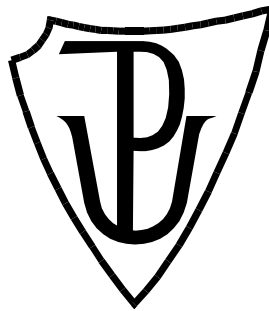


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Transformace rostlin vojtěšky za účelem přípravy
transgenních linií exprimujících fluorescenčně značený
MMK3 protein a linií s vyřazeným MMK3 proteinem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Králiková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivan Luptovčiak, PhD.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Ivana Luptovčiaka, PhD. s použitím uvedené literatury a pramenů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují autorská práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ivanovi Luptovčiakovi, PhD. za odborné vedení, rady a čas při zpracování mé práce. Také bych ráda poděkovala celému kolektivu na Oddělení buněčné biologie Centrum regionu Haná za jejich ochotu mi vždy pomoci.

Tato práce vznikla za podpory projektu „Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje“, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827 financovaného z EFRR.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Králiková
Název práce	Transformace rostlin vojtěšky za účelem přípravy transgenních linií exprimujících fluorescenčně značený MMK3 protein a linií s vyřazeným MMK3 proteinem
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Ivan Luptovčiak, PhD.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Mitogenem aktivované protein kinasy patří mezi fosforylační enzymy, na jejichž aktivaci se podílejí například hormony nebo biotický a abiotický stres. Vzniká mezi nimi signální dráha, která vede k expresi specifických genů souvisejících s odpověďmi na stresové a neoptimální podmínky prostředí. Mitogenem aktivovaná protein kinasa MMK3 je součástí buněčného dělení, a také signálních kaskád souvisejících se stresem. Tato bakalářská práce se zabývá transformacemi rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Cílem práce byla příprava transientně transformovaných rostlin tabáku, v jehož listových buňkách byl pozorován fluorescenčně značený MMK3 protein pomocí GFP nebo mRFP proteinu. Dále byly stabilně transformovány rostliny *Medicago sativa*, do kterých byly vneseny konstrukty ověřené u *N. benthamiana* se značeným MMK3 proteinem nebo Crispr/Cas9 konstrukty pro vyřazení MMK3 proteinu. Regenerace stabilně transformovaných rostlin probíhala prostřednictvím somatické embryogeneze. Pro ověření, zda se podařilo jednotlivé rostliny transformovat, byly použity metody genotypizace, Western blot a v případě rostlin s fluorescenčně značeným MMK3 proteinem také fluorescenční mikroskopie. Dále byla provedena fenotypová analýza kořenů *mpk13* mutantů *Arabidopsis thaliana*. Na základě výsledků byla zjištěna lokalizace fluorescenčně značeného MMK3 proteinu v listových buňkách *N. benthamiana* a to zejména v jádře a cytoplazmě. Z výsledků genotypizace stabilně transformovaných rostlin *M. sativa* s vyřazeným MMK3 proteinem je zřejmé, že v některých rostlinách byl transgen přítomen. Na základě této genotypové analýzy byla vybrána nejvhodnější rostlina *M. sativa* a podrobena Western

blotové analýze. Výsledky předběžně ukazují úbytek MMK3 proteinu a jeho kompenzaci pSIMK.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , MMK3, MAP kinasy, transformace, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , somatická embryogeneze, AtMPK13, Crispr/Cas9, GFP
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kateřina Králiková
Title	Transformation of alfalfa plants to prepare transgenic lines expressing the fluorescently labeled MMK3 protein and the deleted MMK3 protein lines
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cellural biology CRH
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčiak, PhD.
The year of presentation	2020

Abstract

Mitogen-activated protein kinases are phosphorylating enzymes and for example hormones or biotic and abiotic stress are involved in their activation. A signaling pathway arises between them, which leads to the expression of specific genes associated with responses to stressful and non-optimal environmental conditions. Mitogen-activated protein kinase MMK3 is involved in cell division as well as stress-related signaling cascades. This bachelor thesis deals with plant transformations using *Agrobacterium tumefaciens*. The aim of the work was to prepare transiently transformed *Nicotiana benthamiana* plants in whose leaf cells fluorescently labeled MMK3 protein was observed using GFP or mRFP protein. Furthermore *Medicago sativa* plants were stably transformed with constructs verified previously in *N. benthamiana* for MMK3 labeled protein or for knock-out mutant using Crispr/Cas9. Regeneration of stably transformed plants was performed by somatic embryogenesis. Genotyping methods, Western blotting and in the case of plants with fluorescently labeled MMK3 protein the fluorescence microscopy were used to verify that individual plants which were successfully transformed. Furthermore a phenotypic analysis of the roots of *mpk13* mutants of *Arabidopsis thaliana* was performed. Based on the results the localization of fluorescently labeled MMK3 protein in *N. benthamiana* leaf cells was determined especially in the nucleus and cytoplasm. From the genotyping results of stably transformed *M. sativa* plants with the Crispr/Cas9 constructs it is clear that the transgene was present in some plants. Based on this genotypic assay the most suitable

M. sativa plant was selected and subjected to Western blot analysis and results preliminary show lack of MMK3 protein and its compensation via pSIMK.

Keywords *Medicago sativa*, MMK3, MAP kinases, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, somatic embryogenesis, AtMPK13, Crispr/Cas9, GFP

Number of pages 77

Number of appendices 0

Language Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1	<i>Medicago sativa</i>	12
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	12
2.3	Mitogenem aktivované protein kinasy	13
2.3.1	Mitogenem aktivované proteinové kinasy kinasy kinasy	15
2.3.2	Mitogenem aktivované proteinové kinasy kinasy	15
2.3.3	Mitogenem aktivované proteinové kinasy	16
2.4	MAP kinasy <i>Medicago sativa</i> v reakci na stres	17
2.4.1	Oxidační stres	18
2.4.2	Stres způsobený kovy	19
2.4.3	Stres způsobený solí.....	19
2.4.4	Stres způsobený elicitorem	20
2.5	MAP kinasy a vybrané hormony.....	22
2.6	MAP kinasy při vývinu rostlin	22
2.7	MsMMK3 a její ortolog AtMPK13.....	23
2.8	Somatická embryogeneze.....	23
2.8.1	Somatická embryogeneze u <i>Medicago sativa</i>	24
2.9	Transformace pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.9.1	Transientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i>	26
2.9.2	Stabilní transformace <i>Medicago sativa</i>	27
2.10	RNA interference.....	27
2.11	CRISPR/Cas9 technologie.....	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1	Materiál	31
3.1.1	Chemikálie	31
3.1.2	Použité protilátky	32
3.1.3	Přístroje	32
3.1.4	Software	33
3.1.5	Roztoky a média	33
3.1.6	Gely pro elektroforézu	36
3.1.7	Rostlinný materiál.....	36
3.1.8	Bakteriální materiál.....	37
3.2	Metody	38

3.2.1	Somatická embryogeneze <i>Medicago sativa</i>	38
3.2.2	Naočkování bakterií.....	38
3.2.3	Transientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.2.4	Mikroskopování transformovaných části listu.....	39
3.2.5	Stabilní transformace <i>Medicago sativa</i>	39
3.2.6	Fenotypová analýza <i>mpk13</i> mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.2.7	Genotypová analýza rostlin metodou PCR.....	41
3.2.8	Western blot.....	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1	Somatická embryogeneze <i>Medicago sativa</i>	47
4.2	Transientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i>	48
4.3	Ověření transformovaných rostlin <i>N. benthamiana</i> pomocí Western blotu.....	51
4.4	Stabilní transformace listů <i>Medicago sativa</i>	52
4.5	Ověření transformovaných rostlin pomocí genotypizace.....	56
4.6	Ověření transformovaných rostlin <i>M. sativa</i> pomocí Western blotu	59
4.7	Mikroskopická analýza <i>M. sativa</i> MMK3-GFP.....	63
4.8	Fenotypová analýza mutantu <i>mpk13</i>	65
5	ZÁVĚR	67
6	REFERENCE.....	68
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	76

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

1. Přehled publikací o mitogen aktivovaných protein kinasach v *Medicago sativa* a jejich ortologů v *Arabidopsis thaliana*.
2. Přehled signálních drah mitogen aktivovaných protein kinas se zaměřením na MMK3 při vývinu a odpovědi na stres.

Praktická část:

1. Testování konstruktů se značeným MMK3 proteinem prostřednictvím metody transientní transformace *Nicotiana benthamiana* a stabilní transformace *Medicago sativa*.
2. Testování Crispr-Cas9 konstruktů za účelem přípravy mutantních linií vojtěšky s vyřazeným MMK3 proteinem.

1 ÚVOD

Rostlinné genetické inženýrství za poslední dobu ulehčilo produkci hospodářských plodin. Tyto rostliny mají zvýšenou odolnost vůči škůdcům, patogenům, herbicidům a mají lepší schopnost se adaptovat na stres v prostředí, což může být například sucho, neoptimální teplota nebo těžké kovy v půdě (Tohidfar *et al.*, 2013). Mezi významné hospodářské plodiny patří *Medicago sativa*, která se řadí mezi vysoce kvalitní píce obsahující spoustu výživných látek. V hospodářství je proto používána jako krmení pro hospodářská zvířata. Každoročně je pěstována přibližně na plantážích o rozloze 30 milionů hektarů (Monteiro *et al.*, 2003; Kechang *et al.*, 2009).

Rostliny obsahují signalizační sítě, díky kterým jsou schopny reagovat na stres v prostředí, a také hormony a živiny, které dále ovlivňují růst a vývoj rostlin. Mitogenem aktivované proteinové kinasy hrají důležitou roli v signalizačních dráhách rostlin od buněčného dělení až po buněčnou smrt. Mechanismus mitogenem aktivovaných proteinových kinas spočívá v přenosu signálu mezi buněčnými receptory a jádrem buňky v eukaryotech (Hirt, 2000; Tena *et al.*, 2001). MMK3 (*Medicago* MAP kinasa) protein patří mezi mitogenem aktivované proteinové kinasy, který byl pozorován ve všech stádiích buněčného dělení (Bögge *et al.*, 1999).

Pro stabilní i transientní transformace rostlin se velmi často používá bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, protože má schopnost vkládat svou DNA do hostitelského genomu prostřednictvím velkého Ti-plazmidu (Gelvin, 2003).

Somatická embryogeneze je vývojový proces, při kterém se z nezygotických buněk vytvoří embrya, ze kterých následně vyrostou plodné rostliny. Totipotence těchto buněk zahrnuje dediferenciaci a následnou rediferenciaci, což vede k vytvoření všech buněk, které tvoří zralou rostlinu (Rose *et al.*, 2010).

Práce se zabývá testováním konstruktů se značeným MMK3 proteinem pomocí transientní transformace rostlin *N. benthamiana*. Dále přípravou stabilně transformovaných rostlin *M. sativa* se značeným MMK3 proteinem a s vyřazeným MMK3 proteinem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Medicago sativa*

Medicago sativa (česky Tolice vojtěška) patří mezi nejčastěji studované druhy rostlin z pohledu produkce tkáňových kultivovaných embryí. Patří mezi nejstarší pícniny, pochází z Blízkého východu poblíž Iránu a dnes se nachází na většině kontinentech. Vydrží ve spoustě klimatických podmínek, přičemž je vysoce odolná na sucho díky dormanci trvající až dva roky. Využívá se jako krmivo pro velkou část hospodářských zvířat, jelikož obsahuje mnoho vitamínů a bílkovin. Dále dobře fixuje dusík díky symbióze s bakteriemi rodu *Rhizobium* (Monteiro *et al.*, 2003).

M. sativa se řadí do čeledi *Fabaceae*, je tetraploidní a velikost jejího genomu činí 800 – 100 Mb. Má až 60 cm vysoké stonky s mnoha větvemi a listy dlouhé 5 – 20 mm. Květy jsou zabarveny fialově. Tobolky jsou zabarveny žlutohnědě a obsahují 10 až 20 semen (Randuška *et al.*, 1986; Blondon *et al.*, 1994). Kořeny vojtěšky mívají jeden hluboký kořen a další různě velké boční kořeny (Johnson *et al.*, 1998).

Pomocí genetického inženýrství bylo u vojtěšky dosaženo pokroku v nutričních hodnotách nebo zvýšení tolerance vůči stresu (Schroeder *et al.*, 1991; McKersei *et al.*, 1993).

2.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (česky Huseníček rolní) je malá rostlina patřící do čeledi brukvovitých, která se využívá ve výzkumu biologie rostlin. Její genom se skládá z pěti chromozomů a obsahuje asi 20 000 genů. Pro genetické a molekulární studie jsou uznávány jako standardní ekotypy Columbia a Landsberg (Meinke *et al.*, 1998).

Celý životní cyklus rostliny je dokončen za 6 týdnů. Jedna rostlina je schopna vyprodukovat více než 5 000 semen. Zralá semena mají délku asi 0,5 mm a velikost květů činí asi 2 mm. Sazenice rostliny jsou vyvinuty z rozety, která má v průměru 2 – 10 cm, podle toho v jakých podmínkách se rostlina nachází. Listy jsou pokryty trichomy, které se využívají jako modely pro studium morfogeneze a buněčné diferenciaci. Dospělé rostliny rostou do výšky 15 – 20 cm. Kořeny mají jednoduchou strukturu a nevytvářejí symbiózu s bakteriemi vázajícími dusík (Meinke *et al.*, 1998).

2.3 Mitogenem aktivované protein kinasy

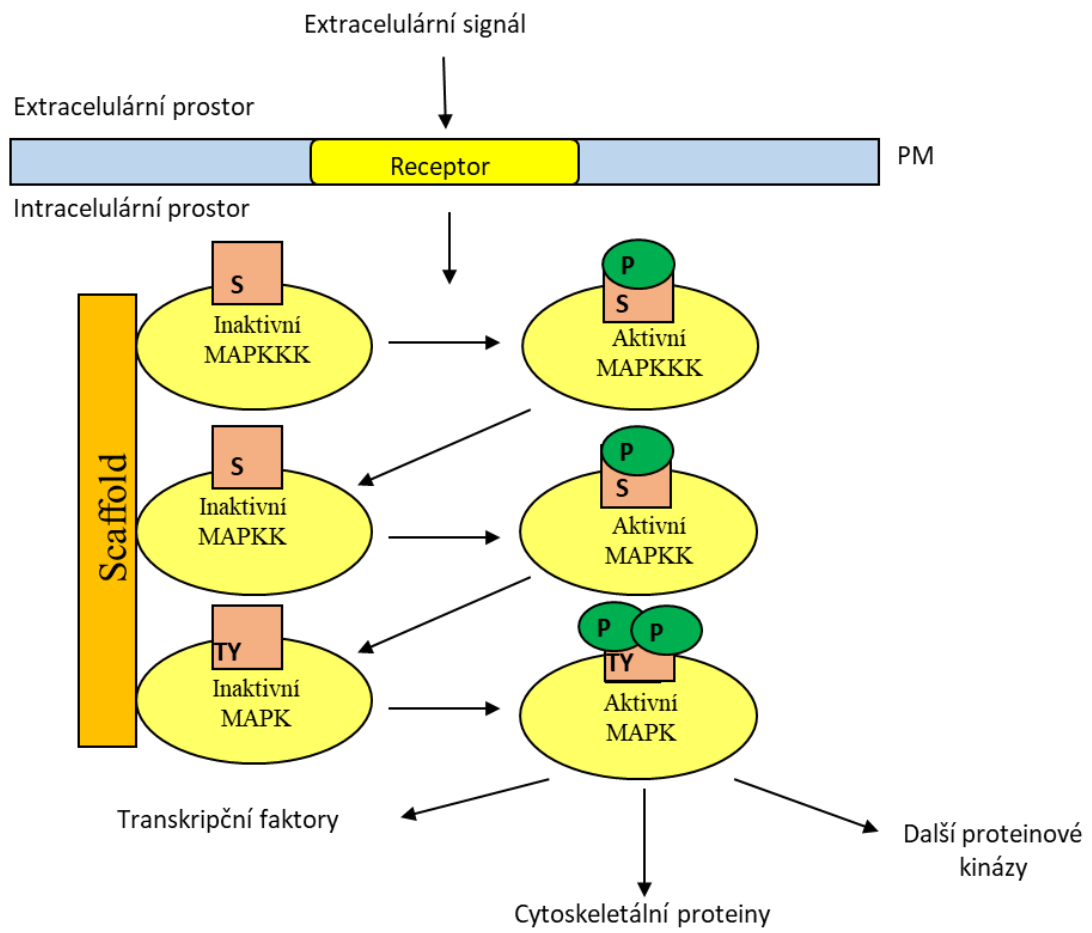
Rostliny jsou neustále vystaveny biotickému a abiotickému stresu ve vnějším prostředí. Aby tyto nevhodné podmínky přežily, vyvinuly si mechanismy, díky kterým vnímají signály z vnějšího prostředí a následně se na tyto změny způsobené stresem adaptují. Hlavní přenos signálu je uskutečněn pomocí mitogenem aktivovaných proteinových kinas (Šamajová *et al.*, 2013).

Mitogenem aktivované protein kinasy jsou fosforylační enzymy, které jsou sestaveny v proteinových komplexech, MAPK modulech, držících pohromadě pomocí skafoldových proteinů, které pravděpodobně signálním drahám přisuzují určitou specifickou. Sestavené moduly signální dráhy MAPK jsou tvořeny kinasou kinas MAPK (MEKK, MAPKKK nebo MAP3K), dále kinasou MAPK (MEK, MAPKK nebo MAP2K) a MAPK. Moduly MAP3K – MAP2K – MAPK mohou být někdy aktivovány další proteinovou kinasou MAPKKKK (MAP4K). Aktivace jednotlivých členů je zprostředkována reverzibilní fosforylací. MAP3K a MAP2K jsou fosforylovány a aktivovány na serinových nebo treoninových zbytcích, zatímco MAPK na treoninových a tyrosinových zbytcích (Obr. 1) (Jonak *et al.*, 2002; Šamajová *et al.*, 2013).

MAP kinasy hrají důležitou roli v transdukčních dráhách od buněčného dělení až po buněčnou smrt, přičemž se reverzibilní fosforylace MAP kinas může podílet na transkriptomických, buněčných a fyziologických odpovědích (Tena *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002).

Mnoho studií dokazuje, že mitogenem aktivované proteinové kinasy jsou aktivovány například hormony nebo abiotickými a biotickými stresy (Hirt, 2000). Aktivované MAP kinasy regulují v jádře transkripční faktory, popřípadě jiné proteiny související s transkripcí. Také mohou regulovat proteiny, které se podílejí na remodelaci cytoskeletu nebo cytoplazmatické proteiny (Obr.1) (Šamajová *et al.*, 2013). Embryogeneze, postembryonický růst a vývoj rostliny mohou být částečně řízeny signalizací MAP kinas tak, aby svůj vývoj přizpůsobily vnějším podmínkám prostředí (Komis *et al.*, 2018).

Pomocí genetické manipulace modulárních složek mitogenem aktivovaných proteinových kinas je možné zlepšit toleranci vůči stresu například u obilovin (Jonak *et al.* 2002; Šamajová *et al.*, 2013).



Obr. 1 Zjednodušené schéma MAPK kaskády a přenos signálu. MAPK jsou organizovány v MAPK modulech, které jsou drženy pohromadě proteinovým lešením – Scaffold proteiny. Extracelulární signál je přijat pomocí membránového receptoru. MAPKKK aktivuje MAPKK a ta následně aktivuje MAPK. MAPK dále aktivuje další proteinové kinasy, transkripční faktory, které vedou k expresi specifických genů nebo cytoskeletální proteiny (upraveno podle Šamajová *et al.*, 2013)

2.3.1 Mitogenem aktivované proteinové kinasy kinasy kinasy

MAP3K tvoří největší skupinu mitogenem aktivovaných proteinových kinas. V *A. thaliana* bylo nalezeno 80 MAP3K, které mohou být rozděleny do dvou skupin. Jedna skupina je tvořena 21 MEKK-like kinasami a 11 ZIK-like kinasami. Do této skupiny lze zařadit MAPKKK1 z huseníčku (*AtMEKK1*), ZIK1 z vojtěšky nebo *Nicotiana* protein kinasu (NPK1) z tabáku (Mizoguchi *et al.*, 1996; Nishihama *et al.*, 2001; Zweger a Hirt, 2001; Jonak *et al.*, 2002).

Druhá skupina je tvořena 48 geny kódujícími Raf-like kinasy a zahrnuje *Arabidopsis* CTR1 (constitutive triple response 1) a EDR1 (enhanced disease resistance 1), které se podílejí na signalizaci způsobenou ethylenem, popřípadě na obranných reakcích proti nemocem (Kieber *et al.*, 1993; Frye *et al.*, 2001).

Skupiny ZIK-like a MEK-like kinasy se také objevují ve fylogenetických analýzách MAP3K, ale nebylo prokázáno, že tyto proteiny fosforylují MAP2K v rostlinách (Champion *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2010).

2.3.2 Mitogenem aktivované proteinové kinasy kinasy

Bylo identifikováno 21 rostlinných MAP2K (Ichimura *et al.*, 2002). MAP2K jsou řazeny do čtyř skupin (A – D).

Do skupiny A se řadí MKK1 a MKK2 (MAP kinase kinase 1, 2) z huseníčku, které působí proti směru toku MAPK MPK4 (mitogen-activated protein kinase 4). Dalšími členy této skupiny jsou SIPKK (salicylic acid-induced protein kinase kinase) z tabáku a PRKK (pathogen-responsive protein kinase kinase) z vojtěšky, přičemž jsou tyto dvě MAP2K ortologní s MKK1-2 z huseníčku (Tab. 1) (Ichimura *et al.*, 1998; Ichimura *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2006). Součástí této skupiny je také *AtMKK6*, která působí jako downstream *AtMPK13* (Melikant *et al.*, 2004). Ortologem *AtMKK6* je *NtMEK1*, která aktivuje *Ntf6* (Nuclear translation factor 6), který je ortologem k *AtMPK13* a *MsMMK3* (Tab. 1), a také je součástí buněčného dělení (Calderini *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002; Melikant *et al.*, 2004).

Do skupiny B patří MKK3 z huseníčku účastníci se kaskád, které jsou vyvolány patogeny a potřebují signalizaci kyseliny jasmonové. *AtMKK3* a NPK2 tabáku jsou kinasy, jejichž součástí je faktor jaderného přenosu (NTF). Je tedy možné, že MAP2K s těmito faktory se účastní cytoplasmatického jaderného přenosu (Ichimura *et al.*, 2002; Dóczy *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2010).

Do skupiny C se řadí SIMKK (stress-induced MAP kinase kinase) z vojtěšky, která aktivuje SIMK a zprostředkovává signální dráhy indukované solným stresem a elicitorem (Obr. 3) (Kiegerl *et al.*, 2000). Do této skupiny také patří NtMEK2 (ortolog MsSIMKK Tab. 1) z tabáku, jenž se podílí na aktivaci SIPK a WIPK (wounding-induced protein kinase), a také na buněčné smrti v listech při transientní transformaci tabáku indukované dexamenthasonem (Yang *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002). AtMKK4 a AtMKK5, jakožto ortologové tabáku NtMEK2 měly podobné účinky při stabilní transformaci huseníčku (Ren *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2002). Skupina D zahrnuje MKK7 – MKK10 z *A. thaliana* (Ichimura *et al.*, 2002).

2.3.3 Mitogenem aktivované proteinové kinasy

V genomové sekvenci *A. thaliana* bylo identifikováno 20 genů, které kódují možné MAPK, jež lze rozdělit do čtyř skupin (A – D). Podle motivu TxY fosforylovaného MAP2K jsou MAPK huseníčku klasifikovány do dvou podtypů: TEY a TDY, přičemž TEY se dělí do tří skupin A, B, C a podtyp TDY tvoří vzdálenější skupinu D (Ichimura *et al.*, 2002).

