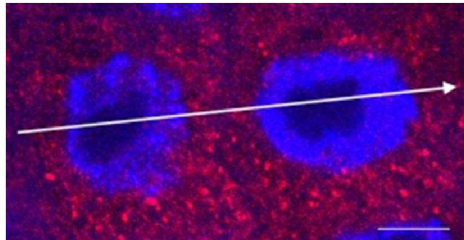


Obrázok 44. Intenzita fluorescenčného signálu SIMK, pERK a DAPI v epidermálnych bunkách koreňa *M.sativa* transgénnej línie GFP-SIMK po 1 a 2 hodinách od inokulácie čistým Fahraeus médiom alebo *Enterobacter* sp. SA187. Biela šípka ukazuje miesto merania signálu. Mierka 5 μm

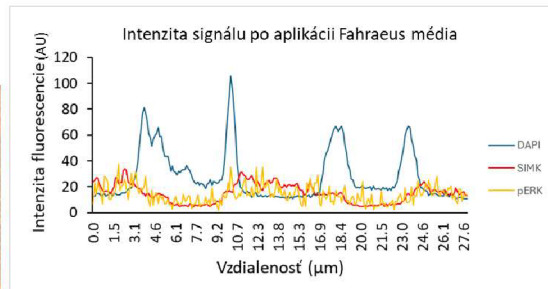
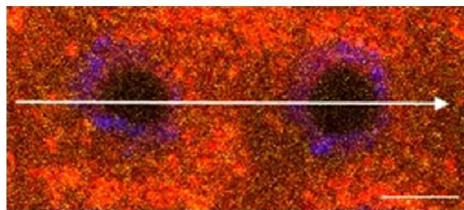
### SIMKi kontrola 1h



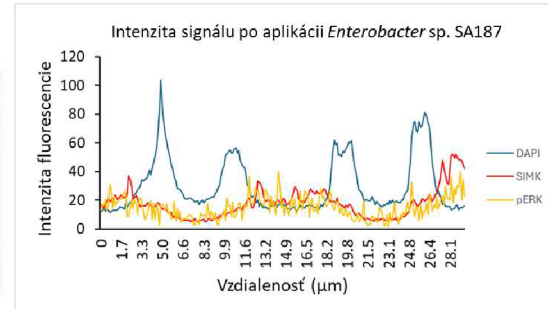
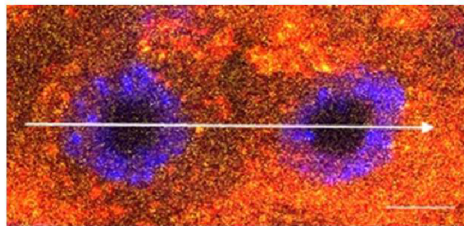
### SIMKi SA 1h



### SIMKi kontrola 2h



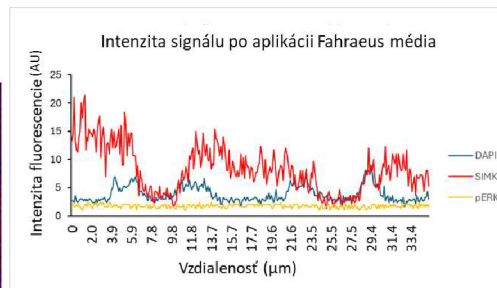
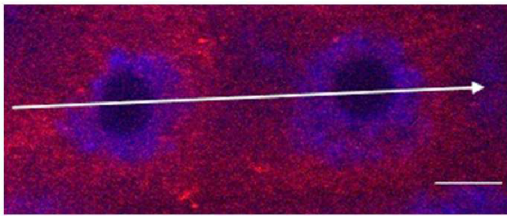
### SIMKi SA 2h



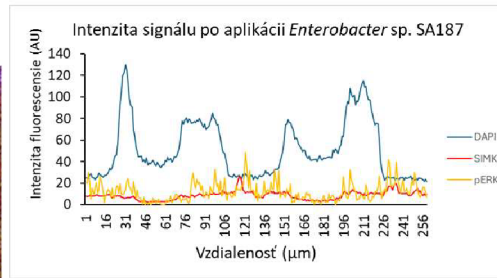
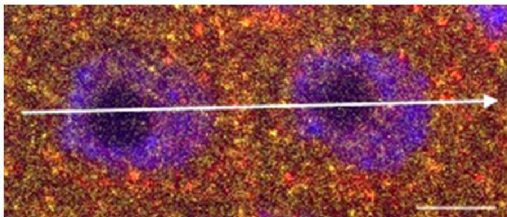
Obrázok 45. Intenzita fluorescenčného signálu SIMK, pERK a DAPI v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M.sativa* transgénnej línie *SIMKi* po 1 a 2 hodinách od inokulácie čistým Fahraeus médiom alebo *Enterobacter* sp. SA187. Biela šípka ukazuje miesto merania signálu. Mierka 5  $\mu\text{m}$



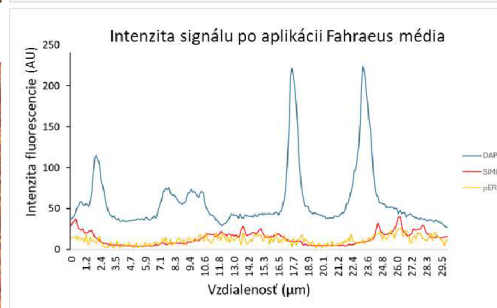
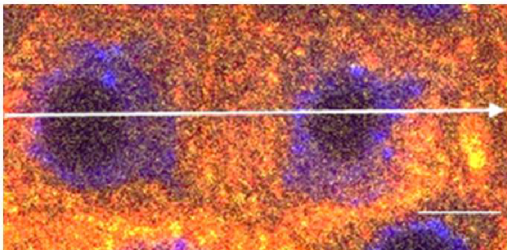
#### SIMKKi kontrola 1h



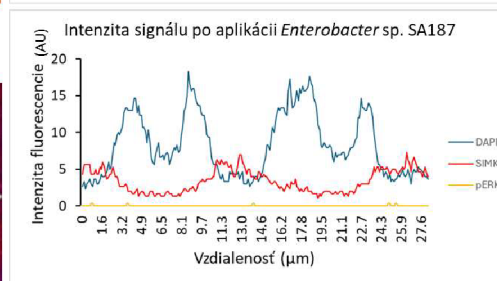
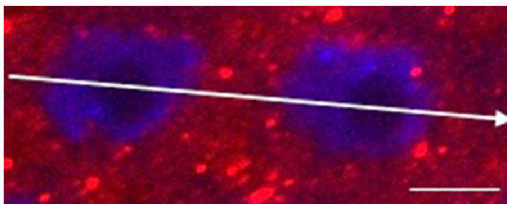
#### SIMKKi SA 1h



#### SIMKKi kontrola 2h



#### SIMKKi SA 2h



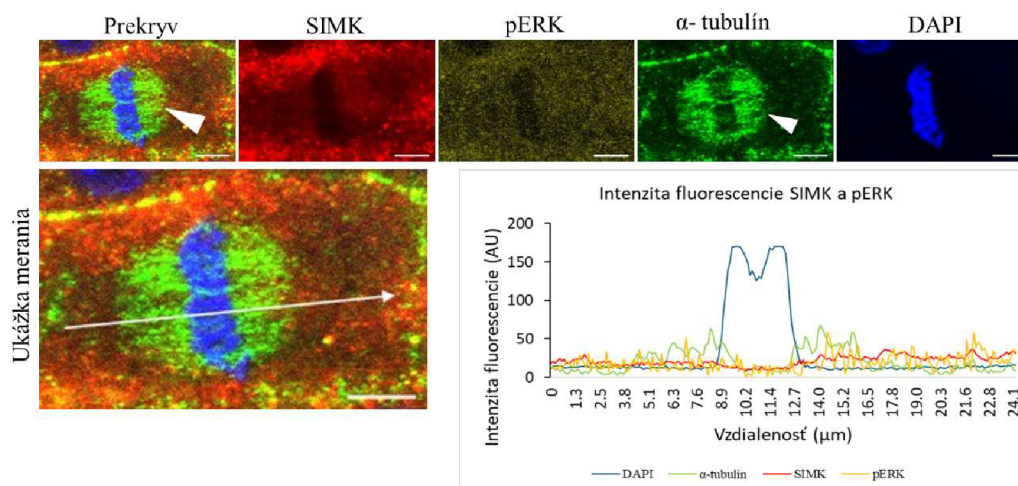
Obrázok 46. Intenzita fluorescenčného signálu SIMK, pERK a DAPI v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M.sativa* transgéennej línie *SIMKKi* po 1 a 2 hodinách od inokulácie čistým Fahraeus médiom alebo *Enterobacter* sp. SA187. Biela šípka ukazuje miesto merania signálu. Mierka 5  $\mu\text{m}$

## 4.2 Analýza fluorescenčného signálu SIMK a pERK v deliacich sa bunkách koreňov *M. sativa*

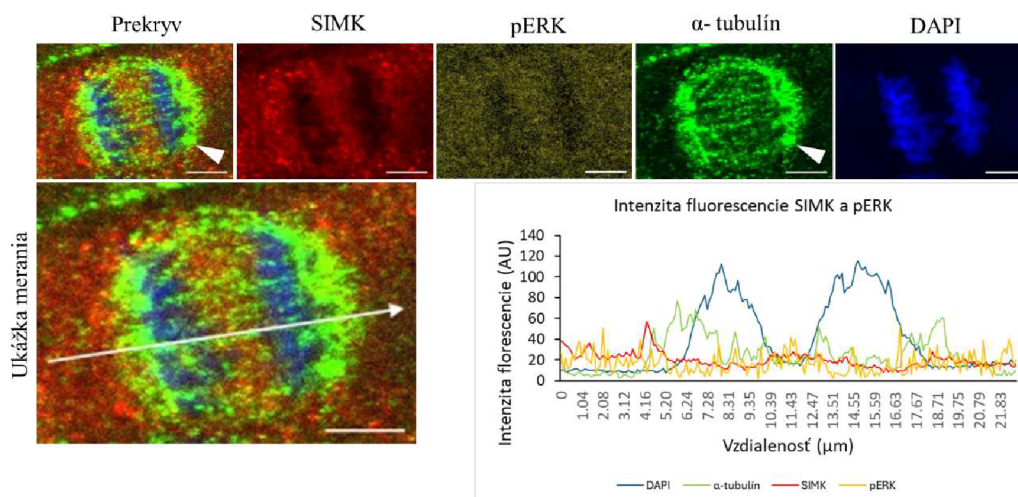
Koreňové špičky rastlín rastúcich na Fahraees médiu boli odobrané, zafixované a zafarbené využitím Whole mount metódy. SIMK, pERK,  $\alpha$ -tubulín boli značené rovnakým spôsobom ako je popísané v časti 4.2 a 4.3. U koreňov rastlín divokého typu RSY bola pozorovaná lokalizácia SIMK a pERK v deliacich sa epidermálnych bunkách



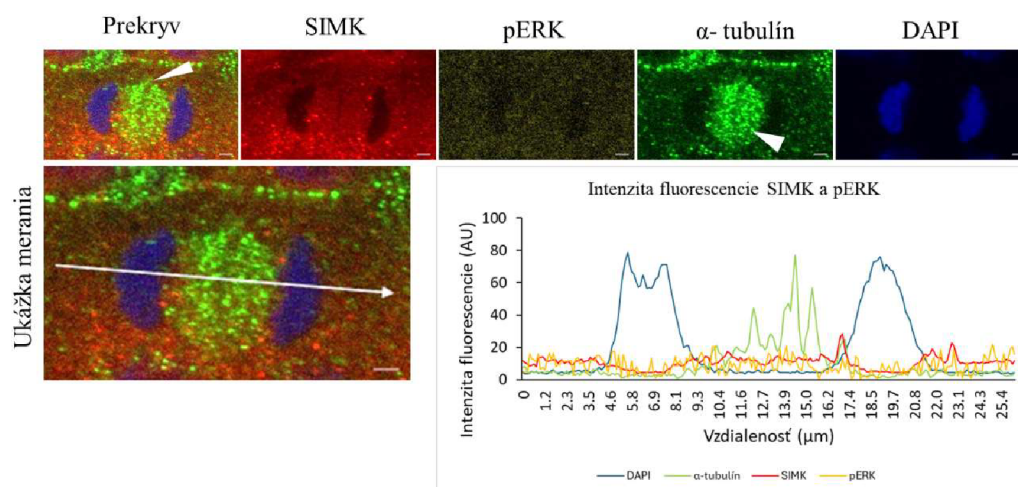
koreňovej špičky. V oblasti mitotického vretienka vykazovala SIMK rovnakú mieru fluorescencie ako v cytoplazme (Obr. 47, 48). V oboch fázach mitózy, intenzity fluorescenčného signálu pERK a SIMK dosahovali podobnú hodnotu. Rovnako v oblasti fragmoplastu nebol oproti cytoplazme pozorovaný rozdiel v intenzite SIMK a pERK (Obr. 49). Najnižšia intenzita SIMK a pERK bola nameraná v oblasti chromozómov.



Obrázok 47. Meranie intenzity fluorescenčného signálu v metafáze bunkového delenia v epidermálnych meristemických bunkách koreňa *M. sativa* divokého typu RSY. Hrot šípky ukazujú na deliace sa vretienko. Šípka ukazuje meranú oblasť. Mierka 5  $\mu\text{m}$ .



Obrázok 48. Meranie intenzity fluorescenčného signálu v anafáze bunkového delenia v epidermálnych meristemických bunkách koreňa *M. sativa* divokého typu RSY. Hrot šípky ukazujú na deliace sa vretienko. Šípka ukazuje meranú oblasť. Mierka 5  $\mu\text{m}$ .



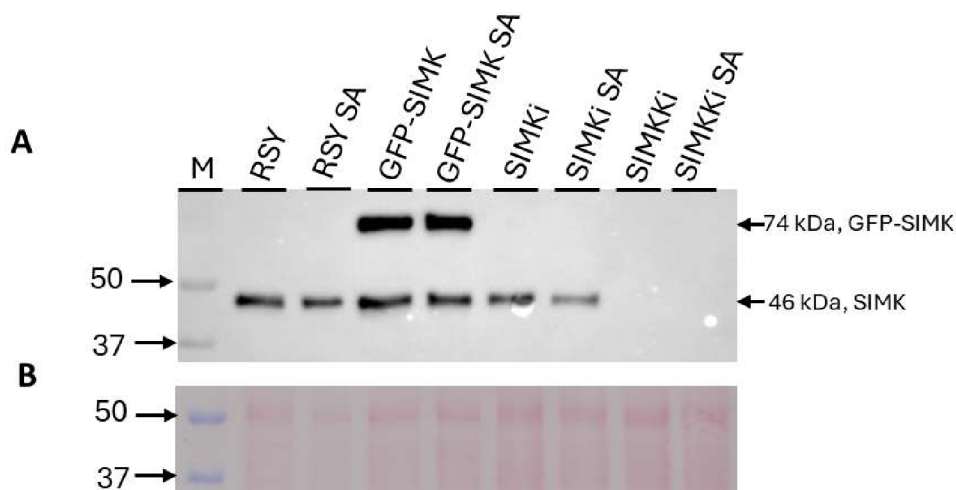
Obrázok 49. Meranie intenzity fluorescenčné signálu v telofáze bunkového delenia v epidermálnych meristematických bunkách koreňa *M. sativa* divokého typu RSY. Hrot šípky ukazuje na fragmoplast. Šípka ukazuje meranú oblasť. Mierka 2  $\mu\text{m}$

### 4.3 Imunoblotová analýza transgénnych rastlín *M. sativa* počas interakcie s *Enterobacter* sp. SA187

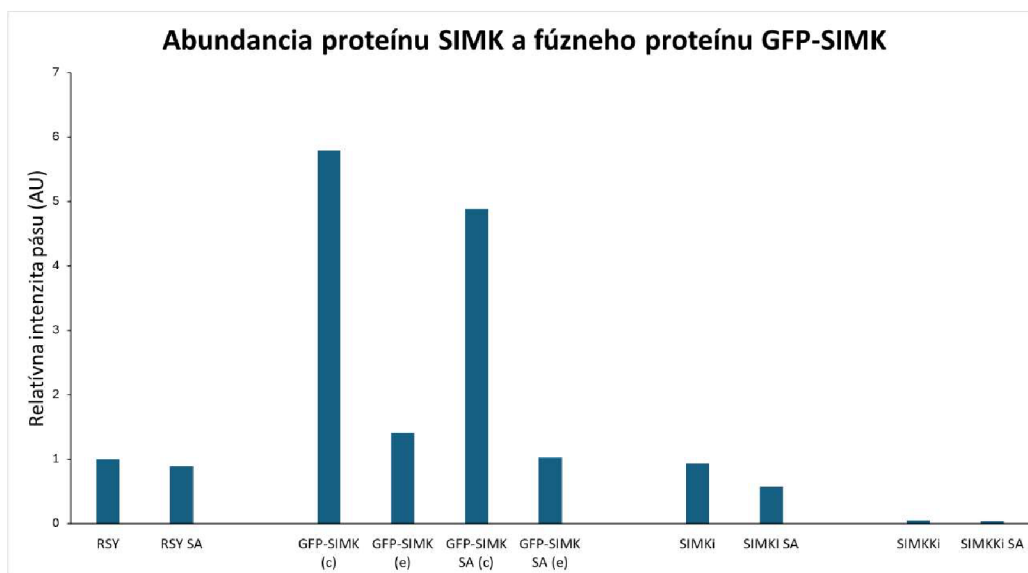
Rastliny *M. sativa* divého typu RSY a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMK*i a *SIMKK*i boli prenesené na čisté Fahraeus médium (kontrola) alebo na Fahraeus médium inokulované bakteriálnou bunečnou suspenziou *Enterobacter* sp. SA187. Po 3 a po 6 dňoch od prenesenia bol koreňový systém rastlín odobratý a zhomogenizovaný a následne podrobený imunoblotovej analýze proteínov. Western blot analýza bola zhotovená v dvoch biologických opakovaníach. Na detekciu proteínu SIMK s molekulovou hmotnosťou 46 kDa a fúzneho proteínu GFP-SIMK o veľkosti 74 kDa bola použitá protilátka proti MPK6, ktorú je možné použiť vďaka veľmi vysokej homológii s proteínom SIMK (Bekešová et al., 2015). Intenzita pásov na membráne bola zmeraná v programe ImageLab a vložená do grafov ako relatívna hodnota intenzity k hodnote RSY, pre ktorú bola priradená hodnota 1 (Obr. 52, 54). U línie GFP-SIMK bola meraná celková abundancia proteínu SIMK (GFP-SIMK(c)), teda abundancia proteínu SIMK spolu s abundanciou fúzneho proteínu GFP-SIMK, a taktiež intenzita endogénnej SIMK (GFP-SIMK(e)).