MAPK patřící do skupiny A, bývají zapojovány do environmentálních a hormonálních reakcí. Do této skupiny patří například AtMPK3 a AtMPK6, které se aktivují infekcí z patogenu, oxidačním nebo osmotickým stresem (Ichimura *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002; Colcombet a Hirt, 2008). Dále se zde řadí SIPK a WIPK z tabáku, jenž jsou aktivovány kyselinou salicylovou nebo zraněním. Dále pak SIMK a SAMK (stress-activated MAP kinase) z vojtěšky, které mají podíl na odpovědích souvisejících s biotickým a abiotickým stresem (Zhang a Klessig, 2001; Zwerger a Hirt, 2001).

MAPK patřící do skupiny B se zapojují do buněčného dělení a podílejí se na reakcích vyvolaných stresem z vnějšího prostředí. Do této skupiny patří například MPK4 z huseníčku, která se účastní signalizace při ochraně rostlin (Petersen *et al.*, 2000; Cheong a Kim, 2010). MMK3 z vojtěšky a Ntf6 z tabáku jsou ortologní s MPK13 z huseníčku. Jsou aktivovány v závislosti na buněčném dělení a nacházejí se ve fragmoplastu během telofáze. MAP kinasa vojtěšky MMK2 je taktéž součástí této skupiny a pravděpodobně se účastní syntézy buněčné stěny během růstu (Bögre *et al.*, 1999; Calderini *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002).

MAPK skupiny C nejsou dobře známy v signálních dráhách rostlinného stresu, avšak ukázalo se, že AtMPK7 patřící do této skupiny je regulována cirkadiálním rytmem (Schaffer *et al.*, 2001).

MAPK náležící do skupiny D zahrnují MPK8, MPK9 a MPK15 z huseníčku, BWMK1 (blast and wound MAP kinase 1) z rýže a TDY1 z vojtěšky. V několika studiích bylo zmíněno, že OsBWMK1 a TDY1 jsou indukovány patogeny a zraněním (He *et al.*, 1999; Schoenbeck *et al.*, 1999; Cheong *et al.*, 2003).

2.4 MAP kinasy *Medicago sativa* v reakci na stres

Rostliny jsou často vystaveny nepříznivým podmínkám prostředí. Sucho, salinita, oxidační stres, patogeny a znečištění výrazně ovlivňují růst, vývoj i produktivitu rostlin (Kovtun *et al.*, 2000). *M. sativa* stejně jako i jiné rostliny používá k odpovědi na různé typy podnětů mitogenem aktivované proteinové kinasy (Nakagami *et al.*, 2004).

Tab. 1 Přehled známých MAPKs v *M. sativa* jejich ortology v *A. thaliana* a *N. tabacum* (upraveno podle Ichimura *et al.*, 2002).

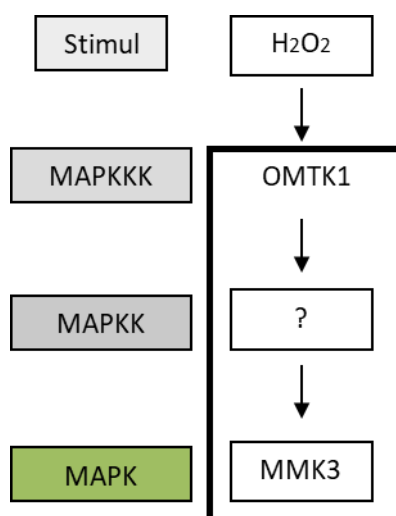
	MAP3K	MAP2K	MAPK
<i>M. sativa</i>	OMTK1	PRKK, SIMKK	SAMK, SIMK, MMK3, MMK2
<i>A. thaliana</i>	?	MKK1-2, MKK4-5	MPK3, MPK6, MPK13, MPK4
<i>N. tabacum</i>	?	SIPKK, MEK2	WIPK, SIPK, Ntf6, ?

2.4.1 Oxidační stres

H₂O₂ je signální molekula, která se podílí na obranných reakcích, jenž mohou být způsobeny různými stresy (Neill *et al.*, 2002). Zároveň však signalizace H₂O₂ přispívá k programované buněčné smrti. Rostliny tedy reagují na H₂O₂ různým způsobem v závislosti na jeho množství (Nakagami *et al.*, 2004).

Mezi MAP3K *M. sativa* patří MEK-like kinasa OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1), nacházející se v rostlinných protoplastech, kde indukuje buněčnou smrt. Tuto MAP3K aktivuje pouze H₂O₂. OMTK1 funguje jako protein skafold, jelikož s MAPK MMK3 dohromady tvoří součást jednoho proteinového komplexu *in vivo* a přímo spolu interagují *in vitro* (Obr. 2). OMTK1 specificky aktivuje MMK3, což vede ke zvýšené míře buněčné smrti. OMTK1 byl také akumulován po indukci solným stresem, avšak nevyvolal aktivaci MMK3 kinasy (Nakagami *et al.*, 2004; Nakagami *et al.*, 2005).

MPK3 a MPK6 jsou MAP kinasy *A. thaliana*, přičemž jsou nejvíc podobné MAP kinasám vojtěšky, konkrétně MPK3 je ortolog SAMK a MPK6 je ortolog SIMK (Tab. 1) (Tena *et al.*, 2001). H₂O₂ patří mezi aktivátory MAPK *A. thaliana* listových buněk. H₂O₂ aktivuje proteinovou kinasu ANP1 (arabidopsis nukleus phragmoplast 1), což je MAP3K v *A. thaliana* a ta následně aktivuje MPK3 a MPK6. Tato MAPK kaskáda vede k indukci specifických genů, které na tento stres reagují, ale blokuje působení auxinu (Kovtun *et al.*, 2000).



Obr. 2 Schematické znázornění aktivace MMK3 pomocí H₂O₂. Aktivace je závislá na OMTK1, který přímo interaguje s MMK3 a má zde funkci proteinu scaffoldu. MAP2K není v současnosti v této signální dráze známá (upraveno podle Nakagami *et al.*, 2004).

2.4.2 Stres způsobený kovy

Vysoký obsah kovů v půdě má nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin. Antropogenní uvolňování kovů do životního prostředí má za následek zvyšování kontaminace půdy. Vysoké množství těžkých kovů v půdě vyvolává v rostlinách řadu buněčných odpovědí, například souvisejících se změnou v genové expresi. Měď je důležitý kov, který se podílí na normálním růstu a vývoji rostlin, avšak nadměrné množství mědi je škodlivé, protože způsobuje produkci ROS. Kadmium se nevyznačuje žádnou kladnou biologickou funkcí, je velmi reaktivní a inhibuje enzymatické procesy, je toxické pro všechny živé buňky a způsobuje jejich oxidační poškození (Jonak *et al.*, 2004, Smékalová *et al.*, 2014).

M. sativa aktivuje čtyři odlišné proteinové kinasy při stresu, který je vyvolán přebytkem iontů mědi nebo kadmia, jedná se o SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK. Tyto MAPK jsou velmi rychle aktivovány měděnými ionty, zatímco u iontů kadmia projevují zpožděnou reakci. SIMKK specificky aktivovala SIMK a SAMK v protoplastech, avšak neaktivovala MMK2 a MMK3, což znamená, že rostliny reagují na stres z těžkých kovů indukcí několika různých drah (Jonak *et al.*, 2004).

U *A. thaliana* kadmium aktivuje mitogenem aktivované protein kinasy MPK3 a MPK6 prostřednictvím akumulace kyslíkových radikálů (ROS). Aktivita těchto dvou MAPK je při stresu z kadmia vyšší v kořenech než v listech (Liu *et al.*, 2010).

2.4.3 Stres způsobený solí

Salinita je stav, kdy se v zemědělské půdě nacházejí vysoké koncentrace solí, které způsobují špatný růst a nízkou produktivitu rostlin. Nejčastěji se jedná o nadbytek iontů sodíku v půdě, což může u rostlin způsobit fyziologický nedostatek vody (Yadav *et al.*, 2011).

SIMKK je MAP2K u *M. sativa* a je aktivovaná prostřednictvím solného stresu. Následně je zapojena do signální dráhy, která zprostředkovává aktivaci SIMK (Obr. 3). SIMKK a SIMK jsou společně lokalizovány v cytoplazmě a jádře. Po aktivaci solným stresem se společně přemísťují do cytoplazmatických kompartmentů jakožto mikrotubulárních polí a to konkrétně do preprofázních svazků (PPB) nebo fragmoplastů. To naznačuje, že rostlinné mitotické mikrotubuly mohou interagovat se SIMK v buňkách postižených stresem (Baluška *et al.*, 2000; Kiegerl *et al.*, 2000; Šamaj *et al.*, 2002; Šamaj *et al.*, 2004; Ovečka *et al.*, 2014).

U *A. thaliana* je MKK2 aktivována solným stresem, přičemž dále fosforyluje MPK4 a MPK6. Jako aktivátor MKK2 se ukázala MAP3K MEKK1. Dohromady se tedy na přenosu signálu způsobeném solným stresem podílí modul MAPK MEKK1 – MKK2 – MPK6 nebo MPK4 (Teige *et al.*, 2004).

V *N. tabacum* byly rychle aktivovány MAPK SIPK a 42-kD za podmínek osmotického stresu (Mikolajczyk *et al.*, 2000).

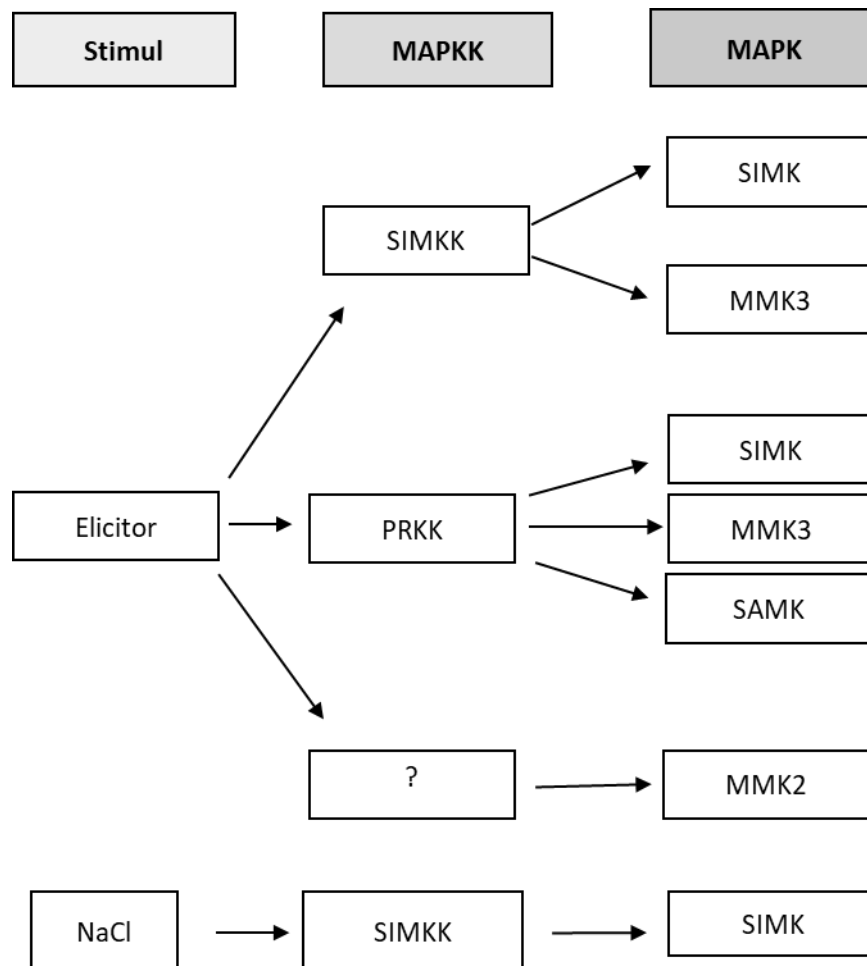
2.4.4 Stres způsobený elicitorem

Rostliny si vyvinuly schopnost vnímat signály, jenž jsou odvozeny od patogenů. Jakmile rostlina detekuje elicitor, následuje intracelulární přenos signálu, který má za následek tvorbu obranných reakcí. Mezi obranné reakce může patřit tvorba ROS, exprese genů souvisejících s patogenem, popřípadě buněčná smrt. (Cardinale *et al.*, 2000).

U vojtěšky byly pomocí elicitoru aktivovány čtyři různé MAPK (SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK). SIMK a MMK3 byly aktivovány prostřednictvím SIMKK (Obr. 3). Příbuzná MAP2K PRKK při aktivaci patogenním elicitorem zprostředkovala nejen přenos signálu na SIMK a MMK3, ale ještě navíc aktivovala i SAMK. Při stresu způsobeném elicitorem odvozeným od buněčné stěny kvasinek, byly aktivovány hlavně SIMK a MMK3, o něco méně pak SAMK a MMK2 (Zhang a Klessing, 1998; Cardinale *et al.*, 2000). MMK2 má také schopnost doplňovat kvasinkové buňky, které mají nedostatek MAPK Mpk1 (Jonak *et al.*, 1995).

Flg22 (flagellin 22) je na leucin bohatá repetiční receptorová kinasa, která u *A. thaliana* spouští aktivaci MPK3, MPK4 a MPK6. MKK4 a MKK5 aktivují MPK3 a MPK6, což vede k aktivaci transkripčních faktorů WRKY22 a WRKY29 (WRKY transcription factor 22, 29) (Asai *et al.*, 2002).

U tabáku jsou při stresu vyvolaným patogenem aktivovány dvě MAPK – SIPK a WIPK (Tena *et al.*, 2001).



Obr. 3: Signální dráhy indukované solí a elicitorem na úrovni MAP2K. Oba stimuly aktivují SIMKK v případě elicitoru je indukovaná i PRKK. Jestliže je SIMKK aktivovaná elicitorem následně aktivuje SIMK a MMK3, zatímco PRKK aktivuje SIMK, MMK3 a navíc SAMK. Elicitem je také aktivovaná MMK2, avšak není známo, která MAP2K je v této dráze zapojena. Solným stresem je indukována aktivace SIMKK, která poté aktivuje SIMK (upraveno podle Cardinale *et al.*, 2002).

2.5 MAP kinasy a vybrané hormony

Ethylen patří mezi rostlinné hormony. Účastní se při vývojových a fyziologických procesech rostlin. Podílí se také při obranných reakcích způsobených stresem, jako je například napadení škůdcem, chlad nebo mechanické zranění rostliny. V případě, že jsou rostliny vystaveny stresu, nastává zvýšená syntéza ethylenu, která má za následek regulaci exprese genů (Abeles *et al.*, 1992; Ouaked *et al.*, 2003). Různé MAPK kinasy jsou aktivovány kyselinou aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC), která je prekurzorem ethylenu. U *M. sativa* byly touto kyselinou aktivovány SIMK a MMK3 prostřednictvím SIMKK. U rostlin *A. thaliana* byla přes ACC aktivovaná MAPK MPK6 a další MAPK (Ouaked *et al.*, 2003).

Kyselina salicylová je fenolový derivát vyskytující se u mnoha druhů rostlin. Podílí se na růstu rostlin, indukcii květů, ovlivňuje biosyntézu ethylenu a regulaci otvírání stomat. Rostliny se chrání vůči patogenům prostřednictvím kyseliny salicylové, popřípadě kyseliny jasmonové, přičemž jsou do signálních dráh těchto kyselin zapojeny i MAPK jako pozitivní i negativní regulátory (Hayat a Ahmad, 2007; Jagodzic *et al.*, 2018).

2.6 MAP kinasy při vývinu rostlin

Správná lokalizace mitogenem aktivovaných proteinových kinas je důležitá pro vývoj rostlin a pro buněčnou signalizaci (Müller *et al.*, 2010).

Aktivace určitých MAP kinas je v koordinaci s danými fázemi během cytokineze. MMK3 z vojtěšky a Ntf6 z tabáku se nacházejí v rovině buněčného dělení a aktivují se během mitózy (Calderini *et al.*, 1998; Bögre *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2010).

U *M. sativa* se SIMK a její upstream SIMKK podílejí na regulaci růstu kořenových vlásků. SIMK se nachází v jádrech, avšak jakmile začnou růst kořenové vlásky, přemístí se v aktivovaném stavu do špičky kořenových vlásků pomocí aktinových filamentů (Šamaj *et al.*, 2002).

Průduchy jsou specializované epidermální buňky, které se podílejí na výměně plynů a vodní páry mezi rostlinami a prostředím, ve kterém se rostliny nacházejí. U huseníčku patří mezi významné regulátory vývoje průduchů MPK3, MPK6 a jejich upstream MAP2K MKK4 a MKK5 (Wang *et al.*, 2007).

AtMPK3 a AtMPK6 mají také funkci u vedení pylové láčky, přičemž by signální kaskáda MPK3/MPK6 mohla mít vliv na expresi genů v předešlých stádiích během vývoje pylu (Guan *et al.*, 2014). MPK6 je dále lokalizována v mitotických

mikrotubulech, a také v sekrečních vezikulách TGN (Trans-Golgi network). TGN je síť vezikul a tubulů na trans straně Golgiho komplexu, které jsou transportované do vakuol nebo na plasmatickou membránu. To slouží pro sekreci proteinů ven z buňky nebo proteinovou degradaci ve vakuole. MPK6 je také zapojena při vývoji kořenů *A. thaliana* (Müller *et al.*, 2010).

2.7 MsMMK3 a její ortolog AtMPK13

Medicago MAP kinasa – MMK3 je MAPK, která je zařazena do skupiny B. Při aktivaci MMK3 proteinu je fosforylován motiv TEY (Ichimura *et al.*, 2002).

Mitogenem aktivovaná proteinová kinasa MMK3 byla nalezena ve všech stádiích buněčného cyklu, avšak její aktivita byla přechodná v mitóze a korelovala s načasováním tvorby fragmoplastů. MMK3 se nachází v cytoplazmě v buňkách v interfázi a vstupuje do jádra, když buňky vstupují do profáze. Hraje tedy roli v rostlinné cytokineze (Bögre *et al.*, 1999).

Jak už bylo uvedeno, je také zapojená do spousty reakcí způsobených stresem a to například v souvislosti s patogenem, těžkými kovy nebo oxidativním stresem, kde vede k buněčné smrti (Cardinale *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2004; Nakagami *et al.*, 2004).

Ortologem MMK3 je MPK13 z *A. thaliana* (Tab. 1), která také náleží do MAPK skupiny B a při její aktivaci dochází k fosforylaci motivu TEY (Ichimura *et al.*, 2002).

V případě AtMPK13 bylo zjištěno, že pokud dojde k částečnému potlačení exprese AtMPK13 nebo AtMKK6, které jsou společně koexprimovány, sníží se počet laterálních kořenů v transgenních liniích, z čehož vyplývá, že modul *A. thaliana* MKK6 – MPK13 pozitivně reguluje tvorbu vedlejších kořenů (Zeng *et al.*, 2011).

2.8 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je proces, při kterém se produkují morfologicky a vývojově normální embrya a následně celé rostliny z nediferencovaných somatických buněk. To dokazuje, že genetický program pro embryogenezi a její průběh je obsažen v buňce a může probíhat bez přítomnosti genových produktů z mateřského prostředí. První popis somatické embryogeneze pochází z pozorování mrkvových buněk v kultuře a demonstrovali ho Steward *et al.* (1958) a Reinert (1958). V případě zygotické embryogeneze se jedná o fertilizaci vajíček, přičemž k oplození dochází uvnitř gametofytu, který je obklopen mateřskou tkání. Mateřská tkáň poskytuje ochranu samičím gametofytům a embryím. V semenu může embryo zůstat v klidu, dokud

nebudou příznivé podmínky pro klíčivost a přežití sazenic. Vývoj somatických embryí se velmi podobá vývoji zygotických embryí jak morfologicky, tak i časově (Zimmerman, 1993; Pierik, 1997; Harada *et al.*, 2010).

Somatická embryogeneze *in vitro* se dělí do dvou forem a to přímou a nepřímou. Tyto formy souvisí s přítomností či nepřítomností fáze vývoje kalusu. Přímá somatická embryogeneze je tvorba somatických embryí bez vytvoření kalusu (Williams a Maheswaran 1986; Dijak *et al.* 1986; Raghavan, 1986).

Dediferencované tkáně kalusu je možné rozmnožit v kapalně kultuře nebo na pevném kultivačním médiu s agarem (Dudits *et al.*, 1995). Manipulací s kultivačními podmínkami se z kultivovaných kalusových buněk indukují somatická embrya (Zimmerman, 1993). Podmínky prostředí jsou optimalizovány v souvislosti s fyzickou, nutriční a hormonální stránkou. Mikroorganismy a škůdci vyšších rostlin musí být vyloučeni (Pierik, 1997). Růstové médium kalusu, které obsahuje určité hormony, může souviset s napodobením přirozeného signálu, jenž embryogenezi zahájí (Zimmerman, 1993). Vhodný hormonální režim v bazálním médiu u daného druhu rostliny při kultivaci explantátu je velmi důležitý pro tvorbu somatických embryí (Rose 2004). Jako jeden z hlavní induktorů embryogeneze v somatických rostlinných buňkách kultivovaných *in vitro* je hormon auxin (Dudits *et al.*, 1995). Morfogeneze u somatických a zygotických embryí se liší v závislosti na polárním transportu auxinu. U somatických embryí inhibitory polárního transportu auxinu blokují morfogenezi do dalšího stadia embrya, zatímco zygotická embrya vykazují lepší snášenlivost vůči stejným inhibitorům polárního transportu auxinů (Zimmerman, 1993). Syntetické kultivační médium tedy obsahuje auxin například jako je kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová a někdy i cytokininy. Poté následuje kultivace na médiu bez hormonů (Dudits *et al.*, 1995; Yang a Zhang, 2010).

2.8.1 Somatická embryogeneze u *Medicago sativa*

Kalusové buňky vojtěšky jsou schopny iniciovat embryogenezi v médiu již při krátkém působení auxinu (Dudits *et al.*, 1993). Auxin je důležitý v růstových reakcích během vývoje rostliny. Působí jako signál pro dělení, expanzi a diferenciaci na buněčné úrovni během vývoje rostliny (Rose a Nolan, 1995). Indukce kalusu z explantátu (listy vojtěšky) vzniká na B5H médiu, jež se skládá z média B5 (Atanassov a Brown, 1984).

Problémy s regenerací somatických embryí souvisí s jejich špatným zráním u mnoha druhů vojtěšky. Somatická embrya nemají endosperm, jenž slouží jako zdroj živin,

proto je užitečné poskytnout somatickým embryím živiny v kultivačním médiu. Kultivační médium je možné obohatit o přírodní organické extrakty, které obsahují aminokyseliny, vitamíny, rostlinné regulátory podporující růst rostlin, regeneraci a somatickou embryogenezi (Amini *et al.*, 2016). Pouze embrya, jenž obsahují dostatek mastných kyselin, cukrů a proteinů, se mohou vyvinout na normální rostliny. *M.sativa* obsahuje relativně nízké množství proteinů a pro přeměnu embryí na rostliny jsou důležité některé složky. Fytohormony a dusík mají dobrý vliv na somatickou embryogenezi (Krochko *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 1992; von Arnold *et al.*, 2002; Sharma a Millam, 2004). Množství proteinů a akumulace prolinu jsou složky účastnící se metabolických procesů indukující somatickou embryogenezi (Dhir *et al.*, 2014; Dhir *et al.*, 2014). Kyselina abscisová má příznivý vliv na maturaci somatických embryí, a také na jejich vývoj na normální rostliny (Vahdati *et al.*, 2008).

Určité organické extrakty, jako je například kaseinový hydrolyzát, kvasnicový extrakt, kokosová voda a cyanobakteriální extrakty, zlepšují somatickou embryogenezi a zrání embryí (Joshee *et al.*, 2007; Palíkova *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2011). Biosyntéza a působení etylenu se podílí na řízení jednotlivých fází somatické embryogeneze v *M. sativa*, přičemž narušení těchto procesů v různých fázích somatické embryogeneze má nepříznivý vliv na vitalitu získaných somatických embryí (Kecpczynska a Zielińska, 2011).