Z výsledkov relatívnej intenzity detegovaných pásov vyplýva, že najnižšia abundancia SIMK proteínu je u línie *SIMKK*i (Obr. 51, 53). Najvyššia miera abundancie proteínu SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK bola pozorovaná u línie GFP-SIMK (Obr. 51- 54). U línie GFP-SIMK a *SIMK*i bolo u inokulovaných rastlín po 3 dňoch od preloženia

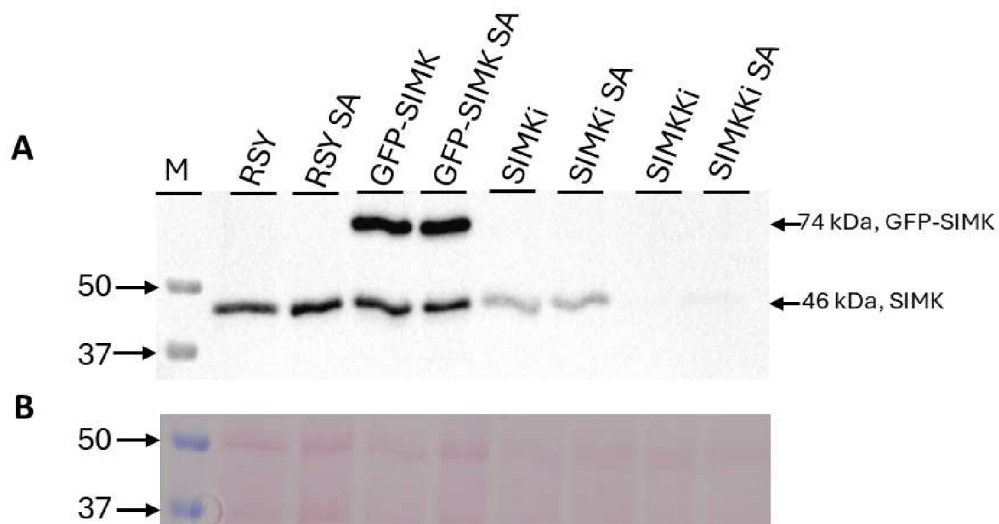
pozorované zníženie abundancie SIMK (Obr. 52). U línie *SIMKKi* bol na šiesty deň pozorovaný mierny nárast signálu u inokulovaných rastlín oproti kontrolným rastlinám (Obr. 54).



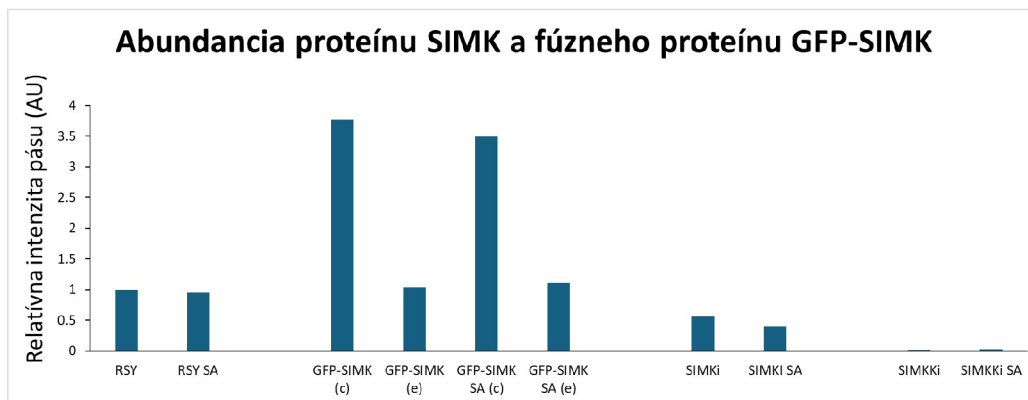
Obrázok 50. Detekcia abundancie proteínu SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK pomocou Western blot analýzy v koreňoch rastlín divokého typu RSY a transgenných línií GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* 3 dni od preloženia na kontrolné médium alebo médium inokulované *Enterobacter* sp. SA187. (A) Imunodetekcia proteínu SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK. M = marker. Pás o veľkosti 46 kDa odpovedá veľkosti proteínu SIMK a 74 kDa je pre GFP-SIMK. (B) Kontrola prenosu proteínov z 10 % polyakryamidového gélu na PVDF membránu pomocou reverzibilného farbenia Ponceau S.



Obrázok 51. Semikvantitatívne vyhodnotenie detekcie proteínu SIMK v koreňoch *M. sativa*. Relatívna intenzita detegovaných pásov odpovedajúcich proteínu SIMK o veľkosti 46 kDa a fúznemu proteínu GFP-SIMK o veľkosti 74 kDa v koreňoch rastlín divokého typu RSY a transgenných línií GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* 3 dni od prenesenia na médium inokulované *Enterobacter* sp. SA187.



Obrázok 52. Detekcia abundance proteínu SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK pomocou Western blot analýzy v koreňoch rastlín divokého typu RSY a transgénnych línií GFP-SIMK, SIMK<sub>i</sub> a SIMK<sub>Ki</sub> 6 dni od preloženia na kontrolné médium alebo médium inokulované *Enterobacter* sp. SA187. (A) Imunodetekcie proteínu SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK. M = marker. Pás o veľkosti 46 kDa odpovedá veľkosti proteínu SIMK a 74 kDa je pre GFP-SIMK. (B) Kontrola prenosu proteínov z 10 % polyakryamidového gélu na PVDF membránu pomocou reverzibilného farbenia Ponceau S.



Obrázok 53. Semikvantitatívne vyhodnotenie detekcie proteínu SIMK v koreňoch *M. sativa*. Relatívna intenzita detekovaných pásov odpovedajúcich proteínu SIMK o veľkosti 46 kDa a fúznemu proteínu GFP-SIMK o veľkosti 74 kDa v koreňoch rastlín divokého typu RSY a transgénnych línií GFP-SIMK, SIMK<sub>i</sub> a SIMK<sub>Ki</sub> 6 dni od prenesenia na médium inokulované *Enterobacter* sp. SA187.

## 5. DISKUSIA

Praktická časť tejto práce bola zameraná na fenotypovú charakterizáciu rastlín *M. sativa* divokého typu a transgénnych línií GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* počas interakcie s prospešnou baktériou *Enterobacter* sp. SA187 za kontrolných podmienok a počas pôsobenia soľného stresu. Okrem toho bol rastlinný cytoskelet, SIMK a fosforylované MAPK imunolokalizované pomocou whole mount metódy a následne podrobené analýze orientácie cytoskeletu a lokalizácii SIMK a fosforylovaných MAPK v koreňových špičkách rastlín.

*Enterobacter* sp. SA187 je prospešná baktéria izolovaná z koreňových hľúzok púštnej rastliny *I. argentea* (Andrés-Barrao et al., 2017). *Enterobacter* kolonizuje korene rastlín a dokáže zlepšovať ich rast sprístupňovaním živín (de Zélicourt et al., 2018; Khalifa et al., 2016). Jeho aplikácia mala pozitívny vplyv na rast rastlín *M. sativa* rastúcich v poľných podmienkach (Andrés-Barrao et al., 2017). V tejto práci bol pozorovaný vplyv baktérie *Enterobacter* sp. SA 187 na rast nadzemnej časti rastlín rastúcich 1 rok pred inokuláciou v skleníku. U rastlín divokého typu aj u rastlín transgéennej línie *SIMKKi* ošetrovaných bakteriálnou suspenznou kultúrou *Enterobacter* sp. SA187 bol pozorovaný pozitívny efekt na rast nadzemnej časti. Ošetrované rastliny mali väčšiu dĺžku stoniek, čerstvú a suchú hmotnosť.

Hrbáčková et al. (2021) pozorovali pokles biomasy spôsobený downreguláciou SIMK a SIMKK. V tejto práci však nebol pozorovaný rozdiel v biomase medzi rastlinami divokého typu a transgénymi rastlinami *SIMKKi*. Rastliny použité na fenotypovú analýzu v tejto diplomovej práci rástli v skleníku, zatiaľ čo rastliny použité v publikácii Hrbáčková et al. (2021) rástli vo fytotróne za presne určených konštantných podmienok. V skleníku boli rastliny vystavené viacerým zmenám a stresovým faktorom, čo mohlo byť príčinou rozdielnych výsledkov oproti publikovaným výsledkom.

Ďalej bol pozorovaný fenotyp rastlín divokého typu a transgénnych rastlín GFP-SIMK, *SIMKi* a *SIMKKi* ošetrovaných bakteriálnou suspenznou kultúrou v *in vitro* podmienkach a následne prenesených do skleníku do *ex vitro* podmienok. U týchto rastlín bol pozorovaný zlepšený rast inokulovaných rastlín len počas prvých dvoch strihaní u rastlín divokého typu. U ostatných línií neboli pozorované štatisticky významné rozdiely medzi kontrolnými a ošetrovanými rastlinami. To mohlo byť spôsobené stresom vyvolaným prenosom do *ex vitro* podmienok a rozdielnou formou

inokulácie koreňového systému rastlín, než u rastlín inokulovaných *ex vitro*. Taktiež u týchto rastlín neboli pozorované rozdiely v biomase medzi rastlinami divokého typu a transgennými rastlinami *SIMKi* a *SIMKKi*.