Rychlý růst somatických embryí vojtěšky nastává po tom, co embrya vstoupí do stádia vývoje torpéda. Frekvence přenosu somatických embryí do čerstvých medií může poskytnout embryím lepší dostupnost živin (Lai a McKersie, 1993). Tvorba kalusu z listových explantátů *M. sativa* je vyšší než u *M. truncatula* na MS mediu obsahující NAA (kyselina 1-naftyloctová), 2,4-D a kinetin (Hoori *et al.*, 2007).

2.9 Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* je technologie používaná pro produkci geneticky modifikovaných transgenních rostlin. V současné době se *Agrobacterium* používá k transformaci mnoha druhů rostlin (Tzifra a Citovsky, 2006).

Gramnegativní bakterie *A. tumefaciens* způsobuje v rostlinách onemocnění koronárních žláz, přičemž se tvoří nádor, který je v rostlinách tvořen *Agrobacteriem*. To pomocí virulentní molekuly DNA, přenášející T-DNA do rostlinných buněk, která se integruje do hostitelského genomu (Chilton *et al.*, 1977). T-DNA region je nezbytná součást Ti-plazmidu zároveň s oblastí viru, jenž jsou důležité pro indukci nádoru.

Oblast T-DNA je vymezena 25 bp nepřesnými opakováními, označenými jako levý a pravý okraj. Tato oblast obsahuje geny, jenž kódují proteiny, které se podílejí na biosyntéze rostlinných hormonů a opinů. Mezi levý a pravý okraj T-DNA je možné vložit prakticky jakýkoli typ DNA a následně je možné ji použít pro transformaci rostlin (Gelvin, 2003; Zupan *et al.*, 2000, Křenek *et al.*, 2015). Virová oblast Ti-plazmidu obsahuje sedm lokusů (virA, virB, virC, virD, virE, virF a virG), které kódují virulentní proteiny, nutné pro přenos a integraci T-DNA do hostitelského genomu, avšak samotná virová oblast Ti plazmidu do hostitelské buňky není přenesena (Zupan a Zambryski, 1995). Nukleární lokalizační sekvence obsahují proteiny VirD2 a VirE2. Dvousložkové regulační systémy, které se skládají z virA a virG proteinů, zprostředkovávají spojení mezi fenolickými signalizačními molekulami a aktivaci virulentních genů v *Agrobacteriu* (Gelvin, 2000; Gelvin, 2003; Pitzschke a Hirt, 2010).

Expresí genů přenesených přes T-DNA může být transientní nebo stabilní. Transientní transformace se nejvíc projeví po 2 – 4 dnech po infekci rostlinných tkání *Agrobacteriem* a následně klesá počet expresních buněk (Janssen a Gardner, 1990; Lacroix a Citovsky, 2013). Pro stabilní expresi genů je důležitá integrace T-DNA do hostitelského genomu (Janssen a Gardner, 1990).

Mnoho schválených geneticky modifikovaných plodin bylo vyvinuto pomocí metody *Agrobacterium* (Hemmer, 2002). Bylo prokázáno, že používání geneticky modifikovaných plodin vedlo ke snížení používání chemických pesticidů a celkový výnos plodin se zvýšil (Klümper a Qaim, 2014). Pomocí transientní transformace zprostředkované *Agrobacteriem* je možné rychle studovat subcelulární lokalizaci proteinů a interakci proteinů, a také je možná rychlá produkce rekombinantních proteinů (Křenek *et al.*, 2015).

2.9.1 Transientní transformace *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana tabacum a *Nicotiana benthamiana* jsou používány ve vědě díky tomu, že jsou náchylné k velkému počtu rostlinných virů. *N. benthamiana* se tedy stala důležitým modelem pro studium interakcí hostitel – virus v rostlinách (Horsch *et al.*, 1985; Dasgupta *et al.*, 2001).

Transientní transformace je zprostředkována pomocí agroinfiltrace na listy, kokultivací a agroinfekcí různými kmeny *Agrobacteria*. Listy *N. benthamiana* jsou široce používány na agroinfiltraci díky jednoduchosti a vysoké účinnosti. Oproti stabilní transformaci je metoda transientní transformace jednodušší a rychlejší (Voinnet *et al.*,

2003; Yang *et al.*, 2000). Transformace listů *N. benthamiana* pomocí *Agrobacteria* se používá v experimentech, jenž umožňují následnou vizualizaci subcelulárních kompartmentů, které jsou označeny molekulárními markery obsahujícími GFP (green fluorescent protein), YFP (yellow fluorescent protein) nebo RFP (red fluorescent protein) (Křenek *et al.*, 2015).

2.9.2 Stabilní transformace *Medicago sativa*

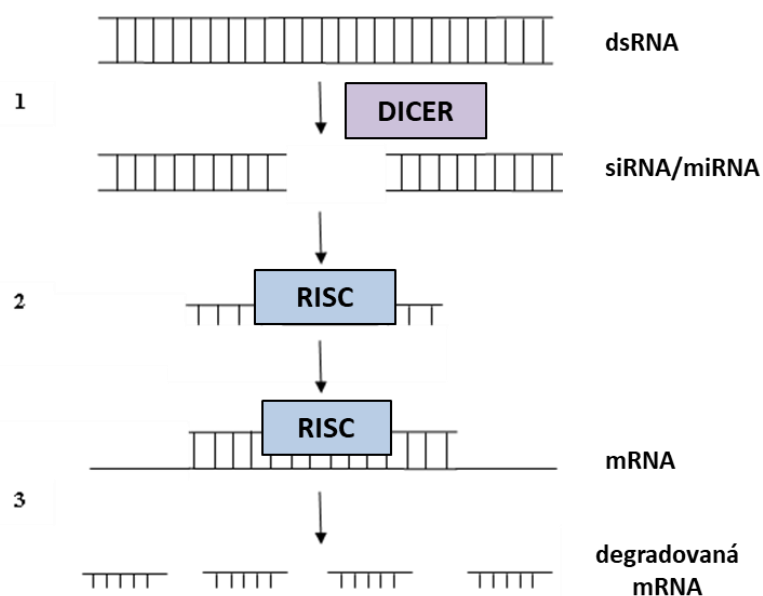
Pro transformaci vojtěšky bylo dosud objeveno mnoho různých metod, avšak prozatím je nejúčinnější a nejrychlejší metodou kultivace listů s *A. tumefaciens*, kde se následně indukují somatická embrya. Takto bylo již vytvořeno několik transgenních rostlin vojtěšky, které sloužily pro produkci vysoce hodnotných sloučenin, průmyslových enzymů a také rostliny, které měly zvýšenou toleranci vůči biotickému a abiotickému stresu. Kmen *A. tumefaciens* LBA4404 se jeví jako jeden z nejúčinnějších kmenů. Další kmény byly neúčinné nebo prokázaly celkově nižší transformační účinnost. Explantáty pocházejí z povrchově sterilizovaných listů a jsou pěstovány v růstové komoře. Doporučená doba kultivace je 7 až 8 dní, kratší časové periody vykazují nižší účinnost transformace. Po odstranění *A. tumefaciens* se explantáty přenášejí na selektivní médium obsahující selektivní činidlo kanamycin, kde se tvoří kalusy 2 až 3 týdny. Pro zabránění opětovného růstu *A. tumefaciens* lze například použít antibiotikum ticarcilin. Na kalusu se vytvoří zralá embrya a ve stádiu děložních listů se přenášejí na nové médium, kde se z nich tvoří rostliny. Po tom, co se vytvoří výhonky, jsou rostliny přeneseny do média bez kanamycinu, kde se stimuluje růst kořenů, popřípadě se rostliny přesadí do půdy, kde se kořeny vytvoří (Samac, 1995; Austin *et al.*, 1995; Austin *et al.*, 1995; Austin-Phillips *et al.*, 1999; Tesfaye *et al.*, 2001; Samac a Temple, 2004). Například na území USA transgenní vojtěška s rezistencí na herbicidy byla pěstována na více než 200 000 hektarech (James, 2011).

2.10 RNA interference

Interference RNA (RNAi) je endogenní mechanismus, který je zodpovědný za úroveň exprese genu. RNAi souvisí s mnoha jevy, například s transpozonovou aktivitou nebo rezistencí na virovou infekci. Využívá dvouvláknovou RNA (dsRNA), která indukuje umlčování genů u různých organismů. Jedná se o technologii „knockdown“, používanou pro genovou analýzu (Hannon, 2002; Kusaba, 2004; Zhang, 2013). V rámci RNAi genom podléhá změnám, jako jsou methylace DNA, tvorba heterochromatinu nebo programovaná eliminace DNA (Agrawal *et al.*, 2003).

Na začátku je dsRNA rozpoznána Dicerem, enzymem patřícím do rodiny RNas III. Dicer degraduje dsRNA na malé interferující RNA (siRNA) o délce 21 – 25 nukleotidů. Poté je jeden ze dvou řetězců siRNA začleněn do RNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC). Jedná se o multiproteinový komplex, například rodina proteinů Agronaute tvoří součást tohoto komplexu, přičemž jsou tyto proteiny pomocí siRNA nebo miRNA vedeny k cílené mRNA pro její umlčení nebo degradaci. siRNA je v RISC využívána jako předloha pro rozpoznání komplementární mRNA. Následná degradace mRNA má za následek sníženou hladinu translace proteinu (Obr. 4) (Agrawal *et al.*, 2003; Kusaba, 2004; Höck a Meister, 2008; Zhang, 2013). Cílové mRNA se tedy nemohou akumulovat v cytosolu, avšak je stále možné je detekovat pomocí jaderných testů (Fagard a Vaucheret, 2000; Agrawal *et al.*, 2003). *A. tumefaciens* je nejčastěji používána k dodávání transgenních konstruktů do hostitelských rostlin (Yin *et al.*, 2005). Lindbo a Dougherty ve své studii zjistili, že rostliny transformované virovými transgeny vykazují ochrannou funkci proti virům i přesto, že nevytváří žádný transgenní protein (Lindbo a Dougherty, 1992; Agrawal *et al.*, 2003).

Interference RNA může mít dopad na zlepšování plodin pomocí metabolického inženýrství, dále je významná při snižování alergenicity, jelikož umlčuje specifické alergeny u rostlin. Tuto technologii lze také používat při zvyšování nutričních hodnot plodin, případně pro rezistenci vůči patogenům a nemocem (Ali *et al.*, 2010).



Obr. 4: Zjednodušené schéma mechanismu RNA interference: **1** dsRNA je enzymem Dicerem rozštěpena na menší interferující siRNA. **2** vždy jedno vlákno siRNA je začleněno do multiproteinového komplexu RISC. **3** siRNA zabudovaná v komplexu RISC rozpozná pomocí komplementarity bází cílovou mRNA, která je následně tímto komplexem degradována na menší části.

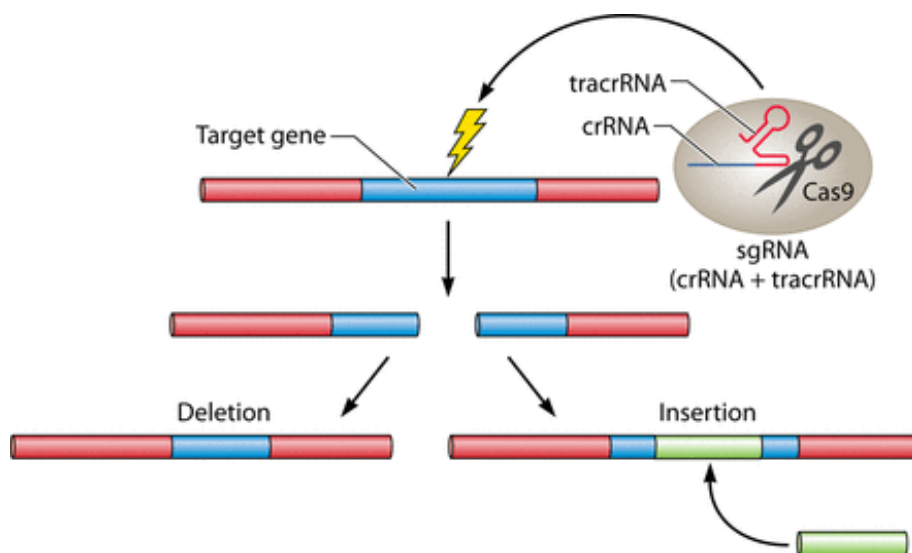
2.11 CRISPR/Cas9 technologie

Mezi novodobé nástroje pro genové inženýrství patří metoda CRISPR/Cas. Jedná se o shloučené a pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice – CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Díky tomuto systému mají bakterie a archea adaptivní imunitu proti virům a plazmidům (Jinek *et al.*, 2012).

Byly nalezeny tři typy CRISPR/Cas systému. Typ II potřebuje pouze jeden protein Cas – Cas9. Cas9 obsahuje dvě nukleasové domény RuvC blízko aminového konce a HNH uprostřed proteinu, která je pravděpodobně zodpovědná za cílové štěpení molekuly DNA (Jakubauskas *et al.*, 2007; Makarova *et al.*, 2011). CRISPR/Cas9 se tedy skládá z endonukleasového proteinu Cas9 a dvou malých RNA molekul, CRISPR RNA (crRNA) a transaktivující crRNA (tracrRNA) (Jinek *et al.*, 2012; Karvelis *et al.*, 2013). crRNA a tracrRNA mohou být fúzovány za vzniku vodící molekuly sgRNA (single guide RNA), která dokáže nasměrovat endonukleasový protein Cas9 do vybrané cílové sekvence (Obr. 5) (Mali *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Místo specifického štěpení je určeno komplementaritou bází mezi crRNA a cílovou protospacerovou DNA, a také krátkým protospacer sousedícím motivem – PAM (protospacer adjacent motif), který se nachází vedle komplementární oblasti v cílené DNA (Jinek *et al.*, 2012). Pokud

by sekvence PAM nebyla přítomná, mohlo by dojít ke změně afinity mezi endonukleasou Cas a cílovou DNA (Westra *et al.*, 2013).

Díky molekule sgRNA, která zprostředkuje informaci o cílené sekvenci je multiplexová editace snadnější u mnoha typů buněk a organismů. Technologie CRISPR/Cas9 poskytuje rychlou a levnou variantu pro editaci genomu (Mahfouz *et al.*, 2014).



Obr. 5: Technologie CRISPR/Cas9 při editaci genomu. Úprava genomu spočívá ve štěpení dvouřetězcové DNA v cílené sekvenci. CRISPR RNA (crRNA) má sekvenci homologní s cílovým místem transaktivující CRISPR RNA (tracrRNA) jsou zodpovědné za přesun endonukleasy Cas9 do cílového místa. crRNA a tracrRNA jsou spojeny do jednoho řetězce RNA – sgRNA. Komplex Cas9-sgRNA štěpí cílový gen, a poté je možné narušit funkci genu delecí popřípadě inzerční mutací (převzato z Ishino *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Alfa aesar

Gellan Gum Powder

BioRad

4x Laemli Sample buffer, akrylamid/bis-akrylamid, Clarity™ Western ECL Substrate, TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions

Duchefa Biochemie

fosfinitricin; kanamyci; rifampicin; spectinomycin; ticarcillin; Gamborg's B5 basal salt mixture; Gamborg's B5 vitamin mixture (1000x); glutamin; kinetin; 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D); Murashige-Skoog's salt mixture; Nitsch and Nitsch vitamin mixture (1000x); Shenk & Hildebrant vitamin mixture (100x); Shenk & Hildebrantbasal salt mixture

GE Healthcare

Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF Blottig Membrane

Nippon Genetics

Midori Green

Roche

cOmplete™ ; PhoSTOP™

Sigma

agarosa; glycerol; 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina monohydrát (MES); 4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenonadenin (Acetosyringon); dusičnan draselný (KNO₃); ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA); heptahydrát síranu horečnatého (MgSO₄ · 7H₂O); hydroxid draselný (KOH); hydroxid sodný (NaOH); chlorid hořečnatý (MgCl₂); L-glutation; L-prolin; L-serin; Luria Bertani (LB) broth médium; LB broth médium s agarem; myo-inositol; sacharosa; trypton; Tween 20; β-merkapt ethanol; Tris; methanol; sacharosa; dithiotreitol; dodecylsíran sodný, hovězí sérový albumin, Ponceau S; isopropanol, methanol; N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED); ethanol 96%; ethanol 70%; sacharosa

Thermo Fisher Scientific

6x DNA loading dye; GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, 10 mmol·l⁻¹ dNTPs, DreamTaq DNA Polymerase

3.1.2 Použité protilátky

primární králičí protilátka anti-MMK3 (1:5000, 3% BSA; GenScript); primární králičí protilátka Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000, 3% BSA; Cell Signaling Technology); primární myší protilátka anti-GFP (1:500, 3% BSA; Sigma Aldrich); sekundární anti-myší protilátka s křenovou peroxidasou (1:5000, 1% BSA; Santa Cruz Biotechnology); sekundární kozí anti-králičí protilátka s křenovou peroxidasou (1:5000, 1% BSA; Invitrogen)

3.1.3 Přístroje

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)

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

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

Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)

Automatické pipety (Eppendorf)

Centrifuga ROTANA 460R (Scholler Instruments)

Centrifuga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific)

Čtecí zařízení Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader (Tecan)

Dokumentační zařízení ChemiDoc™EZ Imager (Bio-Rad)

Dokumentační zařízení ChemiDoc™ MP Imaging systém (Bio-Rad)

Fluorescenční binokulární stereomikroskop Leica M165FC (operační program LAS V 4.0, Leica)

Huawei P9 Lite (Huawei)

Image Lab™ Software (Bio-Rad)

Inkubátor IN55 (Mettler)

Konfokální laserový mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 (operační program Zen Black 2012, Zeiss)

Kultivační komora (Weiss Gallenkamp)

Laboratorní digestoř M 1200 (Merci)

Laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering)

Laminární box (Merci)

Magnetická míchačka (MSH-420, Boeco)
Mikrocentrifuga Microfuge 16 (Beckman Coulter)
pH metr stolní PC 2700 (Eutech instruments)
Skener Image Scanner III (Epson)
Spektrofotometr Smart Spec™ plus (Bio-Rad)
Teplotní sterilizátor (Schuett-biotec.de solaris)
Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)
Třepačka s nastavitelnou teplotou a časem ES-20 (Biosan)
Třepačka Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan)
Vizualizátor Gel Doc™ EZ Imager (operační program Image Lab 4.0.1., Bio-Rad)
Vortex Microspin FV2400 (Biosan)
Zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad)
Zoomovací fluorescenční streomikroskop Axio Zoom. V16 (operační program Zen Blue 2011, Zeiss)

3.1.4 Software

ImageLab (BioRad); ImageJ; i-control™ Microplate Reader Software (Tecan); Zen 2012 Black software (Zeiss); Zen 2011 Blue software (Zeiss); Excel (Microsoft Office); EPSON Scan software

3.1.5 Roztoky a média

Sterilizační roztok na sterilizaci listů *M. sativa*

36 ml dH₂O; 4 ml 10% hypochlorid sodný; 40 µl Tween 20

Roztok aminokyselin

6,65g·l⁻¹ glutamin; 0,83 g·l⁻¹ serin; 0,004 g·l⁻¹ adenin; 0,0083 g·l⁻¹ L-glutation; 1000 ml dH₂O

Zásobní roztok 2,4-D

0,01 g 2,4-D; 50 µl ethanol; 800 µl dH₂O; 150 µl 1 M NaOH; 9 ml dH₂O

Zásobní roztok kinetinu

0,001 g kinetin; 20 µl 1 M NaOH; 9,98 ml dH₂O

1000x Gamborg's vitamin solution

112 g Gamborg's B5 vitamin mixture; 1000 ml dH₂O

B5H médium

3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture; 0,5 g·l⁻¹ KNO₃; 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0,5 g·l⁻¹ L-prolin; 30 g·l⁻¹ sacharosa; 4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum Powder; doplněno na 1000 ml dH₂O; pH 5,7 upraveno pomocí 0,1M KOH

Po sterilizaci v autoklávu bylo ve flowboxu přidáno 30 ml roztoku aminokyselin, 1 mg·l⁻¹ 2,4-D a 1 mg·l⁻¹ kinetinu. 1000x Gamborg's vitamin solution 1 ml. Podle potřeby antibiotika: 1 ml tikarcilinu 500 mg·ml⁻¹ + 9 ml sterilní dH₂O, 160 µl fosfinitricinu nebo 500 µl kanamycinu.

B50 médium

3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture; 0,5 g·l⁻¹ KNO₃; 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0,5 g·l⁻¹ L-prolin; 30 g·l⁻¹ sacharosa; 4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum Powder; doplněn na 1000 ml dH₂O; pH 5,7 upraveno pomocí 0,1M KOH

Po sterilizaci v autoklávu bylo ve flowboxu přidáno 30 ml roztoku aminokyselin. 1000x Gamborg's vitamin solution 1 ml. Podle potřeby antibiotika: 1 ml tikarcilinu 500 mg·ml⁻¹ + 9 ml sterilní dH₂O, 160 µl fosfinitricinu nebo 500 µl kanamycinu.

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution

108,73 g Nitsch vitamin mixture, 1000 ml dH₂O

MMS médium

4,3 g·l⁻¹ MS basal salt mixture; 0,1 g·l⁻¹ Myo-inositol; 30 g·l⁻¹ sacharosa; 4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum Powder; doplněno na 1000 ml dH₂O; pH 5,7 upraveno pomocí 0,1M KOH

Po sterilizaci autoklávem byl ve flowboxu přidán 1 ml Nitsch and Nitsch vitamin solution. Podle potřeby antibiotika: 1 ml tikarcilinu 500 mg·ml⁻¹ + 9 ml sterilní dH₂O, 160 µl fosfinitricinu nebo 500 µl kanamycinu.

MS médium

4,3 g·l⁻¹ MS basal salt mixture; 30 g·l⁻¹ sacharosa; 4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum Powder; doplněno na 1000 ml dH₂O; pH 5,7 upraveno pomocí 0,1M KOH

1/2 MS médium

2,15 g·l⁻¹ MS basal salt mixture; 10 g·l⁻¹ sacharosa; 1 g·l⁻¹ MES; 6 g·l⁻¹ Gellan Gum Powder; doplněno na 1000 ml dH₂O; pH 5,8 upraveno pomocí 1M KOH a 0,1M KOH před přidáním Gellan Gum Powder

LB médium

25 g·l⁻¹ LB Broth; 1000 ml dH₂O; pH 7,2 upraveno pomocí 1M NaOH

SH médium

3,2 g·l⁻¹ Schenk and Hildebrandt basal salt mixture; 30 g·l⁻¹ sacharosa; 0,5 g·l⁻¹ MES; doplněno dH₂O na konečný objem 1 l; pH 5,7 upraveno pomocí 1M KOH

Po sterilizaci v autoklávu bylo ve flowboxu přidáno 10 ml Schenk and Hildebrandt vitamin solution.

SH vitamíny

1,0105 g Scheng a Hildebrandt vitamin mixture; 10 ml dH₂O; sterilizace pomocí filtrace

Inokulační médium

2 g·l⁻¹ MES; 10 ml 1M MgCl₂; doplněno sterilní dH₂O do 1 litru; úprava pH na 5,6 pomocí 0,1M KOH

TAE pufr (50x)

121 g Tris; 28,55 ml kyselina octová; 50 ml EDTA (0,5 ml·l⁻¹); 421,45 ml dH₂O; pH 8

TAE pufr (1x)

20 ml·l⁻¹ 50x TAE; doplněno dH₂O do 1 litru

Transfer pufr 10x (TB)

Tris 30 g·l⁻¹; Glycin 144 g·l⁻¹; doplněno MiliQ H₂O na 1000 ml

Pracovní TB

100 ml 100% methanol; 100 ml 10x TB; 800 ml destilované MiliQ H₂O

Tris buffered saline 10x (TBS) pufr

NaCl 87,8 g·l⁻¹; Tris 24,2 g·l⁻¹; doplněno MiliQ H₂O na 1000 ml; pH 7,4 upraveno pomocí koncentrované HCl

TBST pufr

100 ml 10x TBS; 1 ml Tween 20; doplněno MiliQ H₂O na 1000 ml

Running pufr (RB)

Tris 30 g·l⁻¹; Glycin 144 g·l⁻¹; SDS 10 g·l⁻¹; doplněno MiliQ H₂O na 1000 ml

Pracovní RB

100 ml 10x RB; 900 ml MiliQ H₂O

Extrakční pufr na 1 ml

10 µl 1M DDT; 20 µl CompleteTM; 50 µl PhoStopTM

0,5 M Tris-HCl pH6,8

6g Tris; 60 ml MiliQ H₂O; pH 6,8 upraveno pomocí 1M HCl; doplněno MiliQ na 100 ml

1,5 M Tris HCl pH 8,8

54,45 g Tris; 150 ml MiliQ H₂O; pH upraveno na 8,8 pomocí 1M HCl; doplněno MiliQ H₂O na 300 ml

0,5 M NaOH

20 g NaOH; 1000 ml dH₂O

4% Blotting-Grade Blocker

2 g Blotting-Grade Blocker; 50 ml TBS-T

Barvivo Ponceau S

1 g·l⁻¹ Ponceau S 50 ml 5% kyselina octová; doplněno MiliQ H₂O na 1000 ml

3.1.6 Gely pro elektroforézu

1% Agarosový gel

1 g agarosa; 100 ml TAE pufr (1x); 1 µl Midori Green doplněn po rozpuštění agarosy

10% dělicí polyakrylamidový gel

2,425 ml dH₂O; 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 1,25ml 40% akrylamid; 0,05 ml 10% SDS; 0,025 ml 10% APS (5 mg/50 µl); 0,0025 ml TEMED

10% zaostřovací polyakrylamidový gel

0,795 ml dH₂O; 0,315 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,125 ml 40% akrylamid; 0,0125 ml 10% SDS; 0,00625 ml 10% APS (5 mg/50 µl); 0,00125 ml TEMED; 0,0025 ml Bromophenol blue

10% gel Stain-Free Resolver

3 ml FastCast Resolver A, 10%; 3 ml TGX FastCast Resolver B; 30 µl 10% APS; 3 µl TEMED

10% gel Stain-Free Stacker

1 ml FastCast Stacker A; 1 ml TGX FastCast Stacker B; 10 µl 10% APS; 2 µl TEMED

3.1.7 Rostlinný materiál

Pro stabilní transformaci pomocí *A. tumefaciens* byla použita *Medicago sativa* L. divoký typ Regen SY (RSY), pěstovaná v hlíně.

Pro transienční transformaci pomocí *A. tumefaciens* byla použita rostlina *N. benthamiana* L. pěstovaná v hlíně.

Pro fenotypovou analýzu *A. thaliana* byli použiti mutanti *mpk13* AT1G07880 SALK_130193, SALK_204107C, SALK_048680 a jako kontrola ekotyp Columbie (Col-0).

Rostliny byly kultivovány v kultivační místnosti (Weiss Gallenkamp) při teplotě 21 °C, s fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma, intenzita světla 60 až 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a s 71% vlhkostí.

3.1.8 Bakteriální materiál

A. tumefaciens kmen GV3101 (pGWB455) nesoucí konstrukty *35S::mRFP:MMK3*, *35S::MMK3:mRFP*.

A. tumefaciens kmen GV3101 (pB7m34GW) nesoucí konstrukt *35S::MMK3:GFP*.

A. tumefaciens kmen GV3101 (pDe-Cas9) nesoucí konstrukty Cas9:MMK3-gRNA-T1A, Cas9:MMK3-gRNA-T2A, Cas9:MMK3-gRNA-T6.

Bakteriální materiál byl poskytnut od vedoucího bakalářské práce.

Seznam použitých konstruktů a jejich rezistence k antibiotikům uveden v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2 Seznam použitých konstruktů a jejich antibiotická rezistence. Spe – Spectinomycin, Rif – rifampicin, Kan – kanamycin, Fos – fosfomicin.

Konstrukt	Antibiotikum (rezistence bakterie)	Koncentrace antibiotik ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antibiotikum (rezistence rostliny)	Koncentrace antibiotik ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>35S::mRFP:MMK3</i>	Spe/Rif	100/100	Kan	50
<i>35S::MMK3:GFP</i>	Spe/Rif	100/100	Fos	10
Cas9:MMK3-gRNA-T1A	Spe/Rif	100/100	Fos	10
Cas9:MMK3-gRNA-T2A	Spe/Rif	100/100	Fos	10
Cas9:MMK3-gRNA-T6	Spe/Rif	100/100	Fos	10
P19	Kan/Rif	25/100	X	X

3.2 Metody

3.2.1 Somatická embryogeneze *Medicago sativa*

Sterilizace a příprava listů

Z rostlin *M. sativa*, které byly pěstovány v hlíně ve fytotronu, byly odštíhnuty mladé zdravé trojlístky a byly vloženy do 50 ml konické zkumavky s kohoutkovou vodou. Trojlístky byly poté v laminárním boxu sterilizovány. Sterilizace byla provedena nejprve v etanolu po dobu 10 sekund a následně ve sterilizačním roztoku 2,5 minuty. Nakonec byly trojlístky minimálně třikrát promyty ve sterilní destilované vodě. Poté byly lístky *M. sativa* přeneseny na filtrační papír a pomocí skalpelu byly jednotlivé lístky rozříznuty na dvě až tři části.

Průběh somatické embryogeneze

Připravené sterilní části lístku byly přesunuty na Petriho misky s B5H médiem inkubované ve fytotronu při teplotě 21 °C, s fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma, intenzita světla 60 až 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a s 71% vlhkostí. Na B5H médiu se z lístků po dobu 3 týdnů tvořil kalus. Poté byly kalusy přeneseny na Petriho misky s B50 médiem, které indukovalo tvorbu embryí. Po dvou až čtyřech týdnech byla vytvořená embrya přenesena na Petriho misky s MMS médiem, na kterém byl indukován růst kořenů. Po jednom až třech týdnech z embryí vyrůstaly kořeny, případně i nadzemní část rostliny, které byly přesunuty na Petriho misky s MS médiem, na kterém se rostlinky udržovaly *in vitro*. Všechny přesuny z jednotlivých médií probíhaly v laminárním boxu, aby se zabránilo kontaminacím.

3.2.2 Naočkování bakterií

Obdržená tekutá kultura *A. tumefaciens* s daným vektorem byla naočkována do LB média s příslušným antibiotikem (rifampicin 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a spektinomycin 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebo kanamycin 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, finální koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). LB médium bylo přelito do Erlenmayerových baněk popřípadě do falkonových zkumavek. Na 10 ml LB média bylo použito 15 μl kultury *A. tumefaciens* a 20 μl z jednotlivých antibiotik. Vše probíhalo v laminárním boxu ve sterilním prostředí. Poté se takto naočkováná bakteriální kultura nechala kultivovat na třepačce při 28 °C, 220 rpm 24 hodin.

3.2.3 Transientní transformace *Nicotiana benthamiana*

Příprava bakteriální kultury pro infiltraci listů *N. benthamiana*

Po 24 hodinách od naočkování bakterií byl změřen počet narostlých bakterií pomocí spektrofotometru při OD_{600} . Do kyvety byl napipetován 1 ml LB média

s agrobakteriemi a jako blank byl použit 1 ml LB média s danými antibiotiky. Zbylé množství agrobakterií v LB médiu bylo centrifugováno při 3000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odlit do odpadní láhve v digestoři a k peletu byl přidán 1 ml inokulačního média. Vzniklá směs byla rozsuspendována na vortexu. Poté bylo v laminárním boxu ze směsi odpipetováno 50 µl a napipetováno do kyvety, ve které bylo již napipetováno 450 µl čistého inokulačního média (10x ředěno). Dále byla změřena absorbance na spektrofotometru při OD₆₀₀, přičemž jako blank bylo použito 500 µl čistého inokulačního média. Výsledná hodnota byla vynásobena 10x. Následně bylo vypočteno množství bakterií v inokulačním médiu, které je potřeba použít na transformaci tak, aby výsledná hodnota OD₆₀₀ činila 0,7 v 1 ml. Inkubace roztoku čistého inokulačního média s agrobakteriemi probíhala 2-3 hodiny za tmy.

Infiltrace listů *N. benthamiana*

Pomocí plastové stříkačky byla provedena inokulace suspenze přes průduchy do spodní strany listu *N. benthamiana*. Aby byly průduchy více otevřené, bylo potřeba ráno rostliny tabáku zalít. Poté byly rostliny přeneseny do fytotronu a po třech, případně čtyřech dnech od transformace, byly listy pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu ZEISS LSM 710.

3.2.4 Mikroskopování transformovaných částí listu

Pro pozorování na mikroskopu bylo potřeba zhotovit preparát z listu *N. benthamiana*, který byl inokulován. Nůžkami byl z inokulovaného listu odstříhnut kousek ve tvaru trojúhelníku tak, aby byla odebrána část listu, kde inokulace stříkačkou začínala. Následně byla část listu přenesena na podložní sklíčko do kapky vody abaxiální stranou nahoru a překryta krycím sklíčkem. Pro fixaci sklíček byla použita oboustranná lepicí páska a parafilm.

3.2.5 Stabilní transformace *Medicago sativa*

Příprava bakteriální kultury pro stabilní transformaci

Pro přípravu bakteriální kultury byly použity den předem naočkované bakterie. Pomocí spektrofotometru byla změřena optická denzita při OD₆₀₀, přičemž byl do kyvety napipetován 1 ml LB média s agrobakteriemi a jako blank byl použit 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Zbytek agrobakterií v LB médiu bylo centrifugováno při 3000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odlit do odpadní láhve v digestoři a k peletu byly přidány 3 ml SH média. Poté byl pelet rozsuspendován na vortexu. Následně bylo ve flowboxu ze směsi odpipetováno 50 µl a napipetováno do

kyvety, ve které bylo již napipetováno 450 µl čistého SH média (10x ředěno). Dále byla změřena absorbance na spektrofotometru při OD₆₀₀, kde jako blank bylo použito 500 µl čistého SH média. Výsledná hodnota byla vynásobená 10x. Bakteriální suspenze byly naředěny tak, aby finální OD bylo 0,7 v 1 ml. Ke každé bakteriální suspenzi bylo přidáno 12 ml SH média tak, aby výsledný objem byl 15 ml, ve kterém OD činí 10,5.

Průběh transformace

Byly připraveny a sterilizovány lístky *M. sativa* stejným způsobem jako u somatické embryogeneze. Připravené lístky byly přidány k 15 ml bakteriální suspenze a celý obsah byl kultivován 30 minut na třepačce (20 RPM). Ve flowboxu byly nařezané lístky z bakteriální suspenze vysušeny na filtračním papíru a pomocí pinzety přeneseny na Petriho misku s B5H médiem bez antibiotik pro indukci tvorby kalusů a kokultivaci s bakteriemi. Petriho misky byly překryty filtračním papírem a kultivovány ve fytotronu po dobu jednoho týdne.

Po týdnů kultivace byly na miskách narostlé bakteriální kolonie *A. tumefaciens*. Ve flowboxu byly misky otevřeny, pinzetou byly lístky protaženy médiem, a tak očištěny od nadbytku bakterií. Následně byly lístky přesunuty do sterilní Falkonové zkumavky se sterilní dH₂O a alespoň pětkrát promyty. Očištěné lístky byly vysušeny na filtračním papíru a přeloženy na B5H médium s danými antibiotiky. Následně proběhl proces somatické embryogeneze, přičemž do příslušných médií byly přidány antibiotika podle potřeby.

Kultivace Petriho misek probíhala v kultivační místnosti při teplotě 21 °C a 71% vlhkostí s fotoperiodou 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Pro zjištění transformovaných rostlin byly použity metody PCR, Western blot a fluorescenční mikroskopie.

3.2.6 Fenotypová analýza *mpk13* mutantů *Arabidopsis thaliana*

Sterilizace semen

Celý proces sterilizace semen byl proveden v laminárním boxu. Všechny použité nástroje při práci byly vždy předem sterilizovány 96% etanolem a tepelným sterilizátorem.

Semena byly přesypány do mikrozkuvek o objemu 1,5 ml tak, aby dosahovaly po rysku 0,1 ml. Nejprve byl k semenům napipetován 1 ml 70% etanolu, ve kterém byla semena promíchávána po dobu 5 minut. Poté byl etanol odpipetován a k semenům byl napipetován 1 ml 96% etanolu, ve kterém byla semena promíchávána po dobu 1 minuty. Po vysterilizování etanolem byla semena 3x promyta ve sterilní dH₂O, 2x 5 minut a při

třetím přidání dH₂O byla semena napipetována na sterilní filtrační papír v Petriho misce. Takto tam byla ponechána, dokud neuschla. Poté bylo možné semena rovnou použít k vysázení na Petriho misku s 1/2 MS médiem, popřípadě byla uzavřena v Petriho miskách s filtračním papírem pomocí parafilmu a uskladněna v lednici.

Vysazení semen na Petriho misku

Semena *A. thaliana* byla v laminárním boxu vysazena na 1/2 MS médium pomocí párátka. Na jednu Petriho misku bylo vysázeno 10 semen v řadě, vždy tři opakování pro každou linii. Poté byly Petriho misky s vysazenými semeny uzavřeny pomocí parafilmu a na 4 dny vloženy do lednice, kde probíhala jejich stratifikace.

Následně byly Petriho misky se semeny odneseny do fytotronu, kde se ponechaly ve vertikální poloze při 21 °C a světelných podmínkách 16 h světlo a 8 h tma a intenzita osvětlení 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 71% vlhkost vzduchu. Každé tři dny od vyklíčení byly Petriho misky se semeny snímány pomocí skeneru.

Vyhodnocení fenotypu *mpk13* mutantů

Z pořízených snímků na skeneru byl spočítán počet vedlejších kořenů u rostlin a pomocí počítačového programu ImageJ byla měřena délka hlavních kořenů u rostlin vždy osmý den po vyklíčení.

Následně se k vyhodnocování výsledků použil software Microsoft Excel. K porovnání *mpk13* mutantů byly použity rostliny *A. thaliana* ekotyp Col-0.

3.2.7 Genotypová analýza rostlin metodou PCR

Izolace DNA

Pro izolaci DNA byl odstříhnut kousek lístku z rostliny *M. sativa* nesoucí daný konstrukt a vložen do 1 ml mikrozkušavky s 20 μl dilučního pufru, kde byl lístek ihned rozdrcen pomocí špičky. Poté byly mikrozkušavky s izolovanou DNA ponechány na ledu po dobu 30 – 60 minut. Aby vzorek neobsahoval části listu, byla mikrozkušavka stočena a vzniklý supernatant byl odpipetován do nové 1 ml mikrozkušavky. Takto izolovaná DNA byla použita jako templát pro PCR reakci.

Příprava reakčních směsí

Celkem bylo připraveno několik reakčních směsí pro celkový objem na jeden vzorek 10 μl (Tab. 3). Lišily se v použití primerů pro dané konstrukty (Tab. 4). Pro listy *M. sativa* nesoucí konstrukt 35S::*MMK3:GFP* byly použity primery 35S CaMV a SS 129. Na rostliny *M. sativa* nesoucí konstrukty Cas9:*MMK3-gRNA-T2A* a Cas9:*MMK3-gRNA-T6* byly použity primery SS42 a SS43. Pro kontrolu přítomnosti genomické DNA byly vždy použity primery MMK3 I3. Jako negativní kontrola byla použita PCR H₂O a jako

pozitivní kontrola byl použit plazmid nesoucí daný konstrukt. Podle počtu vzorků byl objem vynásoben, poté byl namíchán master mix, který byl po 9,5 μ l napipetován do malých Eppendorfových zkumavek, do kterých byl následně napipetován templát po 0,5 μ l. Připravené vzorky byly vloženy do termocykleru, na kterém byly nastaveny podmínky pro PCR reakci (Tab. 5).

Tab. 3 Reakční směs pro amplifikaci genu.

Složka	Objem (μ l)
PCR H ₂ O	6,1
5xBuffer (pufr)	2
10 mM dNTPs	0,2
10 μ l Forward primer	0,5
10 μ l Reverse primer	0,5
Phire polymeráza	0,2
templát	0,5
Celkový objem	10

Tab. 4 Použité primery

Primer	Sekvence
SS42 (forward)	5'-TCCCAGGATTAGAATGATTAGG-3'
SS43 (reverse)	5'-CGACTAAGGGTTTCTTATATGC-3'
35 S (forward)	5'-CTCCTCGGATTCCATTG-3'
SS 129 (reverse)	5'-CACAGGAAACAGCTATGAC-3'
MMK3 I3 (intron3 forward)	5'-TGGGGAGCTTACTGATATAG-3'
MMK3 I3 (intron3 reverse)	5'-AGATCTCGGTGCAAAAC-3'

Tab. 5 Nastavení PCR reakce

Krok	Fáze	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet opakování
1.	Iničiační denaturace	98	0,5	1
2.	Denaturace	98	0,5	
3.	Annealing	57	0,5	35
4.	Elongace	72	3	
5.	Finální elongace	72	10	1

Elektroforéza v agarosovém gelu

Pomocí agarosové elektroforézy v 1% gelu byla ověřena amplifikace daného genu. Do 100 ml agarosového gelu byl přidán 1 µl barviva Midori Green DNA Staining Solution, které zde sloužilo pro vizualizaci DNA. Poté byl gel nalit do aparatury. Do každého vzorku byly napipetovány 2 µl vzorkovacího pufru 6x DNA loading dye, poté se jednotlivé vzorky pipetovaly do jamek v gelu po 5 µl, přičemž jako vzor byl do první jamky napipetován 1,5 µl Gene Ruler. Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při konstantním napětí 90 V po dobu 30 minut. Výsledek elektroforézy byl vyhodnocen pomocí zařízení Gel DocTM EZ systému a softwaru ImageLabTM.

3.2.8 Western blot

Příprava vzorků

Trojlistky *M. sativa* byly pomocí nůžek odstříhnuty z dospělé rostliny a vloženy do mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml. Do každé mikrozkuřavky byly pomocí pinzety vloženy 3 odstřížené trojlistky. Poté byly mikrozkuřavky se vzorky dány do krabice s tekutým dusíkem.

Pro přípravu vzorků *N. benhamiana* byly ustříženy transformované listy, ze kterých byla přesně odstříhnutá část z infiltrovaným inokulačním médiem. Tyto ustřížené části byly vloženy na malý kousek alobalu, do kterého se následně zabalily a takto byly vhozeny do tekutého dusíku.

Homogenizace vzorků probíhá za neustálého chlazení tekutým dusíkem. V případě *M. sativa* byly vzorky homogenizovány přímo v mikrozkuřavce pomocí malého plastového tloučku, přičemž jako podklad sloužila třecí miska, do které byl soustavně přidáván tekutý dusík. Vzorky *N. benhamiana* byly drceny přímo ve třecí misce pomocí tloučku za stálého chlazení tekutým dusíkem. Po rozdrcení byly vzorky přesunuty pomocí podchlazené laboratorní lžice do podchlazené mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml. Vzorky byly drceny, dokud z nich nevznikl drobný, do zeleno-bíla zabarvený prášek. Správná homogenizace byla důležitá, aby výtěžek proteinů ze vzorků byl co nejvyšší.

Extrakce proteinů ze vzorků

Pro extrakci proteinů ze vzorků vzniklých homogenizací se používá extrakční pufr a vše je chlazené na ledě. Před použitím extrakčního pufru bylo nutné do něho přidat redukční činidlo DTT, které zde sloužilo pro rozrušení disulfidických můstků. Dále bylo nutné přidat proteázový inhibitor cOmpleteTM, aby nedocházelo k degradaci proteinů a PhosSTOPTM, který slouží jako ochrana před fosfatasami, aby nedocházelo

k odstraňování fosfátových skupin. Následně byl extrakční pufr přidán k homogenizovaným vzorkům, množství extrakčního pufru bylo přidáváno podle množství homogenizátu. Poté se vzorky promíchaly na vortexu a vzniklá směs byla ponechána na ledu přibližně po dobu 1 hodiny. Následně byly vzorky centrifugovány při 13 000 g při 4°C po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován do čisté na ledu chlazené mikozkumavky o objemu 1,5 ml a opět centrifugován za stejných podmínek jako předtím, aby byly vzorky pro následné používání co nejčistší. Čistý supernatant se ponechal na ledu.

Měření koncentrace proteinů

Absorbance byla měřena pomocí mikrodestičkového spektrofotometru. Do každé jamky, která byla použita na měření absorbance v mikrotitrační destičce, bylo napipetováno 239 μ l MiliQ H₂O a k tomu 60 μ l Protein Assay Reagent Concentrate 5x. Následně se k této směsi přidávaly vzorky vždy po 1 μ l do dané jamky, přičemž byla tato směs pomocí pipety promíchána. Poté se nechaly vzorky 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Vzorky byly měřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 595 nm, přičemž pro zaznamenávání výsledků daných vzorků byl použit počítač se softwarem i-controlTM a následně bylo v Excelu vypočítáno množství proteinů z rovnice lineární regrese kalibrační křivky. Byla použita předem připravená kalibrační křivka.

Příprava gelů do aparatury

Pro separaci jednotlivých proteinů byly použity buď 10% dělicí a zaostřovací polyakrylamidový gel nebo 10% Resolver a Stacker Stain-Free gel. Nejprve byla sestavena aparatura. Dále se v digestoři do sestavené aparatury napipetovalo 5 ml dělicího, popřípadě Resolver, gelu. V případě 10% dělicího polyakrylamidového gelu byl na gel přidán isopropanol, aby se hladina gelu vyrovnala. Gel byl v obou případech ponechán necelou hodinu v digestoři, dokud plně neztuhnul, pak byl u dělicího gelu pomocí filtračního papíru isopropanol odsán. V následujícím kroku se na dělicí/Resolver gel napipetoval gel zaostřovací/Stacker po vrch skla, který má za následek sjednocení a zúžení proteinů do řady, poté byl do gelu vložen hřeben a gel se nechal ztuhnout v digestoři. Po ztuhnutí byl gel připraven k použití, popřípadě se mohl nechat v lednici, přičemž byl zabalen ve folii a lehce pokropen dH₂O.

Zpracování vzorků pro nanesení na gel

Ke vzorkům byl přidán 4x Laemmli pufr a β -merkaptoethanol (1:4), tzv. 4x Laemmli Sample buffer, tak aby ve výsledku vznikl poměr mezi vzorkem a 4x Laemmli Sample

buffer 3:1. Vzniklá směs byla denaturována v digestoři v termobloku při 95°C po dobu 5 minut. Dále bylo možné zpracované vzorky rovnou použít pro gelovou elektroforézu, popřípadě je ponechat v mrazáku při -80°C.

SDS gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Nejprve byla připravena aparatura. Poté se připravený gel vložil do elektroforetické vany, do které byl také nalit running buffer. Následně se vybral hřeben z gelu a v případě *M. sativa* byly do jamek napipetovány vzorky v určitém vypočítaném množství. V případě *N. benthamiana* se do každé jamky napipetovalo 10 µl vzorku. Do první jamky a poté ještě do další zvolené jamky bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu. Následně se elektroforetická vana přikryla víkem a celá aparatura byla zapojena do elektrického zdroje na 70 minut při 180 V. Elektroforetická vana byla po celou dobu v krabici s ledem. Do této elektroforetické vany byly vždy vloženy 4 gely.