V druhej časti tejto práce bol analyzovaný vplyv baktérie *Enterobacter* sp. SA187 na rast koreňového systému *M. sativa* rastúcich *in vitro* za kontrolných podmienok a počas pôsobenia soľného stresu. Inokulácia koreňového systému rastlín *M. sativa* za kontrolných podmienok nemala žiaden efekt na rast koreňov. Tento výsledok je v zhode s pozorovaniami u *A. thaliana*, kde *Enterobacter* sp. SA187 nemal efekt na rast koreňov v kontrolných podmienkach, ale len počas soľného stresu (de Zelicourt et al., 2018).

U embryí inokulovaných *Enterobacter* sp. SA187 bol pozorovaný štatisticky preukazný rozdiel len na 21. a 25. deň u línie RSY, kedy mali kontrolné rastliny väčší RP koreňového systému ako inokulované rastliny. U embryí vystavených soľnému stresu nebol pozorovaný štatisticky preukazný rozdiel medzi rastlinami ošetrovanými Fahraeus médiom a rastlinami inokulovanými *Enterobacter* sp. SA187. Inokulované embryá kultivované na médiu bez soli rástli rýchlejšie ako kontrolné embryá rastúce na médiu bez soli. Tento výsledok je opačný ako výsledok, ktorý bol pozorovaný v prvom experimente s embryami. Z dôvodu nedostatku rastlinného materiálu nebolo možné experimenty so somatickými embryami opakovať. U somatických embryí dochádza k variabilite v dôsledku somaklonálnej variácie (Bobadilla Landey et al., 2013). Niektoré embryá prestanú rásť kvôli mechanickému stresu spôsobeného prekladaním. To mohlo spôsobiť rozdielne výsledky v dvoch experimentoch uskutočnených na somatických embryách.

Soľný stres inhibuje rast a viabilitu rastlín. Zvýšené množstvo iónov vedie k zmenám v osmotickom tlaku. Okrem toho  $\text{Na}^+$  súťaží s  $\text{K}^+$  o membránový transport a enzymatické aktivity čo má za výsledok toxický efekt na bunkové membrány a cytoplazmu (Munns a Tester, 2008). To sa potvrdilo aj pri výsledkoch tejto práce, kedy koreňový systém rastlín divokého typu RSY a transgenných línií *SIMKi* a *SIMKKi* rastúcich na médiu s NaCl rástol oproti kontrolným rastlinám pomalšie. *Enterobacter* sp. SA187 zvýšil toleranciu rastlín *A. thaliana* voči soľnému stresu produkciou kyseliny 2-keto-4-metyltiomaslovej (de Zelicourt et al., 2018). Takisto Andres-Barrao et al., (2021) zistila, že soľný stres u *A. thaliana* spôsobuje poruchy metabolizmu síry v chloroplastoch a s tým spojenú indukciu ROS. Aplikácia baktérie *Enterobacter* sp. SA187 na rastliny *A. thaliana* vystavené soľnému stresu zvýšila hladinu sulfátu v koreňoch a pomohla tak zmierniť negatívny vplyv soľného stresu. V tejto práci nebol



pozorovaný pozitívny efekt inokulácie rastlín *M. sativa* počas pôsobenia soľného stresu ani pri jednom spôsobe inokulácie koreňov. Ako vyplýva z výsledkov tejto práce, spomedzi pozorovaných línií je línia GFP-SIMK najodolnejšia voči soľnému stresu. Proteín SIMK sa u *M. sativa* podieľa na odpovedi na soľný stres (Munnik et al., 1999). Rastliny transgéennej línie GFP-SIMK majú oproti rastlinám divokého typu nadexpresiu proteínu SIMK (Hrbáčková et al. 2021). To môže mať za následok vyššiu odolnosť voči soľnému stresu.

Rastlinný cytoskelet je vysoko dynamická štruktúra, zložená hlavne z aktínových filamentov a MT. Cytoskelet je nevyhnutný pre správnu funkciu mnohých bunkových procesov vrátane bunkového delenia, prenosu signálu, morfológie buniek, interakcii s prospešnými mikroorganizmami ale aj odpovedi na abiotické a biotické stresy (He et al., 2020; Li a Staiger, 2018; Smidth a Panstruga 2007; Wang et al., 2021). Počas pôsobenia soľného stresu dochádza k dynamickým zmenám v organizácii cytoskeletu. Nízke aj vysoké koncentrácie soli spôsobujú depolymerizáciu a reorganizáciu MT. Tieto procesy sú nevyhnutné pre prekonanie stresu (Shoji et al., 2006). V tejto práci boli zaznamenané zmeny v orientácii MT počas pôsobenia soľného stresu a taktiež po aplikácii *Enterobacter* sp. SA187. U línie RSY a GFP-SIMK boli u inokulovaných rastlín oproti mokrej kontrole pozorované zmeny v orientácii mikrotubulov po jednej hodine od ošetrenia. Inokulované rastliny mali väčší priemerný uhol orientácie MT ako kontrolné rastliny. U línie *SIMKi* bola robená analýza iba po 2 hodinách od ošetrenia. Medzi kontrolnými a inokulovanými rastlinami neboli zaznamenané rozdiely v orientácii MT. U línie *SIMKKi* došlo k zmenám v orientácii mikrotubulov ako po 1 tak aj po 2 hodinách od ošetrenia. V oboch prípadoch mali inokulované rastliny väčší priemerný uhol orientácie MT. Kontrolné rastliny rastúce na médiu s NaCl a taktiež inokulované rastliny rastúce na kontrolnom médiu ale aj médiu s NaCl mali u všetkých línií rozdielny priemerný uhol orientácie MT ako kontrolné rastliny rastúce na médiu bez NaCl.

Proteín SIMK je lokalizovaný v jadre a cytoplazme. Po jeho aktivácii dochádza k jeho translokácii z jadra do cytoplazmy (Ovečka et al., 2014). SIMK vykazuje vysokú sekvenčnú a štruktúrnú homológiu s proteínom AtMPK6 u *A. thaliana*. Je známe, že AtMPK6 interaguje s fragmoplastom a PPB (Müller et al., 2010). V tejto diplomovej práci bola pozorovaná lokalizácia SIMK v jadre a cytoplazme buniek koreňa a taktiež v oblasti mitotického vretienka a fragmoplastu.

V záverečnej časti experimentálnej práce bola uskutočnená western blot analýza abundancie SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK po 3 a 6 dňoch od prenesenia na médium inokulované *Enterobacter* sp SA187. Je známe, že proteín SIMK je aktivovaný rôznymi stimulmi vrátane soľného (Kiegerl et al., 2000) a oxidatívneho stresu (Munnik et al., 1999), vysokej koncentrácie kovov (Jonak et al., 2004), po pôsobení elicitorov húb a baktérii (Cardinale et al., 2000; Fernandez-Pascual et al., 2006), ale taktiež v skorých fázach interakcie rastlín s rizóbiami (Hrbáčková et al., 2021). V tejto práci bol pozorovaný mierny nárast abundancie SIMK iba u línie *SIMKKi* po 6 dňoch na médiu inokulovanom baktériou. V ostatných prípadoch nebola pozorovaná zvýšená abundancia proteínu SIMK. U línie GFP-SIMK dokonca došlo k zníženiu množstva SIMK a tiež GFP-SIMK po 3 dňoch kultivácie na inokulovanom médiu. Podobne bolo zistené, v prípade suspenznej kultúry buniek *M. sativa*, že aktivácia SIMK nebola sprevádzaná zvýšenou abundanciou tohto proteínu v odpovedi na elicitor (Cardinale et al., 2000). K expresii SIMK môže dochádzať v iných časových bodoch. U *A. thaliana* pozoroval Kim et al. (2014) aktiváciu MPK6 po aplikácii *Enterobacter* sp. EJ01 už po šiestich hodinách od inokulácie. U *Capsicum chinense* bola pozorovaná najvyššia expresia MPK6 prevažne 7 dní po aplikácii PGPR na rastliny. Je pozoruhodné, že aplikácia PGPR navyše viedla k oveľa nižšej indukcii expresie MPK6 ako aplikácia patogénnych baktérii (Gogoi et al., 2024).



## 6. ZÁVER

Teoretická časť tejto diplomovej práce sa venovala reakcii a odpovedi rastlín na rôzne abiotické stresy, charakterizácii rastliny *M. sativa* a úlohe prospešných mikroorganizmov v podpore rastu rastlín počas pôsobenia abiotických stresov. Taktiež bola charakterizovaná baktéria *Enterobacter* sp. SA187. Keďže praktická časť sa zaoberala aj pozorovaním cytoskeletu počas interakcie s prospešnými baktériami, bola ďalšia časť teoretického úvodu zameraná na cytoskelet a proteíny asociované s cytoskeletom.

Praktická časť tejto práce sa zaoberala fenotypovou charakterizáciou nadzemnej časti rastlín *M. sativa* rastúcich v *ex vitro* podmienkach po ošetroaní baktériou *Enterobacter* sp. SA187. U rastlín rastúcich v inokulovanej zemine, ošetrenej bakteriálnou suspenznou kultúrou, bol pozorovaný pozitívny vplyv baktérie na rast nadzemnej časti rastlín. U rastlín ošetrovaných baktériou v *in vitro* podmienkach a prenesených do *ex vitro* podmienok nebol pozorovaný pozitívny efekt na rast nadzemnej časti rastlín.

Taktiež bola uskutočnená fenotypová charakterizácia koreňového systému rastlín *M. sativa* rastúcich v *in vitro* podmienkach počas interakcie s baktériou *Enterobacter* sp. SA187. Koreňový systém rastlín bol pozorovaný za kontrolných podmienok ale aj počas pôsobenia soľného stresu.