Přesun proteinů na membránu

Nejprve byla sestavena aparatura pro western blot, kde se z gelu proteiny přenášejí na PVDF membránu. Z elektroforetické aparatury byl vybrán gel a vložen do transferového pufru. Membrána byla ustřižena tak, aby její velikost činila 8,5 cm x 6 cm a poté byla aktivována v metanolu po dobu 10 s. Pro přenos proteinů byl složen sendvič. K tomu byla použita plastová vanička, do které byl nalit transfer pufr. Do vaničky byla vložena otevřená kazeta, na černou stranu byla vložena černá houbička předem namočená v transferovém pufru. Na houbičku byl položen hrubší filtrační papír, který se také předem namočil do transferového pufru, poté se na filtrační papír položila aktivovaná membrána a na ní rozdělovací gel. Pomocí válečku se z pod membrány odstranily bubliny. Dále se na gel položil opět filtrační papír a na něho černá houbička, přičemž obě věci byly předtím namočený v transferovém pufru. Poté byla kazeta uzavřena a vložena do vany určené pro přenos proteinů tak, aby černá strana směřovala k černé. Do vany byl nalit 1x transferový pufr, a také se do vany vložil chladicí box. Celá aparatura byla přiklopena víkem, přenesena do lednice a zapojena do zdroje při 100 V na 10 minut. Následně se aparatura nechala v lednici při 24 V přes noc. Ráno se aparatura opět nechala při 100 V po dobu 10 minut.

Po přenosu byla membrána vymyta v dH₂O, aby z ní byly odstraněny případné vlákna z filtračního papíru. Dále byla zjištěna úspěšnost přenosu pomocí barvičky Ponceau S, ve které byla membrána inkubována po dobu 5 minut ve skleněné čtvercové misce na třepačce a následně byla 3x promyta v dH₂O. Poté byla membrána vyfocena

přes Chemidoc™ MP systém a byl pro to použit program ImageLab. V následujícím kroku byla membrána vymývána v TBS-T pufru 5 x 10 minut ve skleněné čtvercové misce na třepačce.

Použití protilátek a detekce proteinů

Před samotným použitím protilátek bylo nutné membránu blokovat v 4% BSA po dobu 1 hodiny na třepačce ve skleněné čtvercové misce. Poté bylo 4% BSA odlito a na membránu byla nanesena primární protilátka. V případě anti-MMK3 a anti-pERK protilátek probíhala jejich inkubace s membránou přes noc. U protilátky anti-GFP probíhala inkubace 1 hodinu. Po odstranění primární protilátky byla membrána promývána v TBS-T 5x 10 minut. Dále byla na membránu nanesena sekundární protilátka na dobu 1 hodiny. Po sekundární protilátce byla membrána opět promývána v TBS-T 5x 10 minut.

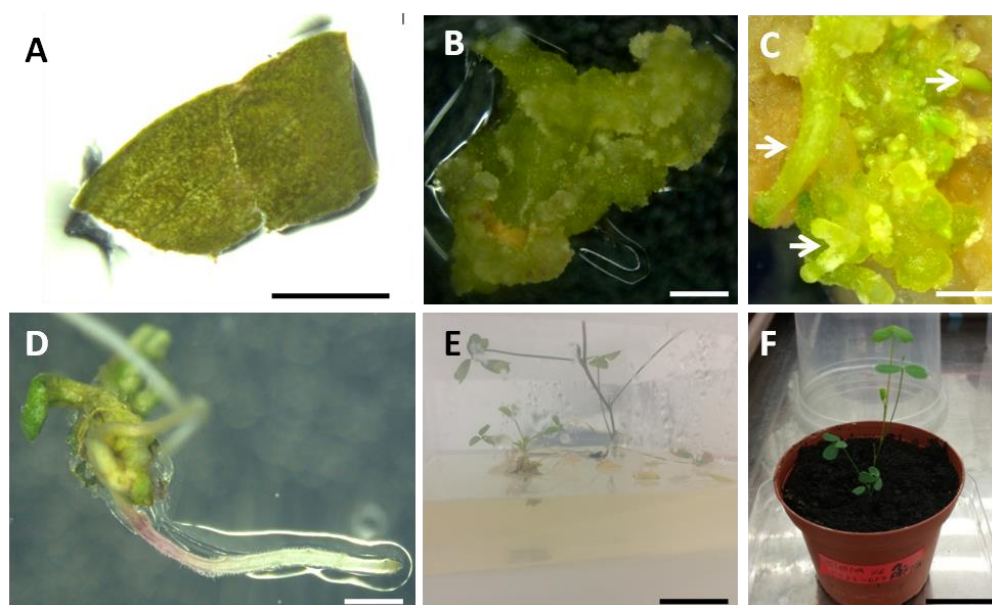
Detekce specifických proteinů na membráně byla provedena pomocí přístroje BioRad ChemiDoc™ MP a programu ImageLab. Předtím než byla membrána vložena do přístroje, bylo potřeba ji namočit do detekčního roztoku ECL po dobu 1 minuty. Následně byla membrána vložena do přístroje, kde byl detekován chemiluminiscenční signál.

Normalizace proteinů z Western blotu byla provedena pomocí programu Image Lab™ Software, přičemž byly detekovány a analyzovány pruhy na PVDF membráně a polyakrylamidovém gelu. Výsledné hodnoty byly převedeny do softwaru Excel, kde byl vytvořen graf. Normalizací vzniklé hodnoty proteinů byly porovnávány s hodnotou 1, kterou nesl vzorek sloužící jako kontrola pro *M. sativa* RSY.

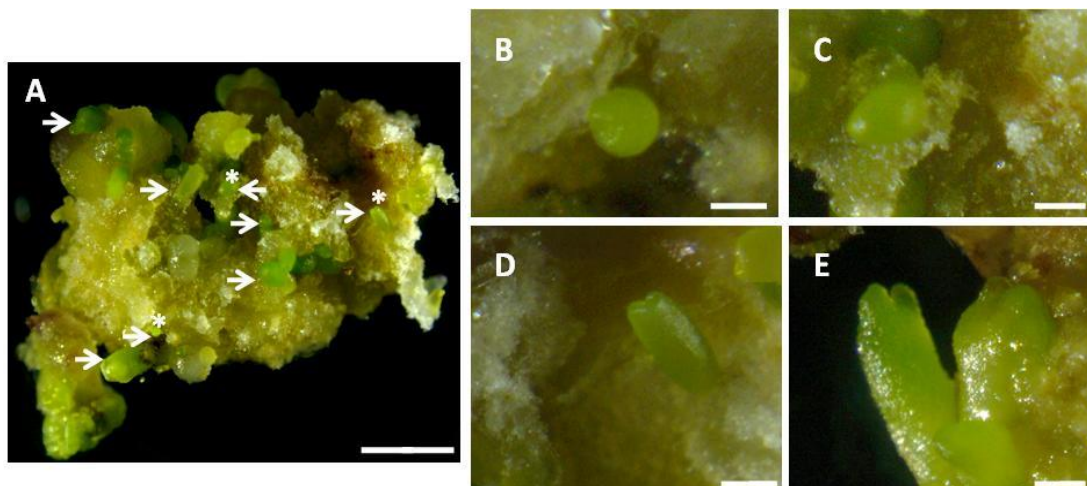
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Somatická embryogeneze *Medicago sativa*

V *in vitro* podmínkách je možné rozmnožovat rostliny prostřednictvím somatické embryogeneze. Nejprve byly sterilizovány listy donorové rostliny *M. sativa* genotyp RSY, které byly následně kultivovány na médiu B5H (Obr. 6 A), které indukuje vznik kalusu z listu (Obr. 6 B). Po třech týdnech byly vzniklé kalusy přeneseny z B5H média na médium B50, na kterém dochází k růstu embryí na kalusech (Obr. 6 C). Embrya během vývoje procházejí různými stádii (Obr. 7), ty která dozrála do torpédovité fáze vývoje (Obr. 7 D, E), byla přenesena na MMS médium, na kterém dochází k jejich dalšímu vývoji a kde je iniciován růst kořenů (Obr. 6 D). Mladé rostlinky vzniklé z embryí na MMS médiu byly přeneseny na MS médium (Obr. 6 E), na kterém již zůstaly růst, popřípadě byly přeneseny do půdy (Obr. 6 F).



Obr. 6: Průběh somatické embryogeneze. **A** Část listového explantátu na B5H médiu, **B** kalus na B5H médiu, **C** kalus se somatickými embryi na B50 médiu, **D** vyvíjející se mladá rostlina z embrya na MMS médiu, **E** mladá rostlina kultivována na MS médiu, **F** mladá rostlina rostoucí v půdě. Měřítka A – D 2 mm; E, F 1 cm. A – D AXIO Zoom.V16, E, F Huawei P9 Lite.



Obr. 7: **A** Kalus se somatickými embrii v různých fázích embryogeneze. Šipky ukazují na embrya, hvězdičky na embrya v obrazcích (**B – D**). Měřítka 2 mm. **B** pozdní globulární embryo, **C** srdčité stádium embrya, **D** brzká torpédovitá fáze embrya, **E** pozdní torpédovitá fáze embrya. Měřítka 1 mm. AXIO Zoom.V16.

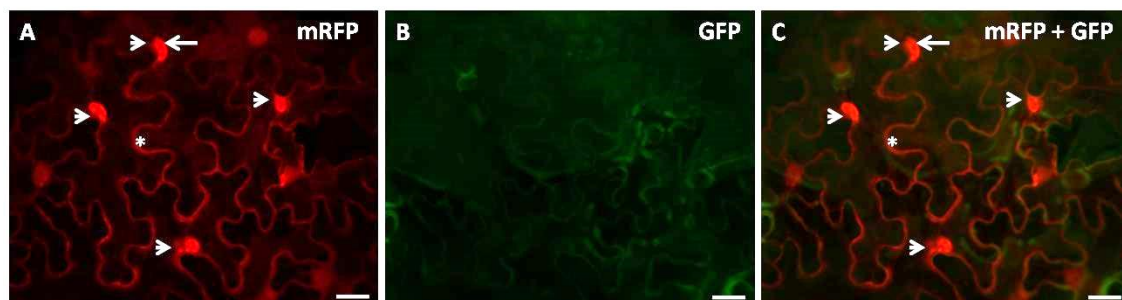
4.2 Transientní transformace *Nicotiana benthamiana*

Transientní transformace pomocí agrofiltrace listů *N. benthamiana* byla použita pro ověření funkčnosti konstruktů *35S::mRFP:MMK3* a *35S::MMK3:GFP*.

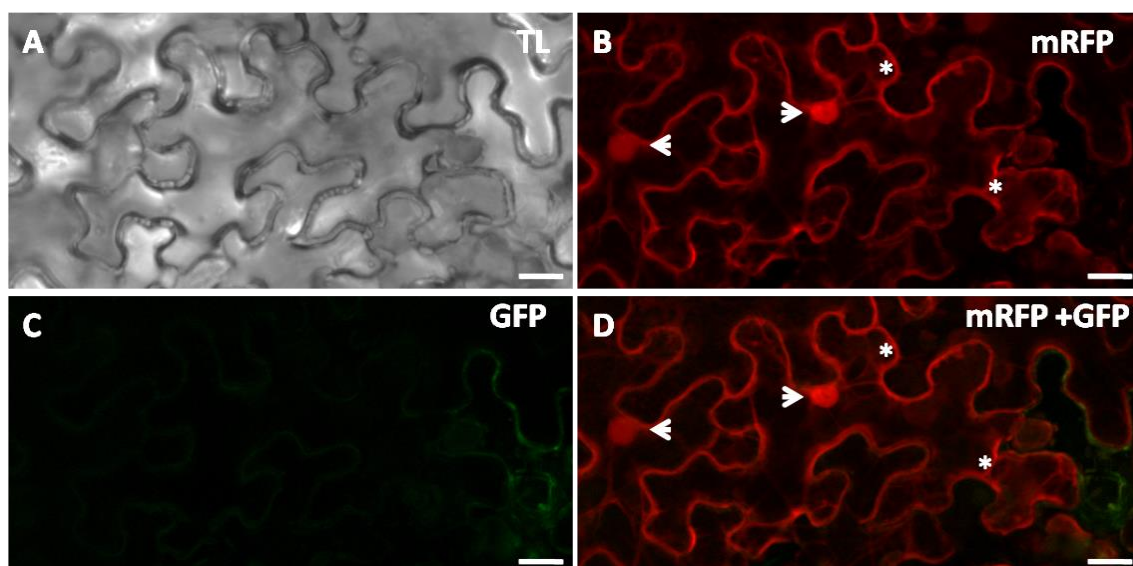
Po 3 – 4 dnech po transformaci byl pozorován fluorescenční signál v listových epidermálních buňkách *N. benthamiana*, ve kterých byl konstrukt exprimován. S dalším narůstajícím počtem dnů se exprese fluorescenčně značených proteinů ztrácí (Lacroix a Citovsky, 2013) a listy tabáku začínají odumírat, vzhledem ke způsobenému stresu transformací. Aby nedocházelo k post-transkripčnímu umlčování RFP-MMK3 a MMK3-GFP proteinu, byl použit plazmid, nesoucí protein p19, který potlačuje post-transkripční umlčení genů (Voinnet *et al.*, 1999). V případě, že tento podpurný plazmid nebyl použit, nezaznamenávali jsme fluorescenční signál v listových buňkách při pozorování mikroskopem.

Pro pozorování fluorescenčního signálu byl použit zoomovací fluorescenční stereomikroskop, konfokální laserový mikroskop (CLSM) a spinning disk (SD). V epidermálních buňkách *N. benthamiana* byl pozorován MMK3 protein značený červeným fluorescenčním proteinem mRFP pomocí konstruktů *35S::mRFP:MMK3* (Obr. 8, 9, 10) a MMK3 protein značený zeleným fluorescenčním proteinem GFP pomocí konstruktů *35S::MMK3:GFP* (Obr. 11, 12). V transformovaných epidermálních buňkách bylo možné pozorovat jádra buněk (Obr. 8 – 12 B, D), jádérko v buněčném

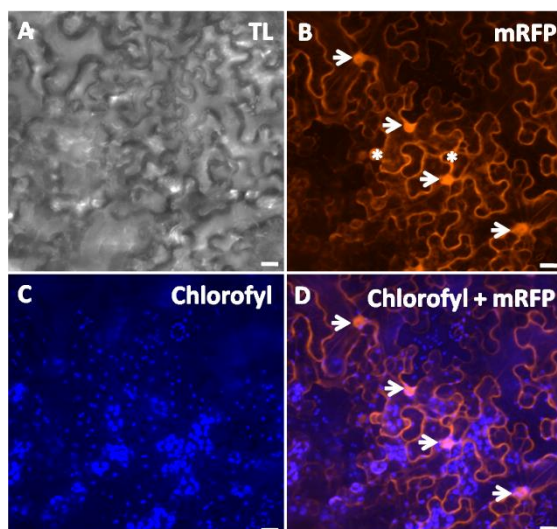
jádře (Obr. 8 A, C), a také cytoplazmatický signál (Obr. 8 – 12), přičemž fluorescenční signál byl pozorován v jádře, plazmatické membráně a cytoplazmě, z čehož vyplývá nejčastější výskyt MMK3 proteinu. Obrázky z konfokálního laserového mikroskopu (Obr. 8, 9) jsou kvalitnější než obrázky pořízené ze zoomovacího fluorescenčního mikroskopu (Obr. 11), přičemž na CLSM se dají pořídit detailnější snímky buněk ve větším zvětšení. Snímky zhotovené pomocí spinning disku (SD) jsou poměrně porovnatelné se snímky z CLSM (Obr. 10, 12).



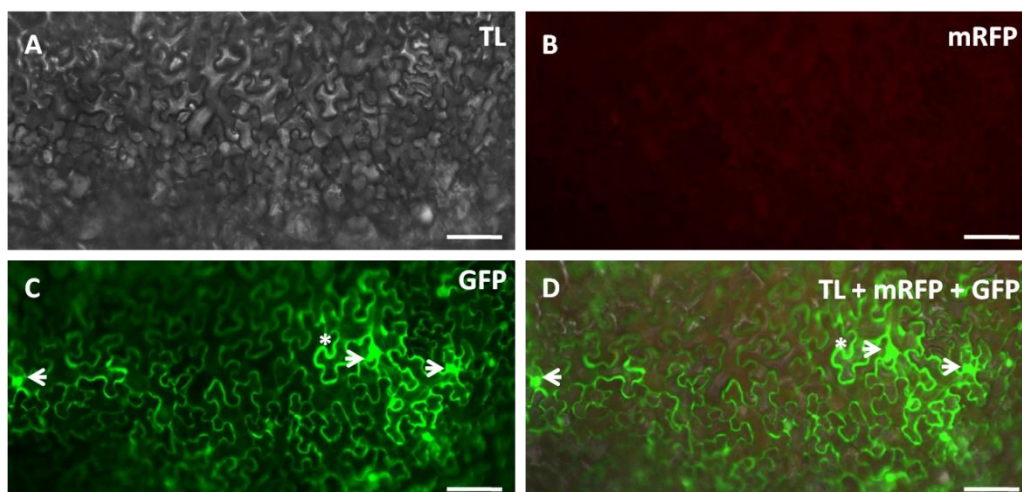
Obr. 8: Lokalizace RFP–MMK3 proteinu v transientně transformovaných buňkách *N. benthamiana*. **A** MMK3 protein vizualizován pomocí fúze s mRFP, **B** kontrola autofluorescence – GFP, **C** sloučené kanály mRFP a GFP. Šípky ukazují na jádérko, hlavičky šipek na jádra. Hvězdičky ukazují specifický cytoplazmatický signál. Měřítko 20 μm . Konfokální laserový mikroskop.



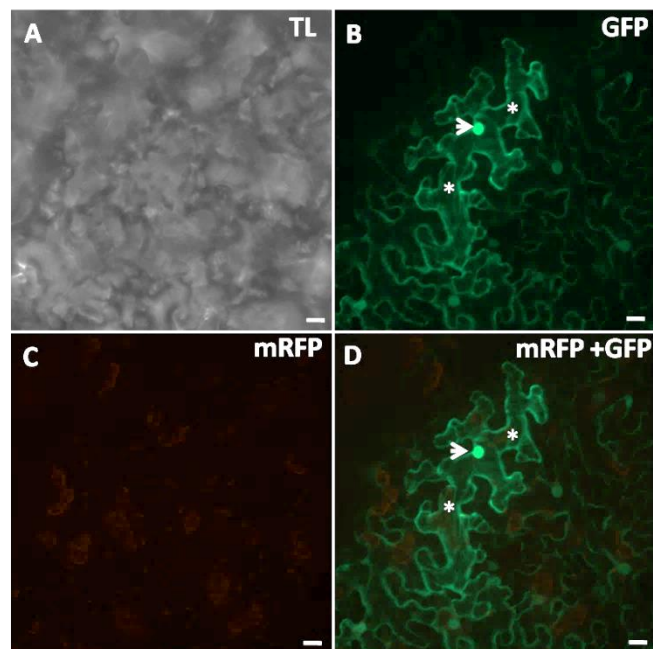
Obr. 9: Lokalizace RFP–MMK3 proteinu v transientně transformovaných buňkách *N. benthamiana*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** MMK3 protein vizualizován pomocí fúze s mRFP, **C** kontrola autofluorescence – GFP, **D** sloučené kanály mRFP a GFP. Hlavičky šipek ukazují na jádra. Hvězdičky ukazují specifický cytoplazmatický signál. Měřítko 20 μm . Konfokální laserový mikroskop.



Obr. 10: Lokalizace RFP–MMK3 proteinu v transientně transformovaných buňkách *N. benthamiana*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** MMK3 protein vizualizován pomocí fúzního proteinu MMK3-mRFP, **C** kontrola autofluorescence – chlorofyl, **D** sloučené kanály mRFP a chlorofyl. Hlavičky šipek ukazují na jádra. Hvězdičky ukazují specifický cytoplazmatický signál. Měřítko 20 μm . Spining disk.



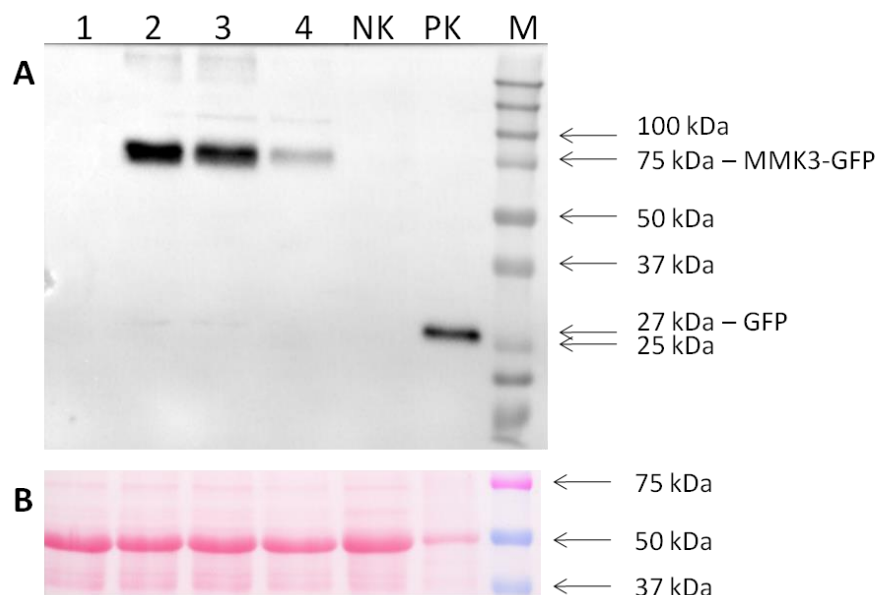
Obr. 11: Lokalizace MMK3–GFP proteinu v transientně transformovaných buňkách *N. benthamiana*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** kontrola autofluorescence – mRFP, **C** MMK3 protein vizualizován pomocí fúzního proteinu MMK3-GFP, **D** sloučené kanály. Hlavičky šipek ukazují na jádra. Hvězdičky ukazují specifický cytoplazmatický signál. Měřítko 100 μm . AXIO Zoom.V16.



Obr. 12: Lokalizace MMK3–GFP proteinu v transientně transformovaných buňkách *N. benthamiana*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** kontrola autofluorescence – mRFP, **C** MMK3 protein vizualizován pomocí fúze s GFP, **D** sloučené kanály. Hlavičky šipek ukazují na jádro. Hvězdičky ukazují specifický specifický cytoplazmatický signál. Měřítko 20 μm . Spining disk.

4.3 Ověření transformovaných rostlin *N. benthamiana* pomocí Western blotu

Byla provedena western blotová analýza z listů *N. benthamiana*, které byly transientně transformovány a nesly konstrukt *35S::MMK3:GFP*. V tomto případě byla zjišťována přítomnost MMK3 proteinu, na který je navázán GFP protein, použitím anti-GFP protilátky. Jako negativní kontrola byl použit netransformovaný list *N. benthamiana* a jako pozitivní kontrola byl použitý vzorek *A. thaliana* Col-0 pMAT nesoucí transgen *35S::GFP*. Protein MMK3 s GFP byl detekován a jejich velikost dohromady činí přibližně 75 kDa (Obr. 13 A). Samotný protein GFP má velikost 27 kDa (Obr. 13 A) a MMK3 44 kDa. Úspěšnost přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu byla zjištěna prostřednictvím barviva Ponceau S (Obr. 13 B).



Obr. 13: **A** Detekce proteinu MMK3 – GFP u transientně transformovaných rostlin *N. benthamiana*. Přítomnost pruhů detekována prostřednictvím anti-GFP protilátky. M – marker; 1 – 4 *35S::MMK3:GFP* v listech *N. benthamiana*; NK – negativní kontrola – netransformované listy *N. benthamiana*; PK – pozitivní kontrola – Col-0 *35S::GFP*. **B** Kontrola přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu prostřednictvím barviva Ponceau S.

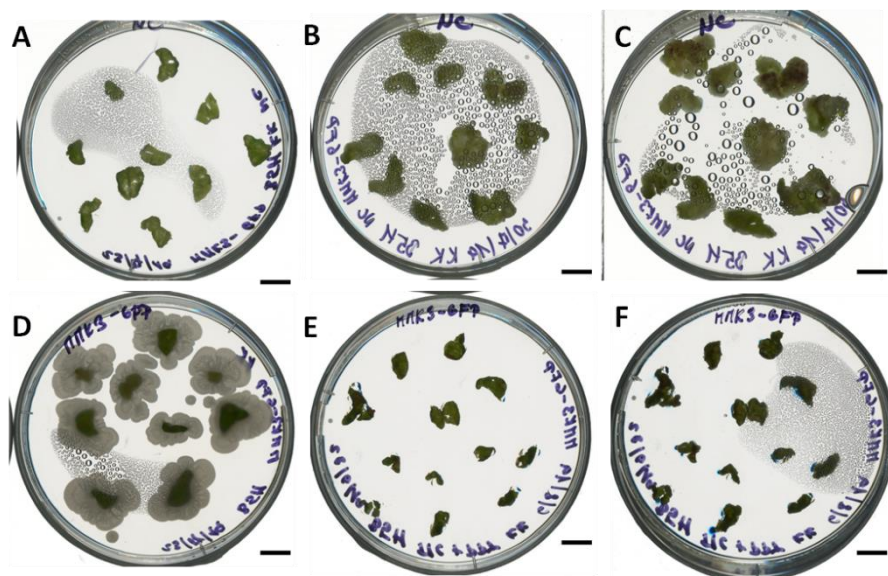
4.4 Stabilní transformace listů *Medicago sativa*

Ověřené konstrukty v *A. tumefaciens* se značeným MMK3 proteinem, byly použity pro stabilní transformaci *M. sativa* (*35S::mRFP:MMK3*, *35S::MMK3:GFP*). Stabilní transformace *M. sativa* byla také použita pro přípravu rostlin s vyřazeným MMK3 proteinem (*Cas9:MMK3-gRNA-T1A*, *Cas9:MMK3-gRNA-T2A* a T6 *Cas9:MMK3-gRNA-T6*).

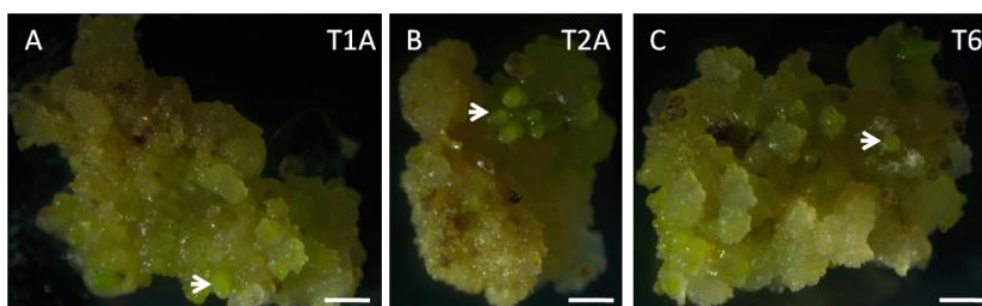
Pro stabilní transformaci rostlin *M. sativa* byl použit proces somatické embryogeneze podle Samac a Austin-Phillips, 2006. Transformované listy kultivované na kalus indukujícím B5H médiu po týdnu obrostly bakteriemi *A. tumefaciens* (Obr. 14 D), zatímco kontrolní listy bakteriemi obrostlé nebyly (Obr. 14 A). Po pročištění od bakterií a přenosu na čerstvé B5H médium s antibiotiky, se již na transformovaných listových explantátech kolonie bakterií netvořily (Obr. 14 E). Po dvou týdnech od transformace bylo možné pozorovat kalusy u listových explantátů negativní kontroly (Obr. 14 B), avšak u transformovaných listových explantátů se kalusy začaly tvořit až po 3 týdnech transformace (Obr. 14 F). To bylo způsobeno tím, že buňky kalusu rostou pomaleji, jelikož jsou v médiu obsžena antibiotika a rostou jen ty buňky, které jsou transgenní, zatímco u kontrolního kalusu rostou všechny buňky, proto je růst rychlejší.

Po 3 – 4 týdnech byly kalusy přeneseny na B50 médium, které indukovalo vznik embryí (Obr. 15). Vyvinutá somatická embrya transformovaných rostlin byla přenesena na MMS médium, kde se z nich postupně vyvíjely celé rostlinky (Obr. 16 A, C), které byly poté přeneseny na MS médium (Obr. 16 D). Jakmile byly rostliny dostatečně velké, byly přesunuty do větších sterilních nádob s MS médiem (Obr. 16 B) nebo do půdy. Pro kultivaci transformovaných explantátů a později i celých rostlin v *in vitro* podmínkách, bylo nutné udržovat sterilní prostředí, aby nedošlo k úhynu vypěstovaných rostlin. Následně bylo na rostlinách prověřeno, jestli byla transformace úspěšná a zda nesou daný transgen. Na obrázcích číslo 15 a 16 je možné vidět vznik kalusů a rostlin, které byly transformované bakteriemi *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty obsahující CRISPR/Cas9 kazetu pro přípravu mutantních linií. Na obrázcích 17 a 18 je zachycen průběh somatické embryogeneze u rostlin, které byly transformované bakteriemi *A. tumefaciens*, které nesly konstrukty s fluorescenčně značeným MMK3 proteinem.

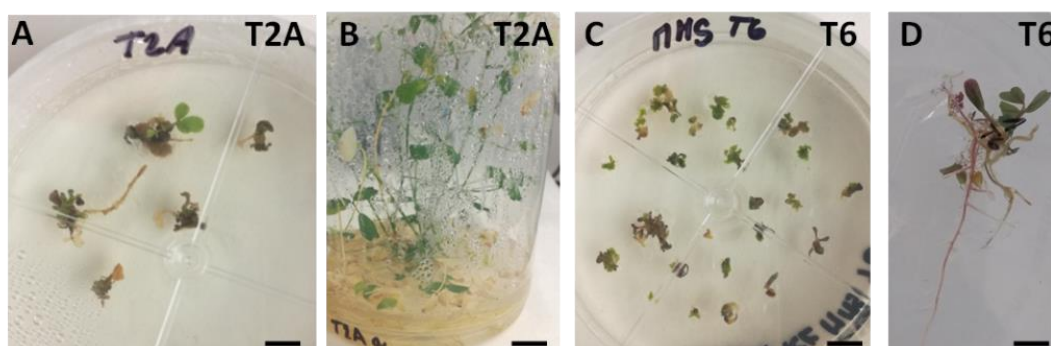
Z transformovaných explantátů *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt Cas9:MMK3-gRNA-T1A nebyla vypěstovaná žádná rostlina. V tomto případě se povedlo dostat explantát pouze do stádia embrya (Obr. 15 A). Vzniklá embrya přenesená na MMS médium vždy odumřela i přesto, že byla vždy v čas přenesena na čerstvé médium. Je tedy možné, že transformace daným konstruktem vedla k předčasnému úhynu explantátu. Dalším možným vysvětlením je, že podmínky ve fytotronu nebyly pro rostliny transformované tímto konstruktem dostatečně vhodné, avšak nebylo možné tyto podmínky speciálně upravovat. Je také možné, že těmto explantátům nevyhovovalo složení jednotlivých médií, ale z časových důvodů nedošlo k optimalizaci médií pro transformované explantáty tímto konstruktem (Zhang *et al.*, 2010).



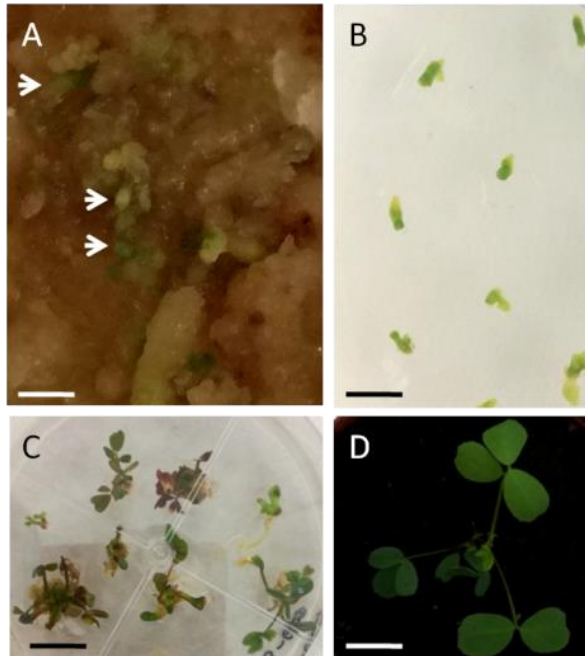
Obr. 14: Proces stabilní transformace *M. sativa*, probíhající na B5H médiu. **A – C** negativní kontrola – netransformované rostliny, **D – F** rostliny transformované konstruktem 35S::MMK3:GFP. Měřítko 1 cm. Skener Image Scanner III.



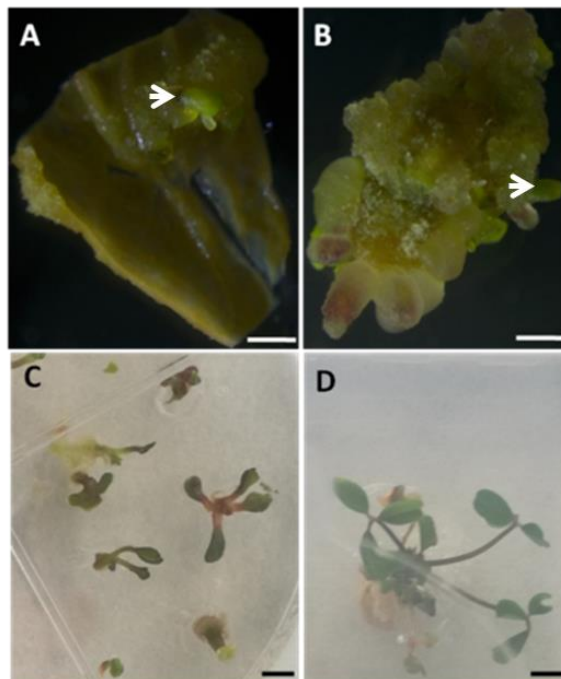
Obr. 15: Kalusy se somatickými embryi na médiu B50 TIC + PPT. **A T1A** – Cas9:MMK3-gRNA-T1A, **B T2A** – Cas9:MMK3-gRNA-T2A, **C T6** – Cas9:MMK3-gRNA-T6. Hlavičky šipek ukazují na embrya. Měřítko 1 mm. AXIO Zoom.V16.



Obr. 16: Vytvářející se transformované rostliny *M. sativa*. **A T2A** – Cas9:MMK3-gRNA-T2A na MMS médiu, **B T2A** – Cas9:MMK3-gRNA-T2A na MS médiu, **C T6** – Cas9:MMK3-gRNA-T6 na MMS médiu, **D T6** – Cas9:MMK3-gRNA-T6 na MS médiu. Měřítko 1 mm. AXIO Zoom.V16.



Obr. 17: Průběh somatické embryogeneze u stabilně transformované *M. sativa* konstrukt *35S::MMK3:GFP*. **A** kalus se somatickými embryi na médiu B50 + TIC + PPT, **B** Embrya na médiu MMS TIC + PPT, **C** mladé rostliny na médiu MS, **D** rostlina v půdě. Hlavičky šipek ukazují na embrya. Měřítko 1 cm. Huawei P9 Lite.



Obr. 18: Somatická embryogeneze u stabilně transformované *M. sativa* konstrukt *35S::mRFP:MMK3*. **A, B** kalus s embryi na médiu B50 + TIC + KAN, **C, D** mladé rostliny na médiu MMS TIC + KAN. Hlavičky šipek ukazují na embrya. Měřítko A, B 1 mm, Zoomovací fluorescenční stereomikroskop AXIO Zoom. C, D 1 cm Huawei P9 Lite.

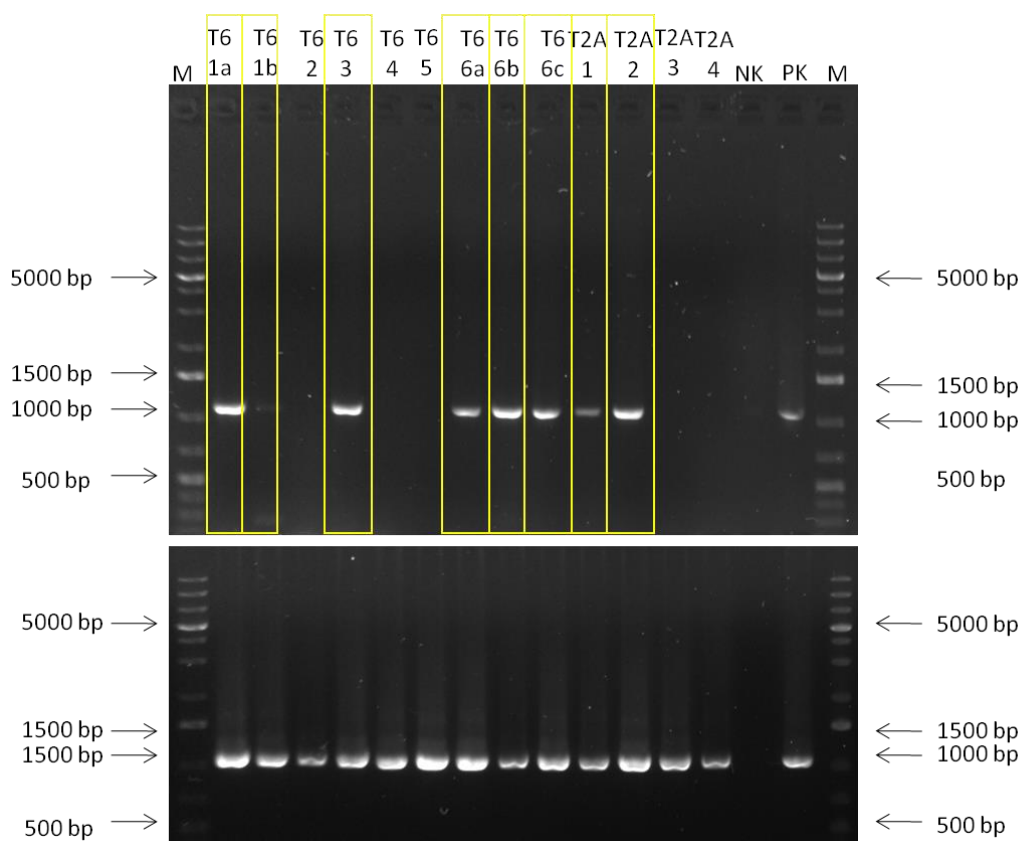
4.5 Ověření transformovaných rostlin pomocí genotypizace

Z transformovaných vypěstovaných rostlin *M. sativa* pomocí somatické embryogeneze byla vyzolována genomová DNA a použita jako templát pro PCR reakci. Pro každý konstrukt byly použité specifické primery (Tab. 4). Pro konstrukty, které mají za následek vyřazení MMK3 proteinu z činnosti, byly použity primery SS42 jako přední (forward) a SS43 jako zadní (reverse). U konstruktů, které mají za následek fluorescenční označení proteinu, byly použity primery 35 S jako přední (forward) a SS 129 jako zadní (reverse). Pro zjištění zda je ve vzorcích přítomná gDNA, byly využity primery speciální pro intron 3 z MMK3 genu a to I3 přední (forward I3F) a I3 zadní primer (reverse I3R).

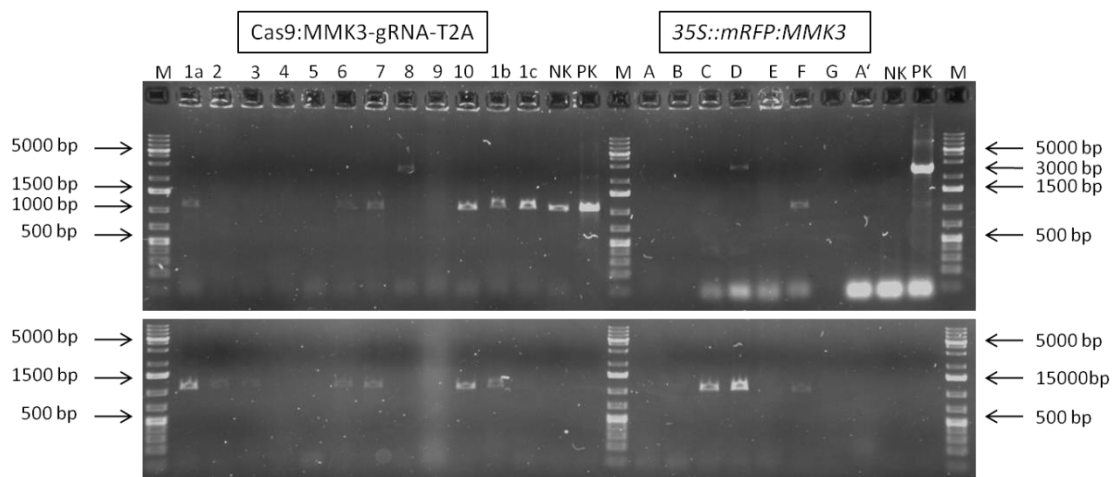
Po provedené PCR reakci byl výsledek amplifikace ověřen pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 19, 20, 21). Podle výsledků byly rostliny označeny jako T6 – 1a, 1b, 3, 6a, 6b, 6c a T2A – 1, 2 (Obr. 19) vybrány jako transgenní a nadále byly pěstovány, popřípadě podle jejich velikosti použity pro další experimenty. V případě genotypizace transformovaných rostlin *M. sativa* nesoucích konstrukt *35S::mRFP:MMK3*, a také *Cas9:MMK3-gRNA-T2A* (Obr. 20 a 21), nebyla jistě zjištěna žádná transgenní rostlina.

Předpokládáme, že vzniklé pásy na obrázku č. 20 u vzorků *Cas9:MMK3-gRNA-T2A* – 1a, 6, 7, 10, 1b jsou způsobeny kontaminací vzorků pravděpodobně pozitivní kontrolou (plazmid nesoucí konstrukt *Cas9:MMK3-gRNA-T2A*), jelikož se pás ukázal i u negativní kontroly (PCR H₂O). Je také možné, že DNA ze vzorků byla nesprávně vyzolována nebo byl špatně připraven master mix, a tudíž reakce PCR neproběhla správně. Avšak pro jisté zjištění, zda jsou rostliny potencionálně transgenní, byla PCR reakce provedena vícekrát. U vzorku *35S::mRFP:MMK3* – F na obrázku č. 20 je také možné, že došlo k podobným problémům jako v předešlém případě, ačkoliv se pás u negativní kontroly neukázal. Vzorek označený jako D byl vybrán jako potencionálně transgenní. Z obrázku č. 21 je patrné, že izolace DNA byla správná, až na rostliny označené jako 1a a 2a. Z výsledků nebyla určena žádná transgenní rostlina, až na rostliny označené jako 1a a 2a, pro které by bylo potřeba genotypizaci opakovat. V případě rostlin transformovaných bakteriemi nesoucí konstrukt *35S::mRFP:MMK3* byla vždy prováděna i fluorescenční mikroskopie. U žádné z těchto rostlin nebyl fluorescenční signál detekován, což nám potvrdilo, že rostliny nejsou transgenní nebo byl transgen umlčen.

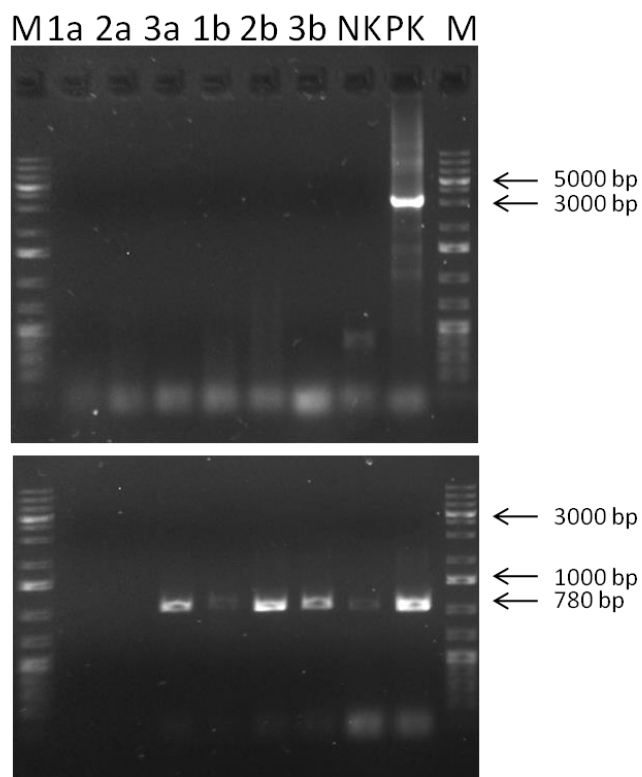
U stabilní transformace *M. sativa* neexistuje žádný pomocný protein, který by potlačoval post-transkripční modifikaci genů, jako je v případě transientní transformace *N. benthamiana* protein p19 (Voinnet *et al.*, 1999). Je tedy pravděpodobné, že došlo prostřednictvím RNA interference k umlčení genu (viz výše). Konkrétně mohlo dojít k transkripčnímu umlčení genu, kde je exprese genu blokována nebo posttranskripčnímu umlčení genu, kde dochází k degradaci mRNA (Sijen *et al.*, 2001). Pro lepší efektivitu stabilní transformace *M. sativa* by bylo možná lepší, použít kmen bakterií *A. tumefaciens* LBA4404, jevící se jako jeden z nejúčinnějších (Samac a Temple, 2004), namísto kmenu GV3101, který jsme použili.



Obr. 19: Elektroforéza v agarosovém gelu po genotypizaci transformovaných rostlin *M. sativa*. M – marker; T6 (1 – 6) – Cas9:MMK3-gRNA-T6; T2A (1 – 4) – Cas9:MMK3-gRNA-T2A; NK – negativní kontrola (PCR H₂O); PK – pozitivní kontrola (plazmid nesoucí daný konstrukt). Nahoře primery SS42/SS43 pro přítomnost MMK3 gRNA – T6 a T2A ve vzorku. Dole primery I3F/I3R pro přítomnost gDNA ve vzorku.



Obr. 20: Elektroforéza v agarosovém gelu po genotypizaci transformovaných rostlin *M. sativa*. M – marker; T2A (1 – 10) – Cas9:MMK3-gRNA-T2A; 14 (A – G) – 35S::mRFP:MMK3; NK – negativní kontrola (PCR H₂O); PK – pozitivní kontrola (plazmid nesoucí daný konstrukt). Nahoře primery SS42/SS43 pro přítomnost MMK3 gRNA – T2A ve vzorku, primery 35S/SS 129 pro přítomnost RFP–MMK3. Dole primery I3F/I3R pro přítomnost gDNA ve vzorku.



Obr. 21: Elektroforéza v agarosovém gelu po genotypizaci transformovaných rostlin *M. sativa*. M – marker; 14 (A – G) – 35S::mRFP:MMK3; NK – negativní kontrola (PCR H₂O); PK – pozitivní kontrola (plazmid nesoucí daný konstrukt). Nahoře primery 35S/SS 129 pro přítomnost RFP–MMK3. Dole primery I3F/I3R pro přítomnost gDNA ve vzorku.

4.6 Ověření transformovaných rostlin *M. sativa* pomocí Western blotu

Rostlina *M. sativa*, která byla prověřena metodou PCR genotypizace jako transgeniční a byla dostatečně velká tak, aby při odběru materiálu nedošlo k jejímu úhynu, byla podrobena Western blotové analýze. Proteiny byly separovány podle molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následně byly přeneseny na PVDF membránu. Pro zjištění stupně fosforylace MMK3 proteinu byla použita protilátka anti-pERK (Obr. 22 A). Pro detekci MMK3 proteinu byla použita protilátka anti-MMK3 (Obr. 23 A). Jako kontrola byla použita rostlina *M. sativa* RSY a mutant *A. thaliana mpk13*, jako kontrola k němu ekotyp Col-0. Pro velkou rostlinu *M. sativa* T62 pěstovanou *in vitro*, byly použity tři technické opakování – T62a, T62b a T62c (Obr. 22, 23, 24). Molekulová hmotnost MMK3 proteinu činí 44 kDa.