Okrem toho bola pomocou mikroskopu Axio ZOOM.V16 pozorovaná kolonizácia koreňového systému *M. sativa* baktériou *Enterobacter* sp. SA187. Rastlinný cytoskelet, SIMK a fosforylované MAPK boli imunolokalizované pomocou whole mount metódy a následne pozorované CLMS. Nakoniec bol pomocou imunoblot analýzy pozorovaný rozdiel v abundancii SIMK a fúzneho proteínu GFP-SIMK po aplikácii baktérie *Enterobacter* sp. SA187.

## 7. Referencie

- Ahemad, M., Malik, A. (2011). Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriology Journal*2, 12–21. DOI:10.3923/bj.2012.12.21
- Alberts, B., Johnson, A., J. L., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J., & Hunt, T. (2015). *Molecular biology of the cell* (6th ed). Garland Science.
- Ali, A., Petrov, V., Yun, D. J., & Gechev, T. (2023). Revisiting plant salt tolerance: novel components of the SOS pathway. *Trends in plant science*, 28(9), 1060–1069. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.04.003>
- Aloo, B. N., Dessureault-Rompré, J., Tripathi, V., Nyongesa, B. O., & Were, B. A. (2023). Signaling and crosstalk of rhizobacterial and plant hormones that mediate abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in microbiology*, 14, 1171104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1171104>
- Andrés-Barrao, C., Lafi, F., Alam, I., de Zélicourt, A., Eida, A., Bokhari, A., Alzubaidy, H., Bajic, V., Hirt, H., & Saad, M. (2017). Complete Genome Sequence Analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a Plant Multi-Stress Tolerance Promoting Endophytic Bacterium. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02023>
- Azua-Bustos, A., and González-Silva, C. (2014). Biotechnological applications derived from microorganisms of the atacama desert. *BioMed Res. Int.* 2014:909312. doi: 10.1155/2014/909312
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Bakker, P. A., Pieterse, C. M., & van Loon, L. C. (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239–243. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0239>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current opinion in biotechnology*, 20(6), 642–650. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.014>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology*, 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(4), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0344-9>
- Bargmann, B. O., Laxalt, A. M., ter Riet, B., van Schooten, B., Merquiol, E., Testerink, C., Haring, M. A., Bartels, D., & Munnik, T. (2009). Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant & cell physiology*, 50(1), 78–89. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn173>
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vypelková, P., Ovečka, M., Luptovčíak, I., Illés, P., Kuchařová, A., & Šamaj, J. (2015). Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Frontiers in plant science*, 6, 336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00336>
- Benslama, O., and Boulahrouf, A. (2013). Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *African journal of Microbiology Research Res.* 7, 5587–5595. doi: 10.5897/ajmr2013.6080
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bharti, N., Barnawal, D., Awasthi, A., Yadav, A., Kalra, A., (2014). Plant growth promoting rhizobacteria alleviate salinity induced negative effects on growth, oil content and physiological

- status in *Mentha arvensis*. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 45–60. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1385-8>
- Bielen, A., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2013). The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *International journal of molecular sciences*, *14*(3), 6382–6413. <https://doi.org/10.3390/ijms14036382>
- Bisseling, T., Dangl, J.L., and Schulze-Lefert, P. (2009) Next-generation communication. *Science* *324*: 691.
- 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>
- Bobadilla Landey, R., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Dechamp, E., Herrera, J. C., Santoni, S., Lashermes, P., Simpson, J., & Etienne, H. (2013). High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PloS one*, *8*(2), e56372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056372>
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical biology*, *49*(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., & Lebeau, T. (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*, *74*(2), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.013>
- Bresson, J., Varoquaux, F., Bontpart, T., Touraine, B., & Vile, D. (2013). The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *The New phytologist*, *200*(2), 558–569. <https://doi.org/10.1111/nph.12383>
- Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). Thermomorphogenesis. *Annual review of plant biology*, *70*, 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095919>
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., & Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of biological chemistry*, *275*(47), 36734–36740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>
- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, *7*(7), 309–315. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02295-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02295-1)
- Cohen, A. C., Travaglia, C., Bottini, R., & Piccoli, P. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, *87*(5), 455–462. <https://doi.org/10.1139/b09-023>
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*, *71*(4), 1685–1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>
- Coulson, T. J., & Patten, C. L. (2015). Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* UW5, a Rhizobacterium Capable of High Levels of Indole-3-Acetic Acid Production. *Genome announcements*, *3*(4), e00843-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00843-15>
- Cui, Y., Lu, S., Li, Z., Cheng, J., Hu, P., Zhu, T., Wang, X., Jin, M., Wang, X., Li, L., Huang, S., Zou, B., & Hua, J. (2020). CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELS 14 and 16 Promote Tolerance to Heat and Chilling in Rice. *Plant physiology*, *183*(4), 1794–1808. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00591>
- Davin-Regli, A., Lavigne, J., & Pagès, J. (2019). *Enterobacter* spp: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(4), e00002-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>

- Delgado, M., Mendez, J., Rodriiguez-Herrera, R., Aguilar, C. N., CruzHernaindez, M., and Balagurusamy, N. (2014). Characterization of phosphatesolubilizing bacteria isolated from the arid soils of a semi-desert region of north-east Mexico. *Biological Agriculture & Horticulture*, 30, 211–217. doi: 10.1080/01448765.2014.909742
- de Zelicourt, A., Al-Yousif, M., & Hirt, H. (2013). Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. *Molecular plant*, 6(2), 242–245. <https://doi.org/10.1093/mp/sst028>
- de Zélicourt, A., Synek, L., Saad, M. M., Alzubaidy, H., Jalal, R., Xie, Y., Andrés-Barrao, C., Rolli, E., Guerard, F., Mariappan, K. G., Daur, I., Colcombet, J., Benhamed, M., Depaepe, T., Van Der Straeten, D., & Hirt, H. (2018). Ethylene induced plant stress tolerance by *Enterobacter* sp. SA187 is mediated by 2-keto-4-methylthiobutyric acid production. *PLoS genetics*, 14(3), e1007273. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007273>
- Diab, A., Ageez, A., and Sami, S. (2017). *Enterobacter cloacae* MSA4, a new strain isolated from the rhizosphere of a desert plant, produced potent biosurfactant used for enhancing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during the bioremediation of spent motor oil-polluted sandy soil. *International Journal of Science and Research*, 6, 2726–2734. doi: 10.21275/art20173636
- Dimkpa, C. O., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., and Kothe, E. (2009). Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry* . 41, 154–162. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.10.010
- Droge, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?. *Research in microbiology*, 163(8), 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.006>
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36, 184–189. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.02.005
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z. Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and Fertility of Soils* 45, 563–571 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0366-y>
- Eida, A. A., Alzubaidy, H. S., de Zélicourt, A., Synek, L., Alsharif, W., Lafi, F. F., Hirt, H., & Saad, M. M. (2019). Phylogenetically diverse endophytic bacteria from desert plants induce transcriptional changes of tissue-specific ion transporters and salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant science*, 280, 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.002>
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Döring, P., & Hirt, H. (2013). Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1, e59. <https://doi.org/10.7717/peerj.59>
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Döring, P., & Hirt, H. (2013). Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1, e59. <https://doi.org/10.7717/peerj.59>
- Fernandez, O., Theocharis, A., Bordiec, S., Feil, R., Jacquens, L., Clément, C., Fontaine, F., & Barka, E. A. (2012). *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 25(4), 496–504. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0245>
- Fernandez O., Theocharis A., Bordiec S., Feil R., Jacquens L., Clement C., et al. (2012). *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25 496–504. 10.1094/MPMI-09-11-0245
- Fernandez-Pascual, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Boscá, L., Hirt, H., & Golvano, M. P. (2006). Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *Journal of experimental botany*, 57(11), 2735–2742. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl038>
- Flajoulot, S., Ronfort, J., Baudouin, P., Barre, P., Huguet, T., Huyghe, C., & Julier, B. (2005). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik*, 111(7), 1420–1429. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0074-4>
- Flowers, T.J., and Yeo, A.R. (1995) Breeding for Salinity Resistance in Crop Plants: Where Next? *Australian Journal Plant Physiology*, 22, 875-884. <https://doi.org/10.1071/PP950875>

- Fu, G., Grbic, V., Ma, S., and Tian, L. (2015). Evaluation of somatic embryos of alfalfa for recombinant protein expression. *Plant Cell Rep.* 34, 211–221. doi: 10.1007/s00299-014-1700-x
- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Gamalero, E., Lingua, G., Giusy Capri, F., Fusconi, A., Berta, G., & Lemanceau, P. (2004). Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.012>
- Gardiner, J. (2013). The evolution and diversification of plant microtubule-associated proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 75(2), 219–229. <https://doi.org/10.1111/tpj.12189>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Glick, B. H., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B. (2007): Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase, *Critical Reviews in Plant Sciences* 26 (5-6), 227-242. DOI:10.1080/07352680701572966
- Glick B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Gogoi, P., Phukan, T., & Saikia, R. (2024). Systemic resistance induced by plant growth-promoting rhizobacteria in Bhut Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq.) suppressed the collar rot disease. *Scientia Horticulturae*, 324, 112625. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112625>
- Gupta, P., & Diwan, B. (2016). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Iftikhar, A. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60, 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Haichar, F.Z., Santaella, C., Heulin, T., and Achouak, W. (2014) Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77: 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
- Hashimoto, T. (2015). Microtubules in plants. *The arabidopsis book*, 13, e0179. <https://doi.org/10.1199/tab.0179>
- He, F., Chen, H., & Han, R. (2020). The Plant Cytoskeleton and Crosslinking Factors. *CellBio*, 09(02), 85-99. <https://doi.org/10.4236/cellbio.2020.9200>
- Hedden, P. (2020). The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant & cell physiology*, 61(11), 1832–1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>
- Hermanová, V. (2022): Studium mitogenem aktivovaných protein kinas v interakci vojtěšky (*Medicago sativa*) s prospěšnými mikroorganismy. [Bakalárska práca]. UPOL Olomouc, Česká republika.
- Holguin, G., & Glick, B. R. (2001). Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial ecology*, 41(3), 281–288. <https://doi.org/10.1007/s002480000040>
- Hong, Y., Zhang, W., & Wang, X. (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, cell & environment*, 33(4), 627–635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02087.x>
- Hrbáčková, M., Dvořák, P., Takáč, T., Tichá, M., Luptovciak, I., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2020). Biotechnological Perspectives of Omics and Genetic Engineering Methods in Alfalfa. *Frontiers in plant science*, 11, 592. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00592>
- Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H., & Lloyd, C. W. (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nature cell biology*, 5(11), 967–971. <https://doi.org/10.1038/ncb1057>