Z western blotové analýzy při použití anti-pERK protilátky byl detekován slabý pruh u vzorku T6a jakožto pMMK3 protein, avšak nebyl detekován u zbylých dvou opakování T6b a T6c ani u kontrolního vzorku *M. sativa* RSY (Obr. 22 A), z čehož vyplývá, že v těchto vzorcích nebyl tento protein fosforylován. Byl však fosforylován u mutantu *A. thaliana mpk13* a jeho kontroly Col-0, přičemž jsou u těchto vzorků detekovány pruhy v oblasti molekulové hmotnosti cca 44 kDa odpovídající proteinu MMK3/MPK13. U všech vzorků byl fosforylován protein SIMK o molekulové hmotnosti cca 46,6 kDa, přičemž nejintenzivnější fosforylace byla zaznamenána u vzorku T62b (Obr. 22 A). V případě použití anti-MMK3 protilátky (Obr. 23 A) byl u každého vzorku detekován protein o hmotnosti cca 44 kDa odpovídající proteinu MMK3/MPK13. U vzorků mutantu *A. thaliana mpk13* a jeho kontroly Col-0 byly detekovány dva neidentifikované proteiny o molekulových hmotnostech 34 kDa a 22 kDa, na které se protilátka nespecificky navázala (Obr. 23 A). Kontrola mutantu *A. thaliana mpk13* a Col-0 byly použity ve snaze validovat protilátku anti-MMK3, avšak u mutantu *mpk13* byl pozorován pruh stejně jako u Col-0. To však nemusí znamenat, že to není mutant, protože se jedná o AtMPK13 protein a protilátka byla navržena na MsMMK3. Je tedy možné, že v *M. sativa* je protilátka specifická na MMK3, čehož důkazem by mohl být vzorek T62b, kde značně protein MMK3 chybí, ale v *A. thaliana* může rozpoznávat jiný protein než ortolog MPK13. Úspěšnost přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu byla zkontrolována prostřednictvím barviva Ponceau S (Obr. 22 B, 23 B).

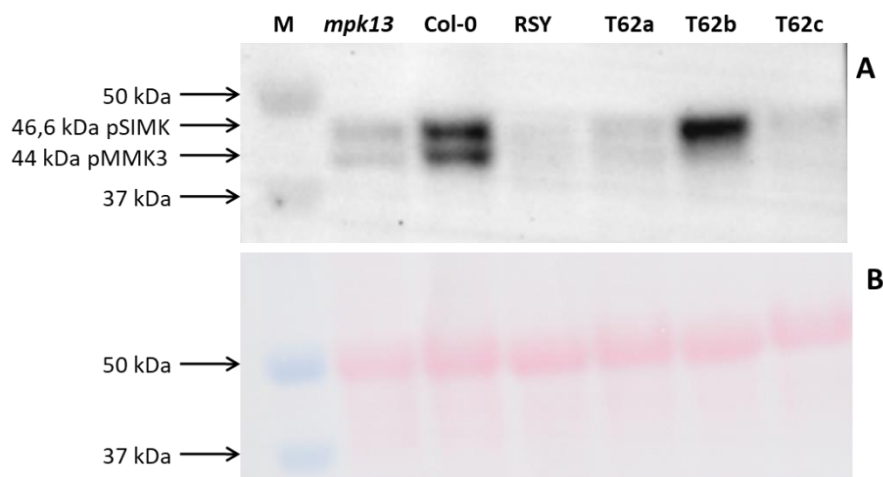
Normalizací proteinů z Western blotu byl vytvořen graf (Obr. 24). Byla pro to využita membrána, na které byly proteiny lokalizovány pomocí anti-MMK3 protilátky

(Obr. 23). Z grafu na obrázku 24 lze usoudit, že nejvyšší abundance proteinu MMK3 byla u vzorku T62a, která byla o 1,655-krát vyšší než u kontroly RSY. V ostatních dvou vzorcích byla v případě vzorku T62b abundance MMK3 proteinu 5,5-krát nižší než u kontroly RSY a u vzorku T62c přibližně 2,5-krát nižší než u kontroly RSY. Jelikož se jednalo o jedno technické opakování, nebyla vyhotovena statistika a nebylo tedy možné do grafu přidat směrodatné odchylky. Pro membránu, na které byly detekovány proteiny pomocí anti-pERK rotilátky, nebyl graf zhotoven. Vzorek RSY pocházel z jinak starých rostlin, než byly mutantní rostliny T62 (Obr. 22), což mohla být jedna z příčin, proč nebyly detekovány anti-pERK protilátkou. Další možností je, že byl špatně napipetován do jamky během přípravy na SDS-PAGE elektroforézu a tudíž se nepřenesl na membránu. Kvůli absenci vzorku RSY tedy nemohl být zhotoven graf, ve kterém by vzorky T62 byly adekvátně porovnány s kontrolou.

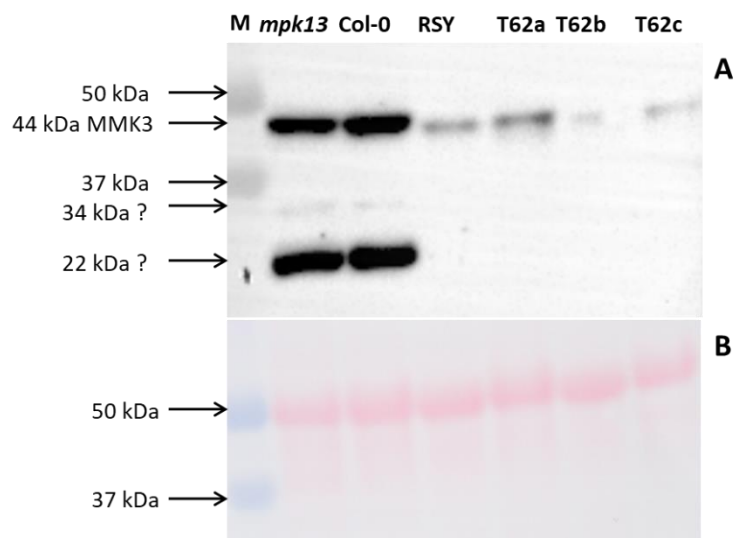
Z těchto výsledků vyplývá, že protilátka anti-MMK3 může být vůči proteinům AtMPK13 nespecifická, ale v případě MsMMK3 a vzorku T62b by mohlo jít o úspěšnou validaci protilátky. U vzorků rostliny *M. sativa* T62a, T62b a T62c se jedná o technické kontroly, kde odběr listů byl proveden z velké rostliny *in vitro* a vzhledem k tomu, že výsledky u každého vzorku byly odlišné (Obr. 22, 23, 24) je možné, že se jedná o chimérickou rostlinu. Při přenosu embryí na MMS média se stává, že jsou embrya mnohokrát neoddělené nebo zarostlé v kalusu. Tito jedinci by mohli být fatálně poškozeni při pokusu o oddělení, a tedy se přenášejí spolu. Mnoho z nich nedoroste do stádia rostliny schopné přenosu do půdy, ale někdy přežijí vícere a vznikne chimérická rostlina spojená na bázi. Z této potencionálně chimerické rostliny by bylo možné prostřednictvím somatické embryogeneze vypěstovat nové rostliny. Listy kultivované na médiu by byly vždy z jednoho stonku. Nově vypěstované rostliny by byly dále podrobeny PCR genotypizaci a Western blotové analýze. Z výsledků by bylo možné určit, které části původní rostliny jsou mutantní a které ne, a také bychom získali další mutanty, v případě, že se opravdu jedná o chimérickou rostlinu.

Jelikož protein SIMK je nejvíce fosforylován ve vzorku T62b (Obr. 22) a anti-MMK3 protilátkou byl detekován velmi slabě (Obr. 23), domníváme se, že SIMK protein je v rostlině tak moc fosforylován jako kompenzace za sníženou expresi MMK3 proteinu. Pro lepší zhodnocení těchto výsledků by byla potřeba experiment alespoň ještě dvakrát opakovat, a také dodělat složitější metody, které by vedly k lepší analýze, jako je například kvantitativní polymerázová řetězová reakce. Z důvodu světové pandemie

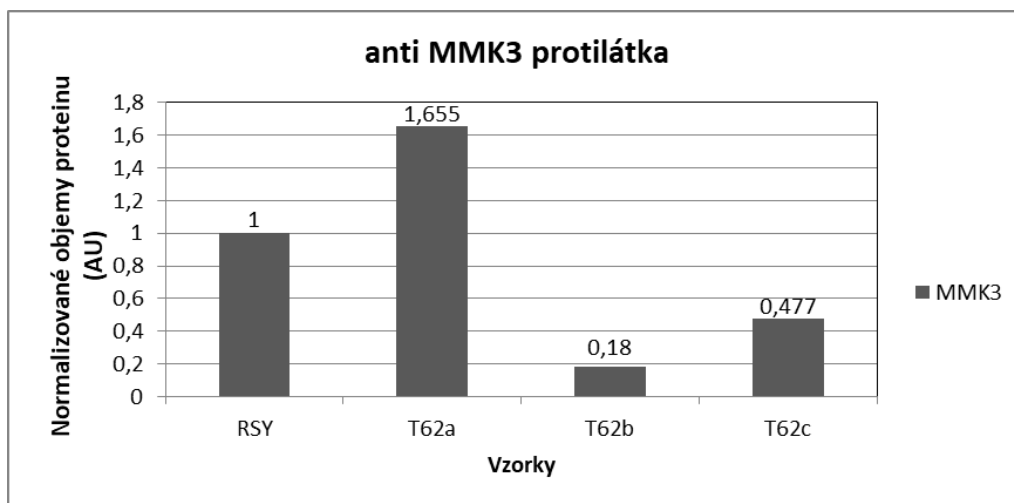
způsobené virem SARS-CoV-2 a následných karanténních opatření nebylo možné provést další experimenty.



Obr. 22: **A** Detekce proteinu MMK3 u stabilně transformovaných rostlin *M. sativa*. Přítomnost pMMK3 a pSIMK pruhů detekována pomocí protilátky anti-pERK, která značí pouze aktivované MAPKs. M – marker, T6 – Cas9:MMK3-gRNA-T6, RSY – *M. sativa* RSY, *Col-0* – *A. thaliana* *Col-0*, *mpk13* – mutant *A. thaliana*. **B** Kontrola přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu prostřednictvím barviva Ponceau S.



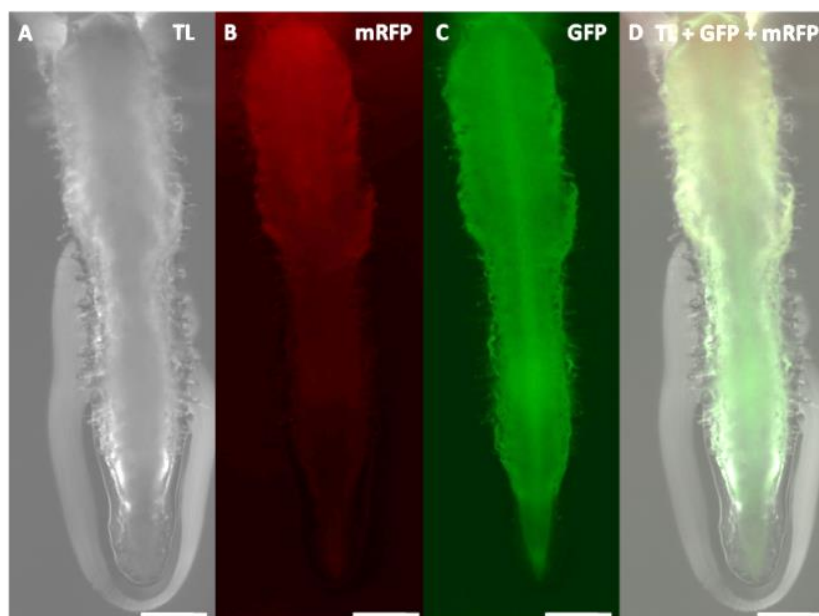
Obr. 23: **A** Detekce proteinu MMK3 u stabilně transformovaných rostlin *M. sativa*. Přítomnost MMK3 pruhů detekována pomocí anti-MMK3 protilátky. M – marker, T6 – Cas9:MMK3-gRNA-T6, RSY – *M. sativa* RSY, *Col-0* – *A. thaliana* *Col-0*, *mpk13* – mutant *A. thaliana*. **B** Kontrola přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu prostřednictvím barviva Ponceau S.



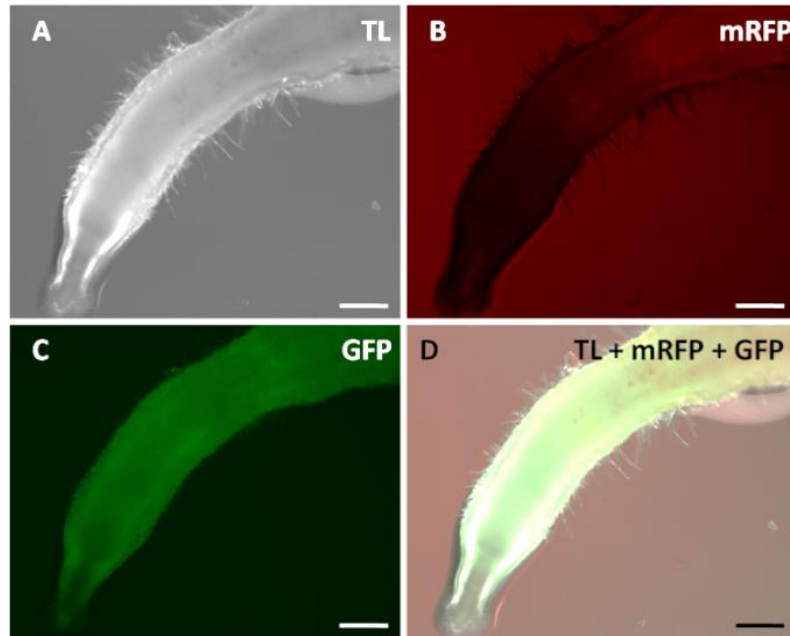
Obr. 24: Graf vyjadřující abudanci proteinu MMK3 z *M. sativa* po normalizaci vzhledem na Stain-Free gel. Detekce proteinů na PVDF membráně použitím anti-MMK3 protilátky. Vzorky transformované rostliny *M. sativa* T62a, T62b a T62c (technická opakování). Kontrola – kultivar RSY. MMK3 značící protein MMK3.

4.7 Mikroskopická analýza *M. sativa* MMK3-GFP

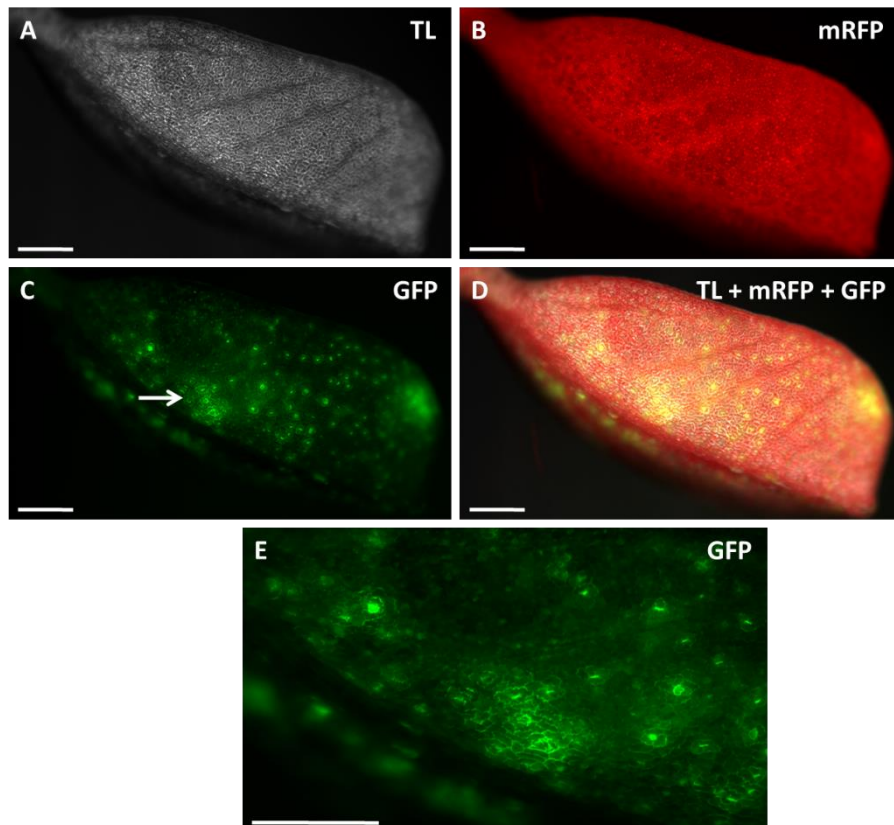
Přítomnost zeleného fluorescenčního proteinu fúzovaného s MMK3 proteinem v transformovaných rostlinách *M. sativa* byla zkoumaná pomocí zoomovacího fluorescenčního mikroskopu. Byly pozorovány kořeny rostlin (Obr. 25, 26) v Petriho miskách na MS médiu. Na obrázcích 25 C a 26 C je možné vidět kořeny rostlin v zeleném fluorescenčním kanálu, které se jeví jako exprimující protein MMK3-GFP. Avšak jakmile byl kořen odejmut z rostliny a pozorován na CLSM, nebyl pozorován žádný fluorescenční signál. Je tedy možné, že na obrázcích 25 C a 26 C se jedná pouze o autofluorescenci. Také byl zaznamenán signál v některých listových buňkách *M. sativa* (Obr. 27). Jelikož byl použit promotor 35 S, byla očekávána exprese proteinu MMK3-GFP ve všech buňkách v rostlině. U obrázku 27, kde jsou vidět listové buňky pravděpodobně exprimující protein MMK3-GFP, je otázné, jestli se jedná o autofluorescenci způsobenou trichomy. Na těchto rostlinách nebyly provedeny žádné další experimenty, které by potvrdily stabilně exprimovaný protein MMK3-GFP v rostlinách *M. sativa*, ačkoliv byla plánovaná jejich genotypizace. Avšak v souvislosti s karanténními opatřeními z důvodu pandemie způsobené virem SARS-CoV-2 nebyla již provedena.



Obr. 25: Lokalizace MMK3-GFP proteinu v kořenech *M. sativa*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** kontrola autofluorescence – mRFP, **C** MMK3 protein vizualizován pomocí fúze s GFP, **D** sloučené kanály. Měřítka 500 μ m. AXIO Zoom.V16.



Obr. 26: Lokalizace MMK3-GFP proteinu v kořenech *M. sativa*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** kontrola autofluorescence – mRFP, **C** MMK3 protein vizualizován pomocí fúze s GFP, **D** sloučené kanály. Měřítko 500 μ m. AXIO Zoom.V16.

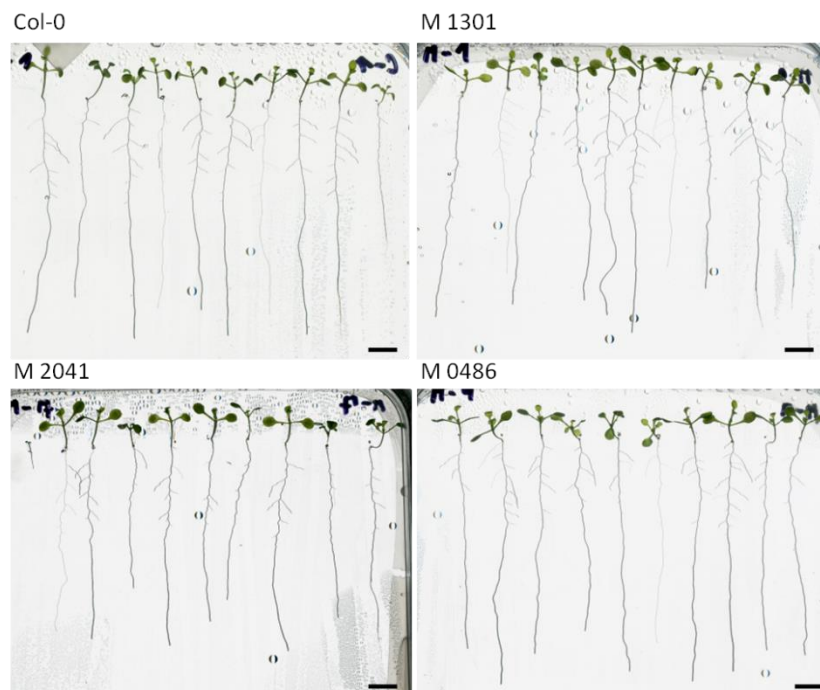


Obr. 27 Lokalizace MMK3-GFP proteinu v listech *M. sativa*. **A** procházející světlo (TL – transmitted light), **B** kontrola autofluorescence – mRFP, **C**, **E** MMK3 protein vizualizován pomocí fúze s GFP, **D** sloučené kanály. Šipka ukazuje na přiblíženou oblast v E. Měřítko 500 μ m. AXIO Zoom.V16.

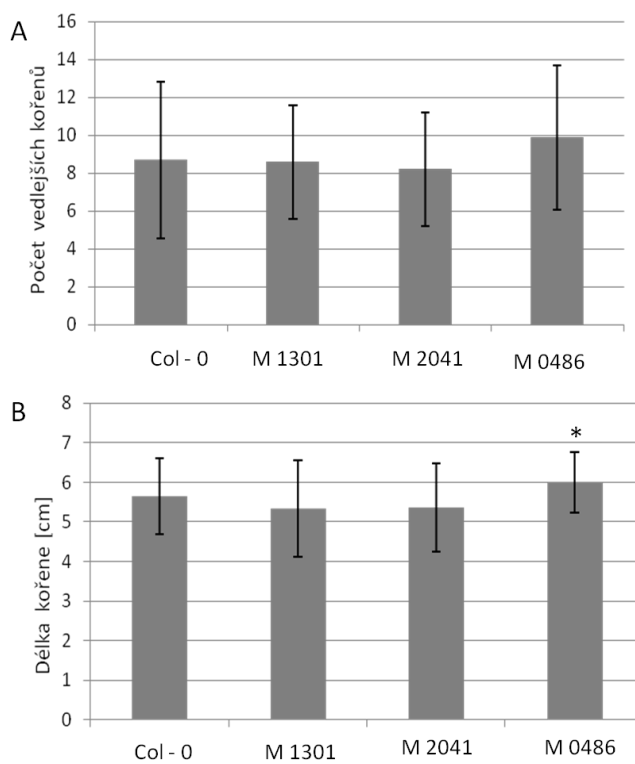
4.8 Fenotypová analýza mutantu *mpk13*

Byly analyzovány tři homozygotní linie mutantu *A. thaliana mpk13* SALK_1301, SALK_2041, SALK_0486. Fenotypová analýza byla zaměřena na podzemní část rostlin a to konkrétně na délku kořene a počet vedlejších kořenů. Pro studium byly použity semenáčky T2 generace a jako kontrola k nim byly použity semenáčky Col-0.