- Chan, J., Calder, G., Fox, S., & Lloyd, C. (2005). Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in Arabidopsis suspension cells. *The Plant cell*, 17(6), 1737–1748. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032615>
- Chakraborty, J. (2023). Microbiota and the plant immune system work together to defend against pathogens. *Archives of microbiology*, 205(10), 347. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03684-9>
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A. C., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., Alenezi, F. N., Vallat, A., Luptakova, L., Yahiaoui, B., Cherrad, S., Vacher, S., Rateb, M. E., & Belbahri, L. (2019). Durum Wheat Stress Tolerance Induced by Endophyte *Pantoea agglomerans* with Genes Contributing to Plant Functions and Secondary Metabolite Arsenal. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms20163989>
- Cheung, A. Y., Niroomand, S., Zou, Y., & Wu, H. M. (2010). A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16390–16395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008527107>
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., & Panda, S. K. (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 8(4), e23681. <https://doi.org/10.4161/psb.23681>
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., & Shinozaki, K. (1998). Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2), 532–543. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9796>
- Jadia, C. D., Fulekar, M. H. (2009). Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. *African Journal of Biotechnology*, 8 921–928.
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., Leonhardt, N., Ellis, B. E., Murata, Y., & Kwak, J. M. (2009). MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20520–20525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907205106>
- Jammes, F., Yang, X., Xiao, S., & Kwak, J. M. (2011). Two Arabidopsis guard cell-preferential MAPK genes, MPK9 and MPK12, function in biotic stress response. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1875–1877. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17933>
- Janke, C., & Bulinski, J. C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(12), 773–786. <https://doi.org/10.1038/nrm3227>
- Janski, N., Masoud, K., Batzenschlager, M., Herzog, E., Evrard, J. L., Houlné, G., Bourge, M., Chabouté, M. E., & Schmit, A. C. (2012). The GCP3-interacting proteins GIP1 and GIP2 are required for  $\gamma$ -tubulin complex protein localization, spindle integrity, and chromosomal stability. *The Plant cell*, 24(3), 1171–1187. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094904>
- Jiang, B., Shi, Y., Peng, Y., Jia, Y., Yan, Y., Dong, X., Li, H., Dong, J., Li, J., Gong, Z., Thomashow, M. F., & Yang, S. (2020). Cold-Induced CBF-PIF3 Interaction Enhances Freezing Tolerance by Stabilizing the phyB Thermosensor in Arabidopsis. *Molecular plant*, 13(6), 894–906. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.04.006>
- Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant physiology*, 136(2), 3276–3283. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>
- Jung, J. H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A. K., Box, M. S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J. C., Schäfer, E., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science*, 354(6314), 886–889. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6005>
- Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., You, Y. H., Hamayun, M., Joo, G. J., et al. (2015). Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. *European Journal of Soil Biology*, 68 85–93. [10.1016/j.ejsobi.2015.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.02.005)
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kim, M. J., Park, J. M., Kim, B. R., Shin, D. H., & Lee, I. J. (2014). Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought

- conditions. *Plant physiology and biochemistry*, 84, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.001>
- Khalifa, A. Y., Alsyeeh, A. M., Almalki, M. A., & Saleh, F. A. (2016). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.008>
- Khan, N., & Bano, A. (2019). Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. *PLoS one*, 14(9), e0222302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222302>
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H., & Meskiene, I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant cell*, 12(11), 2247–2258. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2247>
- Kim, S. H., Woo, D. H., Kim, J. M., Lee, S. Y., Chung, W. S., & Moon, Y. H. (2011). Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(1), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.064>
- Kim, J. M., Woo, D. H., Kim, S. H., Lee, S. Y., Park, H. Y., Seok, H. Y., Chung, W. S., & Moon, Y. H. (2012). Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant cell reports*, 31(1), 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1157-0>
- Kim, K., Jang, Y., Lee, S., Oh, B., Chae, J., & Lee, K. (2014). Alleviation of Salt Stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in Tomato and Arabidopsis Is Accompanied by Up-Regulation of Conserved Salinity Responsive Factors in Plants. *Molecules and Cells/Molecules and Cells*, 37(2), 109–117. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2239>
- Kohler, J., Hernandez, J. A., Caravaca, F., and Roldan, A. (2009). Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 245–252. doi: 10.1016/j.envexpbot.2008.09.008
- Komis, G., Luptovciak, I., Daskocilova, A., & Samaj, J. (2015). Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnology advances*, 33(6 Pt 2), 1043–1062. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.008>
- Kost, B., & Chua, N. H. (2002). The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell*, 108(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00634-1)
- Kovar, D. R., Staiger, C. J., Weaver, E. A., & McCurdy, D. W. (2000). AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 24(5), 625–636. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00907.x>
- Kreutzer, R., Steibl, H. D., Dayananda, S., Dippe, R., Halda, L., Buck, M., et al. (1991). “Genetic characterization of nitrogen fixation in *Enterobacter* strains from the rhizosphere of cereals,” in *Nitrogen Fixation. Developments in Plant and Soil Sciences*, Vol. 48, [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3486-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3486-6_3)
- Kumar, S. V., & Wigge, P. A. (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 140(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.006>
- Laili, N. S., Radziah, O., and Zaharah, S. S. (2017). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria Ananassa* Duch.). *Bangladesh Journal of Botany*, 46 (1), 277–282.
- Lee, J. S., & Ellis, B. E. (2007). Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *The Journal of biological chemistry*, 282(34), 25020–25029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701888200>
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E. S., Rojas, C. C., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P. A., Schäfer, E., Vierstra, R. D., & Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science* (New York, N.Y.), 354(6314), 897–900. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5656>
- Li, J., Xu, Y., & Chong, K. (2012). The novel functions of kinesin motor proteins in plants. *Protoplasma*, 249 Suppl 2(Suppl 2), S95–S100. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0357-3>

- Li, J., Blanchoin, L., & Staiger, C. J. (2015). Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual review of plant biology*, 66, 415–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040327>
- Li, J., & Staiger, C. J. (2018). Understanding Cytoskeletal Dynamics During the Plant Immune Response. *Annual review of phytopathology*, 56, 513–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035632>
- Li, S., Han, X., Lu, Z., Qiu, W., Yu, M., Li, H., He, Z., & Zhuo, R. (2022). MAPK Cascades and Transcriptional Factors: Regulation of Heavy Metal Tolerance in Plants. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4463. <https://doi.org/10.3390/ijms23084463>
- Liu, X. M., Kim, K. E., Kim, K. C., Nguyen, X. C., Han, H. J., Jung, M. S., Kim, H. S., Kim, S. H., Park, H. C., Yun, D. J., & Chung, W. S. (2010). Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry*, 71(5-6), 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.01.005>
- Liu, X. M., Nguyen, X. C., Kim, K. E., Han, H. J., Yoo, J., Lee, K., Kim, M. C., Yun, D. J., & Chung, W. S. (2013). Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates Arabidopsis seed germination under salt and osmotic stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(3), 1054–1059. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.039>
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., & Ma, B. (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(20), 9155–9164. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5193-2>
- Liu, W., Wang, Q., Hou, J., Tu, C., Luo, Y., & Christie, P. (2016). Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Scientific reports*, 6, 26710. <https://doi.org/10.1038/srep26710>
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2017). Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 2552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>
- Liu, Y., Liu, L., Qi, J., Dang, P., & Xia, T. (2019). Cadmium activates ZmMPK3-1 and ZmMPK6-1 via induction of reactive oxygen species in maize roots. *Biochemical and biophysical research communications*, 516(3), 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.116>
- Liu, Q., Ding, Y., Shi, Y., Ma, L., Wang, Y., Song, C., Wilkins, K. A., Davies, J. M., Knight, H., Knight, M. R., Gong, Z., Guo, Y., & Yang, S. (2021). The calcium transporter ANNEXIN1 mediates cold-induced calcium signaling and freezing tolerance in plants. *The EMBO journal*, 40(2), e104559. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104559>
- Locascio, A., Blázquez, M. A., & Alabádi, D. (2013). Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Current biology : CB*, 23(9), 804–809. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.053>
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, E. W. II, Lim, C. K., Shaffer, B. T., et al. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLOS Genet.* 8:e1002784. doi: 10.1371/journal.pgen.1002784
- Lucas, J.R.; Shaw, S.L. (2023). Overlapping Localization of MAP65-2, -6, and -7 in Arabidopsis Hypocotyl Cells.. *microPublication Biology*. 10.17912/micropub.biology.000971.
- Ma, Y., Prasad, M. N., Rajkumar, M., & Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology advances*, 29(2), 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.12.001>
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., Guo, X., Xu, S., Niu, Y., Jin, J., Zhang, H., Xu, X., Li, L., Wang, W., Qian, Q., ... Chong, K. (2015). COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 160(6), 1209–1221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.046>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought



- conditions. *Journal of hazardous materials*, 320, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.009>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Moreno, A., Zhang, C., & Freitas, H. (2017). Serpentine endophytic bacterium *Pseudomonas azotoformans* ASS1 accelerates phytoremediation of soil metals under drought stress. *Chemosphere*, 185, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.135>
- Ma, Y., Dias, M. C., & Freitas, H. (2020). Drought and salinity stress responses and Microbe-Induced tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591911>
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A. F., El-Behairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PloS one*, 7(10), e48479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>
- Margolin, G., Gregoret, I. V., Cickovski, T. M., Li, C., Shi, W., Alber, M. S., & Goodson, H. V. (2012). The mechanisms of microtubule catastrophe and rescue: implications from analysis of a dimer-scale computational model. *Molecular biology of the cell*, 23(4), 642–656. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0688>
- Martinez, H., VanDelinder, V., Imam, Z. I., Spoerke, E. D., & Bachand, G. D. (2019). How non-bonding domains affect the active assembly of microtubule spools. *Nanoscale*, 11(24), 11562–11568. <https://doi.org/10.1039/c9nr02059d>
- Martinière, A., Gayral, P., Hawes, C., & Runions, J. (2011). Building bridges: formin1 of *Arabidopsis* forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 66(2), 354–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04497.x>
- Massalha, H., Korenblum, E., Malitsky, S., Shapiro, O. H., & Aharoni, A. (2017). Live imaging of root-bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4549–4554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618584114>
- Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K., Fukami, Y., Kikkawa, U., & Yasuda, T. (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 29(5), 637–647. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01246.x>
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant physiology and biochemistry*, 42(6), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D. J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertson, W., Sussman, M. R., & Schroeder, J. I. (2002). Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. *FEBS letters*, 531(2), 157–161. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03488-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03488-9)
- McCoy, T. J., & Bingham, E. T. (1988). Cytology and cytogenetics of alfalfa. *Alfalfa and alfalfa improvement*, 29, 737–776. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c24>
- Mekureyaw, M. F., Pandey, C., Hennessy, R. C., Nicolaisen, M. H., Liu, F., Nybroe, O., & Roitsch, T. (2022). The cytokinin-producing plant beneficial bacterium *Pseudomonas fluorescens* G20-18 primes tomato (*Solanum lycopersicum*) for enhanced drought stress responses. *Journal of plant physiology*, 270, 153629. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153629>
- Melo, J., Carolino, M., Carvalho, L., Correia, P., Tenreiro, R., Chaves, S., et al. (2016). Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *SpringerPlus*, 5, 1574. doi: 10.1186/s40064-016-3232-z
- Mellidou, I. & Karamanoli, K. (2022) Unlocking PGPR-Mediated Abiotic Stress Tolerance: What Lies Beneath. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6:832896. doi: 10.3389/fsufs.2022.832896
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 8, 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>

- Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat?. *Trends in biochemical sciences*, 37(3), 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007>
- Mukherjee, P., Mitra, A., & Roy, M. (2019). Halomonas Rhizobacteria of Avicennia marina of Indian Sundarbans Promote Rice Growth Under Saline and Heavy Metal Stresses Through Exopolysaccharide Production. *Frontiers in microbiology*, 10, 1207. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01207>
- Müller, J., Beck, M., Mettbach, U., Komis, G., Hause, G., Menzel, D., & Samaj, J. (2010). Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04046.x>
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., & Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 20(4), 381–388. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00610.x>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M. A., & Khan, N. (2018). Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of basic microbiology*, 58(12), 1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jbom.201800309>
- Němec, M., Kotoučková, L. & Páčová, Z. (2006). Miniatlas mikroorganismů 1. vyd., *Enterobacter cloacae*. Brno, Česká republika: Masarykova univerzita.
- Ning, J., Li, X., Hicks, L. M., & Xiong, L. (2010). A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant physiology*, 152(2), 876–890. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149856>
- Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H. (1998): Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391, 199-203.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J. M., & Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *The Plant cell*, 19(4), 1415–1431. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042291>
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., & Bolwell, G. P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236(3), 765–779. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1696-9>
- Opendakker, K., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2012). Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences*, 13(6), 7828–7853. <https://doi.org/10.3390/ijms13067828>
- Otegui, M. S., Mastronarde, D. N., Kang, B. H., Bednarek, S. Y., & Staehelin, L. A. (2001). Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography. *The Plant cell*, 13(9), 2033–2051. <https://doi.org/10.1105/tpc.010150>
- Otegui, M. S., Verbrugghe, K. J., & Skop, A. R. (2005). Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. *Trends in cell biology*, 15(8), 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.06.003>
- Oulebsir-Mohandkaci, H., Khemili-Talbi, S., Benzina, F., and Halouane, F. (2015). Isolation and identification of entomopathogenic bacteria from Algerian desert soil and their effects against the migratory locust, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25, 739–746.
- Ovečka, M., Samajová, O., Baluška, F., & Samaj, J. (2014). Immunofluorescent localization of MAPKs in Steedman's wax sections. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1171, 117–130. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0922-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0922-3_10)
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurreca, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 417–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945>

- Peng, G., Zhang, W., Luo, H., Xie, H., Lai, W., & Tan, Z. (2009). *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 7), 1650–1655. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65484-0>
- Radovic, J., Sokolović, D., Marković, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6), 465-475
- Rajkumar, M., Ac, N., Prasad, M. N., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ramirez, D., & Giron, M. (2022). *Enterobacter Infections*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Ranawat, B., Bachani, P., Singh, A., & Mishra, S. (2021). *Enterobacter hormaechei* as Plant Growth-Promoting Bacteria for Improvement in *Lycopersicon esculentum*. *Current microbiology*, 78(4), 1208–1217. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02368-1>
- Rao, K. P., Vani, G., Kumar, K., Wankhede, D. P., Misra, M., Gupta, M., & Sinha, A. K. (2011). Arsenic stress activates MAP kinase in rice roots and leaves. *Archives of biochemistry and biophysics*, 506(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.11.006>
- Ravanbakhsh, M., Sasidharan, R., Voesenek, L. A. C. J., Kowalchuk, G. A., and Jousset, A. (2017). ACC deaminase-producing rhizosphere bacteria modulate plant responses to flooding. *Journal Ecology* 105, 979–986. doi: 10.1111/1365-2745.12721
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., & Hurek, T. (2006). An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 19(2), 181–188. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0181>
- Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S. C., Grierson, C. S., Hirt, H., & Knight, M. R. (2004). OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 427(6977), 858–861. <https://doi.org/10.1038/nature02353>
- Ristuccia, A. M., & Cunha, B. A. (1985). An overview of amikacin. *Therapeutic drug monitoring*, 7(1), 12–25. <https://doi.org/10.1097/00007691-198503000-00003>
- Rodríguez-Milla, M. A., & Salinas, J. (2009). Prefoldins 3 and 5 play an essential role in *Arabidopsis* tolerance to salt stress. *Molecular plant*, 2(3), 526–534. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp016>
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in microbiology*, 23(9), 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(4), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
- Salam, M. A., Jammes, F., Hossain, M. A., Ye, W., Nakamura, Y., Mori, I. C., Kwak, J. M., & Murata, Y. (2012). MAP kinases, MPK9 and MPK12, regulate chitosan-induced stomatal closure. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(9), 1785–1787. <https://doi.org/10.1271/bbb.120228>
- Salam, M. A., Jammes, F., Hossain, M. A., Ye, W., Nakamura, Y., Mori, I. C., Kwak, J. M., & Murata, Y. (2013). Two guard cell-preferential MAPKs, MPK9 and MPK12, regulate YEL signalling in *Arabidopsis* guard cells. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 15(3), 436–442. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00671.x>
- Sandhya, V., Ali, S. K. Z., Grover, M., Reddy, G., and Venkateswarlu, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils* 46, 17–26. doi: 10.1007/s00374-009-0401-z

- Seagull, R. W. (2016). The Plant Cytoskeleton. *Reference Module in Food Science*, doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.02873-0
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J. D., & Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 25(1), 28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>
- Scharf, K. D., Berberich, T., Ebersberger, I., & Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et biophysica acta*, 1819(2), 104–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002>
- Shah, S., Li, J., Moffatt, B. A., and Glick, B. R. (1998). Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growthpromoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 833–843. doi: 10.1139/w98-074
- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., et al. (2021). PGPR in agriculture: a sustainable approach to increasing climate change resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 1–22. doi: 10.3389/fsufs.2021.667546
- Shahzad R., Khan A. L., Bilal S., Waqas M., Kang S. M., Lee I. J. (2017). Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany* 136, 68–77. doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.01.010
- Shen, H., Liu, C., Zhang, Y., Meng, X., Zhou, X., Chu, C., & Wang, X. (2012). OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant molecular biology*, 80(3), 241–253. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9941-y>
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., and Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics* 14:271. doi: 10.1186/1471-2164-14-271
- Shoji, T., Suzuki, K., Abe, T., Kaneko, Y., Shi, H., Zhu, J. K., Rus, A., Hasegawa, P. M., Hashimoto, T. (2006). Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology*, 47(8), 1158–1168. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj090>
- Singh, R. P., Jha, P., & Jha, P. N. (2015). The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *Journal of plant physiology*, 184, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.002>
- Singh, R. P., Nalwaya, S., and Jha, P. N. (2017). The draft genome sequence of the plant growth promoting rhizospheric bacterium *Enterobacter cloacae* SBP-8. *Genomics Data* 12, 81–83. doi: 10.1016/j.gdata.2017.03.006
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., Tuteja, N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 196-203.
- Smékalová, V., Doskočilová, A., Komis, G., & Samaj, J. (2014). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances*, 32(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>
- Smeets, K., Opendakker, K., Remans, T., Forzani, C., Hirt, H., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2013). The role of the kinase OXII in cadmium- and copper-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*, 36(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1111/pce.12056>
- Schmidt, S. M., & Panstruga, R. (2007). Cytoskeleton functions in plant–microbe interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4–6), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.01.001>
- Su, S. H., Suarez-Rodriguez, M. C., & Krysan, P. (2007). Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations *mekk1* and *mpk4* suggests signaling pathway complexity. *FEBS letters*, 581(17), 3171–3177. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.083>
- Su, H., Zhu, J., Cai, C., Pei, W., Wang, J., Dong, H., & Ren, H. (2012). FIMBRIN1 is involved in lily pollen tube growth by stabilizing the actin fringe. *The Plant cell*, 24(11), 4539–4554. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099358>
- Subramanian, P., Mageswari, A., Kim, K., Lee, Y., Sa, T. (2015). Psychrotolerant endophytic *Pseudomonas* sp strains OB155 and OS261 induced chilling resistance in tomato