Semena *mpk13* mutantů *A. thaliana* byla vyseta na 1/2 MS médium na Petriho misky a následně byly misky se semeny po dvou, třech, šesti, osmi a devíti dnech skenovány. Poté se na obrázcích vzniklých skenováním provedla fenotypová analýza, přičemž byl vybrán osmý den po vyklíčení jako neoptimalnější pro analýzu. Nejprve byl vypočítán počet vedlejších kořenů a následně se z každé linie včetně té kontrolní vypočítal průměr. Poté byla změřena délka hlavních kořenů, a také byl vypočítán průměr, ze kterého byl vytvořen graf. Dále byl vypočítán F. test a T. test. Bylo předpokládáno, že počet vedlejších kořenů bude u mutantních linií nižší než u Col-0 (Zeng *et al.*, 2011), avšak množství vedlejších kořenů bylo porovnatelné u mutantních linií s Col-0 (Obr. 28, 29). Dále bylo zjišťováno, zda je rozdíl v délce hlavního kořene u mutantních linií v porovnání s Col-0. Ukázalo se, že v případě linie SALK_0486 je délka hlavního kořene větší než v případě semenáčků Col-0 (Obr. 28, 29). Tento rozdíl mohl být způsobený samotnou mutací SALK_486 nebo podmínkami dozrávání semen. Jelikož rostliny *A. thaliana* linie SALK_0486 T1 generace byly pěstovány o pár týdnů později než ostatní linie a Col-0, můžeme se domnívat, že v té době byly lehce změněny podmínky ve fytotronu pro růst rostlin, jakožto jiná teplota, doba světla, vlhkost vzduchu, popřípadě i přítomnost mikroorganismů v půdě a v okolním prostředí. Proto mohla semena T2 generace linie SALK_0486 mít dobu klíčení rychlejší než ostatní linie a Col-0, a to by mohlo vysvětlit delší hlavní kořen oproti Col-0 a dalším mutantům.



Obr. 28: Semenáčky *A. thaliana* 8 dní po vyklíčení na ½ MS médiu.



Obr. 29 Fenotypová analýza mutantů *mpk13* *A. thaliana* 8 dní po vyklíčení. **A** graf vyjadřující počet vedlejších kořenů, **B** graf vyjadřující délku hlavního kořene.

5 ZÁVĚR

V teoretické části se tato bakalářská práce zabývá mitogenem aktivovanými proteinovými kinasami v *Medicago sativa* a jejich ortology v *Arabidopsis thaliana* a dále jejich úlohou při odpovědi na stres. V teoretické části práce je dále popsána metoda somatické embryogeneze a metody stabilní a transientní transformace rostlin. Také je zmíněn princip RNA interference a CRISPR/Cas metody.

V experimentální části práce byla nejprve provedena transientní transformace *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty *35S::mRFP:MMK3* a *35S::MMK3:GFP*, ve kterých byl MMK3 protein značen červeným nebo zeleným fluorescenčním proteinem. Prostřednictvím somatické embryogeneze byla provedena stabilní transformace rostlin *M. sativa*. K transformaci byly využity bakterie *A. tumefaciens*, nesoucí konstrukty *35S::mRFP:MMK3* a *35S::MMK3:GFP*, předem ověřené u *N. benthamiana* a dále konstrukty Cas9:MMK3-gRNA-T1A, Cas9:MMK3-gRNA-T2A a Cas9:MMK3-gRNA-T6, pomocí kterých mělo dojít k vyřazení MMK3 proteinu z funkce. U rostlin, které se po transformaci regenerovaly a byly dostatečně velké byla provedena genotypová analýza pomocí PCR metody. Bylo potvrzeno pět T-DNA inzerčních mutantů z toho tři nesoucí Cas9:MMK3-gRNA-T6 a dvě Cas9:MMK3-gRNA-T2A. Pro Western blotovou analýzu byla jako vhodná vybraná pouze jedna rostlina Cas9:MMK3-gRNA-T6. Prostřednictvím Western blotové analýzy nebyla jednoznačně určena, jakožto inzerční mutant, ale jako potencionální mutant v podobě chimérické rostliny. Transformované rostliny, které měly obsahovat červeně případně zeleně značený MMK3 protein byly podrobeny mikroskopické analýze a v případě konstrukt *35S::mRFP:MMK3* byla provedena i genotypová analýza, avšak nebyla nalezena rostlina, která by značený MMK3 protein pomocí fluorescenčního proteinu nesla. Dále byla provedena fenotypová analýza homozygotních mutantních linií *A. thaliana mpk13* SALK_1301, SALK_2041, SALK_0486 z důvodu plánovaného využití mutantů pro testování funkčnosti konstruktů. Fenotypová analýza byla prováděna u druhé generace rostlin a byla zaměřena na počet vedlejších kořenů a délku hlavního kořene u semenáčků *A. thaliana*. U mutantních linií rostlin *A. thaliana* nebyly pozorovány významné rozdíly v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0. U žádné mutantní linie nebyl pozorován rozdíl v počtu vedlejších kořenů oproti kontrole. V případě délky hlavního kořene byly u mutantní linie SALK_0486 hlavní kořeny o trochu delší než u jiných mutantních linií a u kontroly.

6 REFERENCE

- Abeles F., Morgan P. and Saltveit M. (1992): *Ethylene in Plant Biology*. 1st ed., Academic Press, San Diego, CA, 414 stran.
- Aberham C., Weber S., Phares W. (1996): Spontaneous mutations in the human immunodeficiency virus type 1 *gag* gene that affect viral replication in the presence of cyclosporins. *Journal of Virology* **70**, 3536-3544.
- Agrawal N., Dasaradhi P. V. N., Mohammed A., Malhotra P. (2003): RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 657-685.
- Ahmed A. B. A., Rao A.S., Rao M.V., Taha R. M. (2011): Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllanthus nodiflora* (L.) Greene. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **54**, 7-13.
- Ali N., Datta S., Datta K. (2010): RNA interference in designing transgenic crops. *Genetically modified crops* **1**, 207-213.
- Amini M., Deljou A, Nabiabad H. S. (2016): Improvement of *in vitro* embryo maturation, plant led regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **22** (3), 321-330.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Atanassov A., Brown D. C. W. (1984): Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **3**, 149-162.
- Austin S., Bingham E. T., Mathews D. E., Shahan M. N., Will J., Burgess R. R. (1995): Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica* **85**, 381-393.
- Austin-Phillips, S., Koegel, R., Straub, R., and Cook, M. (Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wis.): *Animal feed compositions containing phytase derived from transgenic alfalfa and methods of use thereof*. U. S. Patent 5,900,525, 4. 5. 1999, 13 stran.
- Baluška F., Ovečka M., Hirt H. (2000): Salt stress induces changes in amounts and localization of the mitogen-activated protein kinase SIMK in alfalfa roots. *Protoplasma* **212**, 262-267.
- Blondon F., Marie D., Brown S., Kondorosi A. (1994): Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* **37**, 264-70.
- Bögge L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP Kinase Is Activated Late in Plant Mitosis and Becomes Localized to the Plane of Cell Division. *The Plant Cell* **11**, 101-113.
- Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998): A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* **111**, 3091-100.
- Calderini O., Glab N., Bergounioux C., Heberle-Bors E., Wilson C. (2001): A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6MAPkinase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18139-18145.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 36734-36740.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt, H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell* **14**, 703-711.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.

- Dasgupta R., Garcia II B. H., Goodman R. M. (2001): Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98** (9), 4910-4915.
- Datsenko K. A., Pougach K., Tikhonov A., Wanner B. L., Severinov K., Semenova E. (2012): Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature Communicaton* **3**, 945.
- Dhir R., Shekhawat G. S. (2014): *In Vitro* Propagation Using Transverse Thin Cell Layer Culture and Homogeneity Assessment in *Ceropegia bulbosa* Roxb. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**, 820-830.
- Dhir R., Shekhawat G. S., Alam A. (2014): Improved protocol for somatic embryogenesis and calcium alginate encapsulation in *Anethum graveolens* L.: a medicinal herb. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **173**, 2267-2278.
- Dijak M., Smith D. L., Wilson T. J., Brown D. C. W. (1986): Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell Reports* **5**, 468-470.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* **19**, 3266-3279.
- Dudits D., Györgyey J., Bögre L., Bakó L. (1995): Molecular biology of somatic embryogenesis. *In Vitro Embryogenesis in Plants*, 267-308.
- Dudits D., Bogre L., and Gyorgyey J. (1991): Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science* **99**, 475-484.
- Dudits D., Bogre L., Bako L., Dedeoglu D., Magyar Z., Kapros T., Felfoldi, F., Gyorgyey J. (1993): Key components of cell cycle control during auxin-induced cell division. In: *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle*. (Ormrod Je., Francis, D., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 111-131.
- Fagard M., Vaucheret H. (2000): (TRANS) GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **51**, 167-194.
- Fromm M., Taylor L. P., Walbot V. (1985): Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 5824-5828.
- Frye C. A., Tang D., Innes R. W. (2001): From the cover:negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 373-378.
- Gelvin S. B. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **51**, 223-256.
- Gelvin S. B. (2003): *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and molecular biology reviews* **67**, 16-37.
- Guan Y., Lu J., Xu J., McClure B., Zhang S. (2014): Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **165**, 528-533.
- Hamel L. P., Nicole M. C., Sritubtim S., Morency M. J., Ellis M., Ehltng J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashi Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A., Ellis B. E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* **11**, 192-198.
- Hannon G. (2002): RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Harada J. J., Belmonte J. F., Kwong R. W. (2010): Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic). *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Hayat S., Ahmad A. (2007): *Salicylic Acid - A Plant Hormone*. Springer, Berlin, 401 stran.
- He C., Fong S. H., Yang D., Wang G. L. (1999): BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanicalwounding in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 1064-1073.

- Hemmer W. (2002): Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/gmo_food.pdf
- Hirt H. (2000): MAP kinases in plant signal transduction. *Results and Problems in Cell Differentiation* **27**, 1-9.
- Höck J., Meister G. (2008): The Argonaute protein family. *Genome Biology* **9**, 210.
- Hoori F., Ehsanpour A. A., Mostajeran A. (2007): Comparison of somatic embryogenesis in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **10** (3), 481-485.
- Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
- Champion A., Picaud A., Henry Y. (2004): Reassessing the MAP3K and MAP4 K relationships. *Trends in Plant Science* **9**, 123-29.
- Chang C. (2003): Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed. *Trends in Plant Science* **8**, 365-368.
- Cheong Y. H., Kim C. Y. (2010): Functions of MAPK Cascade Pathways in Plant Defense Signaling. *The Plant Pathology Journal* **26** (2), 101-109.
- Cheong Y. H., Kim M. Ch. (2010): Functions of MAPK Cascade Pathways in Plant Defense Signaling. *The Plant Pathology Journal* **26**, 101-109.
- Cheong Y. H., Moon B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Kim M. C., Kim I. H., Park C. Y., Kim J. C., Park B. O., Koo S. C., Yoon H. W., Chung W. S., Lim C. O., Lee S. Y., Cho M. J. (2003): BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology* **132**, 1961-1972.
- Chilton M. D., Drummond M. H., Merio D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* **24**, 655-65.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 532-43.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ishino Y., Krupovic M., Forterre P. (2018): History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology* **7**, 200.
- Jagodzick P., Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M., Ludwikow A. (2018): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1387.
- Jakubauskas A., Giedriene J., Bujnicki J. M., Janulaitis A. (2007): Identification of a single HNH active site in type IIS restriction endonuclease Eco31I. *Journal of Molecular Biology* **370**, 157-169.
- James C. (2011): Global status of commercialized biotech/GM crops: brief 43, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications ISAAA, 1-16.
- Janssen B. J., Gardner R. C. (1990): Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology* **4**, 61-72.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N. Y.)* **337**, 816-821.
- Johnson L. D., Marquez-Ortiz J. J., Lamb J. F., Barnes D. K. (1998): Root Morphology of Alfalfa Plant Introduction and Cultivars. *Crop Science* **38**, 497-502.
- Jonak C., Kiegerl S., Hirt H., Lloyd C., Chan J. (1995): MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Molecular Genetics and Genomics* **248**, 686-694.

- Jonak C., Nakagami H., Hirt, H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* **136**, 3276-3283.
- Jonak C., Ökrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415-424.
- Joshee N., Biswas B. K., Yadav A. K. (2007): Somatic embryogenesis and plant development in *Centella asiatica* L. a highly prized medicinal plant of the tropics. *HortScience* **42**, 633-637.
- Karvelis T., Gasiunas G., Miksys A., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2013): crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biology* **10** (5), 841-851.
- Kechang L., Ping Z., Cash D. (2009): Biology and management of major alfalfa diseases and pests. In: *Alfalfa management guide for ningxia*. (Cash D., Yuegao H., Kechang L., Suqin W., Ping Z., Rong G. eds.), China Agricultural Press, China, 37-62
- Kępczyńska E., Zielińska S. (2011): Disturbance of ethylene biosynthesis and perception during somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. reduces embryos' ability to regenerate. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1969.
- Kieber J. J., Rothenburg M., Roman G., Feldmann K. A., Ecker J. R. (1993): CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan Ch., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklof S., Till S., Bogre 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**, 2247-2258.
- Klümper W., Qaim M. (2014): A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS One* **9** (11), e111629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111629>.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237-265.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**,2940-2945.
- Krochko J. E., Pramanik S. K., Bewley J. D. (1992): Contrasting storage protein synthesis and mRNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant Physiology* **99**, 46-53.
- Křenek P., Šamajová O., Luptovčíak I., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2015): Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances* **33**, 1024-1042.
- Kusaba M. (2004): RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 139-143.
- Lacroix B., Citovsky V. (2013): The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium* mediated genetic transformation. *The International Journal of Developmental Biology* **57**, 467-81.
- Lai F. M., McKersie B. D. (1993): Effect of nutrition on maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science* **91**, 87-95.
- Lai F., Senaratna T., McKersie B. D. (1992): Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* somatic embryos. *Plant Science* **87**, 69-77.
- Lewis T., Shapiro P., Ahn N. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research* **74**, 49-139.
- Lindbo J. A., Dougherty W. G. (1992): Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189** (2), 725-733.
- Liu X. M., Kim K. E., Kim K. C., Nguyen X. C., Han H. J., Jung M. S., Kim H. S., Kim S. H., Park H. C., Yun D. J., Chung W. S. (2010): Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* **71**, 614-8.

- Mahfouz M. M., Piatek A., Stewart C. N. (2014): Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 1006-1014.
- Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J. J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Wolf Y. I., Yakunin A. F., van der Oost J., Koonin E. V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 467-477.
- Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N. Y.)* **339**, 823-826.
- McKersei B. D., Chen Y., de Beus M., Bowley S. R., Bowler C., Inzé D., D'haluin K., Botterman J. (1993): Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **103**, 1155-1163.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley C. D., Koorneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282** (662), 679-682.
- Melikant B., Giuliani C., Halbmayer-Watzina S., Limmongkon A., Heberle-Bors E., Wilson C. (2004): The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Letters* **576**, 5-8.
- Mikolajczyk M., Awotunde O., Muszynska G., Klessig D., Dobrowolska G. (2000): Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**, 165-178.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 765-769.
- Monteiro M., Appezzato-da-Glória B., Valarini M. J., de Oliveira C. A., Vieira M. L. (2003): Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. *Scientia Agricola* **60**, 683-689.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the preprophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* **61**, 234-248.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *The Journal of biological chemistry* **279**, 26959-26966.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**, 339-346.
- Neill S., Desikan R., Hancock J. (2002): Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 388-395.
- Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001): The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes & Development* **15**, 352-363.
- Odell J. T., Nagy F., Chua N. H. (1985): Identification of DNA-Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus-35s Promoter. *Nature* **313**, 810-812.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* **22**, 1282-1288.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Šamajová V., Luptovčíak I., Samajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65** (9), 2335-50.

- Palíková M., Krejčí R., Hilscherová K., Babica P., Navrátil S., Kopp R., Bláha L. (2007): Effect of different cyano bacteria l biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* **81**, 312-318.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Pierik R. L. M. (1997): *In Vitro Culture of Higher Plants*. 1st ed., Springer, New York City, NY, USA, 328 stran.
- Pitzschke A., Hirt H. (2010): Newinsights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J* **29**, 1021-1032.
- Raghavan V. (1986): Experimental Embryogenesis in Angiosperms. A Developmental and Experimental Study. In: *Developmental and Cell Biology series*. Cambridge University Press, Cambridge **17**, 115-151.
- Randuška D., Šomšák L., Háberová I. (1986): Barevný atlas rostlin. 3. vydání (2. české opravené vydání). Obzor: Bratislava. ISBN 65-010-86, 640 stran.
- Reinert J. (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebekulturen aus carotten. *Naturwissenschaft* **45**, 344-345.
- Ren D., Yang H., Zhang S. (2002): Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 559-565.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-49.
- Rose R. J. (2004): Somatic embryogenesis in plants. *Encyclopedia of plant and crop science*. (Goodman R. M., ed.), New York: Marcel Dekker Inc., 1165-1168.
- Rose R. J., Mantiri F. R., Kurdyukov S., Chen S. K., Wang X. D., Nolan K. E., Sheahan M. B. (2010): Developmental Biology of Somatic Embryogenesis. In: *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*. Springer, Berlin, Germany, 3-26.
- Rose R. J., Nolan K. E. (1995): Regeneration of *Medicago truncatula* from protoplasts isolated from kanamycin-sensitive and kanamycin-resistant plants. *Plant Cell Reports* **14**, 349-353.
- Samac D. A. (1995): Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **43**, 271-277.
- Samac D. A. and Temple S. J. (2004): Development and utilization of transformation in *Medicago* species. In: *Genetically Modified Crops: Their Development, Uses, and Risks* (Liang, G. H. and Skinner, D. Z., eds.), Haworth Press, New York, 165-202.
- Samac D. A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agrobacterium Protocols*. (Wang K.), Humana Press, Totowa, NJ, USA, 301-312.
- Sharma S. K., Millam S. (2004): Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Reports* **23**, 115-119.
- Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E. (2001): Microarray analysis of diurnal and circadian-regulates genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 113-123.
- Schoenbeck M. A., Samac D. A., Fedorova M., Gregerson R. G., Gantt J. S., Vance C. P. (1999): The Alfalfa (*Medicago sativa*) TDY1 Gene Encodes a Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 882-893.
- Schroeder H. E., Khan M. R. I., Knibb W. R., Spencer D., Higgs T. J. V. (1991): Expression of a chicken ovalbumin gene en three lucerne cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**, 495-505.
- Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J. N., Kooter J. M. (2001): Transcription and postranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* **11** (6), 436-440.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Steward F. C., Mapes M. O., Mears K. (1958): Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany* **45**, 705-708.

- Šamaj J., Baluška F., Hirt H. (2004): From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany* **55** (395), 189-198.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluska F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J* **21**, 3296-3306.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 805-818.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* **15**, 141-52.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 392-400.
- Tesfay M., Temple S. J., Allan D. L., Vance C. P., Samac D. A. (2001): Over-expression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiology* **127**, 1836-1844.
- Tohidfar M., Zare N., Jouzani G. S., Eftekhari S. M. (2013): *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic *cry3a* gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **113**, 227-235.
- Tzifira T., Citovsky V. (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 147-154.
- Vahdati K., Bayat S., Ebrahimzadeh H., Jariteh M., Mirmasoumi M. (2008): Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **93**, 163-171.
- Voignet O., Pinto Y. M. and Baulcombe D. C. (1999): Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 14147-14152.
- Voignet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. (2003): An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* **33**, 949-956.
- von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Daychok J., Filonova L. (2002): Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**, 233-249.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 63-73.
- Wang Z., Su G., Li M., Ke Q., Kim S. Y., Li H., Huang J., Xu B., Deng X. P., Kwak S. S. (2016): Over expressing *Arabidopsis* ABF3 increases tolerance to multiple abiotic stresses and reduces leaf size in alfalfa. *Plant Physiology and Biochemistry* **109**, 199-208.
- Westra E. R., Semenova E., Datsenko K. A., Jackson R. N., Wiedenheft B., Severinov K., Brouns S. J. (2013): Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLOS Genetics* **9** (9):e1003742 <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003742>.
- Williams E. G., Maheswaran G. (1986): Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* **57**, 443-462.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011): Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology* **32**, 667-685.
- Yang K. Y., Liu Y., Zhan S. (2001): Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 741-746.

- Yang X., Zhang X. (2010): Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**, 36-57.
- Yang Y., Li R., Qi M. (2000): *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant Journal* **22**, 543-551.
- Yin Y., Chory J., Baulcombe D. (2005): RNAi in transgenic plants. *Current Protocols in Molecular Biology* **26**, 1-19.
- Zeng Q., Sritubtim S. and Ellis B. E. (2011): AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 1436-1439.
- Zhang H., Huang Q., Su J. (2010): Development of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Regeneration System and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Agricultural Sciences in China* **9** (2), 17-178.
- Zhang S., Klessig D. F. (1998): Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7433-7438
- Zhang S., Klessig D. F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520-527.
- Zhang Y. (2013): RNA-induced Silencing Complex (RISC). *Encyclopedia of Systems Biology*. (W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. H. Cho, H. Yokota eds.), Springer, NY, USA, 1876-1876.
- Zimmerman J. L. (1993): Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell* **5**, 1411-1423.
- Zupan J. R., Zambryski P. (1995): Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* **107**, 1041-1047.
- Zupan J., Muth T. R., Draper O., Zambryski P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal* **23**, 11-28.
- Zwerger K., Hirt H. (2001): Recent advances in plant MAP kinase signaling. *Biological Chemistry* **382**, 1123-1131.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACC 1	aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
BWMK1	ničením a poraněním indukovaná kinasa 1
Cas9	nukleasa 9 asociovaná s CRISPR
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
Col-0	ekotyp Columbia <i>A. thaliana</i>
CRISPR	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice
crRNA	CRISPR RNA
CTR 1	MAP3 kinasa
dH ₂ O	destilovaná voda
dNTPs	deoxynukleotidy
dsRNA	dvouřetězcová RNA
EDR1	kinasa pro zvýšenou rezistenci na nemoce 1
FLG 22	flagellin 22
GFP	zelený fluorescenční protein
HRP	křenová peroxidáza
LB médium	lysogen broth médium
MAP4K	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa kinasa
MAPK	mitogenem-aktivovaná protein kinasa
MAPKK, MAP2K, MKK	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa
MAPKKK, MAP3K, MEKK	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MEKK 1, 2	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa 1,2
miRNA	microRNA
MKK1 – 10	mitogenem aktivované proteinové kinasy kinasy 1 – 10
MMK2, MMK3	<i>Medicago</i> MAP kinasa 2, 3
MPK3, MKP4, MPK6, MPK13	mitogen-aktivovaná protein kinasa 3, 4, 6, 13
MPK7, MPK8, MPK9, MPK 15	mitogen-aktivovaná protein kinasa 7, 8, 9, 15
mRNA	mediátorová RNA
MS médium	Murashige & Skoog médium

NPK1	protein kinasa 1 asociovaná s jádrem a fragmoplastem
OMTK1	oxidativním stresem aktivovaná MAP3K 1
PM	cytoplasmatická membrána
PPT	fosfinotricin
PRKK	patogenem indukovaná proteinová kinasa kinasa
PVDF	polyvinylidendifluorid
RFP	červený fluorescenční protein
RISC	multiproteinový RNA komplex
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku
RSY	kultivar Regen SY
SALK	Institut biologických studií
SAMK	stresem aktivovaná MAPK
SE	somatická embryogeneze
SIMK	stresem indukovaná MAPK
SIMKK	solným stresem MAPKK
SIPK	protein kinasa indukovaná kyselinou salicylovou
SIPKK	protein kinasa kinasa indukovaná kyselinou salicylovou
siRNA	malá interferující RNA
T-DNA	inzerční DNA na Ti-plasmidu
TDY	aktivační aminokyselinový motiv MAPK genu
TEY	aktivační aminokyselinový motiv MAPK genu
Ti plasmid	tumor indukující plasmid <i>A. tumefaciens</i>
TL	procházející světlo
tracrRNA	transaktivační crRNA
Vir geny	geny podílející se na virulenci u transformace pomocí <i>A. tumefaciens</i>
WIPK	proteinová kinasa indukovaná poraněním
WRKY 22, 29	transkripční faktor 22, 29
YFP	žlutý fluorescenční protein