- plants (*Solanum lycopersicum* mill.) by activation of their antioxidant capacity. *Molecular Plant Microbe Interactions* 28 1073–1081. 10.1094/MPMI-01-15-0021-R
- Suzuki, N., Rivero, R., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Synek, L., Rawat, A., L'Haridon, F., Weisskopf, L., Saad, M. M., & Hirt, H. (2021). Multiple strategies of plant colonization by beneficial endophytic *Enterobacter* sp. SA187. *Environmental microbiology*, 23(10), 6223–6240. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15747>
- Taghavi, S., van der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y. B., Walla, M. D., Vangronsveld, J., Newman, L., & Monchy, S. (2010). Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS genetics*, 6(5), e1000943. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000943>
- Tang, N., Zhang, H., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2012). Constitutive activation of transcription factor OsbZIP46 improves drought tolerance in rice. *Plant physiology*, 158(4), 1755–1768. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190389>
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., & Hirt, H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular cell*, 15(1), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.023>
- Tester, M. and Davenport, R. (2003) Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Annals of Botany* , 91, 503-527. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Theocharis, A., Clément, C. & Barka, E.A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* 235, 1091–1105. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
- 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>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia supplementum* (2012), 101, 133–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 99, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.001>
- Tiwari, S., Prasad, V., Chauhan, P. S., & Lata, C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* Confers Tolerance to Various Abiotic Stresses and Modulates Plant Response to Phytohormones through Osmoprotection and Gene Expression Regulation in Rice. *Frontiers in plant science*, 8, 1510. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01510>
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied biochemistry and microbiology* 42, 117–126 (2006). <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Tsugama, D., Liu, S., & Takano, T. (2012). Drought-induced activation and rehydration-induced inactivation of MPK6 in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications*, 426(4), 626–629. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.141>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Van Damme, D., Bouget, F. Y., Van Poucke, K., Inzé, D., & Geelen, D. (2004). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 40(3), 386–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02222.x>
- van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annual review of plant biology*, 71, 403–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>
- Vij, S., & Tyagi, A. (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal*, 5(3), 361–380. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00239.x>
- Xie, S. S., Wu, H. J., Zang, H. Y., Wu, L. M., Zhu, Q. Q., and Gao, X. W. (2014). Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecula Plant Microbe Interactions* 27, 655–663. doi: 10.1094/MPMI-01-14-0010-R

- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., & Ren, D. (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry*, 283(40), 26996–27006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801392200>
- Xu, J., Li, X. L., Luo, L. (2012). Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 78, 8056–8061. doi: 10.1128/AEM.01276
- Xue, B., & Robinson, R. C. (2013). Guardians of the actin monomer. *European journal of cell biology*, 92(10-11), 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.10.012>
- Wang, L., Qiu, T., Yue, J., Guo, N., He, Y., Han, X., Wang, Q., Jia, P., Wang, H., Li, M., Wang, C., & Wang, X. (2021). *Arabidopsis* ADF1 is Regulated by MYB73 and is Involved in Response to Salt Stress Affecting Actin Filament Organization. *Plant & cell physiology*, 62(9), 1387–1395. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab081>
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, S., Kurepa, J., Hashimoto, T., & Smalle, J. A. (2011). Salt stress-induced disassembly of *Arabidopsis* cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. *The Plant cell*, 23(9), 3412–3427. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089920>
- Wang, J., Ren, Y., Liu, X., Luo, S., Zhang, X., Liu, X., Lin, Q., Zhu, S., Wan, H., Yang, Y., Zhang et. al. (2021). Transcriptional activation and phosphorylation of OsCNGC9 confer enhanced chilling tolerance in rice. *Molecular plant*, 14(2), 315–329. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.022>
- Wheatley, R. M., & Poole, P. S. (2018). Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS microbiology reviews*, 42(4), 448–461. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy014>
- Wu, Y., Yan, J., Zhang, R., Qu, X., Ren, S., Chen, N., & Huang, S. (2010). *Arabidopsis* FIMBRIN5, an actin bundling factor, is required for pollen germination and pollen tube growth. *The Plant cell*, 22(11), 3745–3763. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080283>
- Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., & Hayat, S. (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of environmental biology*, 32(5), 667–685.
- Yao, Y., Liu, X., Li, Z., Ma, X., Rennenberg, H., Wang, X., & Li, H. (2013). Drought-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves. *Planta*, 238(1), 217–227. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1886-0>
- Yoo, S. J., Weon, H. Y., Song, J., & Sang, M. K. (2019). Induced Tolerance to Salinity Stress by Halotolerant Bacteria *Bacillus aryabhatai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in Tomato Plants. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(7), 1124–1136. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04026>
- Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., & Zhang, W. (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist*, 188(3), 762–773. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x>
- Yue, J., Xie, M., Gou, X., Lee, P., Schneider, M. D., & Wu, X. (2014). Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4. *Developmental cell*, 31(5), 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.025>
- Zaheer, M. S., Ali, H. H., Iqbal, M. A., Erinle, K. O., Javed, T., Iqbal, J., et al.. (2022). Cytokinin production by *Azospirillum brasilense* contributes to increase in growth, yield, antioxidant, and physiological systems of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers Microbiology* 13:886041. doi: 10.3389/fmicb.2022.886041
- Zaidi S., Usmani S., Singh B. R., Musarrat J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ 101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64 991–997. 10.1016/j.chemosphere.2005.12.057
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., & Pieterse, C. M. (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant physiology*, 162(1), 304–318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212597>

- Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., & Paré, P. W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 21(6), 737–744. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0737>
- Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J. (2020). Thriving under Stress: How Plants Balance Growth and the Stress Response. *Developmental Cell*, 55(5), 529-543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J. K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature reviews. Genetics*, 23(2), 104–119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- Zhao, Q., & Guo, H. W. (2011). Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular plant*, 4(4), 626–634. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr042>
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>
- Zhu, J. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zurbriggen, M., Hajirezaei, M., & Carrillo, N. (2010). Engineering the future. Development of transgenic plants with enhanced tolerance to adverse environments. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 33-56. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648144>

## 1. Zoznam použitých skratiek

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
ABA	abcisová kyselina
ABP	actin binding proteins
ACC	deamináza kyseliny 1-aminocyklopropán karboxilovej
ADF	aktindepolymerizačný faktor
AHL	<i>N</i> -Acyl Homoserine Lactones
CAT	kataláza
CNGC	cyklické nukleotidom riadené iónové kanály
DHN	dehydríny
DMSO	dimethylsulfoxid
DREB1	„dehydration-responsive element-binding protein“
DTT	Dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPS	extracelulárne polysacharidy
ET	etylén
GFP	zelený fluorescenčný proteín
H <sup>+</sup>	vodíkový kation
HSP	heat shock protein
HKT1	high-affinity K <sup>+</sup> transporter
IAA	kyselina indol-3-octová
ISR	indukovaná systémová rezistencia
JA	kyselina jasmónová
LEA	late embryogenesis abundant
MAP	microtubule associated proteins
MAPK	mitogenom-aktivované protein kinázy
MAPKK	MAP kinázy kinázy
MAPKKK	MAP kinázy kinázy kinázy
MAPKKKK	MAP kinázy kinázy kinázy kinázy
MF	mikrofilamenty
MKP2	MAPK fosfatáza 2
MS	médium Murashige a Skoog médium



MT	mikrotubuly
NOS	nitrogen oxigen species
OXI1	„oxidative signal-inducible 1“
PA	kyselina fosfatidová
PGPB	„plant growth promoting bacteria“
PGPR	„plant growth promoting rhizobacteria“
PIF	fytochróm-interagujúci proteín
PKS5	„SOS2-LIKE PROTEIN KINASE5“
RP	relatívny prírastok
PPB	preprofázny zväzok
ROS	„reactive oxygen species“
RSY	kultivar Regen SY
SAMK	stresom aktivovaná MAPK
SAR	„systemic acquired resistance“
SDS	dodecylsírán sodný
SIMK	stresom indukovaná MAPK
SIMKK	stresom indukovaná MAPKK
SOS1	„salinity overly sensitive 1“
SOD	superoxiddismutáza
TEMED	Tetramethylethylendiamin